

SARA SALCEDO SARMIENTO

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* ASSOCIADAS À  
ANTRACNOSE FOLIAR DA SERINGUEIRA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

Salcedo Sarmiento, Sara, 1984-  
S161i Identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose  
2013 foliar da seringueira / Sara Salcedo Sarmiento. - Viçosa, MG, 2013.  
ix, 72f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.63-72.

1. Seringueira. 2. Filogenia. 3. Ascomicetos. 4. Borracha.  
5. Antractone. 6. Seringueira - Doenças e pragas. 7. Fungos.  
8. *Colletotrichum*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 632.46

SARA SALCEDO SARMIENTO

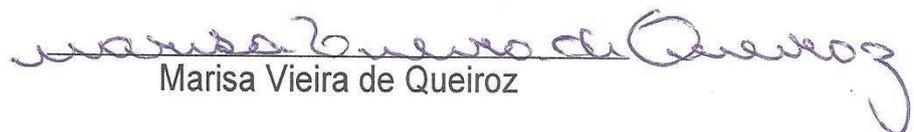
IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* ASSOCIADAS À  
ANTRACNOSE FOLIAR DA SERINGUEIRA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de Agosto de 2013.

  
Olinto Liparini Pereira

  
Braz Tavares da Hora Júnior

  
Marisa Vieira de Queiroz

  
Eduardo Seiji Gomide Mizubuti

(Orientador)

## **Dedicatória**

A Deus pelo amor e inspiração na minha vida.

A meus pais Alicia e Jose pelo carinho e amor.

A minhas irmãs e irmãos pelo amor.

A memória de Dilza Perez pelo presente mais lindo da minha vida.

A meu noivo Carlos Aucique pelo amor.

A minha linda família do apartamento e do departamento.

*“Ninguém escapa ao sonho de voar, de ultrapassar os limites do espaço onde nasceu, de ver novos lugares e novas gentes. Mas saber ver cada coisa, em cada pessoa, aquele algo que a define como especial, um objeto singular, um amigo, é fundamental. Navegar é preciso, reconhecer o valor das coisas e das pessoas, é mais preciso ainda”*

Antoine de Saint-Exupéry

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me consolar nos momentos difíceis, me dar força para superar as dificuldades, iluminar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as necessidades.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e o departamento de Fitopatologia pela grande oportunidade de poder cursar os estudos de pós-graduação.

Ao professor Eduardo Mizubuti pela orientação, paciência e oportunidade.

Aos professores Olinto Liparini e Marisa Vieira de Queiroz por fazer parte da banca de defesa.

A os meus pais Alicia e José, por serem modelos de coragem, pelo seu apoio incondicional e incentivo.

A minhas irmãs lindas que desde a distância me apoiaram e incentivaram.

Ao meu noivo Carlos Aucique, pelo amor, companhia, apoio, compreensão e paciência demonstrados e a total ajuda na superação dos obstáculos que ao longo desta caminhada foram surgindo, pelas palavras doces e pela transmissão de confiança e força.

Aos Professores do departamento de Fitopatologia pela amizade, paciência e ensinamentos, em especial ao Professor Fabrício de Ávila Rodrigues, sem ele nada teria sido possível e ao professor Chico do Vale e o professor Luis Claudio pelo amor com o que ensinam.

Aos professores Acelino Couto Alfenas, José Rogerio de Oliveira, Olinto Liparini e Robert Weingart Barreto pelas sugestões e o acesso às ferramentas necessárias para o desenvolvimento da pesquisa.

A os meus amigos em especial Adans, André, Camilo, Diego, Gustavo, Inolbert, Jaime, Maria, Nilmara, Rosemeire, Ruth, Vanessa, Wilka,

pelo carinho diário, apoio e ajuda, pela partilha dos bons (e não tão bons) momentos, que me permitiram que cada dia fosse encarado com motivação, levarei vocês no meu coração por sempre.

A meus colegas do laboratório de biologia de populações pela amizade, companheirismo e ajuda em especial a Thais Santiago por me ouvir, me compreender e me apoiar. Igualmente a Ana e Miller pela amizade e paciência.

Ao Doutor Braz Tavares, por todos os estímulos e desafios para a realização deste trabalho, pela disposição, paciência e ensinamentos, fico muito grata, resta-me falar que você tem um grande talento para transmitir o conhecimento.

A os funcionários do departamento Don Camilo, Don Bruno, Marcão e Renildo, que alegam a cozinha com os cafezinhos e bate papo do dia a dia.

## **BIOGRAFIA**

SARA SALCEDO SARMIENTO, nasceu em Villavicencio (Meta), Colômbia, no dia 27 de março de 1984.

No ano de 2008, obteve o título como Engenheira Agrônomo da Universidad de los Llanos. Entre 2008 a 2011, fez parte do corpo de pesquisadores do centro de pesquisa em dendê (Centro de Investigaciones en Palma de aceite – CENIPALMA) atuando como auxiliar de pesquisa no programa de sanidade da Palma.

Em 2011, iniciou estudos de mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, atuando na área de biologia de populações sob a orientação do professor Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	4
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	5
3.1. Importância da borracha natural e a cultura da seringueira.....	5
3.2. Antracnose da seringueira .....	7
3.2.1. Agente causal.....	7
3.2.2. Sintomas .....	8
3.2.3. Epidemiologia.....	8
3.2.4. Identificação .....	9
3.2.5. Análise de dissociação em alta resolução ( <i>High-Resolution Melting</i> – HRM).....	10
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	12
4.1. Obtenção dos isolados .....	12
4.2. Teste de patogenicidade .....	14
4.3. Identificação molecular .....	15
4.3.1. Extração de DNA.....	15
4.3.2. Seleção de isolados baseado na análise de curvas de dissociação de alta resolução (HRM).....	15
4.3.3. Análises de filogenia molecular .....	16
4.4. Diagnóstico molecular .....	17
4.4.1. Análise com <i>primers</i> específicos .....	17
4.4.2. Diagnóstico molecular baseado na análise de curvas de dissociação de alta resolução ( <i>High resolution melt</i> - HRM) .....	20
4.5. Caracterização fisiológica e identificação morfológica.....	25
4.6. Análise de dados .....	26
<b>5. RESULTADOS</b> .....	27
5.1. Isolados e teste de patogenicidade .....	27
5.2. Identificação molecular e seleção de isolados baseado na análise de curvas de dissociação de alta resolução ( <i>High resolution melt</i> - HRM)....	27

5.3. Filogenia de espécies de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	27
5.3.1. Filogenia de espécies do complexo <i>C. acutatum</i> .....	28
5.3.2. Filogenia de espécies do complexo <i>C. boninense</i> .....	29
5.3.3. Filogenia de espécies do complexo <i>C. gloeosporioides</i> .....	31
5.4. Diagnóstico molecular .....	31
5.5. Caracterização morfológica .....	34
5.5.1. Crescimento de colônias de <i>Colletotrichum</i> spp.....	34
5.5.2. Variáveis morfológicas .....	38
Morfologia de isolados do complexo <i>C. acutatum</i> .....	38
Morfologia de isolados do complexo <i>C. boninense</i> .....	45
Morfologia de isolados do complexo <i>C. gloeosporioides</i> .....	49
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>62</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>63</b>

## RESUMO

SALCEDO, Sarmiento Sara, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2013. **Identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose foliar da seringueira.** Orientador: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

Os sintomas da antracnose foliar da seringueira são tipicamente lesões necróticas que podem causar o enrugamento dos folíolos e, em etapas avançadas, a desfolha prematura, reduzindo a área foliar. Desde o relato inicial da doença, várias espécies de *Colletotrichum* são mencionadas como sendo o agente etiológico. No Brasil, até o momento, nenhum estudo foi realizado com o propósito de identificar as espécies associadas à antracnose foliar da seringueira. Por essa razão, estabeleceu-se como objetivo gerar informações acerca da natureza do agente etiológico da antracnose da seringueira, mediante caracterização morfológica e análises filogenéticas moleculares. Outro objetivo foi desenvolver procedimento para o diagnóstico molecular de *Colletotrichum* spp. associadas à seringueira. Isolados de *Colletotrichum* spp. foram obtidos de folhas de seringueira, diferentes regiões genômicas foram sequenciadas e as principais características morfológicas de relevância taxonômica foram estudadas. Isolados pertencentes a três complexos de espécies de *Colletotrichum* foram identificados: complexo *C. acutatum*; complexo *C. gloeosporioides*; e complexo *C. boninense*. *Primers* desenhados com base na região que codifica para a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) permitiram a amplificação de bandas específicas para os isolados de *Colletotrichum* associados a cada um dos três complexos de espécies mencionados.

## ABSTRACT

SALCEDO, Sarmiento Sara, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2013. **Identification of species of *Colletotrichum* associated with leaf anthracnose of rubber.** Adviser: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

The foliar anthracnose of rubber tree causes necrotic lesions and wrinkling of the leaflets, which can lead to premature defoliation, reducing leaf area. Since the first reports of occurrence of anthracnose, several species of *Colletotrichum* have been listed as its purported causal agent. However, in Brazil, no study has been conducted for this purpose. For this reason, the objectives of the present study were: to generate information about the identity of the causal agent of foliar anthracnose of rubber tree by morphological and molecular phylogenetic analyses; and to develop procedures for the molecular diagnosis of *Colletotrichum* spp. associated with the disease. Isolates belonging to three complexes of *Colletotrichum* species were found: *C. acutatum* complex; *C. gloeosporioides* complex; and *C. boninense* complex. *Primers* were designed based on the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) region which allowed the amplification of specific bands for *Colletotrichum* associated with each of the three species complexes.

## 1. INTRODUÇÃO

O látex produzido por *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg. é matéria prima para diversos produtos de ampla utilização, em especial na indústria de pneus. Atualmente, a produção mundial de borracha natural é ligeiramente superior à demanda deste produto no mercado internacional (IRSG, 2013). Entretanto, a produção anual brasileira de borracha natural, 171.000 ton, representa apenas 1,5% da produção mundial e não atende a demanda nacional pelo produto, que é de aproximadamente 340.000 ton (EMBRAPA, 2007; Santos & Monthé, 2007; IRSG, 2013). Portanto, atualmente, o Brasil é importador desta matéria prima. Considerando que o Brasil é o centro de origem da seringueira e foi o maior produtor de borracha natural do mundo no início do século XX, a situação atual é crítica e necessita ser alterada. É necessário aumentar a produção para atender a demanda e reduzir o déficit na balança comercial. Concomitante e paradoxalmente, a heveicultura tem sido excelente opção de investimento por ser cultivo passível de exploração por longo período de tempo, ter alta rentabilidade, contribuir para o estabelecimento de florestas comerciais, a preservação ambiental e por ser elemento de exploração no mercado de crédito de carbono (Chagas, 2013).

Nos plantios comerciais estabelecidos em áreas úmidas da América do Sul, a ocorrência de doenças é o principal fator limitante para a maior produtividade da cultura. Duas doenças fúngicas comumente relatadas como severas são a antracnose, causada por *Colletotrichum* spp., e o mal das folhas causado por *Microcyclus ulei* (P. Henn v. Arx.) (Gasparoto et al., 1997). As perdas decorrentes de epidemias do mal das folhas em plantios comerciais de seringueira instalados na Amazônia no início do século XX levaram ao estabelecimento de programas de melhoramento visando ao desenvolvimento de clones resistentes (Sterling & Rodriguez, 2011). Entretanto, observou-se que muitos genótipos produtivos e parcialmente resistentes ao mal das folhas passaram a ser afetados pela antracnose (Sterling et al., 2011).

Nos países do Sudeste Asiático, principais produtores mundiais e onde o mal das folhas não ocorre, a antracnose é a doença que mais afeta a produção de látex. Tal fato também é constatado na Índia, China e na região oeste da África (Hilton, 1959). Na América do Sul, a doença ocorre no Brasil e na Colômbia (Jayasinghe et al., 1997; Saha et al., 2002; Furtado & Trindade, 2005).

A antracnose é particularmente severa em áreas escape ao mal das folhas da seringueira e as plantas afetadas apresentam lesões necróticas nos folíolos que podem perfurar o limbo causando a diminuição da área fotossintética. Soma-se a esse dano, o enrugamento de tecido foliar que pode levar à desfolha prematura, reduzindo o desenvolvimento de plantas jovens e maduras (Wastie, R. L. 1967; Gasparotto et al., 1997). A antracnose é conhecida desde 1905 e foi inicialmente descrita como sendo causada pelo ascomiceto *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. No entanto, ao analisar a morfologia de 52 isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de folhas com sintomas, 18 foram semelhantes a *C. gloeosporioides* e 34 isolados foram classificados como *C. acutatum* (Jayasinghe et al., 1997). Percebe-se, portanto, haver incertezas quanto à identidade do agente causal. Tal fato pode estar associado à plasticidade fenotípica das espécies de *Colletotrichum*, assim como erros de identificação e classificação quando baseadas em caracteres morfológicos (Menezes, 2006).

Como mencionado, espécies de *Colletotrichum* possuem alta plasticidade fenotípica, podem explorar diferentes nichos e adotar estilos de vida distintos (Sreenivasaprasad & Talhinhos, 2005). Curiosamente, não se conhecem espécies de *Colletotrichum* estritamente saprofíticas e algumas espécies de fungos endofíticos podem vir a ser patogênicas (Freeman & Rodríguez, 1993). Em função de algum estresse ou outro(s) fator(es) disparador(es), pode haver mudança no estilo de vida, passando de endossimbionte a parasita (patógeno) (Zabalgogeoazcoa, 2008). As estratégias de vida biotrófica adotada por espécies de *Colletotrichum* e a habilidade de muitas espécies para sobreviver como endófito contribui para relação assintomática, que dificultam o entendimento da especificidade de hospedeiros e os aspectos da interação planta-patógeno (Lu et al., 2004; Liu

et al., 2007; Joshee et al., 2009; Rojas et al., 2010; Yuan et al., 2011). Recentemente, *Glomerella cingulata*, teleomorfo de *Colletotrichum* spp., foi encontrado como endofítico em seringueira (Rocha et al., 2011). Porém, a relação entre a presença desta espécie e o desenvolvimento da antracnose não está claramente estabelecida.

A caracterização e identificação do agente etiológico de uma doença constituem etapas importantes para o entendimento do patossistema e têm implicações para seu manejo. Em geral, a diagnose de doenças fúngicas inicia com a inspeção de sintomas e sinais. Técnicas de microscopia, testes imunológicos, determinação da patogenicidade e, mais recentemente, análises moleculares constituem atividades complementares que permitem confirmar a identidade do agente em estudo (Putnam, 1995). A acurácia na identificação do agente causal é pré-requisito para o conhecimento e controle efetivo da doença, no entanto, os métodos tradicionais de identificação de espécies às vezes podem ser demorados e pouco conclusivos, o que tem gerado a necessidade de desenvolver técnicas que permitam maior rapidez e confiabilidade na identificação do agente causal (Ward et al., 2004).

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo geral foi gerar informações acerca do agente etiológico da antracnose foliar da seringueira no Brasil. Os objetivos específicos são: *i.*) identificar o agente etiológico da antracnose foliar da seringueira no Brasil; *ii.*) estabelecer metodologia para o diagnóstico molecular da antracnose foliar de seringueira.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1. Importância da borracha natural e a cultura da seringueira**

A borracha natural é amplamente utilizada em diferentes produtos. A fabricação de pneumáticos constitui a atividade mais conhecida, de maior valor econômico e a que mais demanda o produto, uma vez que 67% da borracha natural produzida são empregadas na indústria de pneus. Cerca de 8% da borracha natural produzida são utilizados na produção de partes pela indústria automobilística e 5% são utilizados na fabricação de calçados. O restante é predominantemente empregado nas indústrias de adesivos e de produtos médico-hospitalares (CIRAD, 2001).

A demanda mundial de borracha natural é crescente e, para muitos propósitos, suas propriedades físicas ainda não foram superadas ou alcançadas pelos produtos sintéticos (IRSG, 2013). Em 2012, a produção mundial de borracha natural foi de aproximadamente 11,4 milhões de ton. Tailândia, Indonésia, Vietnã, Malásia, Índia e China respondem por 90% da produção mundial. Na África são produzidas 405 mil ton e na América Latina, 203 mil ton. A produção brasileira de borracha natural em 2012 correspondeu a 171 mil ton, razão pela qual o Brasil é importador desta matéria prima. Em 2011, as importações de borracha natural somaram 235 mil ton, sendo 44% provenientes da Indonésia, maior fornecedor. O país dispendeu aproximadamente 1,1 bilhão de dólares com a importação de borracha natural em 2011. O volume importado foi 10% menor que em 2010, mas o dispêndio com a importação foi 40% maior (IRSG, 2013). Considerando que o Brasil é o centro de origem da seringueira e foi o maior produtor de borracha natural do mundo no início do século XX, a situação atual é crítica e necessita ser alterada no sentido de buscar a autossuficiência na produção de borracha.

Aproximadamente 2000 espécies de plantas pertencentes a sete famílias têm a capacidade de sintetizar látex, no entanto, a baixa quantidade e qualidade do látex associadas a cadeias poliméricas curtas, fazem com que a exploração destas espécies não tenha viabilidade econômica (John,

1992). As melhores características físicas e químicas da borracha são obtidas de látex extraído da seringueira, planta da família *Euphorbiaceae*, do gênero *Hevea*. Plantas de *Hevea* spp. ocorrem naturalmente na Amazônia brasileira e em áreas da Bolívia, Colômbia, Peru, Venezuela, Equador, Suriname e Guiana. Das onze espécies do gênero, a originária da região amazônica do Brasil, *H. brasiliensis* é a de maior capacidade produtiva e a que possui maior base genética (Costa et al., 2001).

A seringueira tem estágio de imaturidade, também denominado período improdutivo que pode estender por até 5 anos, dependendo do genótipo. Ao finalizar esse período, inicia-se a colheita do látex que pode prosseguir por 25 a 30 anos, mas seu rendimento pode declinar gradualmente com a idade da planta. Finalizada a etapa de extração do látex, as árvores são fonte de madeira constituindo um sistema de duplo propósito (Corley, 1983). No Brasil, a exploração da seringueira para produção de borracha natural iniciou-se como atividade extrativista. Entretanto, a partir de 1912, o extrativismo começou a decair devido, principalmente, à entrada no mercado internacional de borracha oriunda dos países asiáticos e às epidemias do mal das folhas no Brasil (Martinelli, 2004).

Atualmente, no Brasil, estima-se haver 220.000 hectares plantados com seringueira, dos quais 100.000 hectares encontram-se em fase produtiva (EMBRAPA, 2007). Os principais Estados produtores de borracha natural e com possibilidades de expansão do cultivo da seringueira são: São Paulo (45.000 ha), Mato Grosso (44.700 ha), Bahia, (23.000 ha), Espírito Santo (9.000 ha), Goiás (4.000 ha), Minas Gerais (2.600 ha) e Paraná (700 ha). Nos demais estados a área plantada estimada soma cerca de 8000 ha (IBGE, 2005; EMBRAPA, 2007). Considerando os dados atuais, prevê-se que a demanda em 2020 seja de 630 mil toneladas de borracha natural, portanto, para atender a esta demanda seria necessário implantar 230 mil hectares de seringueira (Rosmann & Gameiro, 2006).

### **3.2. Antracnose da seringueira**

Várias doenças afetam a cultura da seringueira e causam perdas na produção (Reis, 1999). A antracnose é uma doença que nos últimos anos tem causado reduções nos rendimentos desta cultura na Índia, Tailândia, Sri Lanka, China e nos países localizados no Oeste da África. Na Ásia, a antracnose é considerada uma das principais causas da baixa produtividade da cultura (Thambugala & Deshappriya, 2009). A doença foi relatada, também, no Brasil (Henz et al. 1992; Saha et al., 2002) e na Colômbia (Sterling et al., 2011), onde é a segunda doença foliar mais limitante na cultura da seringueira.

A antracnose causa queda secundária das folhas, causando a redução na produção de látex (Furtado & Trindade, 2005), entretanto, a mensuração do impacto econômico da severidade da antracnose não é tarefa simples devido aos repetidos ciclos da doença que limitam as metodologias de quantificação. Por essa razão, diferentes autores consideram que as perdas na produção de látex são devidas à redução da área foliar, afetando o processo fotossintético, e de assimilados necessários para a síntese do látex (Saha et al., 2002).

#### **3.2.1. Agente causal**

A antracnose foi relatada pela primeira vez no Sri Lanka in 1905 (Petch, 1921) e o agente causal identificado como *Glomerella cingulata*, teleomorfo de espécies de *Gloeosporium* e *Colletotrichum* (Carpenter & Stevenson, 1954). Estudos feitos na Sri Lanka e Gabão mostraram que *C. gloeosporioides* Penz é o agente causal da antracnose em seringueira. No entanto, *C. acutatum* foi relatada como a espécie mais comumente associada à antracnose foliar no Sri Lanka (Jayasinghe et al., 1997). Recentemente, esta espécie foi relatada no Brasil causando danos em frutos e folhas (Sierra, 2010). Adicionalmente, *C. dematium* (Pers. ex Fr.) e *C. crassipes* (Speg.) são relatadas como causadoras de danos em seringueira (Wastie & Janardhanan, 1970). Entretanto, vários estudos têm demonstrado que as variações na virulência provavelmente são produto da ação de um

complexo de espécies de *Colletotrichum* associado às epidemias (Brown & Soepena, 1994; Fernando et al., 2000; Guyot et al., 2001; Saha et al., 2002; Guyot et al., 2005).

