



**CLÁUDIA ALVES DE ALMEIDA**

**DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE  
ESPÉCIES DE *Colletotrichum* ASSOCIADAS A  
*Annona* spp.**

**LAVRAS – MG**

**2015**

**CLÁUDIA ALVES DE ALMEIDA**

**DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE  
*Colletotrichum* ASSOCIADAS A *Annona* spp.**

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

Orientador

Dr. Ludwig H. Pfenning

**LAVRAS - MG**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pela própria autora.

Almeida, Cláudia Alves de.

Diversidade e caracterização de espécies de *Colletotrichum*  
associadas a *Annona* spp / Cláudia Alves de Almeida. – Lavras :  
UFLA, 2015.

75 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de  
Lavras, 2015.

Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning.

Bibliografia.

1. Annonaceae. 2. Antracnose. 3. Filogenia molecular. 4.  
Doença de planta. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**CLÁUDIA ALVES DE ALMEIDA**

**DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE  
*Colletotrichum* ASSOCIADAS A *Annona* spp.**

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

APROVADA em 16 de julho de 2015.

Dra. Elaine Aparecida de Souza      UFLA

Dr. Jorge Teodoro de Souza      UFLA

Dra. Tatiana T. M. S. Rodrigues      IFNMG-Câmpus Januária

Dr. Ludwig H. Pfenning  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2015**

A Deus, por toda a proteção, saúde, consolo nas horas difíceis e por preencher minha vida de paz, esperança e amor.

A meus amados pais José Maria e Maria, pelo amor, força, orações e incentivo aos estudos.

A Flávio, meu irmão, pelo carinho e companheirismo.

Ao meu namorado Sérgio, pelo amor, força, paciência e compreensão.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço ao professor Ludwig H. Pfenning, pela orientação, disponibilidade e amizade.

Agradeço também à primeira professora de Fitopatologia, Tatiana Tozzi Martins Souza Rodrigues, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais – Câmpus Januária (IFNMG), por ter me proporcionado oportunidades de pesquisa e me iniciado no meio acadêmico.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-graduação de Fitopatologia, que compartilharam seus conhecimentos e não mediram esforços para nos ensinar.

Agradeço ao colega Mateus J. Comé, Dra. Sarah C. Guimarães e a Dra. Tatiana T. M. S. Rodrigues, pelo apoio no desenvolvimento prático e teórico deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora: Dra. Elaine Aparecida de Souza, Dr. Jorge Teodoro de Souza e a Dra. Tatiana T. M. S. Rodrigues, por contribuírem na avaliação e correção desta dissertação.

Agradeço a todos do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, técnico, colegas e amigos, pela convivência diária, companheirismo e aprendizado.

À equipe do Laboratório de Fitopatologia do IFNMG, em especial ao Allieksiei C. Perim e a Prof. Tatiana T. M. S. Rodrigues, que me ajudaram na condução dos testes de patogenicidade.

À minha família por todo incentivo, amor e carinho ao longo da minha interminável jornada. Sem vocês, esta conquista não teria sido alcançada.

Ao meu namorado Sérgio pelo amor, dedicação, compreensão, amizade e apoio. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

Aos amigos queridos, de casa, de turma, de UFLA, de Lavras, que, de uma forma ou de outra, contribuíram para alegrar meu dia a dia, sempre dedicados e companheiros, me estimulando a completar a trajetória, agradeço e homenageio a todos.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

## RESUMO

A antracnose, causada por espécies de *Colletotrichum*, ocorre em várias frutíferas de clima tropical e temperado. No Brasil é a principal doença das anonáceas. Neste estudo foi avaliada a diversidade de espécies de *Colletotrichum* em associação com espécies de *Annona* por meio de análise filogenética multigênica, avaliação de caracteres morfológicos e da cultura e teste de patogenicidade. 84 isolados foram obtidos de frutos, flores e folhas apresentando antracnose, e de frutos mumificados de espécies comerciais e nativas coletados em plantios comerciais e em pomares domésticos. Sequências parciais do gene GAPDH de 31 isolados de *Colletotrichum* foram analisadas pelo método de Máxima Parcimônia (MP). Baseados nos agrupamentos gerados e na origem geográfica foi selecionado um subgrupo de quatorze isolados para serem analisadas as sequências parciais dos genes ACT e TUB2, bem como para a análise combinada das três regiões gênicas realizada pelo método de Inferência Bayesiana e MP. Os mesmos quatorze isolados também foram caracterizados com base na morfologia dos conídios e apressórios, taxa de crescimento micelial (TCM), cor da colônia e utilizados em testes de patogenicidade em mudas de pinha. Foram identificadas cinco espécies: *C. fructicola*, *C. theobromicola*, *C. gloeosporioides stricto sensu* no complexo ‘gloeosporioides’; *C. nymphaeae* no complexo ‘acutatum’; e *C. karstii* no complexo ‘boninense’. Outros cinco isolados não foram filogeneticamente resolvidos. Este é o primeiro relato de *C. fructicola*, *C. nymphaeae* e *C. karstii* em anonáceas no Brasil. Os caracteres morfológicos não foram informativos o suficiente para separação de complexos e de espécies. Todos os quatorze isolados de *Colletotrichum* avaliados foram patogênicos a *Annona squamosa*, causando sintomas típicos de antracnose nas folhas. A correta identificação dessas espécies será útil em estudos epidemiológicos e em programas de melhoramento, contribuindo desta forma no manejo correto e eficiente da doença, minimizando as perdas provocadas pelo patógeno na pré e pós-colheita.

Palavras-chave: Annonaceae. Antracnose. Filogenia molecular. Doença de planta.



## ABSTRACT

Anthracnose, caused by *Colletotrichum* species, occurs in various fruit of tropical and temperate. In Brazil is the main disease of Annonaceae. We evaluated the diversity of species of *Colletotrichum* in association with species of *Annona* through multigene phylogenetic analysis, evaluation of morphological characters and culture and pathogenicity test. 84 isolates were obtained from fruits, flowers and leaves showing anthracnose, and mummified fruits of commercial and native species collected in commercial plantations and orchards. Partial sequences of the GAPDH gene of 31 isolates of *Colletotrichum* were analyzed by the Maximum Parsimony method (MP). Based on the generated clusters and geographical origin was selected a subset of fourteen isolates are analyzed for the partial sequences of ACT and TUB2 genes as well as for the combined analysis of the three gene regions performed by Bayesian inference method and MP. The same fourteen isolates were also characterized based on morphology of conidia and appressoria, mycelial growth rate (TCM), colony color and used in pathogenicity tests in sweetsop seedlings. Five species were identified: *C. fructicola*, *C. theobromicola*, *C. gloeosporioides* stricto sensu in the complex 'gloeosporioides'; *C. nymphaeae* in the complex 'acutatum'; and *C. karstii* in the complex 'boninense'. Other five isolates couldn't be resolved phylogenetically. This is the first report of *C. fructicola*, *C. nymphaeae* and *C. karstii* in Annonaceae in Brazil. The morphological characters were not informative enough for separating complex and species. All fourteen *Colletotrichum* evaluated were pathogenic to *Annona squamosa*, causing typical symptoms of anthracnose on the leaves. The correct identification of these species will be useful in epidemiological studies and in breeding programs, thus contributing to the correct and efficient management of the disease, minimizing the losses caused by the pathogen in the pre and post-harvest.

Keywords: Annonaceae. Anthracnose. Molecular phylogeny. Plant disease.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Obtenção dos isolados e preservação.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2</b>	<b>Seleção dos isolados para a caracterização molecular, morfológica e patogênica.....</b>	<b>30</b>
<b>3.3</b>	<b>Extração de DNA, amplificação de fragmentos e sequenciamento.....</b>	<b>30</b>
<b>3.4</b>	<b>Análises filogenéticas.....</b>	<b>32</b>
<b>3.5</b>	<b>Caracterização morfológica e características da cultura....</b>	<b>39</b>
<b>3.6</b>	<b>Testes de patogenicidade em mudas de pinha.....</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>Isolados obtidos.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2</b>	<b>Análises filogenéticas.....</b>	<b>42</b>
<b>4.3</b>	<b>Avaliação de marcadores morfológicos e características da cultura.....</b>	<b>50</b>
<b>4.4</b>	<b>Testes de Patogenicidade.....</b>	<b>58</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Annona* é considerado o mais importante da família Annonaceae, por constituir espécies frutíferas de importância econômica a nível mundial. A pinha (*Annona squamosa*), graviola (*Annona muricata*), cherimóia (*Annona cherimola*) e a atemóia (*Annona squamosa* x *Annona cherimola*) são as que se destacam por apresentarem potencial para consumo *in natura* e na forma processada. O interesse neste grupo de plantas é ainda maior quando se leva em consideração que compostos secundários encontrados em várias anonáceas possuem atividade pesticida e antitumoral (São José et al., 2014; Lemos, 2014).

Um dos grandes problemas fitossanitários que vem causando perdas nestas culturas está sendo associados à antracnose. Esta doença é considerada a mais importante na pinha, graviola e atemóia no Brasil por causar danos em pré e pós colheita, inviabilizando a comercialização e o consumo. Os sintomas são observados em folhas, ramos, flores e frutos, tanto na sua fase inicial de desenvolvimento quanto em estágio mais avançado. Nas folhas são observadas manchas de cor preta de contorno irregular com centro esbranquiçado, podendo ocorrer o seu coalescimento e queda posterior. Em flores é observado o escurecimento das pétalas levando ao seu aborto. Nos frutos jovens a superfície fica escura e culmina com a mumificação e em frutos perto do amadurecimento causa podridão escura de rápida evolução (Junqueira & Junqueira, 2014).

No Brasil, até o momento, a espécie *Colletotrichum gloeosporioides* é considerada o principal agente causal da antracnose em anonáceas (Takahashi, 2009; Junqueira & Junqueira, 2014), entretanto, a definição da espécie foi baseada apenas em caracteres morfológicos e teste de patogenicidade. De acordo com o conhecimento atual, não é possível diferenciar espécies do gênero *Colletotrichum* apenas com base em tais caracteres (Cannon et al., 2012).

No estado de Alagoas e de São Paulo outras espécies de *Colletotrichum* foram recentemente descritas associadas à antracnose da pinha, da graviola e da atemóia por meio da análise de dados morfológicos e moleculares. Através da morfometria de conídios e apressórios, e por meio do sequenciamento da região ITS, quatro espécies de *Colletotrichum* foram relatadas associadas à pinha e a graviola em Alagoas, sendo elas, *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. theobromicola* e *C. magna* (Kamei et al., 2014). No estado de São Paulo, as espécies *C. acutatum* e *C. boninense* foram encontradas em associação à atemóia por meio da análise filogenética de dados baseados nas regiões  $\beta$ -tubulina,  $\alpha$ -elongase e ITS-5.8S rDNA do DNA (Firmino et al., 2014).

Embora a espécie *C. gloeosporioides* seja considerada o principal agente causal da doença no país, a associação de mais de uma espécie deste patógeno causando antracnose em um mesmo hospedeiro parece ser comum, a exemplo do que ocorre com a antracnose da graviola na Colômbia, que pode ser causada pelas espécies *C. theobromicola*, *C. tropicale*, *C. siamense*, *C. karstii* e *C. gloeosporioides stricto sensu*.

A análise de seqüências de ácidos nucléicos tem sido considerada a técnica mais confiável para a classificação de espécies do gênero *Colletotrichum*. Embora a análise filogenética baseada em seqüências da região ITS do rDNA tenha sido considerada uma abordagem útil na determinação de espécies do gênero, em algumas situações o sequenciamento de outras regiões genômicas é requerido, especialmente quando se trata de *C. gloeosporioides* (Weir et al., 2012). Recentemente, várias outras regiões do genoma de fungos do gênero *Colletotrichum* têm sido analisadas em conjunto com o ITS gerando dados altamente confiáveis através de clados bem suportados na análise filogenética, entre as quais a  $\beta$ -tubulina, Calmodulina, Glutamina sintetase, Actina e Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (Prihastuti et al., 2009).

Devido ao fato de duas ou mais espécies de *Colletotrichum* parasitando um mesmo hospedeiro poder dificultar o controle da antracnose,

tornando-a uma doença ainda mais importante, fato que se deve em função ao comportamento diferenciado entre espécies, como já verificado para a antracnose do pimentão no Brasil, a identificação correta das espécies de *Colletotrichum* ocorrendo nestas hospedeiras de importância econômica é de grande valia para o conhecimento da variabilidade da população do patógeno. Além disso, como existem espécies de anonáceas nativas de regiões semiáridas no Brasil, sendo possível que estas sejam um reservatório de espécies de *Colletotrichum* que ocorrem em plantas cultivadas, a identificação do fungo pertencente a este gênero nestas hospedeiras também é importante. Essas informações são fundamentais para o desenvolvimento ou recomendação de medidas adequadas de manejo da doença, seja ela baseada em métodos culturais, genéticos ou químicos.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar isolados de *Colletotrichum* por meio da morfologia, filogenia e de teste de patogenicidade, associados às diferentes espécies do gênero *Annona*, exploradas comercialmente e nativas, oriundos de pomares comerciais e não comerciais de regiões produtoras do Brasil. Este estudo permitirá conhecer a diversidade da população do patógeno associada a estas hospedeiras, oferecendo informações claras para o manejo da doença e, conseqüentemente, permitindo melhor orientação em programas de melhoramento genético.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

A família Annonaceae compõe um grupo de plantas que se destaca em várias partes do mundo, principalmente por produzirem frutos de grande interesse comercial. A cherimóia (*Annona cherimola*), a pinha (*A. squamosa*), a atemóia (híbrido *A. squamosa* x *A. cherimola*), e a graviola (*A. muricata*) são os mais destacados membros desta família. No Brasil, o interesse pelo seu cultivo se deve ao alto preço do fruto *in natura* e da polpa alcançados nos mercados interno e externo como o europeu e americano (Sobrinho, 2010).

Economicamente, as anonáceas são importantes para muitos países da África, Ásia, e também da América Central, do Norte e do Sul. Os principais países produtores de cherimóia são Austrália, Chile, Espanha, Estados Unidos, Nova Zelândia e Israel, de graviola o México, Brasil, Venezuela e Costa Rica e de pinha o Brasil, Índia, Tailândia, Filipinas e Cuba (São José et al., 2014).

Dentre as espécies de importância comercial a cherimóia tem sido pouco cultivada no Brasil devido às condições de clima e altitude que são desfavoráveis ao desenvolvimento da espécie, a qual é exigente em temperaturas baixas. A pinha, atemóia e graviola são produzidas em diversas regiões do país suprindo à demanda dos mercados de frutas frescas e processadas. Algumas outras espécies e híbridos de anonáceas apresentam bom potencial para os dois mercados, mas carecem de maior divulgação e pesquisas que selecionem tipos superiores e técnicas de produção compatíveis com sua exploração comercial como as espécies *Annona reticulata*, *A. diversifolia*, *A. crassiflora*, *A. salzmanii* e *Rolinia mucosa* (Lemos, 2014).

No Brasil, a região Nordeste, em especial a Bahia, é o estado que mais produz anonáceas, sendo o maior produtor de pinha e graviola. No Sudeste, Minas Gerais e São Paulo, concentram a produção de pinha, atemóia e cherimóia. No estado de Minas, a região Norte destaca-se como pólo fruticultor com pomares localizados nas áreas dos projetos irrigados de Jaíba, Janaúba e nos municípios de Nova Porteirinha, Pirapora e Matias Cardoso (Sobrinho, 2010).

A antracnose ou podridão-negra-dos-frutos é a doença mais importante das anonáceas. As perdas provocadas pela doença, em períodos de chuvas prolongadas durante a floração e formação dos frutos, podem chegar a 70% e incide preferencialmente nos tecidos jovens de folhas, ramos, flores e frutos. Nas folhas os sintomas são caracterizados por manchas de cor preta de contorno irregular, esbranquiçadas no centro e que se desenvolvem provocando sua deformação e queda. Nas flores aparecem manchas escuras nas pétalas e aborto do órgão. Os frutos podem ser infectados em qualquer estágio do desenvolvimento. Em frutos jovens a superfície fica escura e culmina com a mumificação e em frutos perto do amadurecimento causa podridão escura de rápida evolução inutilizando-o para o consumo ou comercialização (Junqueira & Junqueira, 2014).

Na literatura brasileira a espécie *C. gloeosporioides* é descrita como sendo a principal responsável pela antracnose em pinha, graviola, atemóia e cherimóia (Junqueira & Junqueira, 2014). Entretanto, a atribuição da doença ao agente causal, baseou-se apenas em características morfológicas e patogênicas.

Uma das características do ciclo de vida de *C. gloeosporioides* em outras espécies frutíferas é apresentar infecções quiescentes e desenvolvimento apenas após o amadurecimento dos frutos (Freeman et al., 1998). No gênero *Annona*, o comportamento do patógeno é distinto, pois este apresenta lesões em frutos verdes em qualquer estágio do desenvolvimento. Em frutos jovens a superfície fica escura e culmina com a mumificação e em frutos perto do amadurecimento causa podridão escura de rápida evolução, nos quais podem ser observada esporulação do patógeno significando que não há período de quiescência característico (Morales & Manica, 1998).

Recentemente, outras espécies de *Colletotrichum* têm sido descritas nesses hospedeiros por meio de estudos que associam características morfológicas à filogenia molecular. As espécies *C. acutatum* e *C. boninense* foram descritas em associação à antracnose da atemóia no estado de São Paulo (Firmino et al., 2014). Adicionalmente, as espécies *C. gloeosporioides*, *C.*

*fragariae* (= *C. theobromicola*), *C. theobromicola*, *C. magna* e *C. boninense* foram relatadas provocando a antracnose em pinha e graviola no Estado de Alagoas (Kamei et al., 2014).