### **3.2.2. Sintomas**

Os sintomas iniciais da doença podem ser observados em folhas novas, brotações e frutos, como pequenas manchas de coloração marrom com o centro escuro apresentando um halo clorótico. A coalescência de várias manchas pode formar uma lesão que perfura a folha. Os sintomas mais avançados desta doença nas folhas são visualizados como necroses e enrugamento dos folíolos, o que pode levar à desfolha prematura, além de causar redução nos estádios de desenvolvimento foliar de plantas jovens e maduras. Em condições ótimas de umidade e temperatura ocorre frutificação do fungo que é visível sob microscópio estereoscópico como pequenas massas de coloração rósea formada nos pontos necrosados ou nas folhas enrugadas. As massas de esporos podem ser tão abundantes que podem ser vistas a olho nu (Wastie, 1967; Gasparotto et al., 1997). Os diferentes tipos de sintomas da doença fornecem informação útil para determinar a estrutura genética e as relações entre populações de *Colletotrichum* (Saha et al., 2002). No Estado de São Paulo verificou-se a ocorrência do fungo em folhas, ramos e inflorescências (Silveira & Cardoso, 1987), hastes e gemas de enxerto em jardim clonal e viveiros (Furtado & Silveira, 1992) e também, em painéis de sangria (Silveira et al., 1992).

### **3.2.3. Epidemiologia**

A colonização por *Colletotrichum* sp. pode ocorrer em todos os órgãos da seringueira, mas a esporulação é maior em lesões jovens presentes em frutos maduros, onde acérvulos são formados em abundância. A dispersão do inóculo a longas distâncias pode ser favorecida pela altura das árvores. Chuvas leves favorecem a dispersão, porém, em alta intensidade, as chuvas e ventos não necessariamente resultam em alta dispersão dos esporos e o padrão da infecção depende, fortemente, da direção e intensidade de ventos (Guyot et al., 2005). A severidade da doença e a esporulação do patógeno

aumentam com a concentração de conídios e o tempo de molhamento foliar (Guyot et al., 2005). O surgimento de sintomas ocorre dois dias após a inoculação, mas frequentemente, o período de incubação varia de 3 a 4 dias, e a esporulação apresenta-se depois do quinto dia (Furtado & Trinidad, 2005, Guyot et al., 2005). Em condições de alta concentração de inóculo e longos períodos de molhamento foliar, as lesões aparecem em todos os folíolos praticamente ao mesmo tempo. Sintomas severos da antracnose foliar foram observados quando inoculou-se suspensão de  $10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  com 14h e 16h de molhamento foliar pós-inoculação (Guyot et al., 2005).

Em outros trabalhos *in vitro* foi encontrado que *C. acutatum* esporulou em BDA sob temperaturas que oscilaram entre 10 a 40 °C com um ótimo de 15 a 25°C. Alta germinação (90%) de conídios ocorreu entre 15 a 35°C. A água livre promove a germinação de conídios, mas não é essencial, pois ocorre germinação sob condições de alta umidade relativa (95%). Em *C. acutatum*, constata-se auto inibição da germinação de conídios a concentrações de  $8 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  (Fernando et al., 2000).

#### **3.2.4. Identificação**

Comumente, a identificação de espécies de *Colletotrichum* é baseada em características morfológicas, como tamanho e formato de conídios, conformações da célula conidiogênica e coloração (matiz e intensidade) da colônia (Lenné et al., 1984; Smith & Black, 1990; Mills, 1992; Menezes 2002). Porém, devido à plasticidade fenotípica apresentada pelas espécies do gênero *Colletotrichum*, a identificação e classificação, tradicionalmente baseadas em caracteres morfológicos, apresentam limitações. A combinação de técnicas complementares como as bioquímicas e moleculares deve ser empregada para assegurar a acurácia destes processos (Menezes, 2006). Por exemplo, no caso de espécies que afetam seringueira, características complementares como a sensibilidade aos fungicidas Benomyl, Carbendazim e Tiofanato metílico e o crescimento mais lento em uma dada faixa de temperatura, são características confiáveis para distinguir isolados de *C. acutatum* de *C. gloeosporioides* (Jayasinghe, 1998).

A correta identificação do agente causal é ponto de partida para gerar informações biológicas básicas acerca da doença e delinear estratégias de controle. Saha et al. (2002) evidenciaram mediante a utilização de análises com marcadores RAPD e rDNA que as duas espécies de *Colletotrichum* associadas à *Hevea* podem causar três tipos de sintomas. O complexo de espécies de *Colletotrichum* que afeta seringueira induz diferentes sintomas tais como pequenas lesões cor marrom com halo clorótico, necrose e enrugamento dos folíolos. Portanto, é possível que cada espécie seja afetada pela quantidade de inóculo, umidade foliar, capacidade de dispersão e condições ambientais que acabam por resultar de maneiras diferenciadas a infecção.

### **3.2.5. Análise de dissociação em alta resolução (*High-Resolution Melting* – HRM)**

A análise de HRM se baseia na taxa de dissociação da dupla fita do DNA em função da temperatura. Por sua vez, esta taxa depende das propriedades termodinâmicas do produto, comprimento da sequência, complementariedade e conteúdo de guanina-citosina. Estes fatores determinam as alterações específicas na fluorescência e na curva de resposta à fusão ao longo da análise devido à dissociação do DNA (Reed & Wittwer, 2004). A técnica de HRM tem sido um procedimento analítico interessante para estudos de genotipagem, determinação de mutações, seleção de pre-sequências, estudos epigenéticos (metilações) e constitui uma alternativa para géis de eletroforese (Wittwer et al., 2003; Vossen et al., 2009). A técnica de HRM é considerada como uma metodologia analítica simples, de baixo custo, fácil utilização, alta sensibilidade e especificidade (Vossen et al., 2009). No entanto é uma técnica que depende fortemente de uma boa análise de PCR, instrumentos e corantes (Wittwer, 2009).

Em fitopatologia, a técnica de HRM vem sendo empregada para diferentes propósitos. Por exemplo, recentemente demonstrou-se que HRM associada a RT-PCR foi eficiente para a diferenciação e genotipagem do complexo de *Fusarium oxysporum* em culturas puras, constituindo um ensaio rápido, barato, acurado e uma potencial técnica para classificar

isolados desconhecidos que pode ser utilizada no momento que as variações genotípicas entre as formas especiais sejam determinadas (Ganopoulos et al., 2012). Dadas as características mencionadas, espera-se que HRM possa ser útil para auxiliar a diagnose e identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da seringueira.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Obtenção dos isolados

Foram coletadas folhas de *Hevea brasiliensis* com sintomas de antracnose de diferentes plantações localizadas em Oratórios, MG; Ituberá, BA; Mato Grosso, MT e Manaus, AM. Após a coleta, as folhas foram levadas para o laboratório e lavadas com detergente. Posteriormente, procedeu-se à desinfestação superficial com imersão, sequencialmente, em etanol 70% (30s), hipoclorito de sódio a 2% (1 min), enxaguadas com água esterilizada e deixadas secar sobre papel toalha esterilizado dentro da câmara de fluxo (Alfenas & Mafia, 2007). Fragmentos de lesões compreendidos entre área necrosada e tecido assintomático foram cortados e transferidos para cultivo em batata dextrose ágar (BDA) suplementado de cloranfenicol ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e sulfato de estreptomicina ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). As placas de Petri foram mantidas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12h.

Culturas monospóricas foram obtidas iniciando-se com a raspagem da cultura pura para obter conídios e preparo da suspensão com a adição de 1 mL de água destilada esterilizada às placas. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  dessa suspensão foi transferida para placas com meio BDA e distribuída uniformemente com alça de Drigalski sobre o meio. O procedimento foi realizado sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar, e as placas mantidas em BOD a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 16h. Decorrido este período, observou-se, sob microscópio estereoscópico, a germinação dos conídios. O conídio com tubo germinativo desenvolvido foi retirado da superfície do meio de cultura com ajuda de um bisturi e transferido para o centro de uma placa de Petri contendo BDA. As placas foram mantidas em BOD a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12h luz, até o desenvolvimento das colônias monospóricas. Essas colônias foram então repicadas para novas placas para uso posterior nos experimentos e outra parte foi preservada pelo método Castellani em água esterilizada. Todos os isolados obtidos e, ou, utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Descrição dos isolados usados para identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* spp. associadas à antracnose foliar da seringueira.

Complexo de <i>Colletotrichum</i> spp.	Hospedeiro	Código do Isolado	Local de Coleta	Data da Coleta
	<i>Lupinus</i>	CBS 109225	Ucrânia	
<i>C. acutatum</i>	<i>H. brasiliensis</i> clone FDR5788	UFV C47MT	Itiquira (MT)	2011
	<i>H. brasiliensis</i>	UFV C38BA	Ituberá (BA)	2011
	<i>H. brasiliensis</i> clone FDR5788	UFV C52MT	Itiquira (MT)	2011
	<i>H. brasiliensis</i>	UFV C8BA	Ituberá (BA)	2011
	<i>H. brasiliensis</i>	UFV C1MA	Ituberá (AM)	2011
	<i>H. brasiliensis</i>	UFV C2MA	Ituberá (AM)	2011
		<i>Sinicum</i>	CBS 123755	Japão
<i>C. boninense</i>	<i>H. brasiliensis</i>	UFV C1BA	Ituberá (BA)	2011
	<i>H. brasiliensis</i>	UFV C6BA	Ituberá (BA)	2011
	<i>H. brasiliensis</i> clone RIMM 600	UFV C1MG	Oratórios (MG)	2013
<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Citrus sinensis</i>	CBS 953.97	Itália	
	<i>H. brasiliensis</i> clone FDR5788	UFV C37MT	Itiquira (MT)	2011
	<i>H. brasiliensis</i>	UFV C5BA	Ituberá (BA)	2011
Não definido	<i>H. brasiliensis</i>	UFV C38 MT	Itiquira (MT)	2011
	<i>H. brasiliensis</i>	UFV C44 MT	Itiquira (MT)	2011
	<i>H. brasiliensis</i>	UFV C48MT	Itiquira (MT)	2011
	<i>H. brasiliensis</i>	UFV C50 MT	Itiquira (MT)	2011
	<i>H. brasiliensis</i>	UFV C4MA	Manaus (AM)	2011

**Tabela 1.** (Continuação).

Complexo de <i>Colletotrichum</i> spp.	Hospedeiro	Código do Isolado	Local de Coleta	Data da Coleta
	<i>H. brasiliensis</i>	UFV C6MA	Manaus (AM)	2011
	<i>H. brasiliensis</i>	UFV C9MA	Manaus (AM)	2011
	<i>H. brasiliensis</i>	UFV C2MG	Oratórios (MG)	2013
	<i>H. brasiliensis</i>	UFV C3MG	Oratórios (MG)	2013
	<i>H. brasiliensis</i>	UFV C4MG	Oratórios (MG)	2013
Não definido	<i>H. brasiliensis</i>	UFV C5MG	Oratórios (MG)	2013
	<i>H. brasiliensis</i>	UFV C6MG	Oratórios (MG)	2013
	<i>H. brasiliensis</i>	UFV C7MG	Oratórios (MG)	2013
	<i>H. brasiliensis</i>	UFV C56AC	Acre (AC)	2013
	<i>H. brasiliensis</i>	UFV C57AC	Acre (AC)	2013
	<i>H. brasiliensis</i>	UFV C56FAC	Acre (AC)	2013

#### 4.2. Teste de patogenicidade

A suspensão de conídios foi obtida a partir de inóculo produzido em folhas destacadas de seringueira inoculadas com cada um dos isolados utilizando três folíolos por isolado. Cinco dias após a inoculação, os conídios e a massa mucilaginosa das folhas foram retirados com ajuda de uma agulha histológica e transferidos para um Becker contendo 20 mL de água destilada esterilizada. A concentração de inóculo foi ajustada para  $10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  após a contagem em câmara de Neubauer (Soares et al., 2008).

Folíolos em estágio B2 (Hallé et al., 1978) obtidos de clones FX3864, de sete meses de idade, cultivados sob condições de casa de vegetação, foram destacados e inoculados por aspersão. Os folíolos foram colocados em câmaras úmidas constituídas por bandejas plásticas (35cm × 29cm × 8cm) e mantidas a 25°C. Utilizaram-se seis folíolos por isolado, considerando um folíolo como repetição. Diariamente, avaliou-se a presença de sintomas para determinar o período de incubação (PI). As avaliações

iniciaram-se 24h após a inoculação e se estenderam até sete dias após da inoculação. O PI para cada isolado foi considerado completo quando 50% dos folíolos apresentaram sintomas de antracnose correspondentes à nota três (3) da escala descrita por Guyot et al. (2005): 0 = sem lesão, 1 = pequenos pontos necróticos escuros, 2 = menos de 10 lesões de diâmetro menor de 5mm, ou uma ou duas lesões com diâmetro maior que 5 mm, 3 = muitas lesões pequenas de diâmetro menor de 5 mm, com pequena distorção do folíolo, 4 = lesões grandes e distorções grandes, 5 = folíolo quase totalmente necrótico.

### **4.3. Identificação molecular**

#### **4.3.1. Extração de DNA**

Culturas monospóricas cultivadas em meio líquido batata dextrose (BD) durante cinco dias foram usadas para a extração de DNA. O micélio foi coletado, seco em papel filtro esterilizado e macerado em nitrogênio líquido. O DNA genômico foi obtido utilizando-se o kit *Wizard Genomic DNA Purification Kit*<sup>®</sup> (Promega, Madison, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA integral foi analisado por eletroforeses em gel de agarose e a concentração quantificada utilizando espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher scientific Inc., Waltham, EUA).

#### **4.3.2. Seleção de isolados baseado na análise de curvas de dissociação de alta resolução (HRM)**

Dezessete isolados (Tabela 1) foram avaliados quanto ao perfil de dissociação de alta resolução (HRM) obtido com base no polimorfismo do espaçador interno transcrito do DNA ribossomal (ITS), região considerada como marcador universal em fungos (Conrad et al., 2012) e comumente usada em trabalhos com DNA *barcode*. As análises de HRM foram realizadas com o Rotor Gene Q usando o kit Type-it HRM<sup>™</sup> PCR da Quiagen, de acordo com as recomendações do fabricante. Para a seleção dos perfis de HRM e classificação dos isolados em possíveis subgrupos, incluíram-se três isolados-tipo correspondentes aos três complexos de *Colletotrichum* estudados por Damm et al. (2012): Isolado CBS 109225 do

complexo *C. acutatum*, isolado CBS 123755 do complexo *C. boninense* e isolado CBS 953.97 do complexo *C. gloeosporioides*. Os isolados foram agrupados com base nos diferentes perfis e classificados com base na similaridade do perfil obtido para os isolados-tipo. Foram escolhidos 10 isolados para as análises filogenéticas e morfológicas.

#### 4.3.3. Análises de filogenia molecular

O conjunto de *primers* das regiões nucleares utilizados por Damm et al. (2012) para separar espécies nos complexos *C. acutatum*, *C. boninensis* e *C. gloeosporioides* foi utilizado para as reações de PCR e posterior sequenciamento. Para as espécies do complexo *C. acutatum* foram utilizadas as regiões ITS, sequências parciais dos genes da actina (*ACT*), beta-tubulina (*TUB2*), quitina sintase (*CHS-1*) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) (Tabela 2). Para as espécies do complexo *C. gloeosporioides* e *C. boninensis* utilizaram-se as regiões ITS, *ACT*, *TUB2*, *CHS-1*, *GAPDH*, e sequências parciais do gene da calmodulina (*CAL*) (Tabela 3).

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas utilizando um volume total de 25 µL nas reações, com mistura contendo 30 µg de DNA, 0,2 µM de cada *primer* e 1X de DreamTaq™ DNA polimerase Master mix como recomendado pelo fabricante (Thermo Fisher Scientific). As reações de PCR foram realizadas no termociclador PTC100 (MJ Research), com um passo de desnaturação inicial de 5min a 94°C, seguido por 40 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 72°C e extensão final de 72°C durante 7min. Os produtos do PCR foram visualizados por fluorescência de ultravioleta em gel de agarose a 1% em 1X de buffer TBE e GelRed™ (Biotium).

Os fragmentos amplificados foram purificados com a enzima ExoSAP-it utilizando 2 µL da enzima e 5 µL das reações de PCR, com incubação a 37°C durante 30min seguido de um passo final a 80°C durante 15min. O sequenciamento dos produtos de PCR foi realizado pela empresa MACROGEN, Inc. (Seul, Coreia do Sul). O consenso das sequências e

*contigs* foram montados a partir das sequências direta e reversa, utilizando-se o software SeqAssem (Sequentix). Foram utilizadas sequências adicionais de membros dos complexos *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. boninensis* (Damm et al., 2012b), obtidas a partir do GenBank (Tabela 4).

O alinhamento das sequências foi realizado com o programa MUSCLE implementado no pacote MEGA 5.1 (Tamura et al., 2011) e, quando necessário, foram realizados ajustes manualmente. A filogenia foi reconstruída por meio de métodos baseados em inferência Bayesiana. As árvores filogenéticas foram inferidas utilizando o programa Mr Bayes v.3.2.1 (Ronquist et al., 2012). As sequências parciais dos genes *ACT*, *TUB2*, *CHS* e ITS foram concatenados e se realizaram análises de todos os dados.

Foram realizadas simulações por  $5 \times 10^7$  gerações e amostras foram tomadas a cada 1000 gerações. Foi utilizado o programa Tracer v 1.5 (Rambaut & Drummond, 2009) para analisar a convergência dos dados. As árvores filogenéticas foram visualizadas e editadas com o programa FigTree v 1.4.0 (Rambaut, 2009). Sequências obtidas a partir do GenBank foram utilizadas para construir diferentes conjuntos de dados, definidos conforme cada complexo de espécies de *Colletotrichum*.

#### **4.4. Diagnóstico molecular**

##### **4.4.1. Análise com *primers* específicos**

Foram utilizados *primers* específicos descritos na literatura para identificar possíveis espécies de *Colletotrichum* spp. (Tabela 4). Adicionalmente, compararam-se *primers* desenhados a partir das sequências de *GAPDH* de dez isolados usando o programa Primer 3 v.0.4.0 (Rozen & Skaletsky, 2012). As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas com o Kit Master Mix (Thermo Fisher Scientific).

**Tabela 2.** Descrição dos *primers* usados para identificação de espécies de *Colletotrichum* dos complexos *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *C. boninensis*.

Genes	Nome do produto e tamanho	Sequência do <i>primer</i>	Referência
<i>ACT</i>	Actina (316 bp).	ACT-512F ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC ACT-783R TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT	Carbone & Kohn, 1999
<i>CAL</i>	Calmodulina (756 bp)	CL1C GAA TTC AAG GAG GCC TTC TC CL2C CTT CTG CAT CAT GAG CTG GAC	Damm et al., 2012
<i>CHS</i>	Quitina sintase (229 bp).	CHS-79F TGG GGC AAG GAT GCT TGG AAG AAG CHS-354R TGG AAG AAC CAT CTG TGA GAG TTG	Carbone & Kohn, 1999
<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase (308 bp).	GDF1 GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA GDR1 GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT	Guerber et al., 2003
ITS	Espaçador interno transcrito do DNA ribossomal (615 bp)	ITS-1F CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTAA ITS-4 TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	Gardes & Bruns, 1993; White et al., 1990
<i>GS</i>	Glutamina sintase (907 bp).	GSF1 ATG GCC GAG TAC ATC TGG GsF3 GAA CCG TCG AAG TTC CAC	Stephenson et al., 1997
<i>BT2B</i>	$\beta$ -Tubulina 2 (716 bp).	T1 AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT Bt-2b ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	O'Donnell & Cigelnik, 1997 ; Glass & Donaldson, 1995
ITS	Espaçador interno transcrito do DNA ribossomal (615 bp)	CaInt2 GGGGAAGCCTCTCGCGG ITS-4 TCCTCCGCTTATTGA TATGC	Afanador et al., 2003; White et al., 1990

**Tabela 2.** (Continuação).

Genes	Nome do produto e tamanho	Sequência do <i>primer</i>	Referência
ITS	Espaçador interno transcrito do DNA ribossomal (615 bp)	CgInt GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG ITS-4 TCCTCCGCTTATTGA TAT GC	Brown et al., 1996; White et al., 1990
ITS	Espaçador interno transcrito do DNA ribossomal (615 bp)	Col1 GCCGTCCCCTGAAAAG ITS-4 TCCTCCGCTTATTGA TATGC	Pileggi et al., 2009; White et al. 1990
<i>GADPH</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (308 bp).	CaCGAPDH CCACTTTACCCCTCCATCAT CaCGAPDHR GCAARTTYTGTCTCGGCTGT	Este estudo
<i>GADPH</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (308 bp).	CgCGAPDH CCCAYYTACCCCTCCAAACT CgCGAPDHR TGTGAAGWCGAGTCAGTAMATG	Este estudo
<i>GADPH</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (308 bp).	CbCGAPDH CACTTACCCCTCCAAGGTCA CbCGAPDHR TTGTTGGGCCAAACGAGTAT	Este estudo

**Tabela 3.** Modelo de substituição de nucleotídeos utilizados na análise bayesiana.

Gene	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. boninensis</i>	<i>C. acutatum</i>
Espaçador interno transcrito do DNA ribossomal (ITS)	GTR+I	SYM+I+G	GTR+I
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase ( <i>GAPDH</i> )	HKY+I	HKY+I	SYM+G
Actina ( <i>ACT</i> )	HKY+I	HKY+G	HKY+G
Quitina sintase ( <i>CHS-1</i> )	K80+G	K80+G	K80+I+G
$\beta$ -Tubulina 2 ( <i>TUB2</i> )	SYM+I	HKY+I	HKY+G
Calmodulina ( <i>CAL</i> )	GTR+G	GTR+I	-

GTR: *general time reversible*. HKY Hasegawa-Kishino-Yano. K80: Kimura 2-*parameter*. SYM: *symmetrical model*. I: *proportion of invariable sites* G: *gamma distribution*.

#### 4.4.2. Diagnóstico molecular baseado na análise de curvas de dissociação de alta resolução (*High resolution melt - HRM*)

Todos os isolados não incluídos nos estudos de filogenia molecular e morfologia foram definidos como complexo não definido (Tabela 1), sendo avaliado seu perfil de dissociação de alta resolução (HRM) obtido com base no polimorfismo do espaçador interno transcrito do DNA ribossomal (ITS), e no perfil do gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*).