Na Colômbia, a espécie *C. gloeosporioides* não é a única responsável pela antracnose da gravioleira. Outras espécies como *C. theobromicola*, *C. tropicale*, *C. siamense* e *C. karstii* são descritas como a causa da antracnose nesta hospedeira (Álvarez et al., 2014). Em cherimóia, no México, além de *C. gloeosporioides*, as espécies *C. fragariae* (= *C. theobromicola*) e *C. orbiculare* foram isoladas a partir de sintomas de antracnose (Villanueva-Arce et al., 2008). Há relatos também da espécie *C. theobromicola* ocorrendo em graviola no Panamá (Rojas et al., 2010). Além de dois isolados não identificados dentro do clado *C. siamense lato sensu* ocorrendo em espécies nativas de *Annona* na Tailândia (Udayanga et al., 2013).

*Colletotrichum* é o estágio assexuado de *Glomerella*, pertencente ao Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Família Glomerellaceae (Index Fungorum, 2015). Este gênero é responsável pela antracnose em frutos tropicais de uma vasta gama de espécies hospedeiras, incluindo espécies exploradas comercialmente como o café (*Coffea arabica*), condessa (*Annona reticulata*), figo (*Ficus racemosa*), manga (*Mangifera indica*), neem (*Azadirachta indica*), mamão (*Carica papaya*), abacate (*Persea americana*), banana (*Musa* spp.), dentre outras (Weir et al., 2012), e de espécies hospedeiras vivendo em seu habitat natural (Hyde et al., 2009; Phoulivong et al., 2010; Cannon et al., 2012; Udayanga et al., 2013).

*Colletotrichum* spp. são conhecidas como patógenos que apresentam infecções quiescentes (Dean et al., 2012) e agente causal de doenças pós-colheita (Phoulivong et al., 2010). Entretanto, endófitos tem sido também obtidos de partes de plantas assintomáticas (Cai et al., 2009; Rojas et al., 2010), além de saprófitos (Prihastuti et al., 2009). Este gênero é considerado economicamente importante pelo fato de causar antracnose em várias espécies de plantas frutíferas, cereais, gramíneas e plantas ornamentais em regiões tropicais e temperadas (Freeman et al., 2001; Rojas et al., 2010). Além disso,



pode atacar diferentes órgãos das plantas como flor, folha, ramos e frutos, em vários estádios de desenvolvimento, em diferentes regiões geográficas.

Tradicionalmente, as espécies de *Colletotrichum* têm sido identificadas baseadas em características morfológicas como o tamanho e forma dos conídios e apressórios, células conidiogênicas, presença ou ausência de setas, escleródios e acérvulos, presença de teleomorfo, cor, taxa de crescimento e textura da colônia (Sutton, 1980). Adicionalmente, especificidade por hospedeiro e local de origem são atributos também avaliados, que podem ajudar na diferenciação de espécies. Entretanto, a alta variabilidade das características morfológicas e culturais tem tornado este critério incerto para identificação do patógeno em nível de espécie (Weir et al., 2012). Além disso, várias espécies podem ser encontradas infectando ou colonizando a mesma planta hospedeira (Lima et al., 2013; Kamei et al., 2014; Firmino et al., 2014; Álvarez et al., 2014) ou causando infecção cruzada (Phoulivong, 2012), tornando a identificação do agente causal por meio destas características incerta.

Sistemática com base em morfologia de fungos pode gerar incerteza na identificação de espécies, devido à sobreposição dos valores de tamanho de conídios, conidióforos, número de septos, formato e tamanho de apressórios. Para que se faça uma identificação segura de espécies, devem-se examinar caracteres que exibam variações apropriadas para o discernimento de indivíduos diferentes e sempre que possível associar a análise morfológica à filogenética.

As espécies *C. kahawae* e *C. gloeosporioides* constituem um bom exemplo de que caracteres morfológicos apenas, não podem separar espécies. Contudo, suas distinções são suficientemente suportadas em outros caracteres como utilização de citrato e tartarato como a única fonte de carbono e dados de sequências de DNA (Prihastuti et al., 2009).

Filogenia multigênica tem sido fundamental para identificação de espécies de *Colletotrichum*, além de possibilitar o entendimento das relações entre elas (Weir et al., 2012). A análise de sequências dos genes Actina (ACT),

$\beta$ -tubulina (TUB2), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), Calmodulina (CAL), Glutamina sintetase (GS), regiões do gene ITS e região intergênica de *apn2* e dos genes MAT1-2-1 (ApMAT) (Weir et al., 2012; Sharma et al., 2013) tem sido utilizadas em publicações recentes, adicionalmente à avaliação de caracteres morfológicos, para identificar espécies do gênero superando a incerteza dos métodos tradicionais.

A espécie *C. gloeosporioides* é uma das mais comuns e amplamente distribuída em todo o mundo podendo causar doença em mais de 470 gêneros de plantas de diferentes famílias botânicas (Sutton, 1980). Entretanto, a espécie, tal como é identificada atualmente, apresenta-se como um agregado de subgrupos que contém diferenças em patogenicidade, especificidade por hospedeiros e homogeneidade genética (Hyde et al., 2009).

A epitificação de *C. gloeosporioides* (Cannon et al., 2008), seguida da lista de nomes correntes em uso para o gênero (Hyde et al., 2009), além da abordagem polifásica para estudos com *Colletotrichum* (Cai et al., 2009) e filogenia multigênica (Weir et al., 2012; Damm et al., 2012a, 2012b), possibilitou uma nova visão na taxonomia e estudos filogenéticos do gênero. O que era considerado como sendo uma única espécie, é na verdade, um complexo de espécies, nomeado, complexo de espécies *C. gloeosporioides*, composto por mais de 22 espécies geneticamente distintas, mas morfológicamente indistinguíveis (Weir et al., 2012).

Por meio de análise filogenética multigênica para identificação de espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, outros clados foram também bem definidos, superando a instabilidade dos caracteres morfológicos na separação de espécies, a saber, o clado *acutatum* (complexo de espécies *C. acutatum*) composto por 31 espécies (Damm et al., 2012a) e o clado *boninense* (complexo de espécies *C. boninense*) composto atualmente por cerca de 18 espécies (Damm et al., 2012b).

Embora *C. gloeosporioides* e, em menor extensão, *C. acutatum*, tenham sido relatados por serem o agente causal de podridão de frutos tropicais, nenhum dos 25 isolados de *Colletotrichum* provenientes de banana

(*Musa* sp.), pimenta (*Capsicum* spp.), goiaba (*Psidium guajava*), jujuba (*Zizyphus mauritiane*), longan (*Dimocarpus longan*), manga (*Mangifera indica*), mamão (*Carica papaya*) e de jambo-rosa (*Syzygium jambos*), em Laos e Tailândia, foram identificados como sendo uma das duas espécies por meio da análise das sequências dos genes ACT, TUB, GAPDH e ITS (Phoulivong et al., 2010). Ao contrário do que se pensava, a espécie *C. gloeosporioides sensu stricto* parece ter uma gama de hospedeiros limitada. Udayanga et al. (2013) identificaram a espécie *C. gloeosporioides sensu stricto* somente em *Citrus aurantifolia* e *Syzygium samarangense*, dentre os 15 hospedeiros de importância comercial estudados, além de outras espécies hospedeiras nativas no norte da Tailândia.

No Brasil, a antracnose da cultura da mangueira (*Mangifera indica*) foi atribuída exclusivamente à *C. gloeosporioides* em estudos que analisaram características morfológicas do patógeno (Santos Filho & Matos, 2003). Trabalho recente demonstrou que as espécies *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. karstii* e uma nova espécie descrita como *C. dianesei* estão associadas a esta doença no nordeste do Brasil (Lima et al., 2013).

A associação de mais de uma espécie de *Colletotrichum* causando antracnose em um mesmo hospedeiro também é relatada em outras frutíferas, como por exemplo, o maracujazeiro, que pode ser atacado por *C. acutatum*, *C. boninense* e *C. gloeosporioides* (Tozze Júnior et al., 2010).

A ocorrência de duas ou mais espécies de *Colletotrichum* parasitando um mesmo hospedeiro pode dificultar o controle da antracnose, tornando-a uma doença ainda mais importante uma vez que as espécies podem apresentar comportamento diferenciado. Essa situação já foi verificada para a antracnose do pimentão no Brasil, doença causada por *C. acutatum*, *C. boninense*, *C. capsici*, *C. coccodes* e *C. gloeosporioides*, onde as espécies apresentam sensibilidade diferenciada aos fungicidas azoxistrobina, carbendazim, tiabendazol e tebuconazol (Tozze Júnior et al., 2011).

Desta forma, a identificação de espécies de *Colletotrichum* ocorrendo em anonáceas é necessária para se conhecer a variabilidade da população do

patógeno e compreender o seu ciclo de vida. Estas informações poderão auxiliar em estudos epidemiológicos, contribuindo para o desenvolvimento de programas de melhoramento, garantindo ao produtor a aplicação de um manejo mais sustentável e econômico.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos do Departamento de Fitopatologia da UFLA, com exceção do teste de patogenicidade que foi conduzido no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais – Câmpus Januária (IFNMG-Câmpus Januária), em Januária/MG.

#### 3.1 Obtenção dos isolados e preservação

Um total de 84 isolados de *Colletotrichum* foram obtidos de folhas, flores e frutos. Dentre os isolados de frutos, cinco foram obtidos de fruto com sintoma de antracnose e 19 de frutos mumificados (Tabela 1). Coletas foram realizadas em regiões localizadas em Minas Gerais e São Paulo. Além disso, dois isolados cedidos ao IFNMG-Campus Januária pela Embrapa Agroindústria são também utilizados neste estudo. Os hospedeiros de coleta foram a pinha, atemóia, graviola, condessa e espécies da família Annonaceae vivendo em seu habitat natural.

A partir de lesões típicas e ativas do patógeno, bem como de frutos mumificados, o fungo foi isolado de acordo com a metodologia descrita por Cai et al. (2009). Foram feitas secções de tecidos infectados, em locais de lesões jovens, desinfestadas superficialmente com álcool 70% (1 min.) e hipoclorito de sódio 1% (1 min.) e lavadas em água destilada por duas vezes; em seguida, transferidas para placa de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). Isolamento a partir de frutos mumificados foram realizados de acordo com a metodologia descrita anteriormente a partir do corte de pequenos fragmentos superficiais onde o tecido se encontrava escurecido. No caso de frutos apresentando a esporulação do patógeno em sua superfície, optou-se pelo método de isolamento direto, onde, com o auxílio de uma pinça estéril e uma lupa, foi transferida uma pequena quantidade da massa mucilaginosa para o meio de cultura (Cai et al. 2009). As placas foram

mantidas a temperatura ambiente e observadas diariamente, por cerca de cinco dias, para acompanhamento do desenvolvimento de colônias fúngicas. No meio de cultivo, foi adicionado o antibiótico sulfato de antamicina (50 mg/mL) com a finalidade de inibir o crescimento de bactérias contaminantes. Após a constatação de crescimento fúngico foram confeccionadas lâminas para identificação do gênero.

Culturas monospóricas foram obtidas para todos os isolados a partir da suspensão de esporos em 5 ml de água destilada esterilizada presente em microtubos tipo eppendorf e diluídos por 5 vezes. Em seguida, alíquotas de 10 µl da suspensão foram colocadas em placas de Petri com meio ágar-água e incubadas à temperatura ambiente. Após 6 horas, os conídios que apresentavam tubos germinativos foram transferidos para meio BDA para crescimento das culturas e posterior preservação. Todos os isolados estudados foram depositados como culturas monospóricas na Coleção Micológica de Lavras (CML) por três diferentes métodos de preservação: a criopreservação em glicerina 15%, a preservação em água e a preservação em microtubos tipo *Eppendorf* (Leslie & Summerell, 2006). Para realização dos estudos posteriores, os isolados preservados em microtubos tipo *Eppendorf* foram armazenados em incubadora tipo BOD a temperatura de  $\pm 10$  °C.

Tabela 1 Identificação dos isolados de *Colletotrichum* estudados provenientes de anonáceas dos estados de Minas Gerais (MG), São Paulo (SP) e Ceará (CE)

Nº	Código Isolado	Espécie	Hospedeiro/ substrato	Origem Geográfica	Tipo de sintoma	Genes sequenciados		
						GAPDH <sup>c</sup>	ACT <sup>t</sup>	TUB2 <sup>t</sup>
1	CAA1 <sup>a</sup>	<i>C. theobromicola</i>	<i>A. muricata</i> /fruto	Fortaleza/CE	A	x	-	-
2	CAA2 <sup>ab</sup>	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>A. muricata</i> /fruto	Fortaleza/CE	A	x	x	x
3	CAA4	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>A. cacans</i> /fruto <sup>c</sup>	Maria da Cruz/MG	M	x	-	-
4	CAA5 <sup>b</sup>	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>A. squamosa</i> /folha	Januária/MG	A	x	x	x
5	CAA7	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>A. squamosa</i> /fruto	Januária/MG	A	x	-	-
6	CAA8	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>A. muricata</i> /flor	Januária/MG	A	x	-	-
7	CAA9	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>A. squamosa</i> /folha	Januária/MG	A	x	-	-
8	CAA14	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>A. squamosa</i> /folha	Januária/MG	A	x	-	-
9	CAA28	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>A. reticulata</i> /folha	Januária/MG	A	x	-	-
10	CAA35	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. muricata</i> /folha	Acari/MG	A	-	-	-
11	CAA36	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. muricata</i> /folha	Acari/MG	A	-	-	-
12	CAA37	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>A. squamosa</i> /folha	Acari/MG	A	x	-	-
13	CAA38	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. muricata</i> /fruto	Acari/MG	M	-	-	-
14	CAA70/1	<i>C. theobromicola</i>	<i>A. crassiflora</i> /folha <sup>c</sup>	Umbuzeiro/MG	A	x	-	-
15	CAA70/2	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. crassiflora</i> /folha <sup>c</sup>	Umbuzeiro/MG	A	-	-	-
16	CAA70	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. crassiflora</i> /folha <sup>c</sup>	Umbuzeiro/MG	A	-	-	-
17	CAA74	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. crassiflora</i> /folha <sup>c</sup>	Umbuzeiro/MG	A	-	-	-
18	CAA74/1	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. crassiflora</i> /folha <sup>c</sup>	Umbuzeiro/MG	A	-	-	-
19	CAA81 <sup>b</sup>	<i>C. karstii</i>	<i>A. crassiflora</i> /fruto <sup>c</sup>	Umbuzeiro/MG	M	x	x	x
20	CAA95 <sup>b</sup>	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Annona</i> sp. /folha <sup>c</sup>	Acari/MG	A	x	x	x
21	CAA95/3	<i>Colletotrichum</i>	<i>Annona</i> sp. / folha <sup>c</sup>	Acari/MG	A	-	-	-
22	CAA96	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. muricata</i> /folha	Acari/MG	A	-	-	-
23	CAA96/1	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. muricata</i> /folha	Acari/MG	A	-	-	-

“continua”

Tabela 1 “continuação”

Nº	Código Isolado	Espécie	Hospedeiro/ substrato	Origem Geográfica	Tipo de sintoma	Genes sequenciados		
						GAPDH <sup>e</sup>	ACT <sup>f</sup>	TUB2 <sup>f</sup>
24	CAA96/2	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. muricata</i> /folha	Acari/MG	A	-	-	-
25	CAA99/1	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>A. muricata</i> /folha	Acari/MG	A	x	-	-
26	CAA99/2	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. muricata</i> /folha	Acari/MG	A	-	-	-
27	CAA99/3	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. muricata</i> /folha	Acari/MG	A	-	-	-
28	CAA107	<i>Colletotrichum</i>	<i>Annona</i> sp. /folha <sup>c</sup>	Acari/MG	A	-	-	-
29	CAA107/1	<i>C. theobromicola</i>	<i>Annona</i> sp. /folha <sup>c</sup>	Acari/MG	A	x	-	-
30	CAA107/3	<i>Colletotrichum</i>	<i>Annona</i> sp. /folha <sup>c</sup>	Acari/MG	A	-	-	-
31	CAA107/2	<i>Colletotrichum</i>	<i>Annona</i> sp. /folha <sup>c</sup>	Acari/MG	A	-	-	-
32	CAA109	<i>Colletotrichum</i>	<i>Annona</i> sp. /folha <sup>c</sup>	Acari/MG	A	-	-	-
33	CAA109/1	<i>Colletotrichum</i>	<i>Annona</i> sp. /folha <sup>c</sup>	Acari/MG	A	-	-	-
34	CAA110	<i>Colletotrichum</i>	<i>Annona</i> sp. /folha <sup>c</sup>	Acari/MG	A	-	-	-
35	CAA110/1	<i>Colletotrichum</i>	<i>Annona</i> sp. /folha <sup>c</sup>	Acari/MG	A	-	-	-
36	CAA113	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. reticulata</i> /folha	Acari/MG	A	-	-	-
37	CAA113/2	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. reticulata</i> /folha	Acari/MG	A	-	-	-
38	CAA113/1	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. reticulata</i> /folha	Acari/MG	A	-	-	-
39	CAA114	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. reticulata</i> /folha	Acari/MG	A	-	-	-
40	CAA114/3	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. reticulata</i> /folha	Acari/MG	A	-	-	-
41	CAA115	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. reticulata</i> /folha	Acari/MG	A	-	-	-
42	CAA115/1 b	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>A. reticulata</i> /folha	Acari/MG	A	x	x	x
43	CAA115/2	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. reticulata</i> /folha	Acari/MG	A	-	-	-
44	CAA115/3	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. reticulata</i> /folha	Acari/MG	A	-	-	-
45	CAA136	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. crassiflora</i> /folha <sup>c</sup>	Acari/MG	A	-	-	-

“continua”



Tabela 1 “continuação”

Nº	Código Isolado	Espécie	Hospedeiro/ substrato	Origem Geográfica	Tipo de sintoma	Genes sequenciados		
						GAPDH <sup>e</sup>	ACT <sup>f</sup>	TUB2 <sup>f</sup>
46	CAA136/1	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. crassiflora</i> /folha <sup>c</sup>	Acari/MG	A	-	-	-
47	CAA136/2	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. crassiflora</i> /folha <sup>c</sup>	Acari/MG	A	-	-	-
48	CAA137 <sup>b</sup>	<i>C. fruticola</i>	<i>A. crassiflora</i> /folha <sup>c</sup>	Acari/MG	A	x	x	x
49	CAA137/1	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. crassiflora</i> /folha <sup>c</sup>	Acari/MG	A	-	-	-
50	CAA138	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. crassiflora</i> /folha <sup>c</sup>	Acari/MG	A	-	-	-
51	CAA144	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. crassiflora</i> /folha <sup>c</sup>	Acari/MG	A	-	-	-
52	CAA147	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. crassiflora</i> /folha <sup>c</sup>	Acari/MG	A	-	-	-
53	CAA150	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. crassiflora</i> /folha <sup>c</sup>	Acari/MG	A	-	-	-
54	CAA157 <sup>b</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>A. muricata</i> /fruto	Lavras/MG	M	x	x	x
55	CAA157/1	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. muricata</i> /fruto	Lavras/MG	M	-	-	-
56	CAA157/3	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. muricata</i> /fruto	Lavras/MG	M	-	-	-
57	CAA159	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>A. squamosa</i> /folha	Mocambinho/MG	A	x	-	-
58	CAA160	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. squamosa</i> /folha	Mocambinho/MG	A	-	-	-
59	CAA162 <sup>b</sup>	<i>C. theobromicola</i>	<i>A. squamosa</i> x <i>A. cherimola</i> /fruto	Mocambinho/MG	M	x	x	x
60	CAA163	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>A. squamosa</i> /folha	Mocambinho/MG	A	x	-	-
61	CAA165	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. squamosa</i> x <i>A. cherimola</i> /fruto	Mocambinho/MG	M	-	-	-
62	CAA166	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. squamosa</i> x <i>A. cherimola</i> /fruto	Mocambinho/MG	M	-	-	-
63	CAA167	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. squamosa</i> x <i>A. cherimola</i> /fruto	Mocambinho/MG	M	-	-	-
64	CAA173	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. squamosa</i> x <i>A. cherimola</i> /fruto	Mocambinho/MG	M	-	-	-

“continua”

Tabela 1 “continuação”

Nº	Código Isolado	Espécie	Hospedeiro/ substrato	Origem Geográfica	Tipo de sintoma	Genes sequenciados		
						GAPDH <sup>c</sup>	ACT <sup>f</sup>	TUB2 <sup>f</sup>
61	CAA165	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. squamosa</i> x <i>A. cherimola</i> /fruto	Mocambinho/MG	M	-	-	-
62	CAA166	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. squamosa</i> x <i>A. cherimola</i> /fruto	Mocambinho/MG	M	-	-	-
63	CAA167	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. squamosa</i> x <i>A. cherimola</i> /fruto	Mocambinho/MG	M	-	-	-
64	CAA173	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. squamosa</i> x <i>A. cherimola</i> /fruto	Mocambinho/MG	M	-	-	-
65	CAA174	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. squamosa</i> x <i>A. cherimola</i> /fruto	Mocambinho/MG	M	-	-	-
66	CAA176	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>A. squamosa</i> x <i>A. cherimola</i> /fruto	Mocambinho/MG	M	x	-	-
67	CAA181	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. squamosa</i> x <i>A. cherimola</i> /fruto	Mocambinho/MG	M	-	-	-
68	CAA182	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. squamosa</i> x <i>A. cherimola</i> /fruto	Mocambinho/MG	M	-	-	-
69	CAA183	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. squamosa</i> x <i>A. cherimola</i> /fruto	Mocambinho/MG	M	-	-	-
70	CAA194	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. squamosa</i> x <i>A. cherimola</i> /fruto	Mocambinho/MG	M	-	-	-
71	CAA195	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. squamosa</i> /fruto	São Francisco/MG	M	-	-	-
72	CAA196	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>A. squamosa</i> /fruto	Pintópolis/MG	M	x	-	-
73	CAA197 <sup>b</sup>	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>A. squamosa</i> /flor	São Francisco/MG	A	x	x	x

“continua”

Tabela 1 “conclusão”

Nº	Código Isolado	Espécie	Hospedeiro/ substrato	Origem Geográfica	Tipo de sintoma	Genes sequenciados		
						GAPDH <sup>e</sup>	ACT <sup>f</sup>	TUB2 <sup>f</sup>
74	CAA198	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>A. crassiflora</i> /folha <sup>d</sup>	Lavras/MG	A	x	-	-
75	CAA199 <sup>b</sup>	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>A. reticulata</i> /folha	Campo Belo/MG	A	x	x	x
76	CAA201 <sup>b</sup>	<i>C. nymphaeae</i>	<i>A. muricata</i> /fruto	Lavras/MG	A	x	x	x
77	CAA202	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>A. squamosa</i> x <i>A. cherimola</i> /folha	Lavras/MG	A	x	-	-
78	CAA204	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. squamosa</i> x <i>A. cherimola</i> /folha	Lavras/MG	A	-	-	-
79	CAA205	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. squamosa</i> x <i>A. cherimola</i> /folha	Lavras/MG	A	-	-	-
80	CAA206 <sup>b</sup>	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>A. squamosa</i> x <i>A. cherimola</i> /fruto	Lavras/MG	A	x	x	x
81	CAA207 <sup>b</sup>	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>A. squamosa</i> /folha	São Paulo/SP	A	x	x	x
82	CAA208/1 <sup>b</sup>	<i>C. karstii</i>	<i>A. crassiflora</i> /folha	Elói Mendes/MG	A	x	x	x
83	CAA208/2	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. crassiflora</i> /folha	Elói Mendes/MG	A	-	-	-
84	CAA208/3	<i>Colletotrichum</i>	<i>A. crassiflora</i> /folha	Elói Mendes/MG	A	-	-	-

<sup>a</sup>Isolados provenientes da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza/CE). <sup>b</sup>Isolados utilizados no teste de patogenicidade. <sup>c</sup>Hospedeiras nativas vivendo em seu habitat natural. <sup>d</sup>Hospedeiro presente no Campus da UFLA. <sup>e</sup>31 isolados selecionados, a partir dos 84 isolados obtidos de *Annona* spp., para amplificação do gene GAPDH. <sup>f</sup>Os 14 isolados de *Colletotrichum* selecionados representando as distintas linhagens filogenéticas a partir da árvore filogenética do gene parcial GAPDH. <sup>g</sup>A = antracnose, M = mumificação.

### 3.2 Seleção dos isolados para a caracterização molecular, morfológica e patogênica

Dos 84 isolados de *Colletotrichum* obtidos de órgãos sintomáticos de espécies de *Annona*, selecionou-se uma amostra de 31 isolados que representassem a maior diversidade de características fenotípicas, espécie hospedeira, tipo de sintoma provocado na planta, órgão de coleta e região geográfica de origem. Para os isolados amostrados amplificou-se a região gênica GAPDH para uma análise filogenética preliminar. Com base nos resultados observados na árvore filogenética procedeu-se a seleção de uma nova amostra composta por quatorze isolados para caracterização filogenética multi-locus dos genes Actina e  $\beta$ -tubulina, bem como, realização do teste de patogenicidade, caracterização morfológica e determinação das características da cultura (Tabela 1). O objetivo desta nova seleção foi selecionar aqueles isolados que pertenciam à distintas linhagens filogenéticas possibilitando a caracterização de um número maior possível de diferentes espécies.

### 3.3 Extração de DNA, amplificação de fragmentos e sequenciamento

Culturas monospóricas dos 31 isolados de *Colletotrichum* foram cultivadas em Extrato de Malte 2% líquido por três dias. Para a extração do DNA, o micélio de cada isolado foi filtrado em gaze, lavado com água destilada estéril e submetido à extração do DNA genômico, utilizando o *kit* Wizard Genomic DNA Purification Kit® (Promega), de acordo com o protocolo do fabricante. As concentrações de DNA foram mensuradas utilizando o NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) e padronizadas para 5 ng/ $\mu$ l. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o *kit* Promega GoTaq® Colorless Master Mix no termociclador My Cyclor™ (Bio-Rad) e o mesmo conjunto de *primers* foi utilizado para a reação de sequenciamento.

O fragmento do gene gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi amplificado utilizando-se os *primers* GDF (*forward*; 5'-

GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA-3´) e GDR (*reverse*; 5´-GGGTGGAGTCGTACTIONGAGCTGT-3´) (Templeton et al., 1992), utilizando as seguintes condições de ciclo: (1) desnaturaçã, por 4 minutos, a 94 °C; seguido por 34 ciclos de desnaturaçã, a 94 °C, por 45 segundos; (2) anelamento, por 45 segundos, a 60 °C; (3) extensã, a 72 °C, por 1 minuto e, (4) extensã final, a 72 °C durante 7 minutos (Prihastuti et al., 2009). Uma porçã do gene beta tubulina (TUB2) foi amplificada utilizando-se os *primers* TB5 (*forward*; 5´-GGTAACCAGATTGGTGCTGCCTT-3´) e TB6 (*reverse*; 5´-GCA GTCGCAGCCCTCAGCCT-3´) (Panaccione & Hanau, 1990), utilizando as seguintes condições de ciclo: (1) desnaturaçã, por 5 minutos, a 95 °C; seguido por 35 ciclos de desnaturaçã, a 94 °C, durante 30 segundos; (2) anelamento, a 62 °C, durante 30 segundos; (3) extensã, a 72 °C, por 2 minutos e, (4) extensã final a 72 °C durante 7 minutos (Talhinhas et al., 2002). O gene Actina parcial (ACT) foi amplificado utilizando-se os *primers* ACT-512F (*forward*; 5´-ATGTGCAAGCCGGTTTCGC-3´) e ACT-783R (*reverse*; 5´-TACGAGTCCTTCTGGCCCAT-3´) (Carbone & Kohn, 1999), utilizando as seguintes condições de ciclo: (1) desnaturaçã, a 95 °C durante 5 minutos; seguido por 35 ciclos a 94 °C durante 30 segundos; (2) anelamento, a 58 °C durante 30 segundos; (3) extensã, a 72 °C durante 45 segundos; (4) extensã final, a 72 °C durante 7 minutos (Weir et al., 2012).

Os fragmentos amplificados foram purificados com o *kit* Wizard® SV gel e PCR Clean-Up System (Promega) seguindo as instruções do fabricante. Todas as amostras de DNA amplificadas para as regiões GAPDH, Actin e TUB2 foram enviadas para Macrogen Corporation nos Estados Unidos da América (EUA) para o sequenciamento.

### 3.4 Análises filogenéticas

Sequências consenso foram montadas a partir das sequências *forward* e *reverse*, utilizando-se o programa SeqAssem ver. 07/2008 (SequentiX). Sequências adicionais de membros do complexo de espécies *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum boninense* (Weir et al., 2012; Damm et al., 2012a, 2012b; Cannon et al., 2012) foram obtidas a partir do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Tabela 2). As sequências foram alinhadas usando MUSCLE implementado no MEGA 5 (Tamura et al., 2011). As análises filogenéticas para os genes GAPDH, ACT e TUB2 foram realizadas pelo método de Máxima Parcimônia (MP) com teste de bootstrap de 1000 repetições, utilizando-se o programa MEGA 5. Para o conjunto de dados combinados, a árvore filogenética foi construída pelo método de Máxima Parcimônia e Inferência Bayesiana (Ronquist et al., 2012) com o programa MEGA5 e Mr Bayes 3.2, respectivamente. O modelo de substituição nucleotídica para a Inferência Bayesiana foi GTR+I+G (*General time reversible with Invariable and Gamma distribution*). Foram realizadas duas análises, cada qual contendo quatro cadeias de Markov "aquecidas" por incrementos durante 1.000.000 de gerações e amostradas a cada 100 gerações. Vinte e cinco por cento das 10.000 árvores geradas foram descartadas (25% *of burning*) e a árvore de consenso calculada foi visualizada com o auxílio do programa FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Tabela 2 Isolados de referência de *Colletotrichum* representando espécies conhecidas, utilizados nas análises filogenéticas

Nº	Espécie	Código Isolado	Hospedeiro	Localização Geográfica	Número de acesso no GenBank		
					GAPDH	ACT	TUB2
1	<i>C. aenigma</i>	ICMP 18608*	<i>Persea americana</i>	Israel	JX010044	JX009443	JX010389
2	<i>C. aeshynomenes</i>	ICMP 17673*	<i>Aeshynomene virginica</i>	USA	JX009930	JX009483	JX010392
3	<i>C. alatae</i>	ICMP 17919*	<i>Dioscorea alata</i>	India	JX009990	JX009471	JX010383
4	<i>C. alienum</i>	ICMP 12071*	<i>Malus domestica</i>	New Zealand	JX010028	JX009572	JX010411
5	<i>C. aotearoa</i>	ICMP 18537*	<i>Coprosma</i> sp.	New Zealand	JX010005	JX009564	JX010420
6	<i>C. asianum</i>	ICMP 18580*	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	JX010053	JX009584	JX010406
7	<i>C. boninense</i>	ICMP 17904*	<i>Crinum asiaticum</i>	Japan	JX009905	JX009583	JQ005588
8	<i>C. clidemiae</i>	ICMP 18658*	<i>Clidemia hirta</i>	USA, Hawaii	JX009989	JX009537	JX010438
9	<i>C. cordylinicola</i>	ICMP 18579*	<i>Cordyline fruticosa</i>	Thailand	JX009975	HM470235	JX010440
10	<i>C. fructicola</i>	ICMP 18581*	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	JX010033	FJ907426	JX010405
11	<i>C. fructicola</i>	ICMP18613	<i>Limonium sinuatum</i>	Israel	JX009998	JX009491	JX010388
12	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 17821*	<i>Citrus sinensis</i>	Italy	JX010056	JX009531	JX010445
13	<i>C. horii</i>	ICMP 10492*	<i>Diospyros kaki</i>	Japan	GQ329681	JX009438	JX010450
14	<i>C. kahawae</i>	ICMP 18539*	<i>Olea europaea</i>	Australia	JX009966	JX009523	JX010434
15	<i>C. musae</i>	ICMP 19119*	<i>Musa</i> sp.	USA	JX010050	JX009433	HQ596280

“continua”

Tabela 2 “continuação”

N°	Espécie	Código Isolado	Hospedeiro	Localização Geográfica	Número de acesso no GenBank		
					GAPDH	ACT	TUB2
16	<i>C. nupharicola</i>	ICMP 18187*	<i>Nuphar lutea</i>	USA	JX009972	JX009437	JX010398
17	<i>C. psidii</i>	ICMP 19120*	<i>Psidium sp.</i>	Italy	JX009967	JX009515	JX010443
18	<i>C. queenslandicum</i>	ICMP 1778*	<i>Carica papaya</i>	Australia	JX009934	JX009447	JX010414
19	<i>C. salsae</i>	ICMP 19051*	<i>Salsola tragus</i>	Hungary	JX009916	JX009562	JX010403
20	<i>C. siamense</i>	ICMP 18578*	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	JX009924	FJ907423	JX010404
21	<i>C. siamense</i>	ICMP 18121	<i>Dioscorea rotundata</i>	Nigeria	JX009942	JX009460	JX010402
22	<i>C. siamense</i>	ICMP17795	<i>Malus domestica</i>	USA	JX010051	JX009506	JX010393
23	<i>C. theobromicola</i>	ICMP 18649*	<i>Theobroma cacao</i>	Panama	JX010006	JX009444	JX010447
24	<i>C. theobromicola</i>	ICMP 17895*	<i>Annona diversifolia</i>	Mexico	JX010057	JX009568	JX010382
25	<i>C. ti</i>	ICMP 4832*	<i>Cordyline sp.</i>	New Zealand	JX009952	JX009520	JX010442
26	<i>C. tropicale</i>	ICMP 18653*	<i>Theobroma cacao</i>	Panama	JX010007	JX009489	JX010407
27	<i>C. xanthorrhoeae</i>	ICMP 17903*	<i>Xanthorrhoea preissii</i>	Australia	JX009927	JX009478	JX010448
28	<i>C. endomangiferae</i>	CMM 3814*	<i>Mangifera indica</i>	Brazil-SP	KC702955	KC702922	KM404170
29	<i>C. endophytica</i>	MFLUCC 10-0676	<i>Unknown wild fruit</i>	Thailand	KF242181	KF157827	KF254857

“continua”



Tabela 2 “continuação”