**Tabela 4.** Descrição das unidades taxonômicas operacionais de *Colletotrichum* spp. usadas nas análises filogenéticas.

Complexo	Espécies	Acesso	Hospedeiro	Localização	GenBank No.					
					ITS	GAPDH	CHS-1	ACT	TUB2	CAL
<i>C. acutatum</i>	<i>C. acerbum</i>	PRJ 1199.3	<i>Malus domestica</i>	Nova Zelândia	JQ948459	JQ948790	JQ949120	JQ949780	JQ950110	
	<i>C. acutatum</i>	STE-U 5292	<i>Carica papaya</i>	Austrália	JQ005776	JQ948677	JQ005797	JQ005839	JQ005860	
	<i>C. australe</i>	HKUCC 2616	<i>Trachycarpus fortunei</i>	África do Sul	JQ948455	JQ948786	JQ949116	JQ949776	JQ950106	
	<i>C. brisbanense</i>	DPI 11711	<i>Capsicum annuum</i>	Austrália	JQ948291	JQ948621	JQ948952	JQ949612	JQ949942	
	<i>C. chrysanthemi</i>	CBS 126519	<i>Chrysanthemum coronarium</i>	Holanda	JQ948272	JQ948602	JQ948933	JQ949593	JQ949923	
	<i>C. cosmi</i>	PD 73/856	<i>Cosmos</i> sp.	Holanda	JQ948274	JQ948604	JQ948935	JQ949595	JQ949925	
	<i>C. costaricense</i>	CBS 330.75	<i>Coffea arabica</i>	Costa Rica	JQ948180	JQ948510	JQ948841	JQ949501	JQ949831	
	<i>C. cuscatae</i>	CPC 18873	<i>Cuscuta</i> sp.	Dominica	JQ948195	JQ948525	JQ948856	JQ949516	JQ949846	
	<i>C. floriniae</i>	CBS 125396	<i>Malus domestica</i>	USA	JQ948299	JQ948629	JQ948960	JQ949620	JQ949950	
	<i>C. godetiae</i>	CBS 133.44	<i>Clarkia hybrida</i> cv. <i>Kelvon Glory</i>	Dinamarca	JQ948402	JQ948733	JQ949063	JQ949723	JQ950053	
	<i>C. guajavae</i>	CPC 18893	<i>Psidium guajava</i>	Índia	JQ948270	JQ948600	JQ948931	JQ949591	JQ949921	
	<i>C. indonesiense</i>	CPC 14986	<i>Eucalyptus</i> sp.	Indonésia	JQ948288	JQ948618	JQ948949	JQ949609	JQ949939	
	<i>C. johnstonii</i>	PRJ 1139.3	<i>Solanum lycopersicum</i>	Nova Zelândia	JQ948444	JQ948775	JQ949105	JQ949765	JQ950095	
	<i>C. kinghornii</i>	CBS 198.35	<i>Phormium</i> sp.	Reino Unido	JQ948454	JQ948785	JQ949115	JQ949775	JQ950105	
	<i>C. laticipillum</i>	STE-U 5303	<i>Hevea brasiliensis</i>	Índia	JQ948289	JQ948619	JQ948950	JQ949610	JQ949940	
	<i>C. limetticola</i>	CBS 114.14	<i>Citrus aurantifolia</i>	USA Florida	JQ948193	JQ948523	JQ948854	JQ949514	JQ949844	
	<i>C. lupini</i>	BBA 70884	<i>Lupinus albus</i>	Ucrânia	JQ948155	JQ948485	JQ948816	JQ949476	JQ949806	
	<i>C. melonis</i>	CBS 159.84	<i>Cucumis melo</i>	Brasil	JQ948194	JQ948524	JQ948855	JQ949515	JQ949845	
	<i>C. nymphaeae</i>	CBS 100064	<i>Anemone</i> sp.	Holanda	JQ948224	JQ948554	JQ948885	JQ949545	JQ949875	
	<i>C. orchidophilum</i>	CBS 632.80	<i>Dendrobium</i> sp.	USA	JQ948151	JQ948481	JQ948812	JQ949472	JQ949802	
<i>C. paxtonii</i>	CPC 18868	<i>Musa</i> sp.	Santa Lucia	JQ948285	JQ948615	JQ948946	JQ949606	JQ949936		
<i>C. phormii</i>	AR 3546	<i>Phormium</i> sp.	Alemanha	JQ948446	JQ948777	JQ949107	JQ949767	JQ950097		

**Tabela 4. (Continuação).**

Complexo	Espécies	Acesso	Hospedeiro	Localização	GenBank No.					
					ITS	GAPDH	CHS-1	ACT	TUB2	CAL
	<i>C. pseudoacutatum</i>	CBS 436.77	<i>Pinus radiata</i>	Chile	JQ948480	JQ948811	JQ949141	JQ949801	JQ950131	
	<i>C. pyricola</i>	PRJ 977.1	<i>Pyrus communis</i>	Nova Zelândia	JQ948445	JQ948776	JQ949106	JQ949766	JQ950096	
	<i>C. rhombiforme</i>	RB011	<i>Olea europaea</i>	Portugal	JQ948457	JQ948788	JQ949118	JQ949778	JQ950108	
	<i>C. salicis</i>	CBS 607.94	<i>Salix</i> sp.	Holanda	JQ948460	JQ948791	JQ949121	JQ949781	JQ950111	
	<i>C. scovillei</i>	BBA 70349	<i>Capsicum</i> sp.	Indonésia	JQ948267	JQ948597	JQ948928	JQ949588	JQ949918	
	<i>C. simmondsii</i>	BRIP 28519	<i>Carica papaya</i>	Austrália	JQ948276	JQ948606	JQ948937	JQ949597	JQ949927	
	<i>C. sloanei</i>	CPC 18929	<i>Theobroma cacao</i>	Malásia	JQ948287	JQ948617	JQ948948	JQ949608	JQ949938	
	<i>C. tamarilloi</i>	T.A.6	<i>Solanum betaceum</i>	Colômbia	JQ948184	JQ948514	JQ948845	JQ949505	JQ949835	
	<i>C. walleri</i>	BMT(HL)19	<i>Coffea</i> sp.	Vietnã	JQ948275	JQ948605	JQ948936	JQ949596	JQ949926	
<i>C. boninense</i>	<i>C. annellatum</i>	CH1	<i>Hevea indica</i>	Colômbia	JQ005222	JQ005309	JQ005396	JQ005570	JQ005656	JQ005743
	<i>C. beeveri</i>	ICMP 18594	<i>Brachyglottis repanda</i>	Nova Zelândia	JQ005171	JQ005258	JQ005345	JQ005519	JQ005605	JQ005692
	<i>C. boninense</i>	MAFF 305972	<i>Crinum asiaticum</i> var. <i>sinicum</i>	Japão	JQ005153	JQ005240	JQ005327	JQ005501	JQ005588	JQ005674
	<i>C. brasiliense</i>	PAS12	<i>Passiflora edulis</i>	Brasil	JQ005235	JQ005322	JQ005409	JQ005583	JQ005669	JQ005756
	<i>C. brassicicola</i>	LYN 16331	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	Nova Zelândia	JQ005172	JQ005259	JQ005346	JQ005520	JQ005606	JQ005693
	<i>C. colombiense</i>	G2	<i>Passiflora edulis</i>	Colômbia	JQ005174	JQ005261	JQ005348	JQ005522	JQ005608	JQ005695
	<i>C. constrictum</i>	ICMP 12941	<i>Citrus limon</i>	Nova Zelândia	JQ005238	JQ005325	JQ005412	JQ005586	JQ005672	JQ005759
	<i>C. cymbidiicola</i>	IMI 347923	<i>Cymbidium</i> sp.	Austrália	JQ005166	JQ005253	JQ005340	JQ005514	JQ005600	JQ005687
	<i>C. dacrycarpi</i>	ICMP 19107	<i>Dacrycarpus dacrydioides</i>	Nova Zelândia	JQ005236	JQ005323	JQ005410	JQ005584	JQ005670	JQ005757
	<i>C. gloeosporioides</i>	STE-U 4295	<i>Citrus sinensis</i>	Itália	JQ005152	JQ005239	JQ005326	JQ005500	JQ005587	JQ005673
	<i>C. hippeastri</i>	CSSG1	<i>Hippeastrum vittatum</i>	China	JQ005231	JQ005318	JQ005405	JQ005579	JQ005665	JQ005752
	<i>C. karstii</i>	CBS 128500	<i>Annona cherimola</i>	Nova Zelândia	JQ005202	JQ005289	JQ005376	JQ005550	JQ005636	JQ005723
	<i>C. novae-zelandiae</i>	ICMP 12944	<i>Capsicum annuum</i>	Nova Zelândia	JQ005228	JQ005315	JQ005402	JQ005576	JQ005662	JQ005749
	<i>C. oncidii</i>	CBS 129828	<i>Oncidium</i> sp.	Alemanha	JQ005169	JQ005256	JQ005343	JQ005517	JQ005603	JQ005690

**Tabela 4. (Continuação).**

Complexo	Espécies	Acesso	Hospedeiro	Localização	GenBank No.					
					ITS	GAPDH	CHS-1	ACT	TUB2	CAL
	<i>C. parsonsiae</i>	ICMP 18590	<i>Parsonsia capsularis</i>	Nova Zelândia	JQ005233	JQ005320	JQ005407	JQ005581	JQ005667	JQ005754
	<i>C. petchii</i>	CBS 378.94	<i>Dracaena marginata</i>	Itália	JQ005223	JQ005310	JQ005397	JQ005571	JQ005657	JQ005744
	<i>C. phyllanthi</i>	MACS 271	<i>Phyllanthus</i>	Índia	JQ005221	JQ005308	JQ005395	JQ005569	JQ005655	JQ005742
	<i>C. torulosum</i>	ICMP 18586	<i>Solanum melongena</i>	Nova Zelândia	JQ005164	JQ005251	JQ005338	JQ005512	JQ005598	JQ005685
<i>C. gloesporoides</i>	<i>C. aenigma</i>	ICMP 18608	<i>Persea americana</i>	Israel	JX010244	JX010044	JX009774	JX009443	JX010389	JX009683
	<i>C. aeschynomenes</i>	ICMP 17673	<i>Aeschynomene virginica</i>	USA	JX010176	JX009930	JX009799	JX009483	JX010392	JX009721
	<i>C. alatae</i>	CBS 304.67	<i>Dioscorea alata</i>	Índia	JX010190	JX009990	JX009837	JX009471	JX010383	JX009738
	<i>C. alienum</i>	ICMP 12071	<i>Malus domestica</i>	Nova Zelândia	JX010251	JX010028	JX009882	JX009572	JX010411	JX009654
	<i>C. aotearoa</i>	ICMP 18537	<i>Coprosma</i> sp.	Nova Zelândia	JX010205	JX010005	JX009853	JX009564	JX010420	JX009611
	<i>C. asianum</i>	ICMP 18580	<i>Coffea arabica</i>	Tailândia	FJ972612	JX010053	JX009867	JX009584	JX010406	FJ917506
	<i>C. clidemiae</i>	ICMP 18658	<i>Clidemia hirta</i>	USA Hawaii	JX010265	JX009989	JX009877	JX009537	JX010438	JX009645
	<i>C. cordylinicola</i>	MFLUCC 090551	<i>Cordyline fruticosa</i>	Tailândia	JX010226	JX009975	JX009864	HM470235	JX010440	HM470238
	<i>C. fructicola</i>	ICMP 18581	<i>Coffea arabica</i>	Tailândia	JX010165	JX010033	JX009866	FJ907426	JX010405	FJ917508
	<i>C. gloeosporioides</i>	IMI 356878	<i>Citrus sinensis</i>	Itália	JX010152	JX010056	JX009818	JX009531	JX010445	JX009731
	<i>C. horii</i>	NBRC 7478	<i>Diospyros kaki</i>	Japão	GQ329690	GQ329681	JX009752	JX009438	JX010450	JX009604
	<i>C. kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i>	ICMP 18539	<i>Olea europaea</i>	Austrália	JX010230	JX009966	JX009800	JX009523	JX010434	JX009635
	<i>C. kahawae</i> subsp. <i>kahawae</i>	IMI 319418	<i>Coffea arabica</i>	Quênia	JX010231	JX010012	JX009813	JX009452	JX010444	JX009642
	<i>C. musae</i>	CBS 116870	<i>Musa</i> sp.	USA	JX010146	JX010050	JX009896	JX009433	HQ596280	JX009742
	<i>C. nupharicola</i>	CBS 470.96	<i>Nuphar lutea</i> subsp. <i>polysepala</i>	USA	JX010187	JX009972	JX009835	JX009437	JX010398	JX009663
	<i>C. psidii</i>	CBS 145.29	<i>Psidium</i> sp.	Itália	JX010219	JX009967	JX009901	JX009515	JX010443	JX009743
	<i>C. queenslandicum</i>	ICMP 1778	<i>Carica papaya</i>	Austrália	JX010276	JX009934	JX009899	JX009447	JX010414	JX009691
	<i>C. salsolae</i>	ICMP 19051	<i>Salsola tragus</i>	Hungria	JX010242	JX009916	JX009863	JX009562	JX010403	JX009696

**Tabela 4. (Continuação).**

Complexo	Espécies	Acesso	Hospedeiro	Localização	GenBank No.					
					ITS	GAPDH	CHS-1	ACT	TUB2	CAL
	<i>C. siamense</i>	ICMP 18578	<i>Coffea arabica</i>	Tailândia	JX010171	JX009924	JX009865	FJ907423	JX010404	FJ917505
	<i>C. theobromicola</i>	CBS 124945	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá	JX010294	JX010006	JX009869	JX009444	JX010447	JX009591
	<i>C. ti</i>	ICMP 4832	<i>Cordyline</i> sp.	Nova Zelândia	JX010269	JX009952	JX009898	JX009520	JX010442	JX009649
	<i>C. tropicale</i>	CBS 124949	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá	JX010264	JX010007	JX009870	JX009489	JX010407	JX009719
	<i>C. xanthorrhoeae</i>	BRIP 45094	<i>Xanthorrhoea preissii</i>	Austrália	JX010261	JX009927	JX009823	JX009478	JX010448	JX009653
	<i>Glomerella cingulata</i> "f.sp. <i>camelliae</i> "	ICMP 10643	<i>Camellia</i> × <i>williamsii</i>	Reino Unido	JX010224	JX009908	JX009891	JX009540	JX010436	JX009630

O DNA de lesões de folhas com sintomas de antracnoses também foi utilizado para análise de HRM. Para a seleção dos perfis de HRM e classificação dos isolados em possíveis subgrupos, incluiu-se um isolado-tipo correspondente a cada um dos três complexos de *Colletotrichum* estudados por Damm et al. (2012a, 2012b): Isolado CBS 109225 do complexo *C. acutatum*, isolado CBS 123755 do complexo *C. boninense* e isolado CBS 953.97 do complexo *C. gloeosporioides*. Os isolados UFV C1MA, UFV C2MA, UFV C6BA, UFV C37MT e UFV C5BA, obtidos de seringueira, foram escolhidos como isolados controle. Os isolados foram agrupados com base nos diferentes perfis e classificados com base na similaridade com os isolados-tipo e isolados de referência.

#### **4.5. Caracterização fisiológica e identificação morfológica**

Dez isolados foram escolhidos de modo a representar os diferentes grupos de curvas de HRM e as principais características morfológicas usadas para classificar espécies de *Colletotrichum* foram avaliadas (Sutton, 1980; Mills 1992; Smith & Black, 1990; Menezes, 2002). Inicialmente, os isolados foram submetidos aos procedimentos descritos no item 4.1 para obtenção de culturas monospóricas cultivadas em meio Aveia-ágar, batata dextrose ágar Difco® (BDA) e meio pobre em nutrientes (SNA; Nirenberg 1976). Cinco placas com cada meio foram usadas para cada isolado e o experimento foi realizado duas vezes. As placas foram mantidas a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12h. Diariamente, mensuraram-se os diâmetros perpendiculares das colônias e o diâmetro médio foi calculado. Os valores do diâmetro médio foram usados para calcular a taxa média de crescimento micelial ( $\text{mm dia}^{-1}$ ) estimada a partir da regressão linear do diâmetro (mm) em função do tempo (dias) e a área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM). A AACCM foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{AACCM} = \sum_{i=1}^{n-1} [(t_{i+1} - t_i)(y_i + y_{i+1})/2]$$

Onde  $t_i$  = tempo em dias e  $y_i$  = valores de crescimento da colônia observados em mm (Prada et al., 2009).

A descrição das culturas foi realizada seguindo o protocolo descrito por Sutton (1980). A caracterização da coloração de colônias foi baseada na chave micológica de cores (Rayner, 1970). Para observar a forma e o tamanho de apressórios foram preparadas microculturas (Damm et al., 2007) e após 18 dias o material foi analisado. Das folhas inoculadas no teste de patogenicidade (item 4.2) foram obtidos conídios de lesões típicas de antracnose e transferidos para lâminas de microscopia com lactofenol. As lâminas foram cobertas com lamínulas e se realizaram fotografias digitais com aumento de 80x com o microscópio Olympus (Olympus Co.Tokyo, Japan). Para todos os isolados, mensuraram-se o comprimento e largura de 120 conídios e de 90 apressórios com ajuda do software Image Plus v 2.0.

#### **4.6. Análise de dados**

As variâncias dos dois experimentos de crescimento de colônias foram comparadas com o teste de  $F_{max}$  para estimar a homogeneidade (Hartley, 1950). Como a hipótese de homogeneidade não foi rejeitada realizou-se análise de variância conjunta dos dados de diâmetro final de colônia, área abaixo da curva de crescimento micelial e taxa média de crescimento. Os dados morfológicos comprimento e largura de conídios e de apressórios foram descritos mediante estatística descritiva (Damm et al., 2012a). Os dados foram analisados com o pacote estatístico Minitab v. 15.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Isolados e teste de patogenicidade

Um conjunto de 27 isolados foi obtido a partir de folhas de seringueira. Testes de patogenicidade foram realizados para 11 isolados e todos foram patogênicos quando inoculados em folhas de seringueira. Os valores de período de incubação variaram de 3 a 4 dias, quando foi possível observar lesões necróticas de cor marrom. Os isolados foram novamente recuperados a partir das massas de conídios formadas nas lesões e comparados com os inicialmente inoculados. Para todos os isolados houve alta similaridade morfológica entre o material inoculado e aquele retirado das lesões.

### 5.2. Identificação molecular e seleção de isolados baseado na análise de curvas de dissociação de alta resolução (*High resolution melt - HRM*)

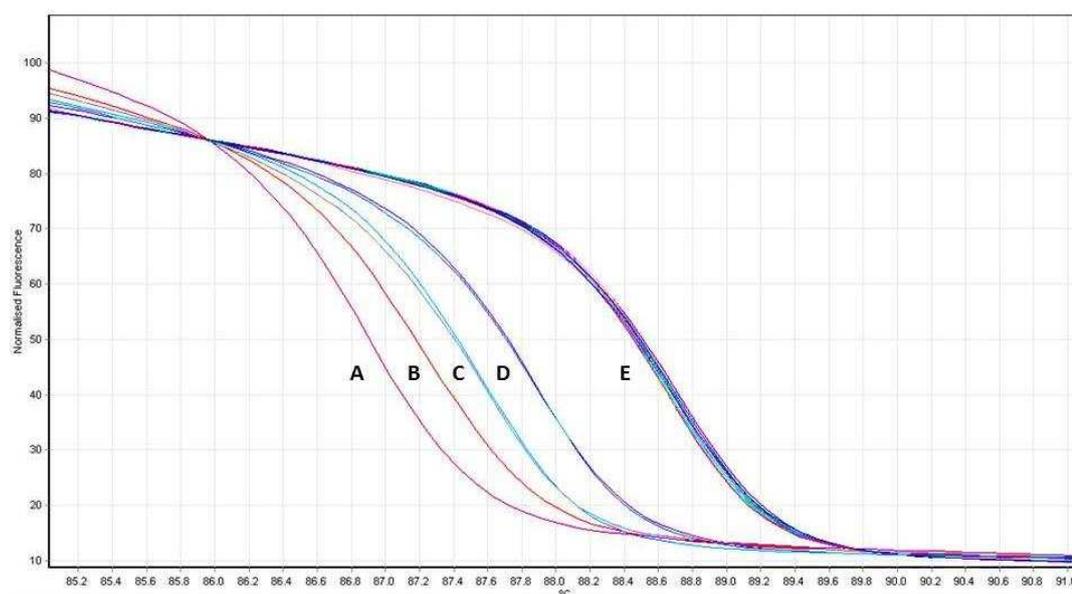
Constatou-se agrupamento dos isolados UFV C37MT e UFV C5BA em duas curvas, permitindo distinguir entre duas variantes dentro do complexo *C. gloeosporioides* (Fig. 1). Os isolados UFV C1BA e UFV C6BA agruparam junto à *C. karstii*, espécie do complexo *C. boninense*. Os isolados UFV C1MA, UFV C2MA, UFV C8BA, UFV C38BA, UFV C47MT e UFV C52MT do complexo *C. acutatum* formaram uma única curva.

### 5.3. Filogenia de espécies de *Colletotrichum* spp.

Com base nos quatro agrupamentos de curvas de HRM e na distribuição geográfica dos isolados em cada um destes agrupamentos, selecionaram-se 10 isolados para realizar análise filogenética molecular.

Os isolados UFV C57MT, UFV C8BA, UFV C1MA, UFV C2MA, UFV C47MT e UFV C38BA formaram um grupo contendo o isolado tipo de *C. acutatum*. Estes isolados foram analisados junto a outros 36 isolados do complexo *C. acutatum*. Como grupo externo (*outgroup*) escolheu-se a espécie *C. orchidophilum* (isolado CBS 632.80). Um total de 1671 nucleotídeos, resultante da concatenação de sequências parciais dos genes *ACT*, *CHS*, *GAPDH*, *TUB2* e *ITS*, foram alinhados, dos quais 1267 foram

conservados, 328 sítios variáveis, 174 informativos para parcimônia e 187 foram singletos.