N°	Espécie	Código Isolado	Hospedeiro	Localização Geográfica	Número de acesso no GenBank		
					GAPDH	ACT	TUB2
30	<i>C. dianesei</i>	CMM4083*	<i>Mangifera indica</i>	Brazil-SFV	KC517194	KC517298	KC517254
31	<i>C. syzygicola</i>	MFLUCC 10-0624*	<i>Syzygium samarangense</i>	Thailand	KF254880	KF157801	KF242156
32	<i>C. viniferum</i>	GZAAS5.08601*	<i>V. vinifera</i> cv. <i>Shuijing</i>	China	JN412798	JN412795	JN412813
33	<i>C. viniferum</i>	GZAAS5.08622	<i>V. vinifera</i> cv. <i>Shuijing</i>	China	JN412796	JN412791	JN412812
34	<i>C. acerbum</i>	ICMP 12921*	<i>Malus domestica</i>	New Zealand	JQ948790	JQ949780	JQ950110
35	<i>C. acutatum</i>	CBS 112996*	<i>Carica papaya</i>	Australia	JQ948677	JQ005839	JQ005860
36	<i>C. australe</i>	CBS 116478*	<i>Trachycarpus fortunei</i>	South Africa	JQ948786	JQ949776	JQ950106
37	<i>C. brisbanense</i>	CBS 292.67*	<i>Capsicum annuum</i>	Australia	JQ948621	JQ949612	JQ949942
38	<i>C. chrysanthemi</i>	CBS 126519	<i>Chrysanthemum coronarium</i>	Netherlands	JQ948602	JQ949593	JQ949923
39	<i>C. cosmi</i>	CBS 853.73*	<i>Cosmos</i> sp.	Netherlands	JQ948604	JQ949595	JQ949925
40	<i>C. costaricense</i>	CBS 330.75*	<i>Coffea arabica</i>	Costa Rica	JQ948510	JQ949501	JQ949831
41	<i>C. cuscutae</i>	IMI 304802*	<i>Cuscuta</i> sp.	Dominica	JQ948525	JQ949516	JQ949846
42	<i>C. fioriniae</i>	CBS 293.67	<i>Persea americana</i>	Australia	JQ948640	JQ949631	JQ949961

“continua”

Tabela 2 “continuação”

N°	Espécie	Código Isolado	Hospedeiro	Localização Geográfica	Número de acesso no GenBank		
					GAPDH	ACT	TUB2
43	<i>C. godetiae</i>	CBS 133.44*	<i>Clarkia hybrida</i>	Denmark	JQ948733	JQ949723	JQ950053
44	<i>C. guajavae</i>	IMI 350839*	<i>Psidium guajava</i>	India	JQ948600	JQ949591	JQ949921
45	<i>C. indonesiense</i>	CBS 127551*	<i>Eucalyptus</i> sp.	Indonesia	JQ948618	JQ949609	JQ949939
46	<i>C. johnstonii</i>	ICMP 12926*	<i>Solanum lycopersicum</i>	New Zealand	JQ948775	JQ949765	JQ950095
47	<i>C. kinghornii</i>	CBS 198.35*	<i>Phormium</i> sp.	UK	JQ948785	JQ949775	JQ950105
48	<i>C. laticiphilum</i>	CBS 112989*	<i>Hevea brasiliensis</i>	India	JQ948619	JQ949610	JQ949940
49	<i>C. limetticola</i>	CBS 114.14*	<i>Citrus aurantifolia</i>	USA, Florida	JQ948523	JQ949514	JQ949844
50	<i>C. lupini</i>	CBS 109225*	<i>Lupinus albus</i>	Ukraine	JQ948485	JQ949476	JQ949806
51	<i>C. melonis</i>	CBS 159.84*	<i>Cucumis melo</i>	Brazil	JQ948524	JQ949515	JQ949845
52	<i>C. nymphaeae</i>	CBS 515.78*	<i>Nymphaea alba</i>	Netherlands	JQ948527	JQ949518	JQ949848
53	<i>C. nymphaeae</i>	IMI370491	<i>Malus pumila</i>	Brazil	JQ948534	JQ949525	JQ949855
54	<i>C. orchidophilum</i>	CBS 632.80*	<i>Dendrobium</i> sp.	USA	JQ948481	JQ949472	JQ949802
55	<i>C. paxtonii</i>	IMI 165753*	<i>Musa</i> sp.	Saint Lucia	JQ948615	JQ949606	JQ949936
56	<i>C. phormii</i>	CBS 118194*	<i>Phormium</i> sp.	Germany	JQ948777	JQ949767	JQ950097
57	<i>C. pseudoacutatum</i>	CBS 436.77*	<i>Pinus radiata</i>	Chile	JQ948811	JQ949801	JQ950131

“continua”

Tabela 2 “continuação”

N°	Espécie	Código Isolado	Hospedeiro	Localização Geográfica	Número de acesso no GenBank		
					GAPDH	ACT	TUB2
58	<i>C. pyricola</i>	ICMP 12924*	<i>Pyrus communis</i>	New Zealand	JQ948776	JQ949766	JQ950096
59	<i>C. rhombiforme</i>	CBS 129953*	<i>Olea europaea</i>	Portugal	JQ948788	JQ949778	JQ950108
60	<i>C. salicis</i>	CBS 607.94*	<i>Salix</i> sp.	Netherlands	JQ948791	JQ949781	JQ950111
61	<i>C. scovillei</i>	CBS 126529*	<i>Capsicum</i> sp.	Indonesia	JQ948597	JQ949588	JQ949918
62	<i>C. scovillei</i>	CBS 120708	<i>Capsicum annuum</i>	Thailand	JQ948599	JQ949590	JQ949920
63	<i>C. simmondsii</i>	CBS 122122*	<i>Carica papaya</i>	Australia	JQ948606	JQ949597	JQ949927
64	<i>C. sloanei</i>	IMI 364297*	<i>Theobroma cacao</i>	Malaysia	JQ948617	JQ949608	JQ949938
65	<i>C. tamarilloi</i>	CBS 129814*	<i>Solanum betaceum</i>	Colombia	JQ948514	JQ949505	JQ949835
66	<i>C. walleri</i>	CBS 125472*	<i>Coffea</i> sp.	Vietnam	JQ948605	JQ949596	JQ949926
67	<i>C. annellatum</i>	CBS 129826*	<i>Hevea indica</i>	Colombia	JQ005309	JQ005570	JQ005656
68	<i>C. beeveri</i>	ICMP 18594*	<i>Brachyglottis repanda</i>	New Zealand	JQ005258	JQ005519	JQ005605
69	<i>C. boninense</i>	CBS 123755*	<i>Crinum asiaticum</i>	Japan	JQ005240	JQ005501	JQ005588
70	<i>C. brasiliense</i>	ICMP 18607*	<i>Passiflora edulis</i>	Brazil	JQ005322	JQ005583	JQ005669
71	<i>C. brassicicola</i>	CBS 101059*	<i>Brassica oleracea</i>	New Zealand	JQ005259	JQ005520	JQ005606
72	<i>C. colombiense</i>	CBS 129818*	<i>Passiflora edulis</i>	Colombia	JQ005261	JQ005522	JQ005608

“continua”

Tabela 2 “conclusão”

N°	Espécie	Código Isolado	Hospedeiro	Localização Geográfica	Número de acesso no GenBank		
					GAPDH	ACT	TUB2
73	<i>C. constrictum</i>	ICMP 12941*	<i>Citrus limon</i>	New Zealand	JQ005325	JQ005586	JQ005672
74	<i>C. cymbidiicola</i>	IMI 347923*	<i>Cymbidium</i> sp.	Australia	JQ005253	JQ005514	JQ005600
75	<i>C. dacrycarpi</i>	ICMP 19107*	<i>Dacrycarpus dacrydioides</i>	New Zealand	JQ005323	JQ005584	JQ005670
76	<i>C. hippeastri</i>	CBS 125376*	<i>Hippeastrum vittatum</i>	China	JQ005318	JQ005579	JQ005665
77	<i>C. novae-zelandiae</i>	ICMP 12944*	<i>Capsicum annuum</i>	New Zealand	JQ005315	JQ005576	JQ005662
78	<i>C. oncidii</i>	CBS 129828*	<i>Oncidium</i> sp.	Germany	JQ005256	JQ005517	JQ005603
79	<i>C. parsonsiae</i>	ICMP 18590*	<i>Parsonsia capsularis</i>	New Zealand	JQ005320	JQ005581	JQ005667
80	<i>C. petchii</i>	CBS 378.94*	<i>Dracaena marginata</i>	Italy	JQ005310	JQ005571	JQ005657
81	<i>C. phyllanthi</i>	CBS 175.67*	<i>Phyllanthus acidus</i>	India	JQ005308	JQ005569	JQ005655
82	<i>C. karstii</i>	CBS 132134*	<i>Vanda</i> sp.	China	HM585391	HM581995	HM585428
83	<i>C. karstii</i>	CBS 127552	<i>Eugenia uniflora</i>	Brazil	JQ005304	JQ005565	JQ005651
84	<i>C. torulosum</i>	ICMP 18586*	<i>Solanum melongena</i>	New Zealand	JQ005251	JQ005512	JQ005598

\* = cultura ex-tipo. As sequências foram obtidas no banco de dados de nucleotídeos do GenBank, ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants, Landcare Research, Auckland, New Zealand; CBS: Centraalbureau voor Schimmel cultures, Utrecht, The Netherlands; IMI - CABI Genetic Resource Collection, UK; CMM: Culture Collection of Phytopathogenic Fung “Prof. Maria Menezes”, Recife, Brazil; MFLUCC: Mae Fah Luang University Culture Collection, Thailand; GZAAS: Guizhou Academy of Agricultural Sciences Herbarium, China.

### 3.5 Caracterização morfológica e características da cultura

Para a avaliação dos caracteres morfológicos e características da cultura, quatorze isolados monospóricos de *Colletotrichum* foram cultivados em triplicatas, em meio BDA e incubados a  $25\pm 2^\circ\text{C}$  sob fotoperíodo de 12 h. Para tal avaliação, foram depositados no centro de placas de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA, discos de micélio de 5 mm de diâmetro retirados da área periférica de colônias dos isolados de aproximadamente 5 dias de idade. As características das culturas avaliadas foram a taxa de crescimento micelial (TCM), cor das colônias e a presença ou não de microescleródios e setas. A TCM foi determinada medindo-se diariamente o diâmetro das colônias em dois sentidos diametralmente opostos, com auxílio de uma régua milimetrada durante seis dias, tempo suficiente para que qualquer um dos isolados avaliados atingissem o diâmetro completo da placa. Os dados gerados foram utilizados para o cálculo das taxas médias de crescimento, em  $\text{mm}\cdot\text{dia}^{-1}$  (Cai et al., 2009). A cor da colônia foi determinada no último dia de avaliação da TCM com o auxílio da Carta Munsell- Soil Color Charts - Washable-Edition (Munsell, 2000).

Para a caracterização morfológica foram avaliados o tamanho e formato de 50 conídios e apressórios escolhidos aleatoriamente. Os conídios foram avaliados no último dia de avaliação da TCM a partir da confecção de lâminas semipermanentes com o auxílio de um microscópio com ocular micrométrica. Para indução da formação do apressório dos isolados em estudo, utilizou-se a técnica de microcultivo em que pedaços de meio BDA de aproximadamente  $10\text{ mm}^2$  foram transferidos para o centro de lâminas presentes no interior de placas de Petri forrada com papel filtro esterilizado. Após, inoculou-se os quatro lados do meio BDA com esporos oriundos da respectiva colônia de cada isolado, e uma lamínula estéril foi colocada sobre o meio BDA inoculado. As placas foram mantidas a temperatura de  $25^\circ\text{C}$  sob fotoperíodo de 12h e após sete dias, o formato e o tamanho do apressório formado na parte inferior da lamínula foi registrado. Os formatos de conídios

e apressórios foram avaliados de acordo com Sutton (1980). O experimento foi implementado em Delineamento em Blocos Casualizados onde cada placa constituiu a parcela experimental. Os valores médios da TCM, largura e comprimento dos conídios e apressórios foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

### **3.6 Testes de patogenicidade em mudas de pinha**

Mudas de pinha obtidas de viveiros comerciais foram mantidas em vasos em casa de vegetação. As necessidades nutricionais das mudas foram supridas de acordo com as recomendações para a cultura (Cordeiro et al., 2000). Sete meses após o transplântio das mudas para os vasos, quando estas atingiram aproximadamente 40 cm de altura, foi realizada a inoculação dos isolados via aspersão de esporos sob toda a superfície do limbo foliar (face adaxial) de acordo com metodologia descrita por Cai et al. (2009).

Para obtenção do inóculo, os quatorze isolados de *Colletotrichum* foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA e mantidos em incubadora tipo BOD a  $25\pm 2^\circ\text{C}$  sob fotoperíodo de 12h durante quatorze dias. Após, para cada isolado, foi preparado uma suspensão de conídios na concentração de  $1,0 \times 10^6$  esporos/ml. A suspensão de conídios foi calibrada com auxílio da Câmara de Neubauer (hemocitômetro). As plantas na pré e pós-inoculação permaneceram por 24 e 48 horas, respectivamente, em condições de câmara úmida a fim de fornecer condições ideais de umidade e temperatura para iniciar os processos de germinação e penetração nos tecidos do hospedeiro.

O experimento foi realizado em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com 3 repetições. A parcela experimental foi representada por uma planta e a testemunha foi constituída por mudas pulverizadas apenas com água destilada e esterilizada. Avaliações do aparecimento e desenvolvimento de sintomas foram realizadas semanalmente durante 30 dias

após a inoculação. Para a quantificação da severidade utilizou-se a escala diagramática desenvolvida para a cultura da pinheira por Correia et al. (2011) (Figura 1). Para aplicação da escala diagramática, avaliou-se as três primeiras folhas da parte inferior de cada planta, totalizando nove folhas/ tratamento (isolado).

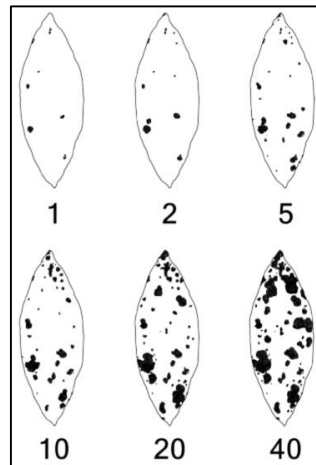


Figura 1 Escala diagramática para avaliação da severidade da antracnose em pinha. Abaixo de cada folha é indicado os níveis, em porcentagem, de área lesionada. Fonte: Correia et al. (2011).

O reisolamento do patógeno foi realizado das margens da lesão e este cultivado em meio BDA a temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , em BOD, para comparação das suas características morfológicas com o isolado originalmente inoculado.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Isolados obtidos

Um total de 84 isolados de *Colletotrichum* foram obtidos de oito espécies de *Annona* apresentando sintomas de antracnose ou mumificação, sendo elas *A. muricata*, *A. squamosa*, *A. reticulata*, *A. cacans*, *A. crassiflora*, *A. squamosa* x *A. cherimola* (híbrido) e duas espécies de *Annona* nativas não identificadas devido ao período de coleta ter sido realizado no momento em que não havia floração e frutificação (Tabela 1).

Dentre os 84 isolados, dezenove foram obtidos a partir de frutos com sintoma de mumificação. Os demais isolados foram oriundos de folhas, flores e frutos com sintoma de antracnose. Nas folhas foram observadas lesões de cor marrom-escuro a enegrecida de contorno irregular, às vezes com o centro esbranquiçado, no caso de lesões mais velhas. Em flores havia o escurecimento das pétalas.

### 4.2 Análises filogenéticas

A análise inicial das sequências do gene parcial GAPDH obtidas para 31 isolados de *Colletotrichum* pelo método de MP revelou que os isolados agruparam em três diferentes complexos, ‘gloeosporioides’, ‘acutatum’ e ‘boninense’ (Figura 2). Os resultados demonstram ainda a distribuição destes isolados em maior número no complexo de espécies *C. gloeosporioides*. Os isolados de anonáceas deste estudo agruparam com isolados de referência de *C. fructicola*, *C. gloeosporioides stricto sensu*, *C. theobromicola*, *C. nymphaeae* e *C. karstii*. Além disso, dentro do complexo ‘gloeosporioides’, foi formado um grupo monofilético bem suportado (valor de *bootstrap* de 93%) apenas com isolados de anonáceas. Devido estes isolados terem formado um clado bem suportado e possivelmente se tratarem de uma nova espécie, este grupo monofilético foi denominado de *Colletotrichum* sp.1.



Os isolados CAA197, CAA207, CAA163, CAA28 e CAA176 agruparam dentro do complexo ‘gloeosporioides’, entretanto, não apresentaram boa resolução a partir da análise deste gene não sendo possível a sua identificação. Este grupo foi então denominado neste estudo de *Colletotrichum* não determinado 1 (*Colletotrichum* n.d.1). Dentro do complexo ‘boninense’ o isolado CAA95 também não foi resolvido a partir da análise filogenética deste gene, desta forma foi denominado de *Colletotrichum* não determinado 2 (*Colletotrichum* n.d.2). No complexo ‘acutatum’ foi formado três grupos filogeneticamente distintos. Três isolados (CAA206, CAA201 e CAA196) agruparam com isolados representantes da espécie tipo *C. nymphaeae*, mas o clado não teve bom suporte *bootstrap*. Os outros dois grupos não apresentaram boa resolução, desta forma foram denominados de *Colletotrichum* não determinado 3 (*Colletotrichum* n.d.3) (Figura 2). O alinhamento utilizado na análise do gene GAPDH para os 31 isolados analisados consistiu de um tamanho de fragmento de 276 pb, dos quais 166 sítios foram informativos.

Para constituir a subamostra de quatorze isolados de *Colletotrichum*, a partir dos agrupamentos gerados pela árvore GAPDH, foram selecionados dois isolados representando *Colletotrichum* n.d.1 (CAA197 e CAA207), um isolado representando a espécie *C. fructicola* (CAA137), um isolado representando *Colletotrichum* sp.1 (CAA2), dois isolados representando a espécie *C. gloeosporioides* (CAA115/1 e CAA157) e um isolado representando a espécie *C. theobromicola* (CAA162) dentro do complexo ‘gloeosporioides’. No complexo ‘boninense’ dois isolados (CAA81 e CAA208/1) representando a espécie *C. karstii* e um isolado representando *Colletotrichum* n.d.2 (CAA95). No complexo de espécies *C. acutatum* os isolados CAA5 e CAA199 foram selecionados representando *Colletotrichum* n.d.3 e os isolados CAA206 e CAA201 representando a espécie *C. nymphaeae*.

A amplificação dos genes ACT e TUB2 para estes quatorze isolados de *Colletotrichum* selecionados, não gerou boas sequências para quatro

isolados, sendo eles, os isolados CAA115/1, CAA208/1, CAA206 e CAA199. Logo, estes isolados não puderam ser analisados nas árvores individuais para cada um destes genes e também na árvore combinada. O alinhamento utilizado na análise do gene ACT para os isolados de *Colletotrichum* teve um tamanho de fragmento de 289 pb, dos quais 100 sítios foram informativos. O gene TUB2 teve um tamanho de fragmento de 425 pb, destes, 132 sítios foram informativos.

As árvores individuais de TUB2 e ACT tiveram a maioria dos agrupamentos congruentes pelo método de MP com a árvore de GAPDH. Como não foi observado nenhum conflito entre as topologias das árvores de genes individuais com base em ACT, TUB2 e GAPDH, as sequências foram combinadas e analisadas por MP e Inferência Bayesiana (Figura 5). As topologias das árvores combinadas obtidas pelos métodos de MP e análise Bayesiana foram congruentes. A Figura 5 mostra a árvore obtida pelo método de Inferência Bayesiana com os valores de probabilidade posterior e *bootstrap* acima dos ramos. Foram identificadas cinco espécies já conhecidas *C. fructicola*, *C. theobromicola*, *C. gloeosporioides stricto sensu* no complexo ‘gloeosporioides’; *C. nymphaeae* no complexo ‘acutatum’; e *C. karstii* no complexo ‘boninense’. Cinco isolados não foram filogeneticamente resolvidos a partir da análise das três regiões combinadas, sendo eles, CAA2, CAA197 e CAA207 no complexo ‘gloeosporioides’, o isolado CAA5 no complexo ‘acutatum’ e o isolado CAA95 no complexo ‘boninense’. Como foi escolhido apenas o isolado CAA2 representativo do grupo monofilético *Colletotrichum* sp.1 a partir do agrupamento gerado na árvore GAPDH e, na análise combinada este não apresentou boa resolução, não foi possível concluir de que se trate de uma nova linhagem filogenética. Outros isolados representantes do grupo monofilético *Colletotrichum* sp.1 devem então ser analisados para que se conclua a respeito.

As sequências combinadas para os três genes estudados resultaram em um total de 990 caracteres alinhados, sendo: 1-289 bp (ACT), 290-714 bp

(TUB2) e 715-990 bp (GAPDH). Do total de caracteres alinhados, 398 caracteres foram informativos.

A espécie *C. gloeosporioides stricto sensu* foi isolada de *A. reticulata* e *A. muricata* apresentando sintomas de antracnose ou mumificação. A espécie *C. fructicola* de *A. crassiflora* apresentando sintomas de antracnose. *C. theobromicola* foi isolada das espécies *A. muricata*, *Annona* sp., *A. crassiflora*, *A. squamosa* x *A. cherimola* apresentando sintomas de antracnose ou mumificação. A espécie *C. karstii* a partir da hospedeira *A. crassiflora* apresentando sintomas de mumificação ou antracnose. *C. nymphaeae* foi isolada de *A. squamosa*, *A. squamosa* x *A. cherimola* e *A. muricata* apresentando sintomas de mumificação ou antracnose. Isolados representantes de *Colletotrichum* sp.1 foram provenientes de *A. muricata*, *A. squamosa*, *A. crassiflora* e *A. cacans* apresentando sintoma de antracnose ou mumificação. *Colletotrichum* n.d.1 em associação a sintoma de antracnose ou mumificação em *A. squamosa*, *A. reticulata* e *A. squamosa* x *A. cherimola*. *Colletotrichum* n.d.2 associada a antracnose de *Annona* sp. (espécie nativa) e *Colletotrichum* n.d.3 associada a antracnose de *A. squamosa*, *A. reticulata* e *A. squamosa* x *A. cherimola*. Estes resultados demonstram a diversidade de espécies de *Colletotrichum* associadas com anonáceas nas regiões de estudo, com a predominância do grupo pertencente ao complexo de espécies *C. gloeosporioides*.

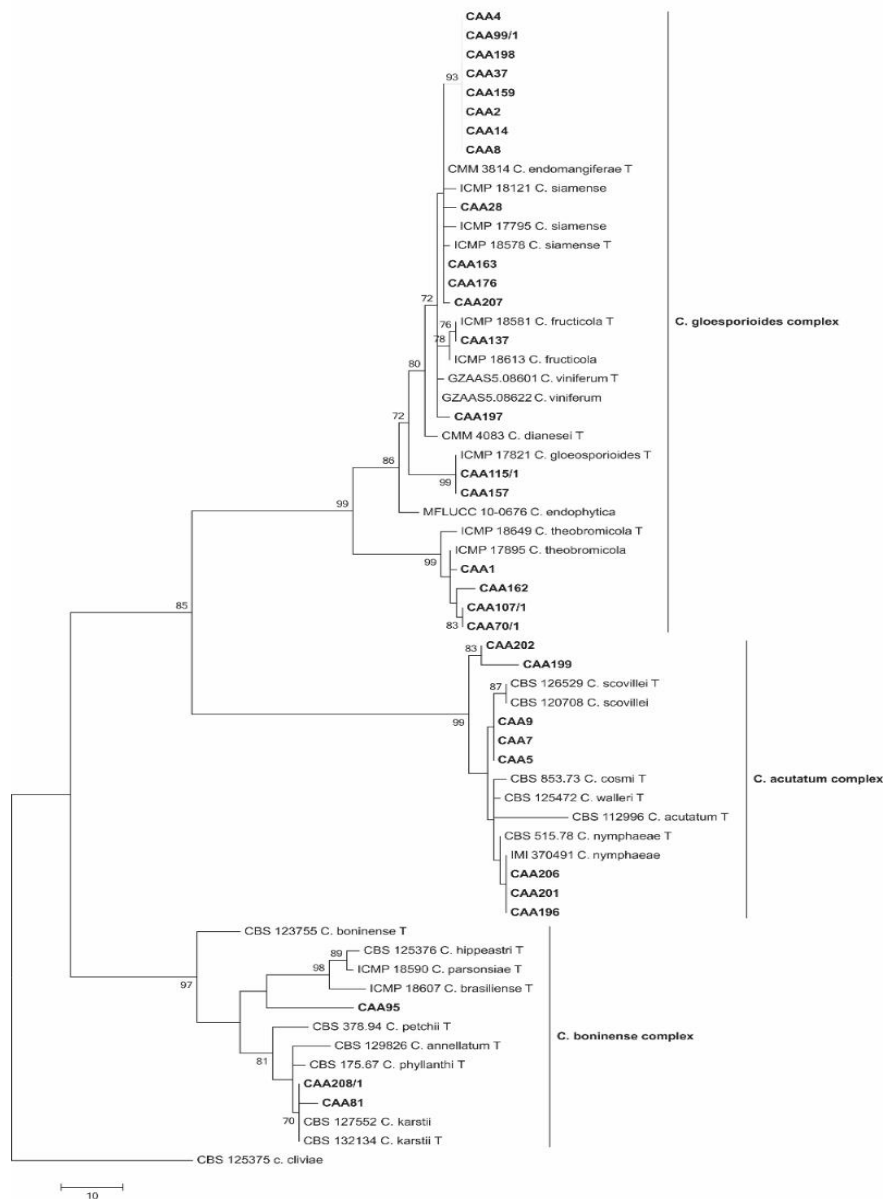


Figura 2 Árvore filogenética de Máxima Parcimônia para espécies de *Colletotrichum*, baseada em sequências do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. *C. cliviae* utilizado como outgroup. A letra “T” na frente do nome da espécie indica isolado tipo. Os valores de *bootstrap*, 1.000 repetições, são indicados em porcentagem acima e abaixo dos internódios. Abreviações: CBS – Centraalbureau voor Schimmel cultures, Utrecht, The Netherlands; CAA - Coleção Cláudia Alves de Almeida; ICMP- International Collection of Microorganisms from Plants, Landcare Research, Auckland, New Zealand; CMM- Culture Collection of Phythopathogenic Fungi “Prof. Maria Menezes”, Recife, Brazil; IMI - CABI Genetic Resource Collection, UK; GZAAS- Guizhou Academy of Agricultural Sciences Herbarium, China; MFLUCC- Mae Fah Luang University Culture Collection, Thailand.

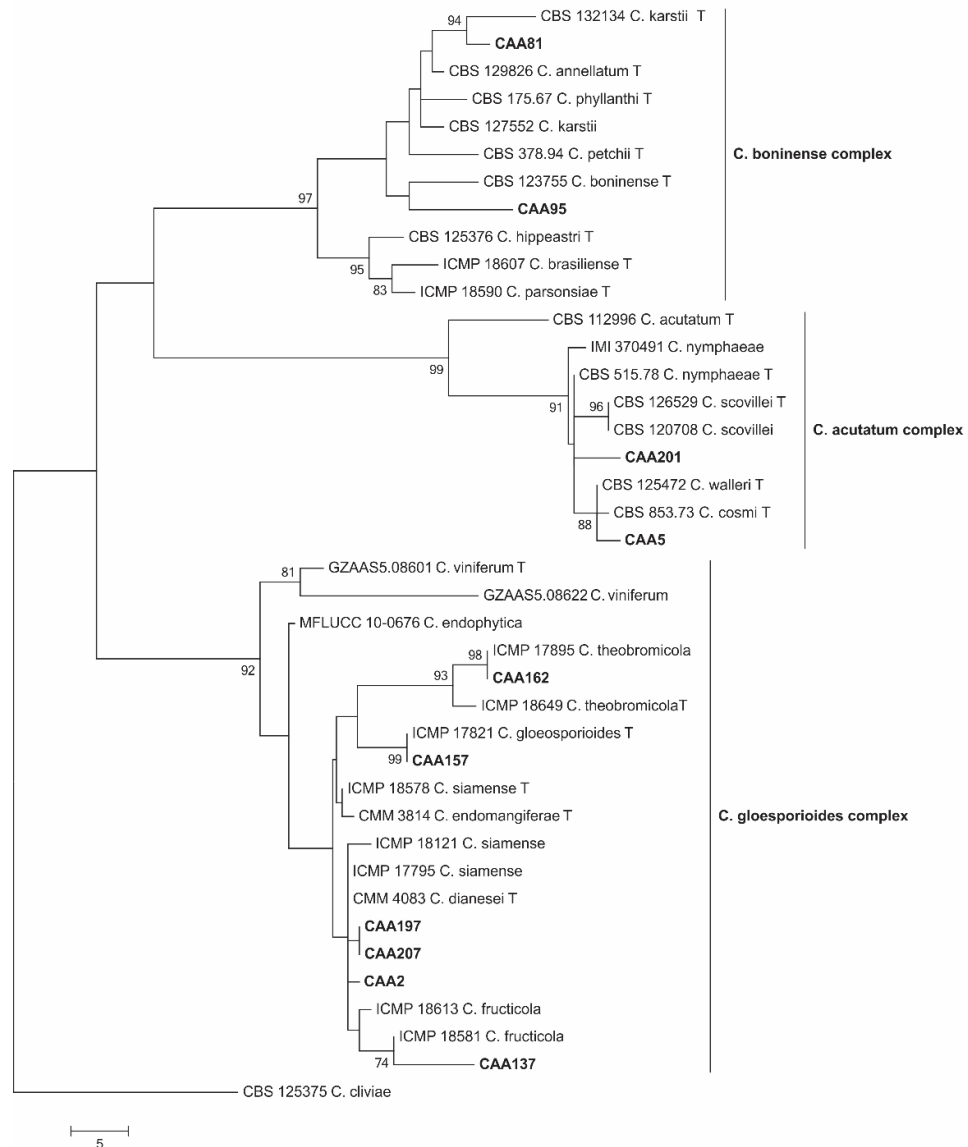


Figura 3 Árvore filogenética de Máxima Parcimônia para espécies de *Colletorichum*, baseada em seqüências do gene actina. *C. cliviae* utilizado como outgroup. A letra “T” na frente do nome da espécie indica isolado tipo. Os valores de bootstrap, 1.000 repetições, são indicados em porcentagem acima e abaixo dos internódios. Abreviações: CBS - Centraalbureau voor Schimmel cultures, Utrecht, The Netherlands; CAA - Coleção Cláudia Alves de Almeida; ICMP- International Collection of Microorganisms from Plants, Landcare Research, Auckland, New Zealand; CMM- Culture Collection of Phythopathogenic Fungi “Prof. Maria Menezes”, Recife, Brazil; IMI - CABI Genetic Resource Collection, UK; GZAAS- Guizhou Academy of Agricultural Sciences Herbarium, China; MFLUCC- Mae Fah Luang University Culture Collection, Thailand.

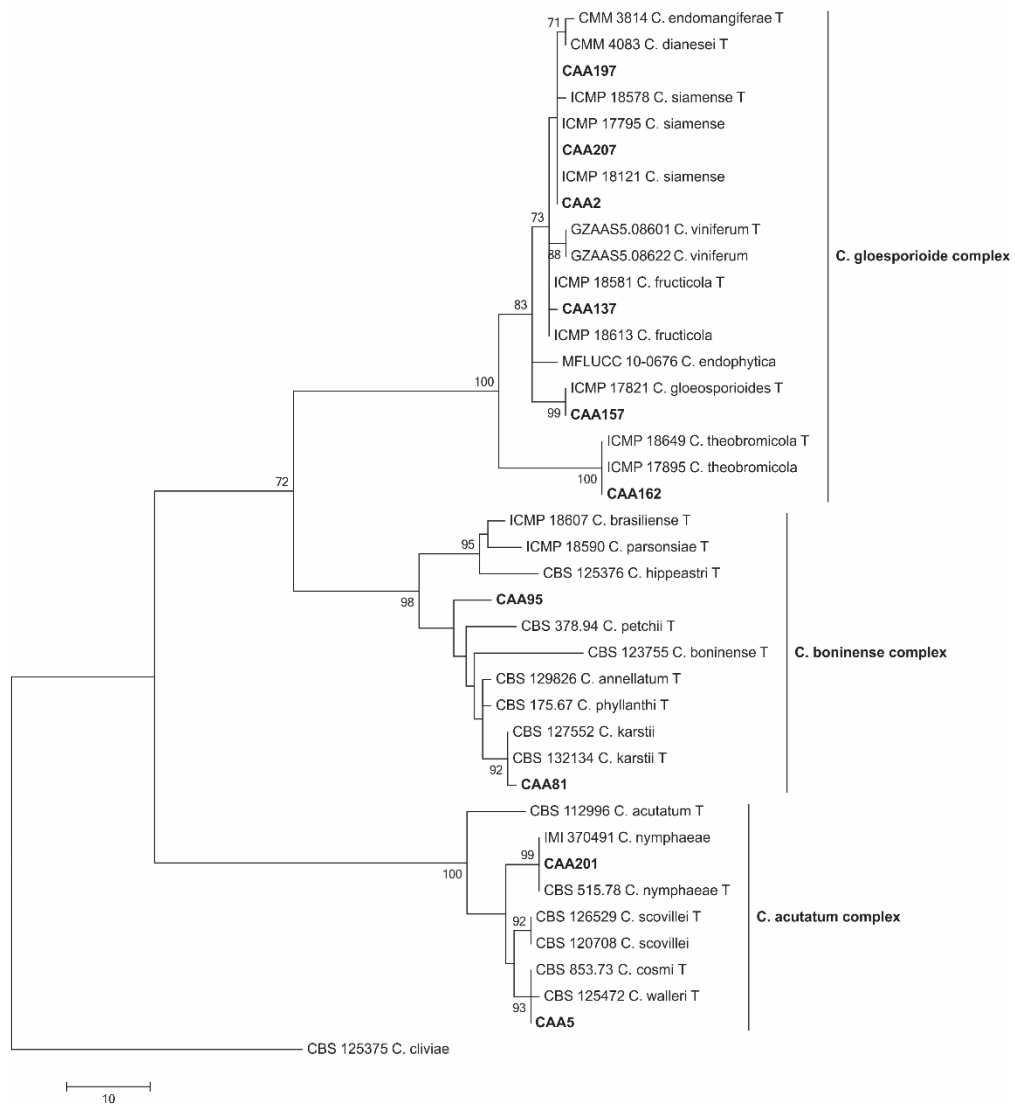


Figura 4 Árvore filogenética de Máxima Parcimônia para espécies de *Colletotrichum*, baseada em sequências do gene  $\beta$ -tubulina. *C. cliviae* utilizado como outgroup. A letra “T” na frente do nome da espécie indica isolado tipo. Os valores de bootstrap, 1.000 repetições, são indicados em porcentagem acima e abaixo dos internódios. Abreviações: CBS - Centraalbureau voor Schimmel cultures, Utrecht, The Netherlands; CAA - Coleção Cláudia Alves de Almeida; ICMP- International Collection of Microorganisms from Plants, Landcare Research, Auckland, New Zealand; CMM- Culture Collection of Phytopathogenic Fungi “Prof. Maria Menezes”, Recife, Brazil; IMI - CABI Genetic Resource Collection, UK; GZAAS- Guizhou Academy of Agricultural Sciences Herbarium, China; MFLUCC- Mae Fah Luang University Culture Collection, Thailand.