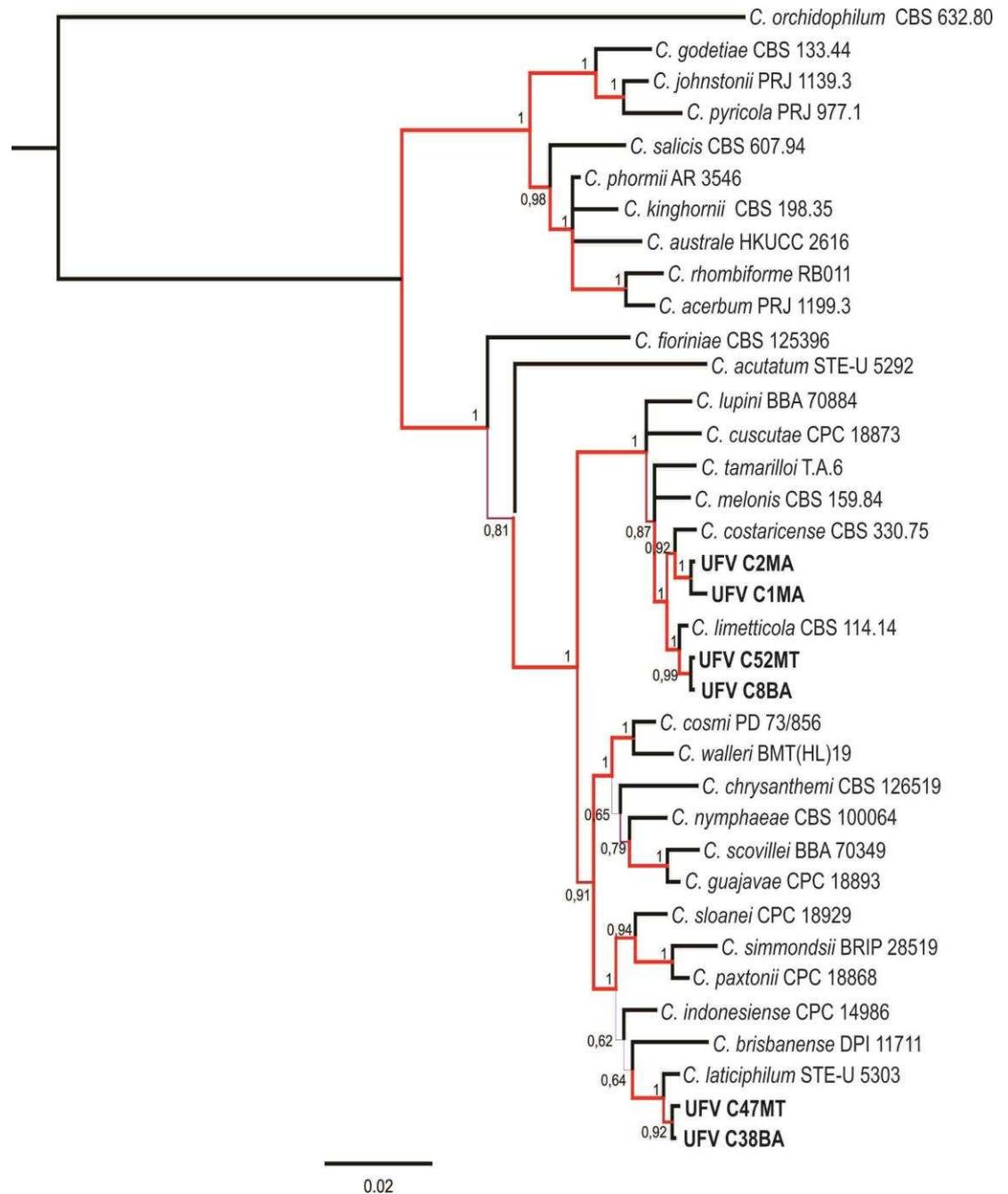
**Figura 1.** Análise de curvas de *high resolution melting* (HRM) geradas para isolados de cinco espécies de *Colletotrichum* obtidos de *Hevea brasiliensis*. Isolado UFV C37MT (A), *C. gloeosporioides* (B), *C. boninense* e UFV C5BA (C), UFV C6BA e UFV C1BA (D), *C. lupinni*, UFV C57MT, UFV C8BA, UFV C1MA, UFV C2MA, UFV C47MT e UFV C38BA (E). Utilizou-se uma amostra dos complexos *C. acutatum*, *C. boninense* e *C. gloeosporioides*, cada amostra foi feita em triplicata.

### 5.3.1. Filogenia de espécies do complexo *C. acutatum*

A análise bayesiana das espécies do complexo *C. acutatum* resultou no agrupamento dos seis isolados obtidos de seringueira em três grupos, cada um associado a um isolado-tipo de espécie distinta (Fig. 2). Os isolados UFV C1MA e UFV C2MA foram agrupados com *C. costarricense* com probabilidade *a posteriori* (PP) de 0,92. Os isolados UFV C57MT e UFV C8BA foram agrupados junto a *C. limeticola* com PP = 1,00. Os isolados UFV C47MT e UFV C38BA, agruparam com *C. laticiphilum* com PP = 1,00.

### **5.3.2. Filogenia de espécies do complexo *C. boninense***

O isolado UFV C1BA obtido de seringueira que agrupou com o isolado tipo de *C. boninense* na análise de HRM, foi comparado a outros 19 isolados desse complexo. Como grupo externo utilizou-se *C. gloeosporioides* (isolado IMI 356878). Após a concatenação de sequências parciais dos genes *ACT*, *CHS*, *GAPDH*, *TUB2*, *CAL* e ITS, obteve-se alinhamento de 2276 nucleotídeos, dos quais 1563 foram conservados, 687 sítios variáveis, 324 informativos para parcimônia e 361 singletos.



**Figura 2.** Árvore de espécies de inferência bayesiana contendo isolados do complexo *Colletotrichum acutatum*. Árvore construída utilizando dados concatenados de sequências parciais dos genes *ACT*, *CHS*, *GAPDH*, *TUB2* e *ITS*. A barra de escala representa o número de mudanças esperadas por sítio. Os números presentes em cada nó representam as probabilidades *a posteriori*.

A análise bayesiana das espécies do complexo *C. boninense* permitiram agrupar o isolado UFV C1BA junto a *C. karstii* (CBS 128500) (Fig. 3).

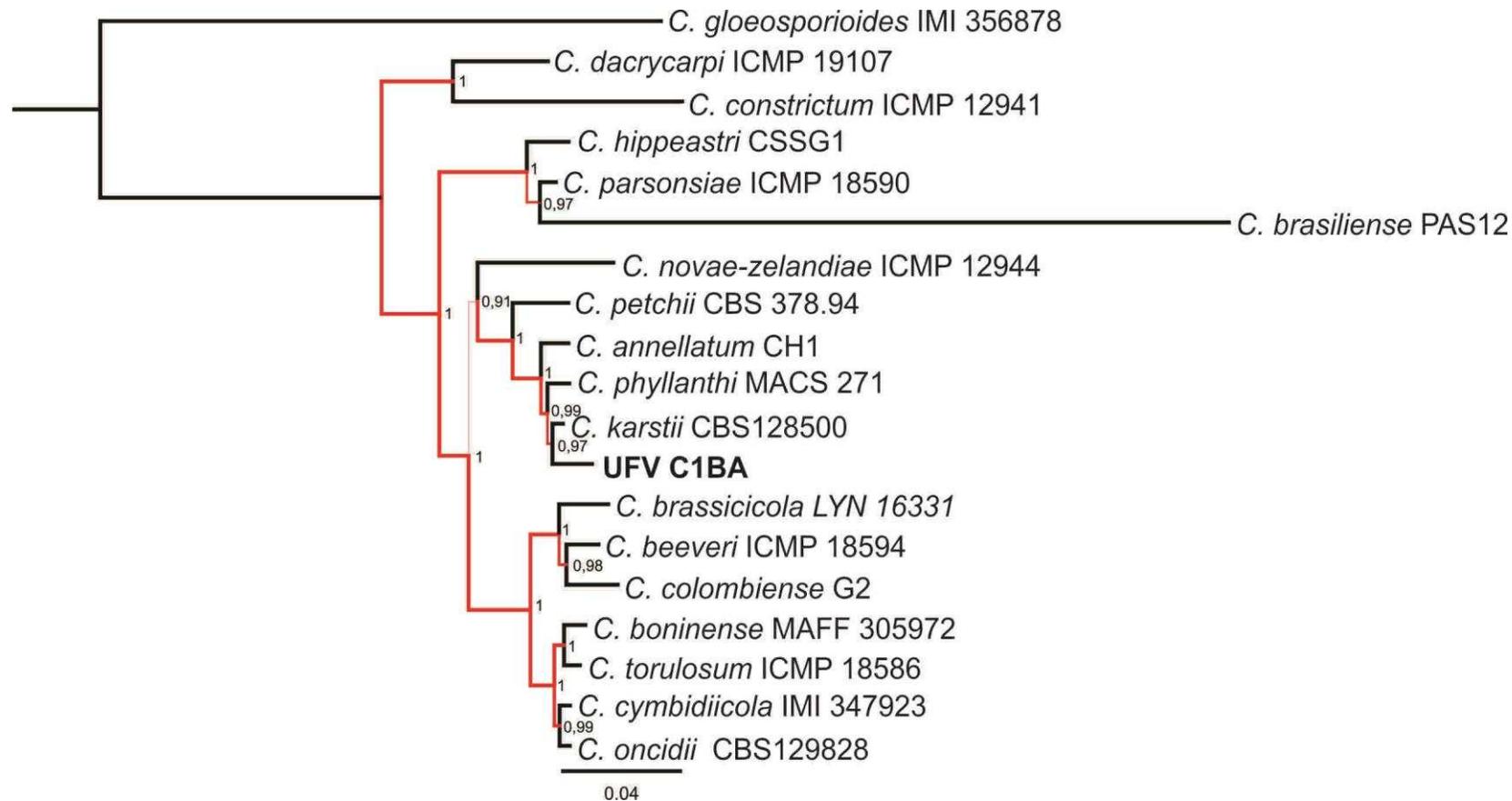
### 5.3.3. Filogenia de espécies do complexo *C. gloeosporioides*

Os isolados UFV C5BA e UFV C37MT que agruparam com o isolado tipo de *C. gloeosporioides* na análise de HRM foram comparados a 27 outros isolados do complexo *C. gloeosporioides*. Como grupo externo utilizou-se *C. boninense* (isolado MAFF 305972). Após a concatenação de sequências parciais dos genes *ACT*, *CHS*, *GAPDH*, *TUB2*, *CAL* e *ITS*, obteve-se alinhamento de 2357 nucleotídeos, dos quais 1610 foram conservados, 635 sítios variáveis, 271 informativos para parcimônia e 362 singletos. Os isolados obtidos de seringueira foram classificados próximos a duas espécies distintas. O isolado UFV C5BA foi agrupado com *C. theobromicola* CBS 124945 e o isolado UFV C37MT foi agrupado com *C. siamense* ICMP 18578 (Fig. 4).

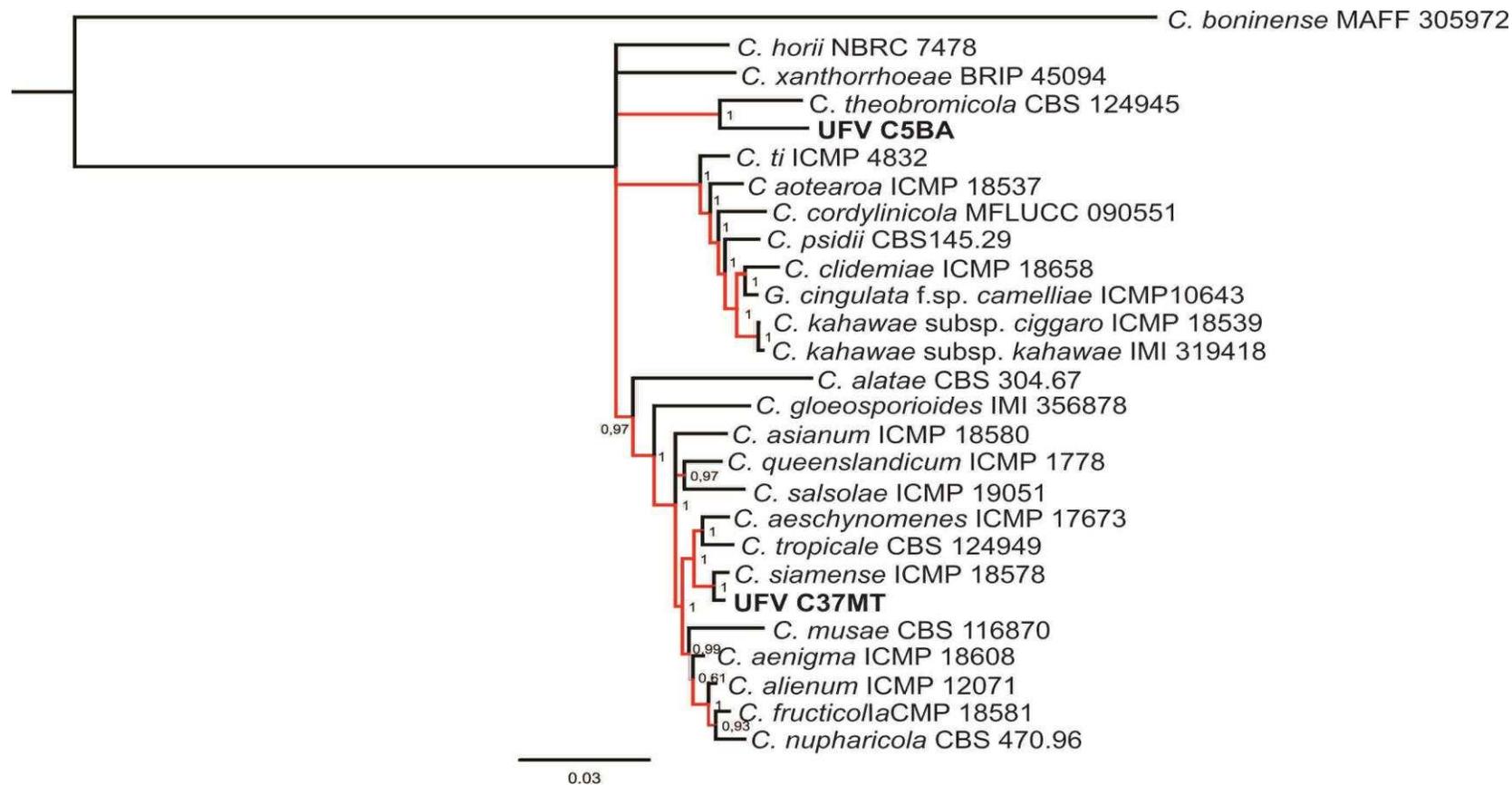
## 5.4. Diagnóstico molecular

Os *primers* Calnt2/ITS4 amplificaram os isolados *C. lupini* (CBS 109225), UFV C1MA e UFV C2MA com bandas definidas de aproximadamente 600 pb, como esperado. No entanto, este mesmo par de *primers* amplificou os isolados *C. boninense* (CBS 123755), UFV C1BA, UFV C6BA e os isolados UFV C37MT e UFV C5BA com bandas inespecíficas.

Os *primers* Col1/ITS4 amplificaram uma única banda em isolados de *C. boninense* (CBS 123755), e os isolados UFV C1BA, UFV C6BA, como esperado. Os *primers* Cglnt/ITS4 amplificaram o isolado UFV C37MT (Tabela 5). O isolado *C. gloeosporioides* (CBS 953.97) não foi amplificado por quaisquer destes *primers*.



**Figura 3.** Árvore de espécies de inferência bayesiana contendo isolados do complexo *Colletotrichum boninense*. Árvore construída utilizando dados concatenados de sequências parciais dos genes *ACT*, *CHS*, *GAPDH*, *TUB2*, *ITS* e *CAL*. A barra de escala representa o número de mudanças esperadas por sítio. Os números presentes em cada nó representam as probabilidades.



**Figura 4.** Árvore de espécies de inferência bayesiana contendo isolados do complexo *Colletotrichum gloeosporioides*. Árvore construída utilizando dados concatenados de seqüências parciais dos genes *ACT*, *CHS*, *GAPDH*, *TUB2*, *ITS* e *CAL*. A barra de escala representa o número de mudanças esperadas por sítio. Os números presentes em cada nó representam as probabilidades.

Os *primers* CaCGAPDH/CaCGAPDHR amplificaram os isolados *C. lupini* (CBS 109225), UFV C1MA, UFV C2MA, do complexo *C. acutatum*, junto aos isolados UFV C38MT, UFV C44MT, UFV C48MT, UFV C50MT, UFV C4MA, UFV C6MA, UFV C9MA e UFV C5MG, associando estes ao complexo *C. acutatum*.

Os *primers* CbCGAPDH/CbCGAPDHR, amplificaram os isolados UFV C1BA e UFV C6BA do complexo *C. boninense* como também os isolados UFV C1MG, UFV C3MG e UFV C7MG, identificando-os como isolados do complexo *C. boninense*. O isolado tipo *C. boninense* (CBS 123755) não foi amplificado com este par de *primers*. Os *primers* CgCGAPDH/CgCGAPDHR amplificaram os isolados UFV C5BA e UFV C37MT, do complexo *C. gloeosporioides*, e os isolados UFV C4MG, UFV C56AC, UFV C57AC, UFV C56FAC (Tabela 5). Os isolados UFV C2MG, UFV C6MG e o tipo *C. gloeosporioides* (CBS 953.97), não amplificaram com qualquer par de *primers*. Usando os *primers* baseados no gene *GAPDH*, os 17 isolados sem complexo definido foram agrupados como: oito isolados do complexo *C. acutatum*, três do complexo *C. boninense* e quatro do complexo *C. gloeosporioides*. Não houve amplificação para dois isolados com os *primers* baseados em *GAPDH* (Tabela 6).

## **5.5. Caracterização morfológica**

Onze isolados foram caracterizados morfológicamente: 10 isolados usados nos estudos filogenéticos e um isolado proveniente de Minas Gerais (UFV C1MG) (Tabela 1).

### **5.5.1. Crescimento de colônias de *Colletotrichum* spp.**

Os dados de diâmetro da colônia, área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) e taxa de crescimento micelial (TCM), foram avaliados em dois experimentos. As tendências foram similares e as variâncias dos experimentos foram consideradas homogêneas (Tabela 7). Portanto, os dados dos dois experimentos foram analisados em conjunto.

**Tabela 5.** Diagnóstico molecular de *Colletotrichum* spp. associados à antracnose foliar da seringueira utilizando *primers* específicos da região ITS.

Complexo	Isolado	Identificação por PCR			ITS
		Calnt2	Col1	Cglnt	
		+	+	+	
		ITS-4	ITS-4	ITS-4	
<i>C. acutatum</i>	CBS 109225	+	-	-	<i>C. acutatum</i>
	UFV C1MA	+	-	-	<i>C. acutatum</i>
	UFV C2MA	+	-	-	<i>C. acutatum</i>
<i>C. boninense</i>	CBS 123755	+*	+	-	<i>C. boninense</i>
	UFV C1BA	+*	+	-	<i>C. boninense</i>
	UFV C6BA	+*	+	-	<i>C. boninense</i>
<i>C. gloeosporioides</i>	CBS 953.97	-	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
	UFV C37MT	+*	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
	UFV C5BA	+*	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>

+ amplificação de bandas específicas

- não amplificação

\*Amplificação com bandas inespecíficas.

Os fatores meio de cultura (M), isolado (I) e a interação MxI foram significativos para DC, AACCM e TCM (Tabela 8). Houve resposta diferencial entre os 11 isolados de *Colletotrichum* spp. quanto ao diâmetro da colônia após 10 dias de cultivo, AACM e TCM. As respostas dos diferentes isolados quando DC, AACM e TCM foram mensuradas variaram conforme o meio de cultura em que foram crescidas as colônias (Tabela 9).

Para os isolados UFV C1MG (complexo *C. boninense*), UFV C2MA (complexo *C. acutatum*), UFV C6BA (complexo *C. boninense*), C37MT (complexo *C. gloeosporioides*), UFV C47MT (complexo *C. acutatum*) e UFV C38BA (complexo *C. acutatum*), maiores valores de diâmetro da colônia, AACM e TCM foram registrados quando crescidos em meio BDA. Para os isolados UFV C1MA (complexo *C. acutatum*), UFV C1BA (complexo *C. boninense*), UFV C8BA (complexo *C. acutatum*) e C52MT (complexo *C. acutatum*) maiores valores das variáveis supracitadas foram registrados no meio SNA.

**Tabela 6.** Diagnóstico molecular de *Colletotrichum* spp. associadas à antracnose foliar da seringueira utilizando *primers* desenhados a partir da sequência do gene *GAPDH*.

Isolado	Identificação por PCR			GADPH
	CaCGAPDH	CbCGAPDH	CgCGAPDH	
	+	+	+	
	CaCGAPDHR	CbCGAPDHR	CgCGAPDHR	
CBS 109225	+	-	-	<i>C. acutatum</i>
UFV C1MA	+	-	-	<i>C. acutatum</i>
UFV C2MA	+	-	-	<i>C. acutatum</i>
CBS 123755	-	-	-	NA
UFV C1BA	-	+	-	<i>C. boninense</i>
UFV C6BA	-	+	-	<i>C. boninense</i>
CBS 953.97	-	-	-	NA
UFV C37MT	-	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
UFV C5BA	-	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
UFV C38 MT	+	-	-	<i>C. acutatum</i>
UFV C44MT	+	-	-	<i>C. acutatum</i>
UFV C48MT	+	-	-	<i>C. acutatum</i>
UFV C50MT	+	-	-	<i>C. acutatum</i>
UFV C4MA	+	-	-	<i>C. acutatum</i>
UFV C6MA	+	-	-	<i>C. acutatum</i>
UFV C9MA	+	-	-	<i>C. acutatum</i>
UFV C1MG	-	+	-	<i>C. boninense</i>
UFV C2MG	-	-	-	NA
UFV C3MG	-	+	-	<i>C. boninense</i>
UFV C4MG	-	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
UFV C5MG	+	-	-	<i>C. acutatum</i>
UFV C6MG	-	-	-	NA
UFV C7MG	-	+	-	<i>C. boninense</i>
UFV C56AC	-	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
UFV C57AC	-	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
UFV C56FAC	-	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>

+ amplificação de bandas específicas

NA = não amplificado.