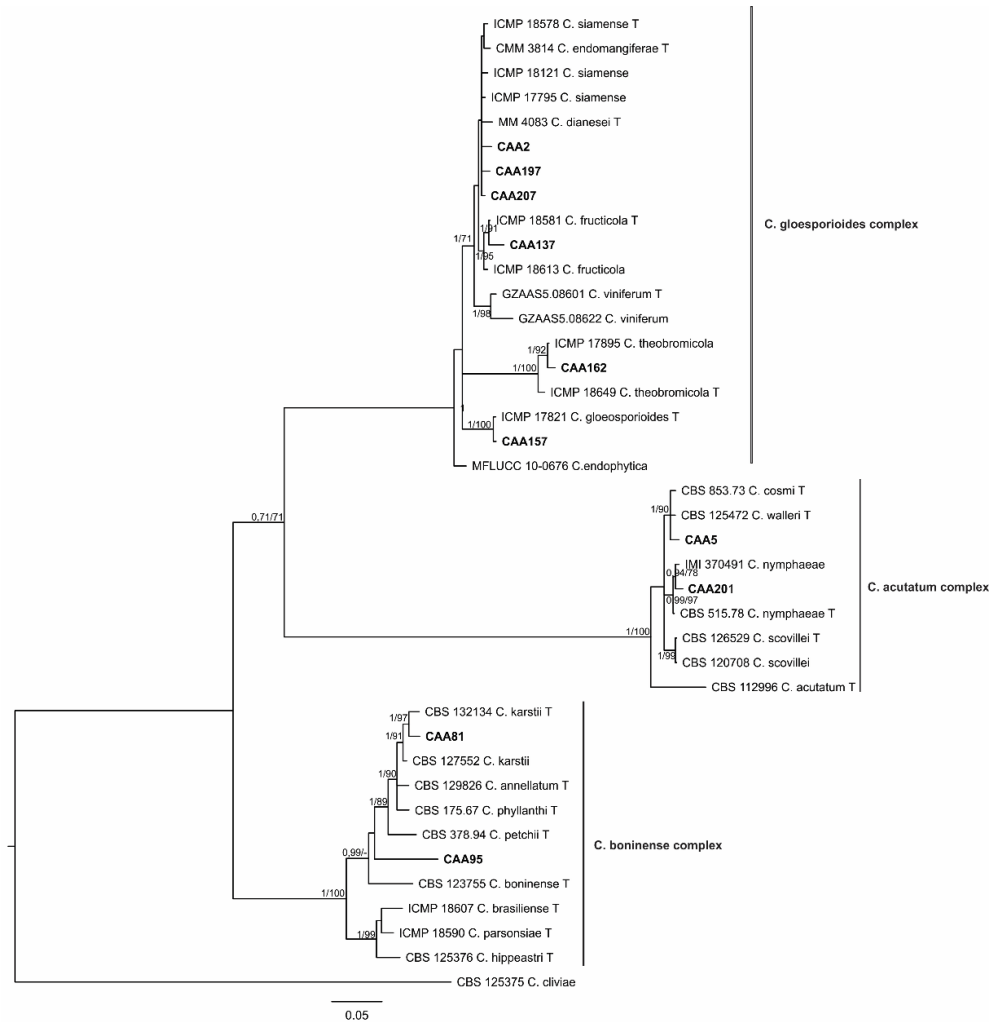


Figura 5 Árvore filogenética de Inferência Bayesiana para espécies de *Colletotrichum*, baseada em sequências concatenadas dos genes gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, actina e  $\beta$ -tubulina. *C. cliviae* utilizado como outgroup. A letra “T” na frente do nome da espécie indica isolado tipo. Os valores de probabilidade posterior obtidos na análise Bayesiana e de bootstrap a partir da análise de Máxima Parcimônia (1.000 repetições) são indicados acima e abaixo dos internódios. Abreviações: CBS - Centraalbureau voor Schimmel cultures, Utrecht, The Netherlands; CAA - Coleção Cláudia Alves de Almeida; ICMP- International Collection of Microorganisms from Plants, Landcare Research, Auckland, New Zealand; CMM- Culture Collection of Phythopathogenic Fungi “Prof. Maria Menezes”, Recife, Brazil; IMI - CABI Genetic Resource Collection, UK; GZAAS- Guizhou Academy of Agricultural Sciences Herbarium, China; MFLUCC- Mae Fah Luang University Culture Collection, Thailand.

### 4.3 Avaliação de marcadores morfológicos e características da cultura

As características morfológicas e da cultura avaliadas para os quatorze isolados de *Colletotrichum* estão apresentadas nas Tabelas 3 e 4 e Figura 6. Procurou-se relações entre estas características com as espécies identificadas baseado em filogenia molecular ou com os complexos de espécies ‘gloeosporioides’, ‘acutatum’ e ‘boninense’.

Todos os isolados dentro do complexo ‘acutatum’ apresentaram cor da colônia salmão e TCM média variando de 6,3-11,1 mm.dia<sup>-1</sup>. Estes isolados apresentaram abundante esporulação com formação de conidiomatas em anéis concêntricos. Não foi observada a presença de setas, microescleródios ou teleomorfo em nenhum dos isolados dentro do complexo. De um modo geral, no complexo, ocorreram os três formatos de conídios, cilíndrico, reto e fusiforme, não sendo observada a predominância de conídios fusiforme, relatado para o complexo na literatura. O comprimento médio dos conídios no complexo variou de 12-13 µm e largura média de 3,7- 4,3 µm. Em relação ao apressório, ocorreram os dois formatos no complexo, ovóide e irregular. O comprimento médio do apressório variou de 9,3-9,8 µm e a largura média de 7,7-7,9 µm. O isolado CAA201, identificado como *C. nymphaeae* apresentou a maior TCM dentre os isolados no complexo ‘acutatum’, 11,1 mm.dia<sup>-1</sup>. A média do comprimento e largura dos conídios para esta espécie foi de 12,0 µm e 3,7 µm, respectivamente.

No complexo ‘boninense’ os isolados representando *Colletotrichum* n.d.2 (CAA95) e *C. karstii* (CAA208/1) apresentaram cor da colônia marrom-escuro. O isolado CAA81, agrupado também neste complexo, identificado como *C. karstii* apresentou cor da colônia cinza-claro. A TCM média observada para estes isolados variou de 9,3-10,7 mm.dia<sup>-1</sup>, com a menor taxa observada para a espécie *C. karstii* (CAA81). Não foi observada a presença de setas, microescleródios ou a formação de teleomorfo em nenhum dos isolados. O comprimento médio dos conídios no complexo variou de 13,9-14,1 µm e a largura média de 5,0-6,4 µm. O formato dos conídios observado foi cilíndrico



e clavado. Os valores médio de comprimento e largura do apressório para estes isolados variou de 9,1-9,6  $\mu\text{m}$  e 7,7-8,0  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Neste complexo, os apressórios também tiveram formato irregular e ovóide.

A variação da taxa de crescimento médio dentro do complexo de espécies 'gloeosporioides' foi de 10,8-14,0  $\text{mm.dia}^{-1}$ . Neste complexo, a espécie *C. theobromicola* apresentou a menor taxa de crescimento médio. Os valores médio de comprimento e largura dos conídios neste complexo variaram de 11,7-15,0  $\mu\text{m}$  e de 3,9-4,5  $\mu\text{m}$ , respectivamente. *C. theobromicola* teve a média de comprimento de 15,0  $\mu\text{m}$  e largura de 4,3  $\mu\text{m}$ . A espécie *C. gloeosporioides* (representada por dois isolados, CAA115/1 e CAA157) apresentou média de comprimento e largura de 14,2 e 11,9  $\mu\text{m}$  e 4,4 e 3,9  $\mu\text{m}$ , respectivamente. *C. fructicola* teve tamanho médio de comprimento e largura de 14,0  $\mu\text{m}$  e 4,5  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Os isolados CAA197, CAA207 e CAA2 apresentaram comprimento de 11,9, 13,2 e 11,7  $\mu\text{m}$ , respectivamente, e largura de 4,1, 4,0 e 4,1  $\mu\text{m}$ , respectivamente. A cor da colônia para as espécies *C. theobromicola*, *C. gloeosporioides stricto sensu* (isolado CAA115/1 e CAA157) e *C. fructicola* foi salmão, cinza escuro (isolado CAA115/1), marrom claro (isolado 157) e cinza escuro, respectivamente. O isolado CAA197 teve a colônia de cor branca e os isolados CAA207 e CAA2 cor cinza claro. O comprimento e largura do apressório para as espécies *C. theobromicola*, *C. gloeosporioides stricto sensu* (isolados CAA115/1 e CAA157), *C. fructicola* e para os isolados CAA197, CAA207 e CAA2 foram, respectivamente, 9,3 e 7,9  $\mu\text{m}$ , 9,0 e 8,0  $\mu\text{m}$ , 9,3 e 7,7  $\mu\text{m}$ , 9,7 e 7,7  $\mu\text{m}$ , 9,3 e 7,6  $\mu\text{m}$ , 8,9 e 7,8  $\mu\text{m}$ , 9,3 e 7,6  $\mu\text{m}$ .

Microescleródios foram observados nas espécies *C. theobromicola*, *C. gloeosporioides*, *C. fructicola* e nos dois isolados de *Colletotrichum* (CAA207 e CAA2). Setas foram verificadas em *C. theobromicola*, *C. fructicola* e nos isolados CAA207 e CAA2.

O tamanho e formato de conídios são caracteres instáveis, dependentes de fatores de cultivo e também da sua idade, sendo, portanto, refletido nas suas dimensões. Estes dados, não foram informativos o suficiente

para suportar a separação das espécies filogenéticas determinadas neste trabalho e/ou para separação a nível de complexos.

Tabela 3 Caracteres culturais observados em colônias de quatorze isolados de *Colletotrichum* oriundos de *Annona* spp. aos seis dias de idade, cultivadas sob fotoperíodo de 12 horas à temperatura de 25 °C

Isolado	Espécie	Complexo de espécies	Cor da colônia		Micro-escleródios	Teleomorfo	Setas	TCM <sup>d</sup> (mm.dia <sup>-1</sup> )
			Frente	Verso				
CAA5	<i>Colletotrichum</i> n.d.3	'acutatum'	Salmão 10 YR-8/1 <sup>g</sup>	Salmão 10 YR-8/2	A <sup>h</sup>	A	A	6,28 a <sup>e</sup>
CAA199	<i>Colletotrichum</i> n.d.3		Salmão 10 YR-8/1	Salmão 10 YR-8/2	A	A	A	8,97 b
CAA206	<i>C. nymphaeae</i>		Salmão 10 YR-8/1	Salmão 10 YR-8/2	A	A	A	10,20 b
CAA201	<i>C. nymphaeae</i>		Salmão 10 YR-8/1	Salmão 10 YR-8/2	A	A	A	11,08 b
CAA81	<i>C. karstii</i>	'boninense'	Cinza claro Gley2 7/5B	Cinza claro Gley2 7/5B	A	A	A	9,28 b
CAA208/1	<i>C. karstii</i>		Marrom escuro Gley2 7/10B	Marrom escuro Gley2 7/10B	A	A	A	10,08 b
CAA95	<i>Colletotrichum</i> n.d.2		Marrom escuro Gley2 7/10B	Marrom escuro Gley2 7/10B	A	A	P	10,70 b
CAA162	<i>C. theobromicola</i>	'gloeosporioides'	Salmão 10 YR-8/1	Salmão 10 YR-8/2	P	A	P	10,75 b
CAA197	<i>Colletotrichum</i> n.d.1		Branca Gley1 8/N	Creme Gley2 7/10B	A	A	A	11,67 c
CAA115/1	<i>C. gloeosporioides</i>		Cinza escuro Gley2 7/10B	Cinza escuro Gley2 7/5B	P	A	A	12,86 c

“continua”

Tabela 3 “conclusão”

Isolado	Espécie	Complexo de espécies	Cor da colônia		Micro-escleródios	Teleomorfo	Setas	TCM <sup>d</sup> (mm.dia <sup>-1</sup> )
			Frente	Verso				
CAA2	<i>Colletotrichum</i> sp.1	‘gloeosporioides’	Cinza claro Gley2 7/5B	Marrom escuro Gley2 7/10B	P	A	P	13,64 <b>c</b>
CAA137	<i>C. fructicola</i>		Cinza escuro Gley2 7/10B	Cinza escuro Gley2 7/10B	P	A <sup>f</sup>	P	14,00 <b>c</b>
CAA207	<i>Colletotrichum</i> sp.2		Cinza claro Gley1 8/N	Cinza escuro Gley2 7/10B	P	A	A	14,00 <b>c</b>

<sup>d</sup>TCM = Taxa de crescimento micelial em mm.dia<sup>-1</sup>. <sup>e</sup>Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. <sup>f</sup>Ocorreu a formação do teleomorfo apenas em placas com 30 dias de idade. <sup>g</sup>Os códigos abaixo da cor representa a codificação para cada cor na Carta Munsell. <sup>h</sup>P = presente, A = ausente.

Tabela 4 Caracteres morfológicos observados em colônias de quatorze isolados de *Colletotrichum* oriundos de *Annona* spp. aos seis dias de idade, cultivadas sob fotoperíodo de 12 horas à temperatura de 25 °C

Isolado	Espécie	N° avaliado	Formato dos conídios (%)			Tamanho médio dos <sup>g</sup> conídios (µm)		Formato dos apressórios (%)		Tamanho médio dos <sup>g</sup> apressórios (µm)	
			Cilíndrico	Fusiforme	Clavado	Comp.	Larg.	Ovóide	Irregular	Comp.	Larg.
						Média (Mín.-Máx.) <sup>h</sup>	Média (Mín.-Máx.)			Média (Mín.-Máx.)	Média (Mín.-Máx.)
CAA5	<i>Colletotrichum</i> n.d.3	50	100	0	0	12,80 <b>b</b> (11-15)	3,98 <b>b</b> (3-5)	10	90	9,32 <b>a</b> (5-16)	7,93 <b>a</b> (5-11)
CAA199	<i>Colletotrichum</i> n.d.3	50	46	40	14	11,98 <b>a</b> (11-14)	4,16 <b>b</b> (3-5)	13	87	9,82 <b>a</b> (7,5-13)	7,73 <b>a</b> (5-11)
CAA206	<i>C. nymphaeae</i>	50	74	24	2	12,96 <b>b</b> (11-15)	4,32 <b>c</b> (4-5)	32	68	9,36 <b>a</b> (5-16)	7,90 <b>a</b> (5-10)
CAA201	<i>C. nymphaeae</i>	50	0	6	94	11,98 <b>a</b> (10-14)	3,72 <b>a</b> (3-4)	74	26	9,38 <b>a</b> (7-13)	7,75 <b>a</b> (5-10)
CAA81	<i>C. karstii</i>	50	78	0	22	13,92 <b>d</b> (11-17)	5,04 <b>e</b> (5-6)	11	89	9,31 <b>a</b> (5-16)	7,71 <b>a</b> (5-9)
CAA208 /1	<i>C. karstii</i>	50	98	0	2	14,10 <b>d</b> (11-18)	6,38 <b>f</b> (5-7)	36	64	9,55 <b>a</b> (5-13)	7,91 <b>a</b> (5-11)
CAA95	<i>Colletotrichum</i> n.d.2	50	100	0	0	14,10 <b>d</b> (12-17)	5,02 <b>e</b> (5-6)	22	78	9,07 <b>a</b> (5-16)	7,96 <b>a</b> (5-11)
CAA162	<i>C. theobromicola</i>	50	10	0	90	15,02 <b>e</b> (13-17)	4,28 <b>c</b> (4-5)	69	31	9,30 <b>a</b> (5-16)	7,85 <b>a</b> (6-9)

“continua”

Tabela 4 “conclusão”

Isolado	Espécie	N° avaliado	Formato dos conídios (%)			Tamanho médio dos <sup>g</sup> conídios (µm)		Formato dos apressórios (%)		Tamanho médio dos <sup>g</sup> apressórios (µm)	
			Cilíndrico	Fusiforme	Clavado	Comp.	Larg.	Ovóide	Irregular	Comp.	Larg.
						Média (Mín.- Máx.) <sup>h</sup>	Média (Mín.- Máx.)			Média (Mín.- Máx.)	Média (Mín.- Máx.)
CAA115 /1	<i>C. gloeosporioides</i>	50	100	0	0	14,18 <b>d</b> (13-16)	4,42 <b>d</b> (4-5)	49	51	9,01 <b>a</b> (5-16)	7,95 <b>a</b> (5-7)
CAA157	<i>C. gloeosporioides</i>	50	98	0	2	11,88 <b>a</b> (10-14)	3,88 <b>a</b> (3-5)	84	16	9,26 <b>a</b> (5-13)	7,73 <b>a</b> (5-8)
CAA2	<i>Colletotrichum</i> sp.1	50	100	0	0	11,70 <b>a</b> (9-14)	4,14 <b>b</b> (3-5)	88	12	9,34 <b>a</b> (5-16)	7,61 <b>a</b> (5-11)
CAA137	<i>C. fructicola</i>	50	98	0	2	13,96 <b>d</b> (13-16)	4,46 <b>d</b> (4-5)	85	15	9,69 <b>a</b> (5-16)	7,65 <b>a</b> (5-9)
CAA207	<i>Colletotrichum</i> n.d.1	50	88	2	10	13,22 <b>c</b> (11-15)	4,02 <b>b</b> (4-5)	23	77	8,92 <b>a</b> (5-16)	7,75 <b>a</b> (5-10)

<sup>g</sup>Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. <sup>h</sup>(Mín.-Máx.) = amplitude das dimensões dos esporos.

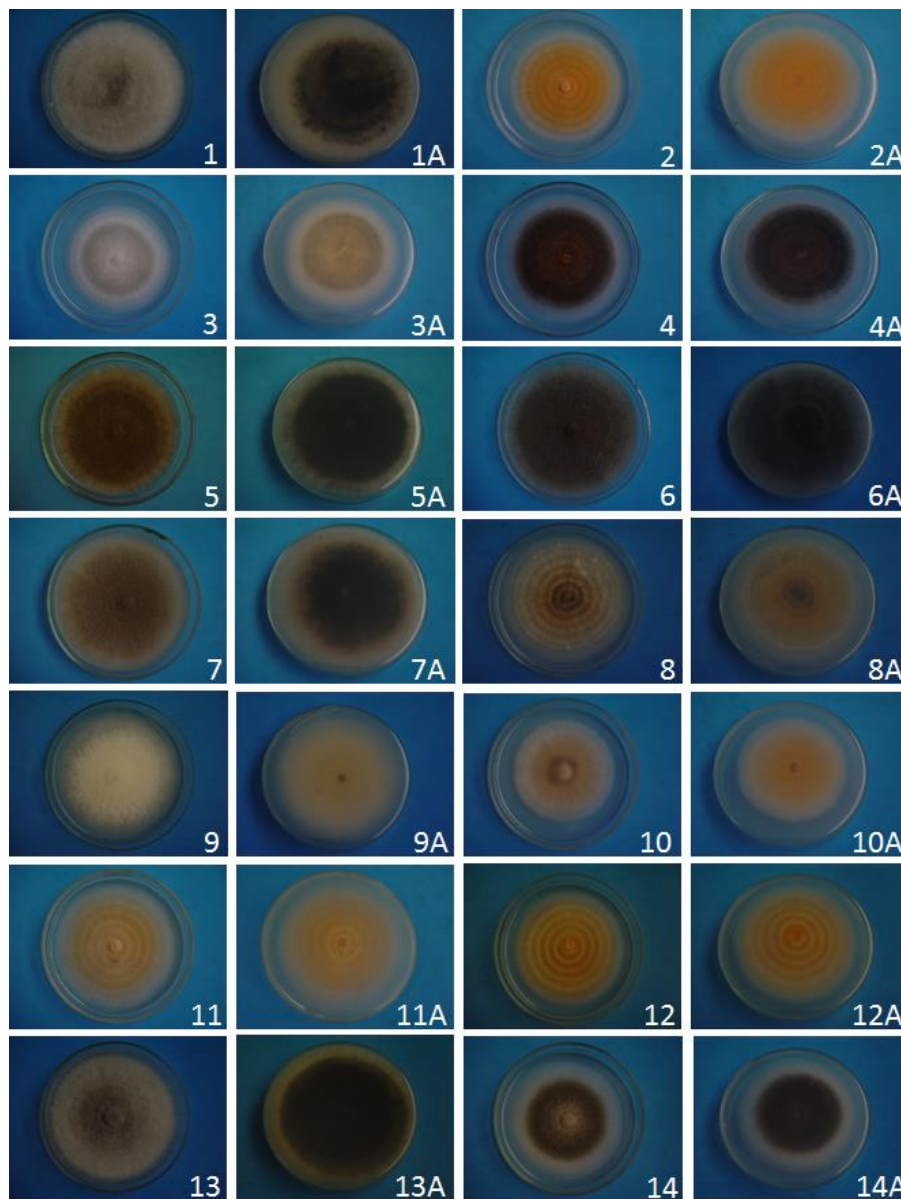


Figura 6 Colônias de isolados de *Colletotrichum* oriundos de anonáceas. 1-1A: Frente e verso *Colletotrichum* sp.1 (isolado CAA2); 2-2A: Frente e verso *Colletotrichum* n.d.3 (isolado CAA5); 3-3A: Frente e verso *C. karstii* (isolado CAA81); 4-4A: Frente e verso *Colletotrichum* n.d.2 (isolado CAA95); 5-5A: Frente e verso *C. gloeosporioides* (isolado CAA115/1); 6-6A: Frente e verso *C. fructicola* (isolado CAA137); 7-7A: Frente e verso *C. gloeosporioides* (isolado CAA157). 8-8A: Frente e verso *C. theobromicola* (isolado CAA162); 9-9A: Frente e verso *Colletotrichum* n.d.1 (isolado CAA197); 10-10A: Frente e verso *Colletotrichum* n.d.3 (isolado CAA199); 11-11A: Frente e verso *C. nymphaeae* (isolado CAA201); 12-12A: Frente e verso *C. nymphaeae* (isolado CAA206); 13-13A: Frente e verso *Colletotrichum* n.d.1 (isolado CAA207); 14-14A: Frente e verso *C. karstii* (isolado CAA208/1).

#### 4.4 Testes de patogenicidade

Plantas inoculadas com espécies de *Colletotrichum*, aos sete meses de idade, começaram a apresentar manchas foliares necróticas logo aos cinco dias após inoculação. O desenvolvimento da doença foi mais rápido entre 20 a 30 dias após inoculação. A necrose foliar foi predominante no ápice e nas extremidades do limbo da maioria das plantas inoculadas (Figura 7).

Todos os quatorze isolados de *Colletotrichum* inoculados foram capazes de desenvolver sintomas nas plantas de pinha nos dois testes realizados, primeira e segunda repetição do experimento. A aplicação da escala diagramática para a cultura da pinheira resultou em notas entre 0 a 20 e 0 a 40 para a primeira e segunda repetição, respectivamente. A média da severidade obtida a partir das lesões nas nove folhas de pinha avaliadas é apresentada na tabela 5. Para a maioria dos isolados, houve semelhança nas notas aplicadas quando comparada as duas repetições.

Não foi observado nenhum sintoma característico para uma determinada espécie ou complexo. O mesmo padrão de lesão foi observado para todos os isolados. Os sintomas iniciaram por toda a superfície do limbo foliar, entretanto, em alguns casos estes desenvolveram pouco e, na maioria, o que prevaleceu foram aqueles originados nas bordas da folha e no ápice, mesmo em plantas com lesões necróticas no centro do limbo foliar.

O reisolamento do patógeno das lesões em folha de pinheira e, posteriormente comparação dos isolados com os inicialmente obtidos, confirmaram que estes isolados apresentavam características morfológicas e cor da colônia semelhantes aos que foram inoculados.



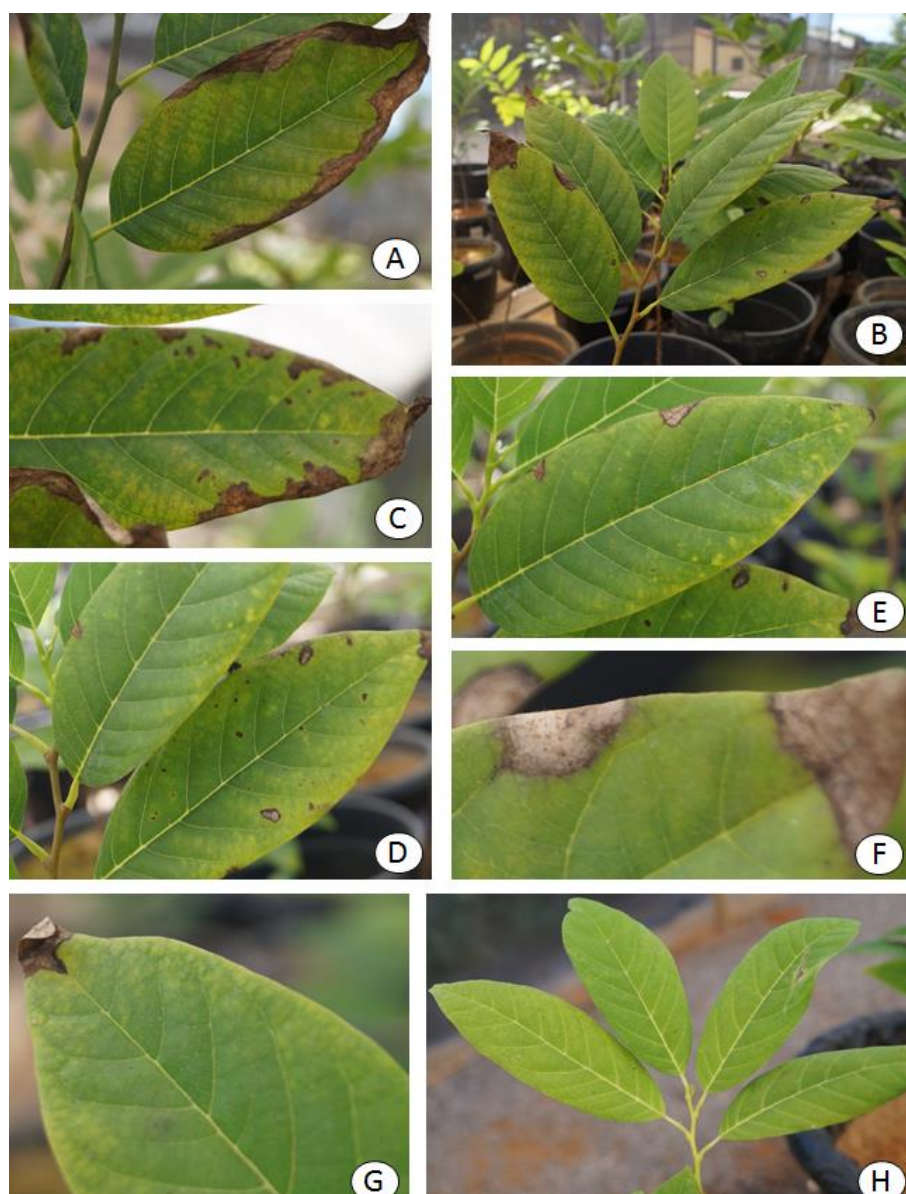


Figura 7 Plantas de pinha apresentando sintomas de antracnose. (A, B, C) Manifestação dos sintomas em maior expressão no ápice e nas extremidades do limbo foliar; (D) Lesões de contorno irregular bem características do patógeno; (E, F, G) Sintomas iniciais, anteriormente ao seu coalescimento; (F) Lesão apresentando estruturas do patógeno em sua superfície; (H) Testemunha inoculada com água.

Tabela 5 Severidade média da antracnose em mudas de pinha em teste de patogenicidade com isolados de *Colletotrichum*

Isolado	Espécie	Complexo de espécies	Repetição 1		Repetição 2	
			Nº de folhas avaliadas	Média (Min.-Max.)	Nº de folhas avaliadas	Média (Min.-Max.)
TESTEMUNHA	-	-	9	-	9	- <sup>a</sup>
CAA5	<i>Colletotrichum</i> n.d.3	'acutatum'	9	12,22 (5-20) <sup>b</sup>	9	12,78 (5-20) <sup>b</sup>
CAA199	<i>Colletotrichum</i> n.d.3		9	1,67 (1-5)	6	2,0 (1-5)
CAA206	<i>C. nymphaeae</i>		9	8,44 (2-20)	9	10,0 (5-20)
CAA201	<i>C. nymphaeae</i>		9	3,33 (0-5)	9	2,33 (0-5)
CAA81	<i>C. karstii</i>	'boninense'	9	2,67 (0-10)	3	10 (10)
CAA208/1	<i>C. karstii</i>		9	1,44 (1-5)	9	0,33 (0-1)
CAA95	<i>Colletotrichum</i> n.d.2		9	2,56 (0-5)	9	1,78 (0-5)
CAA162	<i>C. theobromicola</i>	'gloeosporioides'	9	0,33 (0-1)	9	0,0 0,0
CAA197	<i>Colletotrichum</i> n.d.1		9	1,56 (1-2)	9	1,0 (0-2)
CAA115/1	<i>C. gloeosporioides</i>		9	0,67 (0-2)	9	1,0 (0-2)

"continua"

Tabela 5 “conclusão”

Isolado	Espécie	Complexo de espécies	Repetição 1		Repetição 2	
			Nº de folhas avaliadas	Média (Min.-Max.)	Nº de folhas avaliadas	Média (Min.-Max.)
CAA157	<i>C. gloeosporioides</i>	‘gloeosporioides’	9	1,67 (0-5)	9	5,78 (0-10)
CAA2	<i>Colletotrichum</i> sp.1		9	0,22 (0-1)	9	0,44 (0-2)
CAA137	<i>C. fructicola</i>		9	5,22 (1-10)	9	13,44 (2-40)
CAA207	<i>Colletotrichum</i> sp.2		9	0,89 (0-2)	-	-

<sup>a</sup>“-”As folhas haviam caído durante o momento da avaliação. <sup>b</sup>Amplitude da severidade das lesões observadas nas nove folhas avaliadas.

## 5 DISCUSSÃO

Estudos filogenéticos multi-genes tem sido uma ferramenta molecular importante quando se trata de espécies de *Colletotrichum*, gerando dados confiáveis para a sua identificação e entendimento das relações evolutivas. Neste estudo, os dados gerados possibilitaram compreender as espécies de *Colletotrichum* que estão associadas a espécies de anonáceas exploradas comercialmente e também de algumas espécies nativas nas regiões estudadas.

Análise filogenética com base em sequências concatenadas de ACT, TUB2 e GAPDH mostrou que, embora *C. gloeoporioides stricto sensu* não seja a única espécie associada a doença antracnose nestas hospedeiras, o complexo de espécies *C. gloeosporioides* prevalece com o maior número de isolados agrupados e, conseqüentemente, o grupo que constitui o maior número de espécies responsáveis pela doença nestas frutíferas. Estes resultados corroboram com vários trabalhos recentemente publicados onde se tem confirmado a ocorrência de várias espécies dentro do complexo ‘gloeoporioides’ responsáveis pela antracnose de várias frutíferas de clima temperado e tropical, no Brasil e a nível mundial (Lima et al., 2013; Pholivong et al., 2010; Udayanga et al., 2013; Álvarez et al., 2014; Kamei et al., 2014; Rojas et al., 2010; Phrihastuti et al., 2009). A inespecificidade da maioria das espécies de *Colletotrichum*, aliada ao cultivo de várias frutíferas em um mesmo local ou em regiões geográficas próximas, torna enorme o potencial de dispersão de propágulos, sendo esta talvez, a principal explicação da predominância de espécies dentro deste complexo como os principais agentes responsáveis pela antracnose em frutíferas. Das espécies formalmente descritas e aceitas dentro do complexo de espécies *C. gloeosporioides*, poucas são as que apresentam especificidade ao hospedeiro, sendo, portanto, a maioria encontrada em uma vasta gama de plantas exploradas economicamente e em espécies nativas.

Além da espécie *C. gloeosporioides stricto sensu* encontrada neste trabalho associada a folhas e frutos de *A. reticulata* (condessa) e *A. muricata*

(graviola), respectivamente, outras quatro espécies de *Colletotrichum* foram também encontradas associadas a antracnose em anonáceas, *C. fructicola*, *C. theobromicola*, *C. karstii* e *C. nymphaeae*. Com exceção da espécie *C. gloeosporioides stricto sensu* e *C. theobromicola* que já havia sido descritas no Brasil, este é o primeiro relato da associação de *C. fructicola*, *C. karstii* e *C. nymphaeae* à antracnose de anonáceas no País.

De acordo com estudo realizado recentemente na Colômbia (Álvarez et al., 2014), foi confirmado que as espécies que causam antracnose em folhas, flores, ramos e frutos de graviola no país, estão distribuídas em três complexos, ‘gloeosporioides’, ‘acutatum’ e ‘boninense’. *C. theobromicola*, *C. tropicale*, *C. siamense* e *C. gloeosporioides stricto sensu* no complexo ‘gloeosporioides’; *C. karstii* no complexo ‘boninense’ e dois isolados não resolvidos nos complexos ‘acutatum’ e ‘boninense’ associadas a antracnose desta hospedeira, a partir de análise filogenética baseada em regiões parciais dos genes TUB2, GAPDH, CHS-1 e da região ITS. Estes resultados são semelhantes aos obtidos neste estudo e demonstra a distribuição geográfica destas espécies. Estes cinco taxa são relatados tendo distribuição geográfica mundial e alguns isolados têm sido associado com doenças de plantas de outras culturas agronomicamente importante como *Theobroma cacao*, *Coffea arabica*, *Persea americana*, *Capsicum annum*, *Mangifera indica*, *Citrus* spp., *Olea europaea* e *Carica papaya* (Damm et al., 2012b; Weir et al., 2012; Lima et al., 2013; Udayanga et al., 2013).

Os cinco taxa identificados estão associados a dois tipos de sintomas em diferentes hospedeiras neste trabalho. *C. gloeosporioides stricto sensu* foi isolada de folhas de condessa com sintoma de antracnose e de frutos mumificados de graviola. A espécie *C. theobromicola* foi isolada de fruto mumificado de atemóia e de fruto e folhas com sintoma de antracnose nesta espécie hospedeira e em duas espécies nativas. *C. karstii* associada a folhas e fruto de marolo apresentando, respectivamente, sintomas de antracnose e mumificação e, *C. nymphaeae* associada a antracnose do fruto da pinha e da graviola e a mumificação da pinha. Entretanto, o isolamento do patógeno a

partir de frutos mumificados sempre foi associado a outro fungo de crescimento superior ao de *Colletotrichum* e que apresentava abundante micélio aéreo com cor da colônia cinza claro (dados não mostrados). A ausência de esporos foi observada para este patógeno em colônias relativamente novas, aproximadamente cinco dias de idade. Em comparação destas características morfológicas da colônia e, associação dos sintomas com as informações descritas na literatura, acredita-se que este fungo pertença ao gênero *Lasiodiplodia*, embora neste trabalho não tenha sido realizado nenhuma tentativa de identificação de características morfológicas dos esporos ou estudos filogenéticos do patógeno. Como os isolados de *Colletotrichum* oriundos de frutos mumificados foram patogênicos a plantas de pinha no teste de patogenicidade e apresentou sintomas típicos de antracnose, a mumificação pode ser uma resposta da planta hospedeira frente a associação de mais de um patógeno e, provavelmente não ser causada apenas por espécies de *Colletotrichum*, uma vez que de isolamento de frutos com sintoma de antracnose, cresceu somente fungos pertencentes ao gênero *Colletotrichum*.