Maior diâmetro de colônia do isolado UFV C5BA (complexo *C. gloeosporioides*) foi registrado em meio de Aveia e SNA (Tabela 10). Houve maiores valores de AACM para o isolado UFV C5BA em meio de Aveia (complexo *C. gloeosporioides*) e maiores valores de TCM no meio SNA.

**Tabela 7.** Valores médios das variáveis diâmetro da colônia, área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) e taxa de crescimento micelial (TCM) para 11 isolados de *Colletotrichum* spp. associados à antracnose da seringueira, cultivados em diferentes meios de cultura, em dois experimentos (1 e 2). Teste de homogeneidade de variâncias ( $F_{max}$ ) para cada variável.

Variável	Experimento		$F_{max}$ (P-valor)
	1	2	
Diâmetro da colônia (mm)	32,5	30,3	0,869
AACCM	294	272	0,579
TCM (mm dia <sup>-1</sup> )	6,22	6,32	0,260

$n = 1650$  para diâmetro da colônia e  $n = 165$  para AACCM e TCM.

**Tabela 8.** Valor de probabilidade (P-valor) para diferentes fatores da análise de variância para o diâmetro de colônia aos 10 dias de crescimento, área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) e taxa de crescimento micelial (TCM) para modelo linear contendo os fatores meio de cultura (M), isolados de *Colletotrichum* spp. (I) e a interação (M × I).

Variável	Meio	Isolado	Meio × Isolado	CV(%)
<b>Diâmetro da colônia (mm)</b>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	9,8
<b>AACCM</b>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	4,6
<b>TCM (mm dia<sup>-1</sup>)</b>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	5,7

CV(%) = Coeficiente de variação.

## 5.5.2. Variáveis morfológicas

### Morfologia de isolados do complexo *C. acutatum*

Em meio SNA, os isolados apresentaram hifas septadas hialinas, algumas com cor marrom clara. Setas e clamidósporos não foram observados. Células conidiogênicas hialinas, alongadas-ampuliformes a ampuliformes. Conídios hialinos, reto-cilíndricos, pontas aguçadas ou redondas. Apressórios apresentaram cor predominantemente marrom escuro, com formato ovóide, irregular ou clavado. O estágio sexual não foi observado (Fig. 5-10).

### Isolados UFV C52MT e UFV C8BA

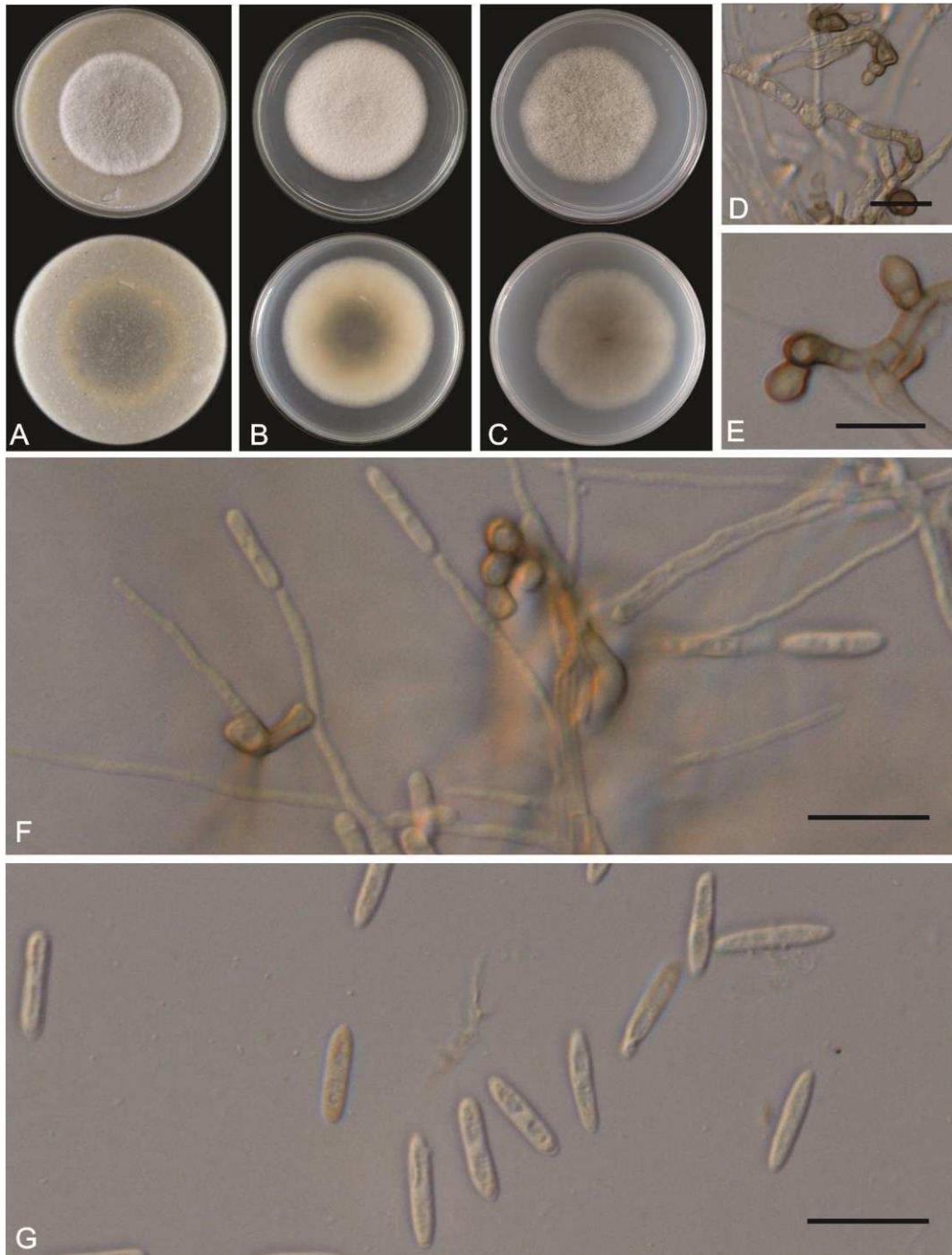
Para o isolado UFV C52MT, os apressórios tiveram comprimento e largura médios de 7,4  $\mu\text{m}$  e 5,6  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Os valores médios de comprimento e largura dos conídios foram 14,5  $\mu\text{m}$  e 3,6  $\mu\text{m}$ . Para o isolado UFV C8BA estes valores foram, respectivamente, 6,8  $\mu\text{m}$  e 5,4  $\mu\text{m}$ , para apressórios e 13,7  $\mu\text{m}$  e 3,7  $\mu\text{m}$ , para conídios (Tabela 10). Características da cultura do isolado UFV C52MT em meio ágar-aveia (OA): formato redondo, micélio aéreo cotonoso, pouco convexo, cor cinza a verde pálido e reverso cinza (Fig. 5A). Em meio BDA com formato redondo, micélio aéreo feltroso, pouco convexo, branco e reverso cinza oliváceo (Fig. 5B). Em meio SNA: colônia com formato redondo, micélio aéreo plano, feltroso, cor branco e reverso cinza oliváceo (Fig. 5C).

Colônias do isolado UFV C8BA em meio ágar-aveia apresentaram um formato redondo, micélio interno aéreo elevado, cotonoso. Micélio periférico imerso, cor branca, reverso cor cinza ferro no centro e branca na periferia (Fig. 6A). Em meio BDA: formato redondo, micélio aéreo interno cotonoso, côncavo com bordo elevado, micélio periférico não imerso, cor branco nas duas faces da placa (Fig. 6B). Em meio SNA apresentaram-se com formato redondo, micélio aéreo centro elevado e feltroso. Micélio periférico imerso, cor branca, reverso cor branca (Fig. 6C).

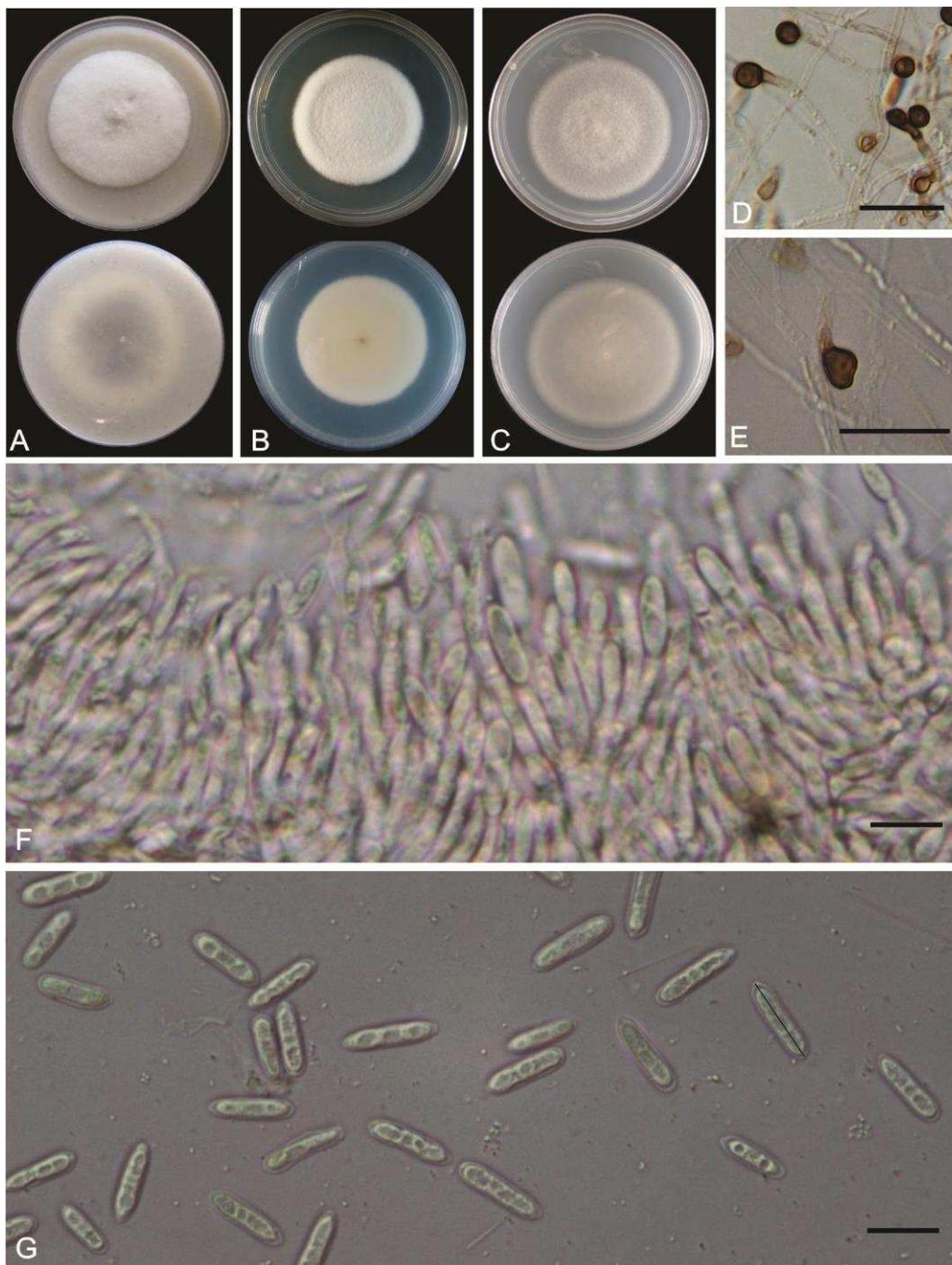
**Tabela 9.** Diâmetro final da colônia, área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) e taxa de crescimento micelial (TCM) de 11 isolados de *Colletotrichum* spp. associados à antracnose da seringueira, cultivados em diferentes meios de cultura.

Meio	Isolado	Diâmetro (mm)	AACCM	TCM (mm dia <sup>-1</sup> )
Aveia	UFV C1MA	53,5 e	254 de	5,81 e
	UFV C1BA	60,7 bc	272 cd	6,83 ab
	UFV C1MG	65,0 ab	309 b	6,86 ab
	UFV C2MA	55,1 de	265 de	6,00 cd
	UFV C5BA	66,8 a	328 a	7,29 a
	UFV C8BA	59,3 cd	289 c	6,44 cd
	UFV C6BA	54,0 e	254 de	5,90 e
	UFV C37MT	53,9 e	259 de	5,67 e
	UFV C47MT	54,5 de	261 de	5,87 e
	UFV C52MT	55,4 de	252 e	6,00 cd
	UFV C38BA	51,1 e	257 de	5,49 e
	CV (%)	5,81	4,62	5,23
BDA	UFV C1MA	54,4 f	271 d	5,83 de
	UFV C1BA	57,9 def	278 d	5,95 de
	UFV C1MG	74,6 a	362 a	8,13 a
	UFV C2MA	56,4 ef	270 d	6,12 cde
	UFV C5BA	60,0 de	285 d	6,65 bc
	UFV C8BA	54,0 f	272 d	5,80 de
	UFV C6BA	65,0 bc	349 ab	6,65 bc
	UFV C37MT	60,2 de	307 c	6,31 cd
	UFV C47MT	61,8 cd	307 c	6,71 bc
	UFV C52MT	53,8 f	245 e	5,66 e
	UFV C38BA	67,7 b	340 b	7,19 b
	CV (%)	5,29	4,73	6,5
SNA	UFV C1MA	59,4 bc	280 ab	6,22 bc
	UFV C1BA	61,1 bc	278 ab	6,46 b
	UFV C1MG	63,0 ab	269 bc	6,60 b
	UFV C2MA	53,8 d	250 d	6,00 c
	UFV C5BA	65,9 a	279 b	7,41 a
	UFV C8BA	61,4 dc	288 a	6,53 b
	UFV C6BA	60,7 bc	275 abc	6,37 bc
	UFV C37MT	53,7 d	261 cd	5,50 d
	UFV C47MT	50,4 d	243 d	5,27 d
	UFV C52MT	58,8 c	274 abc	6,31 bc
	UFV C38BA	59,8 bc	287 a	6,34 bc
	CV (%)	4,34	4,42	4,62

CV (%) = coeficiente de variação. Médias de uma mesma variável, seguidas pela mesma letra, na coluna, para cada meio de cultura, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.  $n = 10$ .



**Figura 5.** Características do isolado UFV C52MT crescido em meio Aveia-  
ágar (A), BDA (B), SNA (C). Apressório ovóide e irregular (D e E). Células  
conidiogênicas hialinas (F). Conídios reto-cilíndricos, pontas aguçadas ou  
redondas (G). As imagens D-G foram obtidas a 80x. A barra representa a  
escala de 20 $\mu$ m.



**Figura 6.** Características do isolado UFV C8BA crescido em meio Aveia-  
 ágar (A), BDA (B), SNA (C). Apressório ovoide e irregular (D e E). Célula  
 conidiogênica hialinas (F). Conídios reto-cilíndricos, pontas aguçadas ou  
 redondas (G). As imagens D-G foram obtidas a 80x. A barra representa a  
 escala de 20  $\mu\text{m}$ .

### **Isolados UFV C1MA e UFV C2MA**

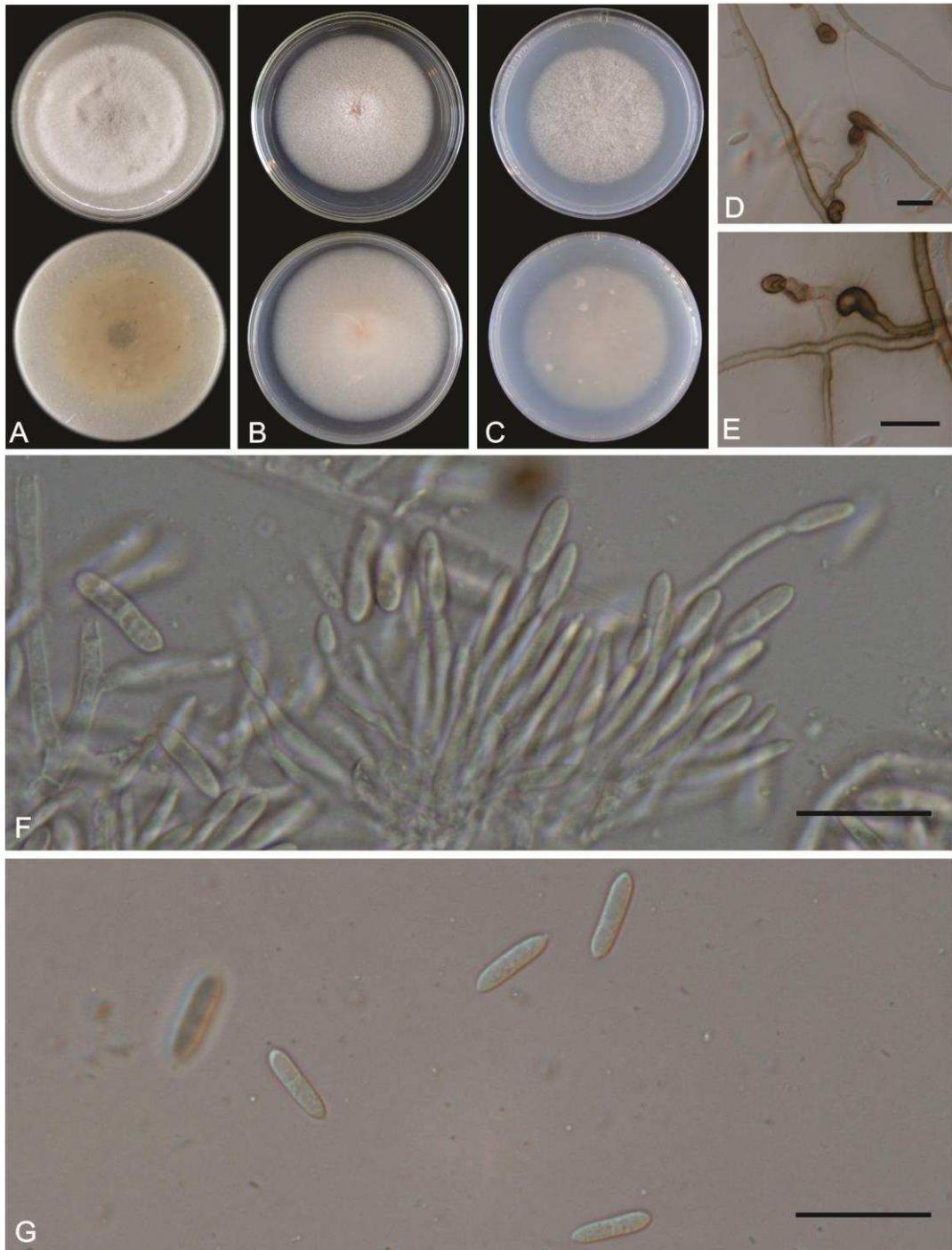
Para o isolado UFV C1MA, os apressórios tiveram comprimento e largura médios de 8,5  $\mu\text{m}$  e 5,5  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Os valores médios de comprimento e largura dos conídios foram 12,7  $\mu\text{m}$  e 3,7  $\mu\text{m}$ . Para o isolado UFV C2MA estes valores foram, respectivamente, 7,3  $\mu\text{m}$  e 5,6  $\mu\text{m}$ , para apressórios e 14,0  $\mu\text{m}$  e 3,8  $\mu\text{m}$ , para conídios (Tabela 10).

Colônias do isolado UFV C1MA em meio ágar-aveia: apresentaram formato redondo, micélio interno aéreo côncavo com bordo elevado, feltroso, micélio externo mais denso, micélio periférico imerso, cor cinza lavanda no centro e branco na periferia, reverso cor rosa (Fig. 7A). Em meio BDA: formato redondo, micélio aéreo interno cotonoso, côncavo com margens elevadas, micélio periférico não imerso, cor branco nas duas faces da placa (Fig. 7B). Em meio SNA: colônia com formato redondo, micélio aéreo feltroso, pouco convexo, micélio periférico imerso, cor branca, reverso cor branca, esporulação escassa, conídios em massa laranja (Fig. 7B).

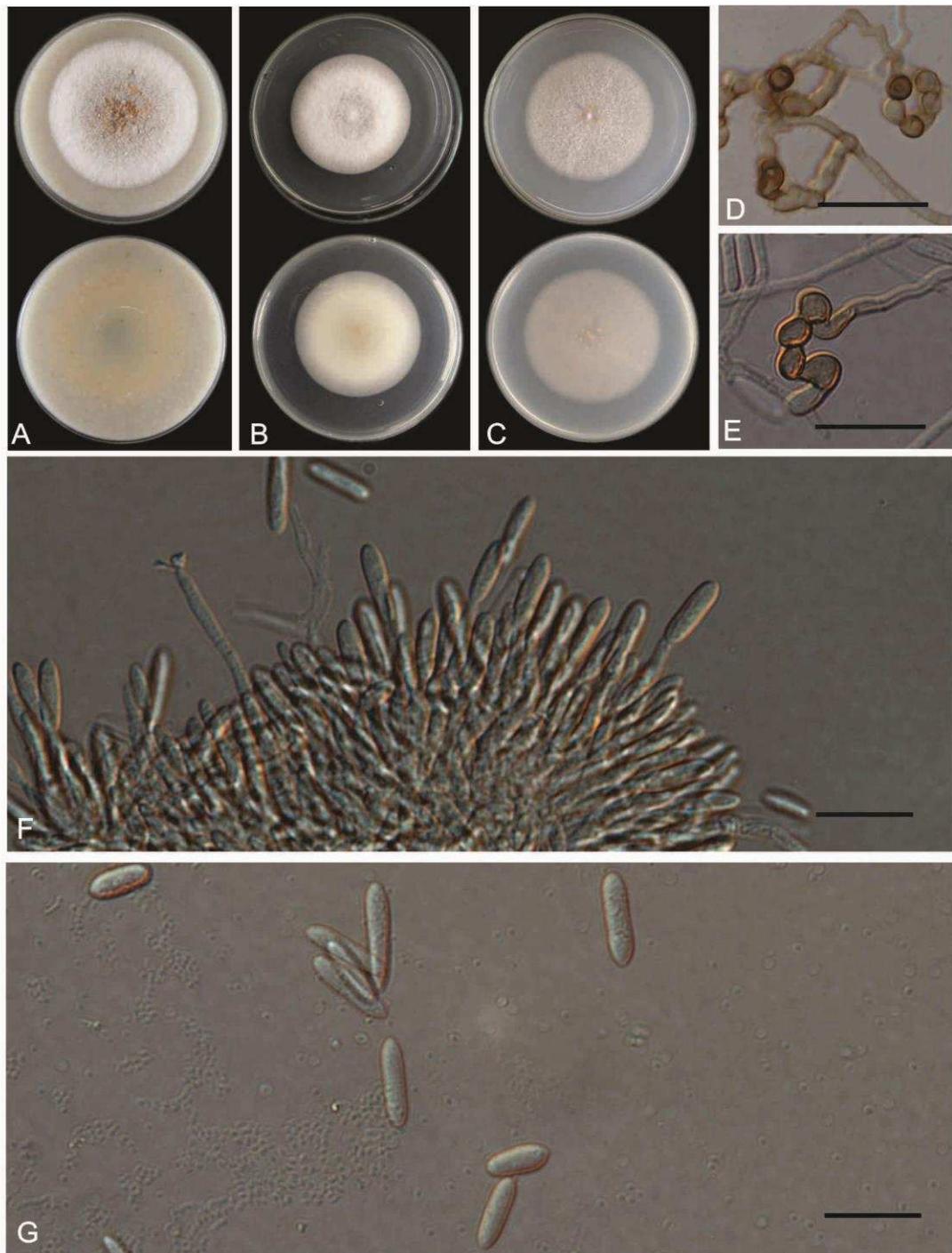
Colônias do isolado UFV C2MA Em meio ágar-aveia: formato redondo, micélio interno aéreo plano, cotonoso, micélio periférico imerso, cor cinza lavanda no centro e branca na periferia, reverso cinza oliváceo no centro e branco na periferia, crescimento radial, esporulação abundante (Fig. 8A). Em meio BDA: com formato redondo, micélio aéreo interno feltroso, com centro elevado, micélio periférico não imerso, cor branca, reverso cor rosa no centro e branca na periferia (Fig. 8B). Em meio SNA: colônia com formato redondo. Micélio aéreo plano, feltroso. Micélio periférico imerso. Cor branca, reverso cor branca. Crescimento radial. Esporulação abundante. Conídios em massa laranja (Fig. 8C).

### **Isolados UFV C47MT e UFV C38BA**

Para o isolado UFV C47MT, os apressórios tiveram comprimento e largura médios de 9,5  $\mu\text{m}$  e 5,3  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Os valores médios de comprimento e largura dos conídios foram 13,7  $\mu\text{m}$  e 4,0  $\mu\text{m}$ . Para o isolado UFV C38BA estes valores foram, respectivamente, 12,5  $\mu\text{m}$  e 5,9  $\mu\text{m}$ , para apressórios; e 14,6  $\mu\text{m}$  e 3,4  $\mu\text{m}$ , para conídios (Tabela 10).



**Figura 7.** Características do isolado UFV C1MA crescido em meio Aveia-ágar (A), BDA (B), SNA (C). Apresório ovoide e irregular (D e E). Célula conidiogênica hialinas (F). Conídios reto-cilíndricos, pontas aguçadas ou redondas (G). As imagens D-G foram obtidas a 80x. A barra representa a escala de 20  $\mu\text{m}$ .



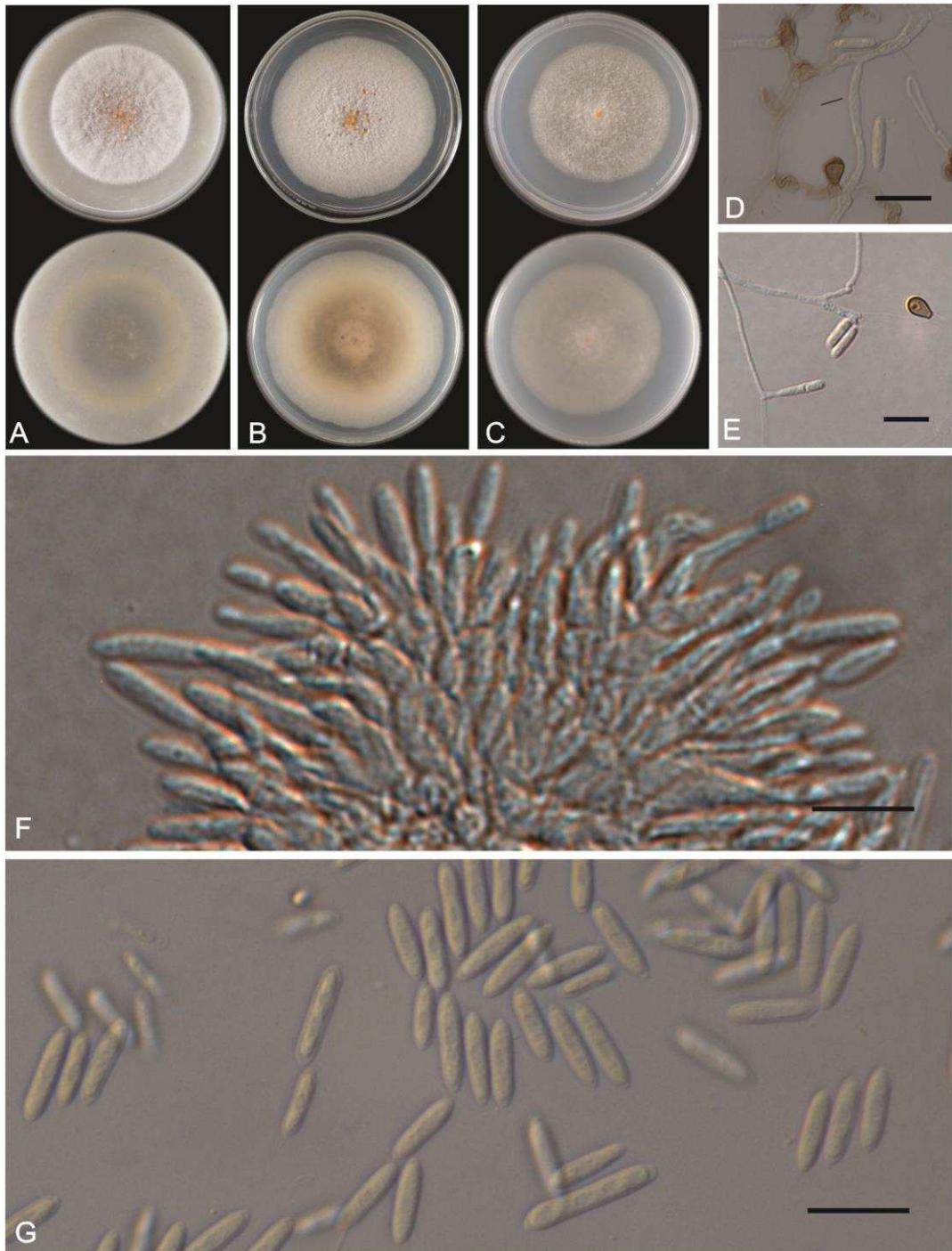
**Figura 8.** Características do isolado UFV C2MA crescido em meio Aveia-água (A), BDA (B), SNA (C). Apressório ovoide e irregular (D e E). Célula conidiogênica hialinas (F). Conídios reto-cilíndricos, pontas aguçadas ou redondas (G). As imagens D-G foram obtidas a 80x. A barra representa a escala de 20  $\mu\text{m}$ .

Colônias do isolado UFV C47MT em meio ágar-aveia: formato redondo, micélio interno aéreo elevado com borda côncava, aspecto feltroso. Micélio periférico imerso. Cor cinza lavanda no centro e mais clara na periferia. Reverso cinza oliváceo no centro e branco na periferia. Crescimento radial e esporulação abundante (Fig. 9A). Em meio BDA: formato redondo, micélio aéreo cotonoso, pouco convexo, micélio interno branco, micélio externo cor rosa, micélio periférico não imerso, cor branca, reverso cor mel. Esporulação abundante, presença de peritécios não férteis (Fig. 9B). Em meio SNA: formato redondo, micélio aéreo plano, feltroso, micélio periférico imerso, cor branca, reverso cor branca. Esporulação abundante, conídios em massa laranja (Fig. 9C).

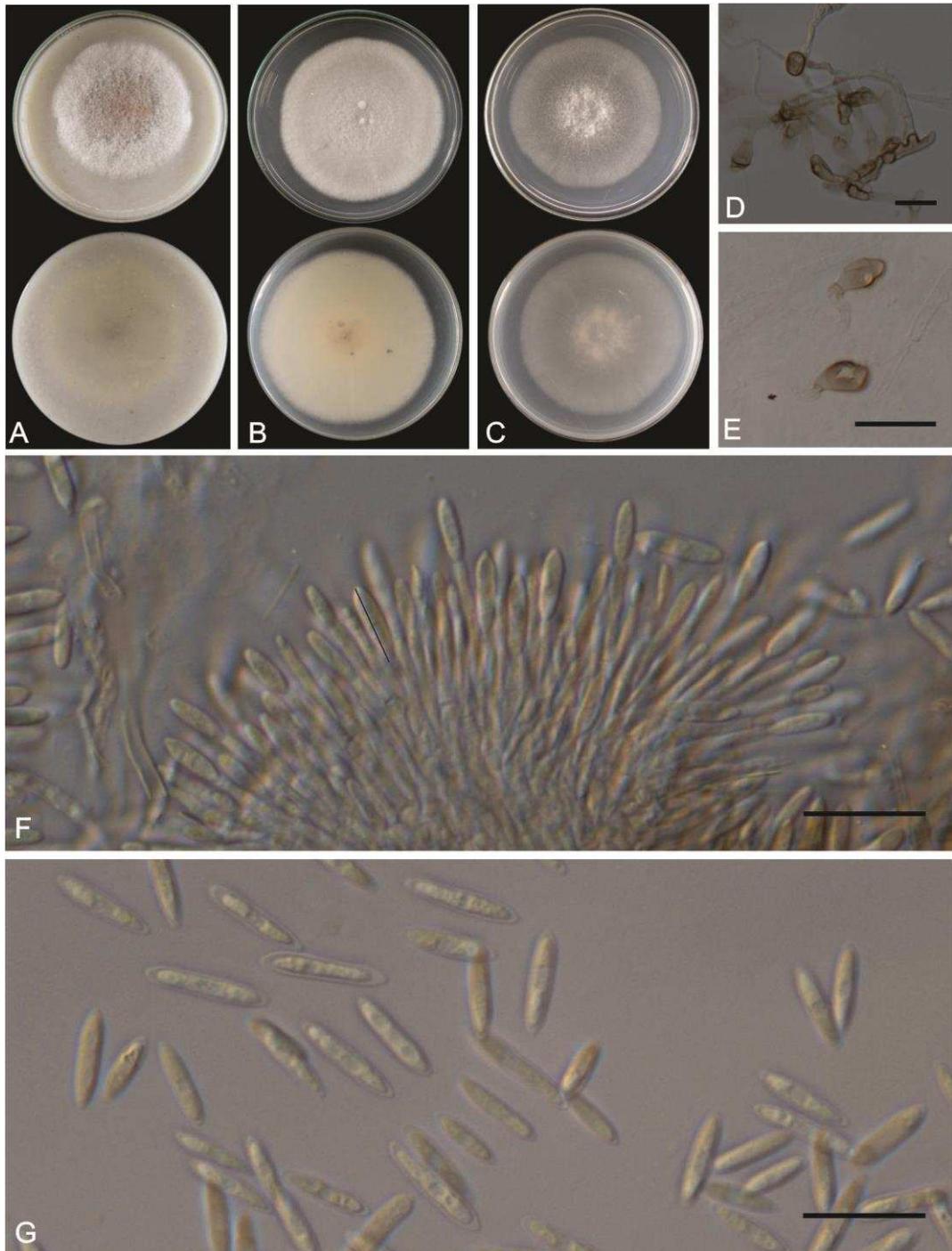
Colônias do isolado UFV C38BA em meio ágar-aveia: formato redondo, micélio interno aéreo elevado, cotonoso, micélio periférico imerso, cor cinza lavanda no centro e branca na periferia. Reverso cor branca. Esporulação abundante (Fig. 10A). Em meio BDA: formato redondo, micélio aéreo cotonoso, pouco convexo, micélio interno branco, micélio externo cor olivácea, micélio periférico não imerso, cor branca, reverso cor mel. Presença de peritécios não férteis (Fig. 10B). Em meio SNA: colônia com formato redondo, micélio aéreo plano, feltroso, micélio periférico imerso, cor branca. Reverso branco (Fig. 10C).

### **Morfologia de isolados do complexo *C. boninense***

Em meio SNA, apresentaram hifas septadas hialinas, algumas com cor marrom claro. Clamidósporos não foram observados. Setas cor marrom escura. Células conidiogênicas hialinas, alongadas-ampuliformes a ampuliformes, pequenas anelações e engrossamento nas pontas. Conídios hialinos, não septados, elipsoidal, pontas redondas. Apressórios de cor predominantemente marrom escuro, com formato ovóide, irregular, reniforme ou clavado. O estágio sexual não foi observado (Fig. 11-13).



**Figura 9.** Características do isolado UFV C47MT crescido em meio Aveia-  
ágar (A), BDA (B), SNA (C). Apresório ovoide e irregular (D e E). Célula  
conidiogênica hialina, alongadas-ampuliformes (F). Conídios reto-cilíndricos,  
pontas aguçadas ou redondas (G). As imagens D-G foram obtidas a 80x. A  
barra representa a escala de 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 10.** Características do isolado UFV C38BA crescido em meio Aveia-  
ágar (A), BDA (B), SNA (C). Apresório ovoide e irregular (D e E). Célula  
conidiogênica hialinas (F). Conídios reto-cilíndricos, pontas aguçadas ou  
redondas (G). As imagens D-G foram obtidas a 80x. A barra representa a  
escala de 20  $\mu\text{m}$ .

## Isolados UFV C1BA. UFV C6BA e UFV C1MG

Para o isolado UFV C1BA, os apressórios tiveram comprimento e largura médios de 8,5  $\mu\text{m}$  e 5,9  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Os valores médios de comprimento e largura dos conídios foram 14,0  $\mu\text{m}$  e 5,0  $\mu\text{m}$ . Os valores médios de comprimento e largura das setas foram 67,1  $\mu\text{m}$  e 5,2  $\mu\text{m}$ . Para o isolado UFV C6BA estes valores foram, respectivamente, 8,1  $\mu\text{m}$  e 5,5  $\mu\text{m}$ , para apressórios; 12,9  $\mu\text{m}$  e 4,9  $\mu\text{m}$  para conídios; e de 71,3  $\mu\text{m}$  e 4,8  $\mu\text{m}$  para setas. Para o isolado UFV C1MG estes valores foram, respectivamente, 10,8  $\mu\text{m}$  e 5,8  $\mu\text{m}$ , para apressórios; 14,5  $\mu\text{m}$  e 4,7  $\mu\text{m}$ , para conídios; e de 69,7  $\mu\text{m}$  e 4,7  $\mu\text{m}$  para setas. (Tabela 10).

Colônias do isolado UFV C1BA em meio ágar-aveia: formato redondo, micélio interno aéreo plano, feltroso, micélio periférico imerso, micélio cor branca, reverso cor canela (Fig. 11A). Em meio BDA: formato redondo, micélio aéreo escasso, plano, micélio interno cinza rato, micélio externo cor canela, micélio periférico imerso, reverso cor canela. Conidiomatas presentes com setas. Esporulação abundante (Fig. 11B). Em meio SNA: formato redondo, micélio aéreo escasso, plano, micélio periférico imerso, cor branca, reverso cor branca. Conidiomata presente com setas. Esporulação abundante, conídios em massa cor laranja (Fig. 11C).

Colônias do isolado UFV C6BA em meio ágar-aveia: formato redondo, micélio interno aéreo cotonoso, côncavo com borda elevada, micélio periférico imerso, cor branca, reverso cor branca (Fig. 12A). Em meio BDA, colônia com formato redondo, micélio aéreo plano, cotonoso, micélio interno rosa (*rosy buff*), micélio externo cor branca, micélio periférico não imerso, reverso cor canela. Crescimento radial. Esporulação escassa (Fig. B). Em meio SNA: colônias com formato redondo, micélio aéreo com centro elevado, feltroso, micélio periférico imerso, cor branca, reverso cor branca ou hialino. Conidiomata presente com setas. Esporulação escassa (Fig. 12C).

Colônias do isolado UFV C1MG em meio ágar-aveia: formato redondo, micélio interno aéreo elevado, feltroso, micélio periférico imerso, micélio cor branca e reverso cor branca (Fig. 13AB). Em meio BDA: formato

redondo, micélio aéreo escasso, plano, micélio periférico imerso, duas faces com micélio central cor canela e mais claro na periferia. Conidiomata presentes com setas. Esporulação abundante (Fig. 13B). Em meio SNA: formato redondo, micélio aéreo com centro elevado, feltroso, micélio periférico não imerso, cor branca, reverso cor branca. Conidiomata presente com setas. Esporulação abundante, conídios em massa laranja (Fig. 13C).

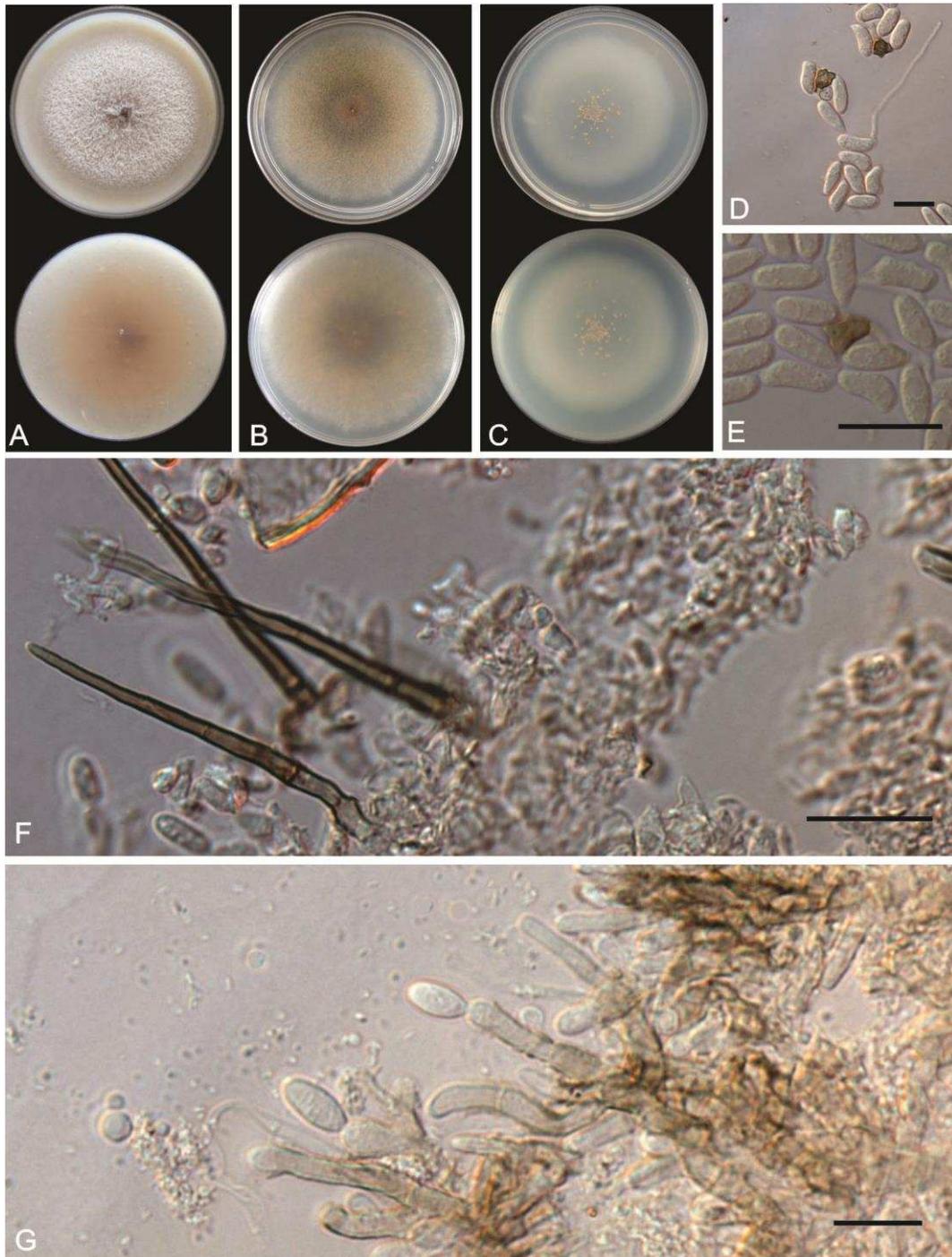
### **Morfologia de isolados do complexo *C. gloeosporioides***

Em meio SNA, apresentaram hifas septadas hialinas, algumas com cor marrom claro. Setas e clamidósporos não foram observados. Células conidiogênicas hialinas, alongadas-ampuliformes a ampuliformes. Conídios hialinos, não septados, reto-cilíndricos, pontas aguçadas ou arredondadas. Apressórios de cor predominantemente marrom escuro, com formato irregular ou clavado. O estágio sexual não foi observado (Fig. 14-15).