De acordo com Freire et al. (2003), as anonáceas estão entre as frutíferas tropicais mais comumente afetadas por *Lasiodiplodia theobromae* (*Botryodiplodia theobromae*). Este fungo era considerado um patógeno fraco, mas nos últimos anos levantou-se a hipótese que ele tenha evoluído em patogenicidade em consequência das pressões ambientais, especialmente nas regiões semi-áridas, onde as condições climáticas lhes são muito favoráveis. Para que esta ocorrência seja confirmada e esclarecida, estudos relacionados devem ser desenvolvidos para que se possa minimizar os danos provocados pelo patógeno.

Das espécies identificadas neste estudo, apenas *C. fructicola* e *C. nymphaeae* não haviam sido descritas, a nível mundial, associadas com espécies de *Annona*. *Colletotrichum fructicola* foi originalmente descrita provocando doença em frutos de café na Tailândia (Prihastuti et al., 2009). Esta espécie foi também encontrada como um endófito em várias partes de

plantas na América central (originalmente descrita como *C. ignotum* (Rojas et al., 2010)). *Colletotrichum fructicola* é biologicamente e geograficamente diverso. A espécie é atualmente conhecida associada a *Coffea arabica* (Tailândia), *Pyrus pyrifolia* (Japão), *Limonium* (Israel), *Malus domestica* e *Fragaria x ananassa* (Israel), *Malus domestica* e *Fragaria x ananassa* (EUA), *Persea americana* (Austrália), *Ficus* (Alemanha), *Malus domestica* (Brasil), *Dioscorea* (Nigéria), *Theobroma* e *Tetragasrtis* (Panama), *Vitis* (china) e *Mangifera indica* (Brasil) (Weir et al., 2012; Lima et al., 2013).

*Colletotrichum nymphaeae* foi originalmente descrita provocando doença em folhas de *Nymphaea alba* na Holanda (Van Der AA, 1978). Esta espécie também é biologicamente e geograficamente diversa. Já foi anteriormente descrita em *Fragaria x ananassa* (Sul da África, Espanha, Reino Unido e EUA), *Fragaria* sp. (Espanha e EUA), *Fragaria vesca* (Reino Unido), *Leucaena* sp. (México), *Mahonia aquifolium* (Itália), *Malus pumila* (Brasil), *Nuphar luteum* (Holanda), *Nymphaea* (Holanda), *Oenothera* sp. (Holanda), *Olea europaea* (Portugal), *Pelargonium graveolens* (Índia), *Photinia* sp. (EUA), *Protea* sp. (Austrália), *Protea* spp. (Sul da África), *Phaseolus* sp. (Holanda) e *Malus domestica* (Brasil) (Velho & Stadnik, 2014; Damm et al., 2012a).

*Colletotrichum karstii* foi recentemente relatada em graviola na Colômbia (Álvarez et al., 2014). Esta espécie ocorre em muitas plantas hospedeiras e é a mais comum e geograficamente diversa no complexo de espécies *C. boninense* ocorrendo em folhas de *Vanda* sp. (Yang et al., 2011) e em folhas de *Citrus* (Peng et al., 2012). Vários isolados de *Passiflora edulis* no Brasil, que foram inicialmente identificados como *C. boninense* (Tozze Júnior et al., 2010), foram mais tarde revelados serem *C. karstii* por sequências GAPDH. Esta espécie foi também relatada recentemente em *Mangifera indica* na Austrália (Damm et al., 2012b) e no Brasil (Lima et al., 2013).

*Colletotrichum theobromicola* já havia sido relatada em associação à antracnose de espécies de anonáceas na Colômbia, Panamá e no México (Álvarez et al., 2014; Rojas et al., 2010; Villanueva-Arce et al., 2008).

Descrita inicialmente em associação a folhas de *Theobroma cacao* (Rojas et al., 2010), é amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais em uma ampla gama de hospedeiros (Weir et al., 2012; Álvarez et al., 2014; Kamei et al., 2014).

*Colletotrichum gloeoporioides stricto sensu*, até então considerado o agente mais importante de antracoses em uma vasta gama de hospedeiras, foi originalmente descrito em associação à antracnose de *Citrus sinensis* na Itália. É também relatado ocorrendo nesta espécie hospedeira nos EUA, Nova Zelândia e no Norte da Tailândia. O patógeno é descrito em associação com *Carya illinoensis* (Austrália), *Ficus* sp. (Nova Zelândia), *Mangifera indica* (Sul da África), *Pueraria lobata* (EUA), *Annona muricata* (Colômbia), *Syzygium* (Norte da Tailândia), *Coffea arabica* (Tailândia) e *Annona* spp. (Brasil) (Weir et al., 2012; Álvarez et al., 2014).

O isolado CAA2 foi o único escolhido representando o grupo monofilético *Colletotrichum* sp.1 a partir da filogenia por meio do gene GAPDH e, portanto, não foi possível concluir nada a seu respeito na análise filogenética multigênica, sendo necessária a análise conjunta de mais isolados e avaliação de outras regiões gênicas como, por exemplo, a utilização do marcador ApMat e do gene glutamina sintetase (GS) que tem sido útil na discriminação de espécies dentro do complexo ‘gloeoporioides’ (Sharma et al., 2013; Liu et al., 2015) e que poderá auxiliar em sua identificação. Os isolados CAA95 e CAA5 também não foram filogeneticamente resolvidos a partir destes genes estudados, sendo necessária a análise de outras regiões gênicas como, por exemplo, quitina sintetase 1 (CHS-1), histona 3 (HIS3) e calmodulina (CAL) (Damm et al., 2012a, 2012b) para melhor entendimento a respeito da sua identidade.

Os caracteres morfológicos e culturais recorridos para caracterização dos isolados de *Colletotrichum* oriundos de anonáceas neste estudo, não geraram informações suficientes para determinar a separação dos isolados a nível de espécies e de complexos. Isto retrata a instabilidade de tais caracteres sozinhos na identificação de espécies de *Colletotrichum*. Como são



manifestados em virtude da resposta genotípica do indivíduo frente a determinadas condições do ambiente e, existe ainda uma deficiência na padronização de métodos para o seu estudo, a variação dentro de uma mesma espécie tende a ocorrer, mesmo em um único isolado, dificultando a determinação de um marcador morfológico capaz de distingui-lo dos demais indivíduos. A variabilidade observada quando são avaliados esporos provenientes de uma única estrutura, por exemplo, esporos provenientes da conidiomata, é minimizada, mas ainda assim existe, retratando provavelmente uma característica no próprio genótipo do indivíduo.

Caracteres culturais e morfológicos sozinhos falham na identificação de espécies de *Colletotrichum* (Phoulivong et al., 2010; Álvarez et al., 2014; Lima et al., 2013). Entretanto, tais caracteres não devem ser abandonados em estudos do gênero, porque eles fornecem a base inicial para demais estudos, seja eles moleculares, testes bioquímicos ou cruzamentos. Phrihastuti et al. (2009), estudando isolados de *Colletotrichum* que causam doença nos frutos do cafeeiro, conseguiram correlacionar morfotipos com espécies filogenéticas. Estudos futuros, portanto, devem dar maior enfoque na padronização de métodos para estudos destes caracteres, com o intuito de reduzir a grande influência do ambiente no fenótipo do indivíduo.

Testes de patogenicidade são importantes para verificar se uma espécie particular de *Colletotrichum* é específica a uma determinada planta hospedeira, ou se possui uma ampla gama de hospedeiras (Cai et al., 2009), além de permitir atribuir ao patógeno a causa de uma determinada doença. Neste estudo, isolados de *Colletotrichum* foram obtidos de várias hospedeiras, exploradas comercialmente e nativas, e submetidos ao teste de patogenicidade em mudas de pinha (*Annona squamosa*), os resultados obtidos comprovam a patogenicidade cruzada das espécies identificadas e confirmam o agente causal da doença antracnose em anonáceas. Devido as mudas de pinha utilizadas neste estudo terem sido obtidas de sementes, e a pinheira ser uma espécie alógama, acredita-se que haja uma alta variabilidade genética dentro da espécie vegetal e, portanto, não houve comparação da severidade entre as

espécies identificadas e isolados do patógeno utilizados no teste. Isto é justificável porque o desenvolvimento de lesões de antracnose pode ser influenciado pela temperatura, duração do período de molhamento, densidade de inóculo, genótipo do hospedeiro e também do próprio patógeno (Freeman et al., 1998).

A correta identificação do(s) agente(s) causal(is) de uma determinada doença é essencial para decisões quarentenárias, no melhoramento de plantas, e no manejo e controle do patógeno (Cai et al., 2009). A antracnose é a doença mais importante das anonáceas no Brasil e a correta identificação do seu agente etiológico será útil no entendimento do ciclo de vida do patógeno e em estudos epidemiológicos, contribuindo para minimizar os danos provocados pelo patógeno na cultura, sejam eles em campo ou na pós-colheita.

## 6 CONCLUSÕES

A antracnose de várias espécies de *Annona* localizadas nas diferentes regiões estudadas, é causada pelas espécies *C. gloeosporioides stricto sensu*, *C. fructicola*, *C. theobromicola*, *C. karstii* e *C. nymphaeae*.

Espécies de *Colletotrichum* encontradas em anonáceas exploradas comercialmente são também encontradas em espécies nativas.

A filogenia multigene de ACT, TUB2 e GAPDH permitiu a delimitação destas espécies em grupos monofiléticos com alto suporte.

A maioria dos isolados estudados neste trabalho pertencem ao complexo de espécies *C. gloeosporioides* (20 isolados), seguido do complexo ‘acutatum’ (oito isolados) e complexo ‘boninense’ (três isolados).

Caracteres morfológicos e da cultura não foram informativos o suficiente para distinção de espécies de *Colletotrichum* e complexos.

Os isolados de *Colletotrichum* provenientes da pinha, graviola, condessa, atemóia, marolo e duas hospedeiras nativas não identificadas foram patogênicos a pinheira.

## REFERÊNCIAS

Álvarez E, Gañán L, Rojas-Triviño A, Mejía JF, Llano GA, González A (2014) Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species isolated from soursop in Colombia. *European Journal of Plant Pathology* 139: 325-338.

Cai L, Hyde KD, Taylor PWJ, Weir BS, Waller J, Abang MM, Zhang JZ, Yang YL, Phoulivong S, Liu ZY, Prihastuti H, Shivas RG, McKenzie EHC, Johnston PR (2009) A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39:183-204.

Cannon PF, Buddie AG, Bridge PD (2008) The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycotaxon* 104:189-204.

Cannon PF, Damm U, Johnston PR, Weir BS (2012) *Colletotrichum* - current status and future directions. *Studies in Mycology* 73:181-213.

Carbone I, Kohn LM (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553-556.

Cordeiro MCR, Pinto ACQ, Ramos VHV (2000) O cultivo da pinha, fruta-do-conde ou ata no Brasil. Circular Técnica – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Cerrados 9: 1-52.

Correia KC, Martins RB, Câmara MPS, Michereff SJ (2011) Escala diagramática para avaliação da severidade da antracnose em pinha. *Ciência Rural* 41:1-4.

Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC, Crous PW (2012a) The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology* 73:37–113.

Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC, Johnston PR, Weir BS, Tan YP, Shivas RG (2012b) The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology* 73:1-36.

Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M., Kahmann R, Ellis J, Foster GD (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13:414-430.

Firmino AC, Tozze Junior HJ, Tamelini BR, Nosaki DN, Furtado EL (2014) Identificação de espécies de *Colletotrichum* associados à antracnose em plantas de atemóia e colonização do fungo nos frutos. *Summa Phytopathologica* 40:323-328.

Freeman S, Katan T, Shabi E (1998) Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnoses disease of various fruits. *Plant Disease* 82:596-605.

Freeman S, Minz D, Maymon M, Zveibil A (2001) Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum sensu* Simmonds. *Phytopathology* 91:586-592.

Freire FCO, Cardoso JE, Viana FMP (2003) Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica 687p.

Hyde KD, Cai L, Cannon PF, Crouch JA, Crous PW, Damm U, Goodwin PH, Chen H, Johnston PR, Jones EBG, Liu ZY, Mckenzie EHC, Moriwaki J, Noireung P, Pennycook SR, Pfenning LH, Prihastuti H, Sato T, Shivas RG, Tan YP, Taylor PWJ, Weir BS, Yang YL, Zhang JZ (2009) *Colletotrichum* - names in current use. *Fungal Diversity* 39:147-182.

Index Fungorum (2015)  
<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp?pg=2>. Acesso em 29 de maio de 2015.

Junqueira NTV, Junqueira KP (2014) Principais doenças de Anonáceas no Brasil: descrição e controle. *Revista Brasileira de Fruticultura* 36:55-64.

Kamei SH, Costa JFO, Brito Netto MS, Assunção IP, Lima GSA (2014) Identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose de anonáceas no estado de Alagoas. *Revista Brasileira de Fruticultura* 36:209-216.

Lemos EEP (2014) A produção de anonáceas no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura* 36:77-85.

Leslie JF, Summerell BA (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishers, Malden MA, USA, 420p.

Lima NB, Batista MV de A, Morais Jr MA de, Barbosa MAG, Michereff SJ, Hyde KD, Câmara MPS (2013) Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. *Fungal Diversity* 61:75-88.

Liu F, Weir BS, Damm U, Crous PW, Wang Y, Liu B, Wang M, Zhang M, Cai L (2015) Unravelling *Colletotrichum* species associated with *Camellia*: employing ApMat and GS loci to resolve species in the *C. gloeosporioides* complex. *Persoonia* 35:63–86.

Morales CF, Manica I (1998) Moléstias e pragas. In: *Fruticultura; cultivo das anonáceas (ata, cherimólia, graviola)*. pp. 78-91.

Munsell (2000) *Soil color charts*. Revised washable edition. Little Britain Road, New Windsor.

Panaccione DG, Hanau RM (1990) Characterization of two divergent  $\beta$ -tubulin genes from *Colletotrichum graminicola*. *Gene* 86:163-170.

Peng L, Yang Y, Hyde KD, Bahkali AH, Liu Z (2012) *Colletotrichum* species on *Citrus* leaves in Guizhou and Yunnan provinces, China. *Cryptog Mycolog* 33:267–283.

Phoulivong S, Cai L, Chen H, McKenzie EHC, Abd-Elsalam K, Chukeatirote E, Hyde KD (2010) *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity* 44:33-43.

Phoulivong S, McKenzie EHC, Hyde, KD (2012) Cross infection of *Colletotrichum* species; a case study with tropical fruits. *Current Research in Environmental & Applied Mycology* 2:99–111.

Prihastuti H, Cai L, Chen H, Mckenzie EHC, Hyde KD (2009) Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Diversity* 39:89-109.

Rojas EI, Rehner SA, Samuels GJ, Van Bael S.A, Herre EA, Cannon P, Chen R, Pan GJ, Ruiw UW, Yaping Z, Peng YQ, 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* 102:1318-1338.

Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP, 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61:539e542.

Santos Filho HP, Matos AP (2003) Doenças da mangueira. In: Freire FCO, Cardoso JE, Viana FMP (eds) Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp. 435–491.

São José A R., Pires MM, Freitas ALGE, Ribeiro DP, Perez LAA (2014) Atualidades e perspectivas das anonáceas no mundo. *Revista Brasileira de Fruticultura* 36:86-93.

Sharma G, Kumar N, Weir BS, Hyde KD, Shenoy BD (2013) The ApMat marker can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*. *Fungal Diversity* 61:117-138.

Sobrinho RB (2010) Potencial de Exploração de Anonáceas no Nordeste do Brasil. *Embrapa Agroindústria Tropical* 27p.

Sutton BC (1980). *The Coelomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, London, 696p.

Takahashi LM, Rosa DD, Basseto MA, Furtado EL (2009) Caracterização fisiológica, morfológica, cultural e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. causadores de antracnose em atemóia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 35:115-130.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, Chicago, 28:2731-2739.

Templeton MD, Rikkerink EH, Solon SL, Crowhurst RN (1992) Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. *Gene* 122:225-230.

Tozze Júnior HJ, Fischer IH, Câmara MPS, Massola Júnior NS (2010) First report of *Colletotrichum boninense* infecting yellow passion fruit (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes* 5:70-72.

Tozze Júnior HJ, Firmino AC, Massola Júnior NS (2011) Sensibilidade in vitro de isolados de *Colletotrichum* spp. do pimentão a fungicidas sistêmicos. In: XXXIV Congresso Paulista de Fitopatologia, 34, 2011, Campinas. *Summa Phytopatologica* 36p. (CD).

Udayanga D, Manamgoda DS, Liu X., Chukeatirote E, Hyde KD (2013) What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits? *Fungal Diversity* 61:165–179.

Van Der AA HA (1978) A leaf spot diseases of *Nymphaea alba* L. in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology* 84:109–115.

Velho AC, Stadnik MJ (2014) First Report of *Colletotrichum nymphaeae* Causing Apple Bitter Rot in Southern Brazil. *Plant disease* 98:567p.

Villanueva-Arce R, Yáñez-Morales M, Hernández-Anguiano AM (2008) Species of *Colletotrichum* in cherimoya (*Annona cherimola* Mill). *Agrociencia* 42:689-701.

Yang Y, Cai L, Yu Z, Liu Z, Hyde KD (2011) *Colletotrichum* species on Orchidaceae in southwest China. *Cryptogamie Mycologie* 32:229–253.



Weir BS, Johnston PR, Damm U (2012) The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73:115-180.