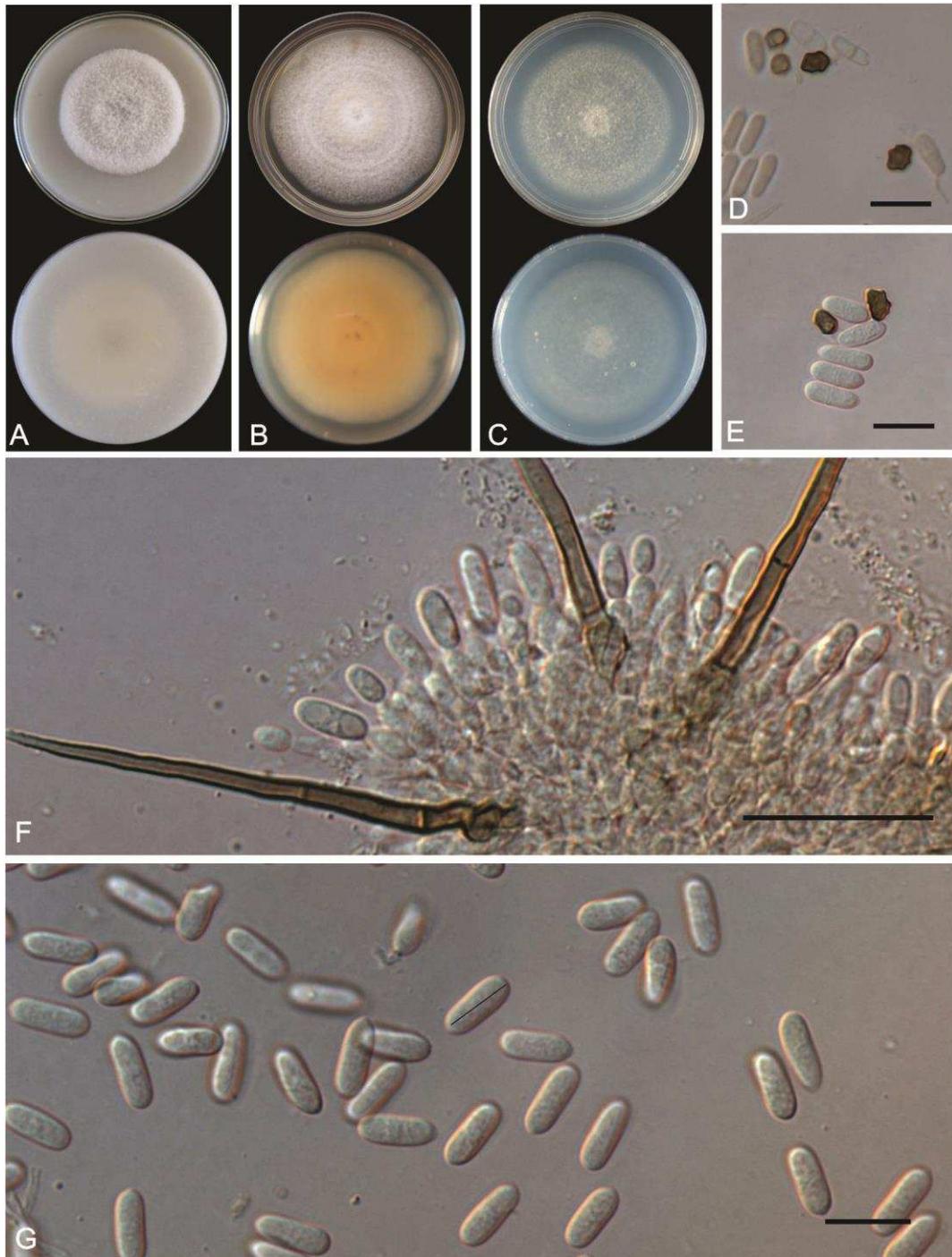
### **Isolados UFV C5BA e UFV C37MT**

Para o isolado UFV C5BA, os apressórios tiveram comprimento e largura médios de 9,4  $\mu\text{m}$  e 5,2  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Os valores médios de comprimento e largura dos conídios foram 16,1  $\mu\text{m}$  e 4,1  $\mu\text{m}$ . Para o isolado UFV C37MT estes valores foram, respectivamente, 7,7  $\mu\text{m}$  e 5,2  $\mu\text{m}$ , para apressórios; e 15,2  $\mu\text{m}$  e 3,2  $\mu\text{m}$ , para conídios (Tabela 10).

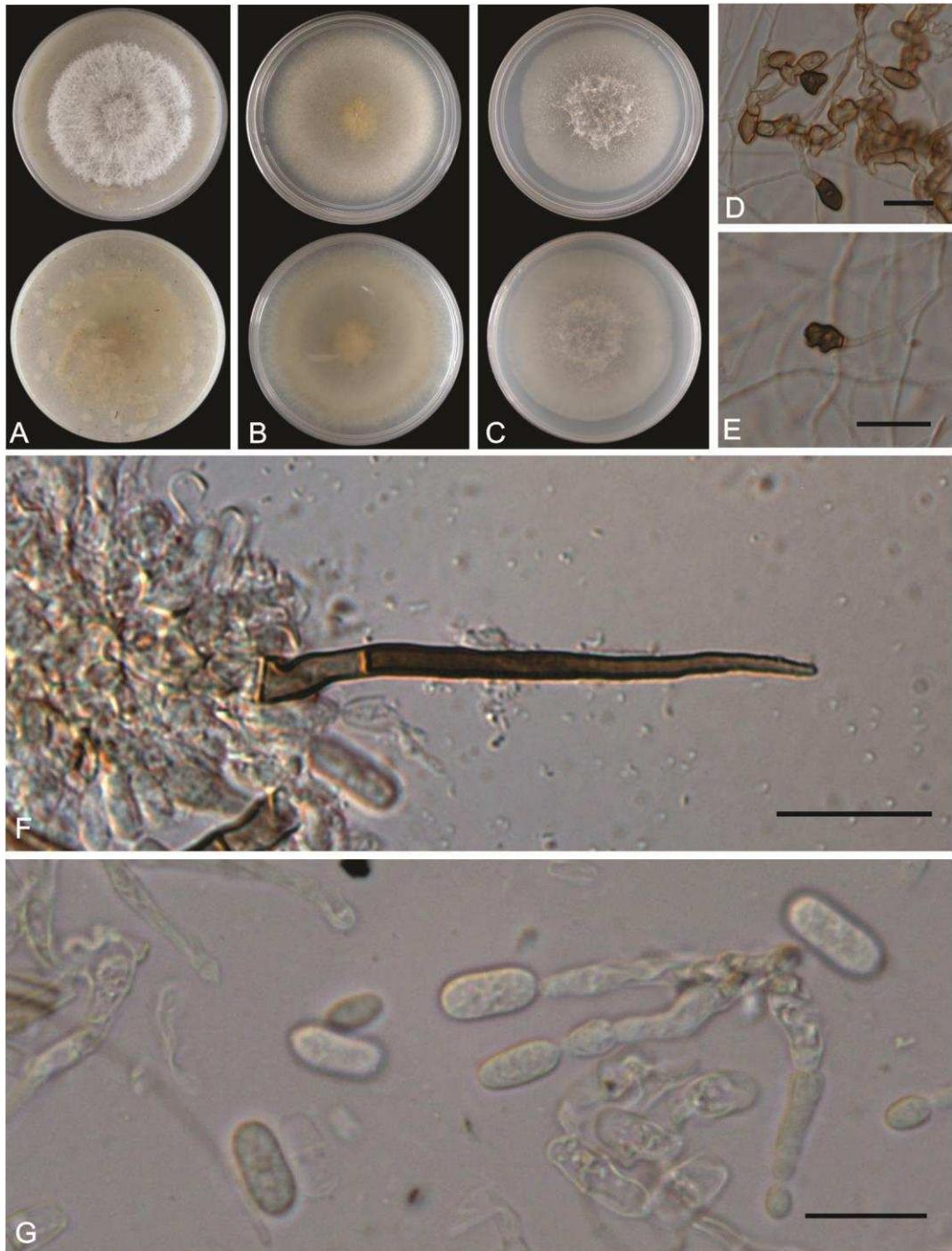
Colônias do isolado UFV C5BA em meio ágar-aveia: formato redondo. Micélio interno aéreo plano, cotonoso. Micélio periférico imerso, cor branca, reverso cor cinza ferro no centro e branca na periferia (Fig. 14A). Em meio BDA: formato redondo, micélio aéreo cotonoso, plano, micélio periférico imerso, duas faces com micélio cor branca (Fig. 14B). Em meio SNA: formato redondo. Micélio interno aéreo plano, feltroso. Micélio periférico imerso cor branca. Apresenta setores. Reversa cor cinza rato (Fig.14C).



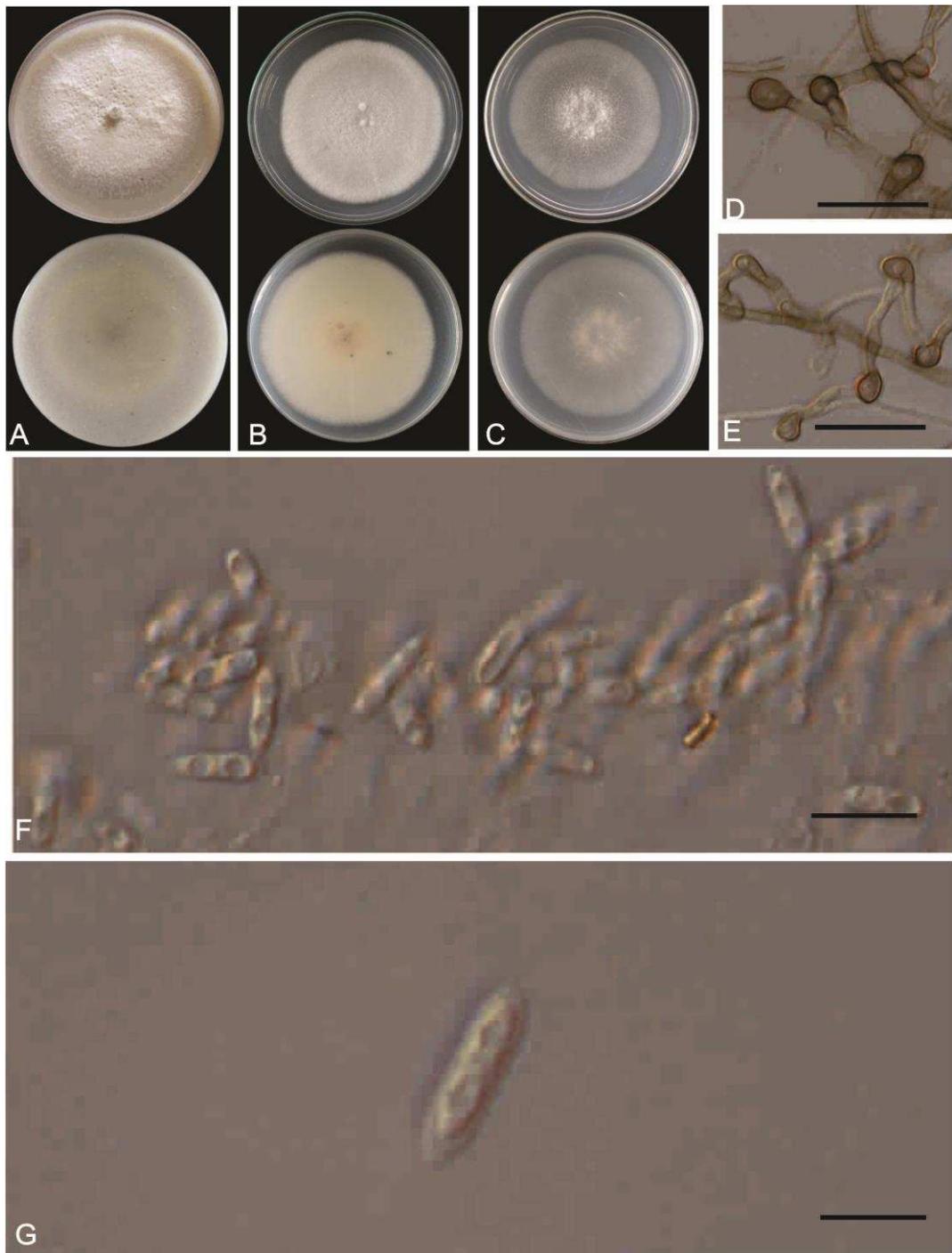
**Figura 11.** Características do isolado UFV C1BA crescido em meio Aveia-  
 ágar (A), BDA (B), SNA (C). Apresório ovoide e irregular (D e E). Célula  
 conidiogênica hialinas (F). Conídios reto-cilíndricos, pontas aguçadas ou  
 redondas (G). As imagens D-G foram obtidas a 80x. A barra representa a  
 escala de 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 12.** Características do isolado UFV C6BA crescido em meio Aveia-  
 ágar (A), BDA (B), SNA (C). Apressório ovoide, irregular reniforme ou  
 clavado (D e E). Célula conidiogênica hialina com setas septadas (F).  
 Conídios hialinos, não septados, elipsoidal com pontas arredondadas (G). As  
 imagens D-G foram obtidas a 80x. A barra representa a escala de 20  $\mu\text{m}$ .

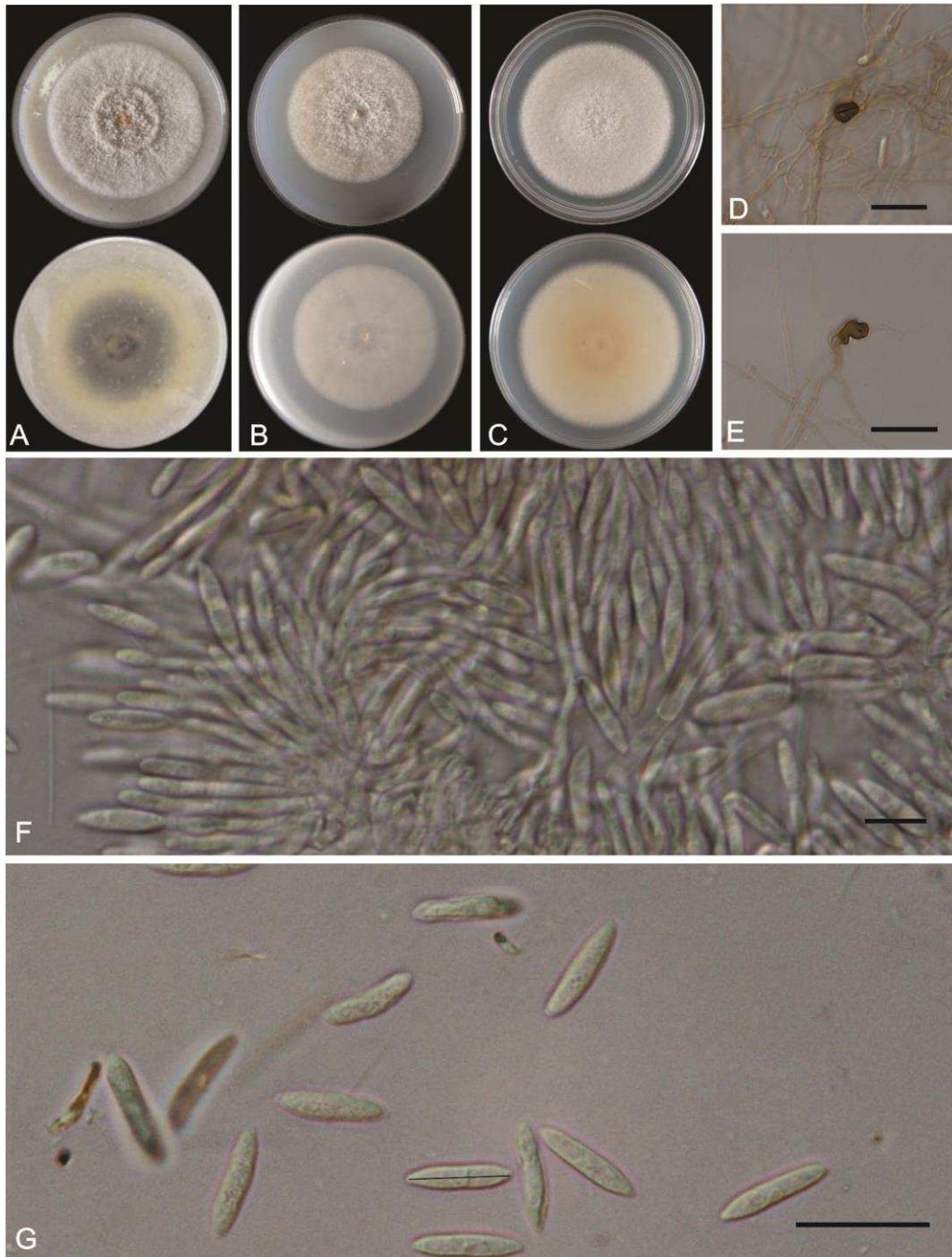


**Figura 13.** Características do isolado UFV C1MGcrescido em meio Aveia-  
 ágar (A), BDA (B), SNA (C). Apresório ovoide e irregular (D e E). Célula  
 conidiogênica hialinas (F). Conídios reto-cilíndricos, pontas aguçadas ou  
 redondas (G). As imagens D-G foram obtidas a 80x. A barra representa a  
 escala de 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 14.** Características do isolado UFV C5BA crescido em meio Aveia-  
 ágar (A), BDA (B), SNA (C). Apresório ovoide e irregular (D e E). Célula  
 conidiogênica hialinas (F). Conídios reto-cilíndricos, pontas aguçadas ou  
 redondas (G). As imagens D-G foram obtidas a 80x. A barra representa a  
 escala de 20  $\mu\text{m}$ .

Colônias do isolado UFV C37MT em meio ágar-aveia: formato redondo. Micélio interno aéreo com centro elevado, feltroso. Micélio periférico não imerso. Micélio cor branca, reverso cor cinza oliváceo no centro e branca na periferia. Esporulação abundante (Fig. 15A). Em meio BDA: formato redondo, micélio aéreo cotonoso, pouco convexo, micélio periférico imerso, micélio cor branca, reverso cor rosa (Fig. 15B). Em meio SNA: formato redondo. Micélio interno aéreo pouco convexo, feltroso. Micélio periférico imerso, cor branca, reverso cor branca. Crescimento radial. Esporulação escassa. Conídios em massa cor laranja (Fig. 15C).



**Figura 15.** Características do isolado UFV C37MT crescido em meio Aveia-  
 ágar (A), BDA (B), SNA (C). Apressório ovoide e irregular (D e E). Células  
 conidiogênicas hialinas, alongadas-ampuliformes a ampuliformes (F).  
 Conídios reto-cilíndricos, pontas aguçadas (G). As imagens D-G foram  
 obtidas a 80x. A barra representa a escala de 20  $\mu$ m.

## 6. DISCUSSÃO

Usando análises morfológicas e moleculares foi possível identificar mais de uma espécie de *Colletotrichum* associada à antracnose foliar da seringueira. Curiosamente, são espécies pertencentes a diferentes complexos. Foram avaliados isolados coletados de diferentes localidades e clones de seringueira e três isolados agruparam mais proximamente a *C. costaricense*, *C. laticipilum* e *C. limetticola*, que são espécies do complexo *C. acutatum*. Dois isolados foram agrupados junto a *C. theobromicola* e *C. siamense*, do complexo *C. gloeosporioides* e um isolado agrupou junto a *C. karstii*, do complexo *C. boninense*. Entretanto, não foi possível identificar a que espécies estes isolados pertencem. São necessárias análises adicionais para proceder à classificação das espécies de forma segura. Considerando os resultados obtidos nas ampliações com *primers* específicos desenhados neste trabalho, especula-se a possibilidade de que as espécies de *Colletotrichum* encontradas ainda não terem sido descritas e, ou, não há sequências em número e qualidade adequados para empregar o conceito filogenético de espécie com segurança.

A maioria dos isolados provenientes de *Hevea* sp. tem sido considerada como pertencente aos complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, descritos como os agentes causais da antracnose foliar (Petch, 1921; Carpenter & Stevenson, 1954; Jayasinghe et al., 1997, Saha et al., 2002, Gazis & Chaverri 2010, Gazis et al., 2011, Damm et al., 2012a). No entanto, recentemente, foi encontrado um isolado proveniente de *H. guianensis* identificado como sendo do complexo *C. boninense* (Gazis et al., 2011). Com a popularização de ferramentas moleculares, é possível que novas e diferentes espécies venham a ser descritas como associadas à doença. Recentemente, Doyle et al. (2013) relataram que a espécie de onde o isolado provem, o órgão da planta hospedeira onde é encontrado e o *habitat* da espécie hospedeira podem determinar a ocorrência de espécies de *Colletotrichum*.

**Tabela 10.** Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) de comprimento e largura de apressórios, conídios e setas de 11 isolados de *Colletotrichum* spp. associados à antracnose foliar da seringueira.

Isolado	Apressórios <sup>a</sup> ( $\mu\text{m}$ )		Conídios <sup>b</sup> ( $\mu\text{m}$ )		Setas <sup>c</sup> ( $\mu\text{m}$ )	
UFV C1BA	8,5 $\pm$ 1,6	5,9 $\pm$ 1,0	14,0 $\pm$ 1,2	5,0 $\pm$ 0,4	67,1 $\pm$ 11,4	5,2 $\pm$ 0,8
UFV C1MA	8,5 $\pm$ 1,7	5,5 $\pm$ 1,0	12,7 $\pm$ 1,1	3,7 $\pm$ 0,5	-	-
UFV C1MG	10,8 $\pm$ 2,1	5,8 $\pm$ 1,3	14,5 $\pm$ 0,8	4,7 $\pm$ 0,5	69,7 $\pm$ 14,6	4,7 $\pm$ 0,8
UFV C2MA	7,3 $\pm$ 1,2	5,6 $\pm$ 0,9	14,0 $\pm$ 1,6	3,8 $\pm$ 0,6	-	-
UFV C37MT	7,7 $\pm$ 1,8	5,2 $\pm$ 0,9	15,2 $\pm$ 1,5	3,2 $\pm$ 0,4	-	-
UFV C38BA	12,5 $\pm$ 2,7	5,9 $\pm$ 1,2	14,6 $\pm$ 1,4	3,4 $\pm$ 0,5	-	-
UFV C47MT	9,5 $\pm$ 2,2	5,3 $\pm$ 1,1	13,8 $\pm$ 1,6	4,0 $\pm$ 0,6	-	-
UFV C52MT	7,4 $\pm$ 1,2	5,6 $\pm$ 0,8	14,5 $\pm$ 1,2	3,6 $\pm$ 0,5	-	-
UFV C5BA	9,4 $\pm$ 2,8	5,2 $\pm$ 0,9	16,1 $\pm$ 1,5	4,1 $\pm$ 0,4	-	-
UFV C6BA	8,1 $\pm$ 1,4	5,5 $\pm$ 0,9	12,9 $\pm$ 1,0	4,9 $\pm$ 0,6	71,3 $\pm$ 15,4	4,8 $\pm$ 0,7
UFV C8BA	6,8 $\pm$ 1,2	5,4 $\pm$ 0,9	13,7 $\pm$ 1,4	3,7 $\pm$ 0,4	-	-

Média  $\pm$  Desvio Padrão. <sup>a</sup>n = 90. <sup>b</sup>n = 120. <sup>c</sup>n = 20.

Isolados identificados do complexo *C. acutatum* foram associados com *C. laticiphilum*, tendo este uma possível relação específica com três táxons descritos anteriormente (Petch, 1906) a partir de coleções de *Hevea* provenientes do Sri Lanka, e nomeados como *C. heveae*, *Gloeosporium heveae* [espécie não relacionada com *C. heveae*] e *G. alborubrum*. Posteriormente, as espécies foram consideradas como sinônimos de *C. gloeosporioides* por von Arx (1957). É possível que *G. alborum* seja uma espécie descrita por Damm et al. (2012b), em estudo no qual foram utilizados isolados provenientes da Índia e Colômbia, obtidos de *H. brasiliense*. O fungo foi encontrado originalmente em hastes verdes de *H. brasiliensis*, no entanto Petch (1927) relatou queda anormal de folhas com lesões que podem estender até as pontas verdes dos ramos causando a morte progressiva. Os conídios de *G. alborum* medem 15-20 × 3-4 µm com características de forma oblonga com pontas arredondadas, retos ou ligeiramente curvos (Petch, 1906). O tamanho é similar a *C. laticiphilum* onde também se observaram conídios ligeiramente curvos, especialmente no isolado proveniente da Colômbia (CBS 129827), a forma dos conídios de ambos *C. laticiphilum* isolados do caule de *Anthriscus* sp. são cilíndricas, não fusiformes com um extremo redondo e o outro ligeiramente agudo.

Outra espécie identificada dentro do complexo *C. acutatum* foi *C. limetticola*, inicialmente descrita como *Gloeosporium limetticola* por Clausen (1912) em ensaios de patogenicidade na Califórnia em *Citrus medica* var. *acida* (*Citrus aurantifolia*, Key lime), os quais foram inoculados com isolados de lima azeda de Cuba e com isolados de laranja, limão, toranja e tangerina provenientes de Cuba, Califórnia e Florida. De acordo com Farr & Rossman (2012), *G. limetticola* foi relatada em *Citrus aurantifolia* em Barbados, Califórnia, Cuba, Fiji, Florida, Hawaii, Índia, Jamaica, Filipinas e Tanzânia. Damm et al. (2012a), descrevem este isolado como *C. limetticola* a partir de isolados provenientes da Florida e depositados na coleção da CBS em fevereiro de 1914 por R.E. Clausen, como *G. limetticola*.

Sierra (2010) testou a patogenicidade de isolados provenientes de citros, os quais foram patogênicos quando inoculados em folíolos de seringueira. No mesmo estudo, identificaram-se estes isolados como *C. acutatum* utilizando *primers* específicos (Calnt2 + ITS4), sendo possível que se trata de *C. limetticola* já que este se distingue de outras espécies do mesmo complexo pela utilização de *TUB2*, *GAPDH*, *HIS3* e mais efetivamente com *TUB2* (Damm et al., 2012a).

Dos isolados do complexo *C. boninense* encontram-se dois isolados dentro do clado *C. karstii*, mas pela morfologia da célula conidiogênica, em particular a presença de anelídeos, o isolado é semelhante a *C. annellatum* (Damm et al., 2012b). Recentemente foi encontrado um isolado obtido de *Hevea guianensis* no Peru cuja sequência de ITS o coloca dentro do complexo *C. boninense* nos clados com *C. karstii* ou *C. phyllanthi* (Gazis et al., 2011; GenBank HQ022474). A sequência de *C. annellatum* difere em dois pares de bases de *C. karstii* e *C. phyllanthi*. Trabalhos adicionais são necessários para elucidar o posicionamento taxonômico do isolado oriundo do Peru (Damm et al., 2012b). Para o isolado obtido neste estudo, é necessário avaliar a possibilidade de obter a monofilia para aclarar esta situação.

O gênero *Colletotrichum* apresenta grande plasticidade genotípica e fenotípica, portanto, devido a importância econômica de algumas culturas e a variabilidade de sintomas das doenças causadas por espécies patogênicas (Saha et al., 2002), é necessário determinar corretamente o agente causal para implementar as estratégias de controle (Tao et al., 2012). Atualmente, muitos estudos voltados ao controle de doenças de plantas iniciam com a caracterização da população do patógeno. Por sua vez, estudos populacionais pressupõem investigações no âmbito intraespecífico. Portanto, faz-se necessário amostrar indivíduos de uma única espécie para que inferências confiáveis sobre a população possam ser derivadas das análises genéticas.

Do ponto de vista de controle, tanto o uso estratégico da resistência quanto a aplicação de medidas químicas podem ser otimizadas com o

conhecimento adequado sobre o agente etiológico da doença. A seleção de materiais genéticos de *Hevea* spp. para plantio em larga escala deve ser acompanhada de avaliações quanto à resistência à antracnose. No entanto, pode ser que haja resposta diferenciada dos genótipos do hospedeiro às distintas espécies do patógeno. Porém, poucos estudos foram realizados com este propósito (Saha et al., 2002; Thambugala & Deshappriya, 2009). Quanto ao controle químico, sabe-se que espécies de *Colletotrichum* demonstram respostas diferentes aos fungicidas (Liyanage et al., 1992; Jayasinghe & Fernando 1998, 2009, Brown et al., 1996). A avaliação da eficiência de fungicidas deve ser realizada após identificação correta da espécie causadora de antracnose foliar que se tem interesse.

O diagnóstico baseado em critérios filogenéticos tem contribuído para o reconhecimento de diferentes espécies de patógenos importantes, e para elucidar complexos que contêm espécies filogeneticamente e fisiologicamente divergentes (Damm et al., 2009; Hyde et al., 2009; Kvas et al., 2009; Tao et al., 2012). Neste estudo o diagnóstico molecular realizado com os pares de *primers* desenhados a partir do gene *GAPDH* (CaCGAPDHF/ CaCGAPDHR, CbCGAPDHF/CaCGAPDHR e CgCGAPDHF/CgCGAPDHR,), para a identificação de espécies de *Colletotrichum* ajudaram a identificar oito isolados do complexo *C. acutatum*, três do complexo *C. boninense* e quatro do complexo *C. gloeosporioides*, respectivamente. No entanto, não se obteve o mesmo resultado com os *primers* específicos da região ITS (Calnt2 /ITS4, Cglnt / ITS4 e Cglnt /ITS4). Possivelmente, as ampliações inespecíficas dos isolados, a não amplificação do isolado tipo e identificação de menor número de isolados ocorreram pelo fato de se tratar de novas espécies, distintas das descritas anteriormente na literatura, diferindo do relatado por Afanador et al. (2003) e Tao et al. (2012). Estes autores mencionam que sequências parciais de *GAPDH* constituíram-se em marcador molecular apropriado na identificação de espécies do complexo *C. gloeosporioides*, uma vez que o gene possui variações apropriadas quando se avalia tanto intra- quanto inter-especificamente. Portanto, os *primers* desenhados neste estudo podem ser

usados como ferramenta de rápido diagnóstico molecular para isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de seringueira.

As espécies identificadas e caracterizadas no presente estudo não apresentaram um padrão de distribuição geográfica ou associação a determinado clone. Isolados de distintas origens geográficas apresentaram agrupamento em complexos similares, e isolados provenientes da mesma região se agruparam em diferentes complexos. Por exemplo, isolados provenientes de Minas Gerais agruparam nos três complexos estudados. Resultados similares foram obtidos por Meireles et al. (2009) onde isolados provenientes de diferentes hospedeiros e isolados provenientes de regiões geográficas distintas foram distribuídos em um mesmo grupo. À semelhança do relatado por Doyle et al. (2013), outros fatores genéticos, tanto do hospedeiro quanto do patógeno, ou ecológicos podem afetar o patossistema seringueira-*Colletotrichum* spp. e determinar a prevalência de uma espécie sobre outra(s). Estudos complementares devem ser conduzidos a fim de entender como e por que mais de uma espécie pode causar epidemias de antracnose em seringueira.

## 7. CONCLUSÕES

- Há diferentes espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose foliar da seringueira.
- Foram detectados isolados pertencentes a três complexos de espécies de *Colletotrichum* associados à doença.
- Indivíduos do complexo de *C. acutatum* foram encontrados mais frequentemente associados à antracnose foliar da seringueira.
- *Primers* específicos baseados na sequência do gene *GAPDH* permitem diagnóstico a nível de complexo de espécies de *Colletotrichum* que afetam seringueira usando técnicas de PCR convencional.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afanador-Kafuri L, Minz D, Maymon M, Freeman S (2003) Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora. and mango in Colombia and identification of unique species from the genus. *Phytopathology* 93:579-587.

Alfenas AC, Mafia RG (2007) Métodos em Fitopatologia. Editora UFV. Viçosa.

von Arx JA (1957) Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. *Phytopathology. Zeitschrift* 29:413-468

Brown AE. Sreenivasaprasad S. Timmer LW (1996) Molecular characterization of slow growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology* 86:523-527.

Brown A, Soepena H (1994) Pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* on leaves of *Hevea* spp. *Mycological Research* 98:264-266.

Carpenter JB. Stevenson JA (1954) A secondary leaf spot of the Hevea rubber tree caused by *Glomerella cingulata*. *Plant Disease Reporter* 38:494-499.

Chagas E (2013) Seringueira como alternativa eficiente para fixação de carbono. Disponível em: <http://www.seringueira.com/seringueira-como-alternativa-eficiente-para-fixacao-de-carbono/>. Acesso em: Agosto de 2013

CIRAD (2001) Conferencia. Caucho natural. situación mundial y perspectivas. Conferencia 2001.

Clausen RE (1912) A new fungus concerned with wither tip of varieties of *Citrus medica*. *Phytopathology* 2:217-234

Conrad LS, Keith AS, Sabiene H, Vincent R, John LS, André LC, Wen C, Fungal Barcoding Consortium (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed

spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. PNAS 109: 6241-6246.

Corley RVH (1983) Potential productivity of tropical perennial crops. *Experimental Agriculture* 19:217-237.

Costa RB, Gonçalves PS, Odalia-Rímoli A, Arruada EJ (2001) Melhoramento e conservação genética aplicados ao desenvolvimento local – o caso da seringueira (*Hevea* sp). *Revista Internacional de Desenvolvimento Local* 1:51-58.

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 (2012b) The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology* 73:1-36.

Damm U, Woudenberg JHC, Cannon PF, Crous PW (2009) *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity* 39:45-87.

Damm U. Crous PW. Fourie PH (2007) *Botryosphaeriaceae* as potential pathogens of *Prunus* species in South Africa. with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* spp. *Mycologia* 99:664-680.

Doyle VP, Oudemans PV, Rehner SA, Litt A (2013) Habitat and host indicate lineage identity in *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. from wild and agricultural landscapes in North America. *PLOS ONE* 8: e62394.

EMBRAPA (2007) O setor produtivo da borracha natural. Edição May-Jun (2007) Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: Fevereiro de 2012.

Farr DF, Rossman AY (2012) *Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA*; Retrieved February 28, 2012.

Fernando TH, Jayasinghe CK, Wijesundera RL (2000) Factors affecting spore production, germination and viability of *Colletotrichum acutatum* isolates from *Hevea brasiliensis*. Mycological Research 104:681-685.

Freeman S, Rodríguez RJ (1993) Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. Science 260:75-78.

Furtado EL, Trindade DR (2005) Doenças da seringueira. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (Eds.) (2005) Manual de Fitopatologia. Vol. 2. Doenças das Plantas Cultivadas. 4ª. Ed. São Paulo SP. Ceres. pp. 559-569.

Furtado EL, Silveira AP (1992) Doenças da seringueira em viveiros e jardins clonais e seu controle. In: Medrado M. J. S. et al. Formação de mudas e plantio de seringueira. Piracicaba: ESALQ. pp. 52-64.

Ganopoulos I, Madesis P, Zambounis A, Tsaftaris A (2012) High-resolution melting analysis allowed fast and accurate closed-tube genotyping of *Fusarium oxysporum* formae speciales complex. FEMS Microbiology Letters 334:16-21.

Gasparotto L, dos Santos AF, Pereira JC, Ferreira FA (1997) Doenças da Seringueira no Brasil. Embrapa. 168 p.

Gazis R, Rehner S, Chaverri P (2011). Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. Molecular Ecology 20:3001-3013.

Gazis R, Chaverri, P (2010) Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. Fungal Ecology 3: 240-254.

Guyot J, Ntawanga E, Pinard F (2005) Some epidemiological investigations on *Colletotrichum* leaf disease on rubber tree. Crop Protection 24:65-77.

Guyot J, Ntawanga E, Ndoutoume E, Otsaghe A, Enjalric F, Assoumou H (2001) Effect of controlling *Colletotrichum* leaf fall of rubber tree on epidemic development and rubber production. *Crop Protection* 20:581-590.

Hallé F, Oldeman RAA, Tomlinson PB (1978) *Tropical trees and forests: an architectural analysis*. Berlin: Springer – Verlag. 441 p.

Hartley HO (1950) The maximum F-ratio as a shortcut test for heterogeneity of variance. *Biometrika* 37:308-312.

Henz GP, Boiteux LS, Lopes CA (1992) Outbreak of strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* in central Brazil. *Plant Disease* 76:212

Hilton RN (1959) *Maladies of Hevea in Malaya*. Kuala Lumpur. Rubber Research Institute of Malaya.

Hyde KD, Cai L, McKenzie EHC, Yang YL, Zhang JZ, Prihastuti H (2009). *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal diversity* 39:1-17.

IBGE (2005) Instituto Brasileiro de geografia e estatística sistema IBGE de recuperação automática SIDRA. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso: Novembro 2012.

IRSG. International Rubber Study Group (2013) Statistics. Disponível em: <http://www.rubberstudy.com/statistics.aspx>. Acesso: Agosto 2013.

Jayasinghe CK, Fernando THPS (2009) First report *Colletotrichum acutatum* on *Mangifera indica* in Sri Lanka. *Ceylon Journal of Science (Biological Science)* 38:31-34.

Jayasinghe CK, Fernando THPS (1998) Growth at different temperatures and on fungicide amended media: Two characteristics to distinguish *Colletotrichum* species pathogenic to rubber. *Mycopathologia* 143:93-95.

Jayasinghe CK, Fernando THPS, Priyanka UMS (1997) *Colletotrichum acutatum* is the main cause of *Colletotrichum* leaf disease of rubber in Sri Lanka. *Mycopathologia* 137:53-56.

John P (1992) Biosynthesis of the major crop products. Wiley Publishers. England. 157 p.

Joshee S, Paulus BC, Park D, Johnston PR (2009) Diversity and distribution of fungal foliar endophytes in New Zealand Podocarpaceae. *Mycological Research* 113:1003-1015.

Kavs M, Marasas WFO, Wingfield BD, Wingfield MJ, Steenkamp ET (2009) Diversity and evolution of *Fusarium* species in *Giberella fujikuroi* complex. *Fungal diversity* 34:1-21.

Lenné JM, Sonoda RM, Parbery DG (1984) Production of conidia by setae of *Colletotrichum* species. *Mycologia* 76:359-362.

Liu X, Xie X, Duan J (2007) *Colletotrichum yunnanense* sp. nov., a new endophytic species from *Buxus* sp. *Mycotaxon* 100:137-144.

Liyanage HD, Mcmillan RT, Kistler HC (1992). Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathology* 82:1371-1376.

Lu G, Cannon PF, Reid A, Simmons CM (2004). Diversity and molecular relationships of endophytic *Colletotrichum* isolates from the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycological Research* 108:53-63.

Martinelli PA (2004) Saga da borracha. passada a limpo. *Correio Popular*. 2004disponivei<[http://www.cosmo.com.br/hotsites/cenarioxxi/2004/01/05/materia\\_cen\\_72857.shtm](http://www.cosmo.com.br/hotsites/cenarioxxi/2004/01/05/materia_cen_72857.shtm)>. Acesso Setembro de 2012.

Meireles Barguil B, Alves de Oliveira SM, Barbosa Coelho RS, Beserra Júnior JEA (2009) Identificação e variabilidade genética de isolados de *Colletotrichum* causando antracnose em inflorescências de plantas ornamentais tropicais. *Ciência Rural* 39:1639-1646

Menezes M (2006) Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica* 3:170-179.

Menezes M (2002) Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. Fitopatologia Brasileira 27:23-24.

MDIC. Ministério de Desenvolvimento. Indústria e Comércio Exterior do Brasil (2013) Comércio Exterior. Disponível em: <http://www.desenvolvimento.gov.br//sitiointerna/index.php?area=5>. Acesso Agosto 2013.

Mills PR, Hodson A, Brown AE (1992) Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical crops. In: Bailey, J. A.; Jeger, M. J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford, United Kingdom: CAB international. pp. 269-288

Nirenberg HI (1976) Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium* Section Liseola. Mitt Biol Bund Land Forst wirt Berlin Dahlem 169:1-117.

Petch T (1906). Descriptions of new Ceylon fungi. Annals of the Royal Botanical Gardens, Peradeniya 3:1-10.

Petch T (1921). The Diseases and Pests of the Rubber Tree. MacMillan. London. 278 p.

Pileggi SA. Veira de Oliveira SF. Andrade CW. Vicente VA. Dalzoto PdoR. Kniphoff da Cruz G. Gabardo J. Massola NS. Tozze HA. Pileggi M. Kava-Cordeiro V. Galli-Terasawa LV. Pimentel IC. Stringari ED. Glienke C (2009) Molecular and morphological markers for rapid distinction between two *Colletotrichum* species. Canadian Journal of Microbiology 55:1076-1088.

Prada H. Ávila L. Sierra R. Bernal A. Restrepo S (2009) Caracterización morfológica y molecular del antagonismo entre el endófito *Diaporthe* sp. aislado de frailejon (*Espeletia* sp.) y el fitopatógeno *Phytophthora infestans*. Revista Iberoamericana de Micología 3:198-201.

Putnam ML (1995) Evaluation of selected methods of plant disease diagnosis. Crop Protection 14:517-525.

Rambaut A, Drummond AJ (2009) Tracer v 1.5 Molecular evolution. phylogenetics and epidemiology: Tracer V 1.5 Sítio web atualizado em 2009 <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/> Acesso 28 julho 2013

Rambaut A (2009) Molecular evolution. Phylogenetics and epidemiology: FigTree V 1.4.0. Sítio web atualizado em 2009. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> Acesso 28 julho 2013.

Rayner RW (1970) A mycological color chart. Commonwealth Mycological Institute. Kew. Surrey and British Mycological Society. 34 p.

Reed GH, Wittwer CT (2004) Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clinical Chemistry* 50:1748-1754.

Reis DML (1999) Doenças de plantas no trópico úmido Brasileiro. Belém: EMBRAPA.

Rocha A, Garcia D, Uetanabaro APT, Carneiro RT, Araújo IS, Mattos CRR, Góes-Neto A (2011) Foliar endophytic fungi from *Hevea brasiliensis* and their antagonism on *Microcyclus ulei*. *Fungal Diversity* 47:75-84.

Rojas EI, Rehner SA, Samuels GJ, Van Bael SA, Herre EA, Cannon P, Chen R, Pang J, Wang R, Zhang Y, Peng YQ, Sha T (2010) *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish pathogen and endophyte clades. *Mycologia* 102:1318-1338.

Rosmann H, Gameiro A (2006) O futuro da heveicultura brasileira. *Florestar Estatístico* 9:14-19.

Ronquist FM, Teslenko P, van der Mark DL, Ayres A, Darling S, Höhna B, Larget L, Liu MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61:539-542.

Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S. Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press. Totowa. NJ. pp 365-386

Saha T, Kumar A, Ravindran M, Jacob CK, Roy B, Nazeer MA (2002) Identification of *Colletotrichum acutatum* from rubber using random amplified polymorphic DNAs and ribosomal DNA polymorphisms. Mycological Research 106:215-221.

Santos G. Monthé C (2007) Prospecção e perspectivas da borracha natural. *Hevea brasiliensis*. Revista Analytica 26:32-40.

Sierra JF (2010) Caracterização e controle de *colletotrichum* spp. em seringueira (*Hevea brasiliensis*). Dissertação para obtenção do título em Agronomia (Proteção de Plantas). Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”. 83 p.

Silveira AP, Furtado EL, Lopes MEBM (1992) Antracnose: nova doença do painel de sangria da seringueira. Summa Phytopathologica 18:195-200.

Silveira AP, Cardoso RMG (1987) Ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* em seringueira (*Hevea brasiliensis*) no Estado de São Paulo. Summa Phytopathologica 13:19-24.

Smith BJ, Black LL (1990) Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. Plant Disease 74:69-76.

Soares AR, Lourenço AS, Amorim L (2008) Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporoides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento. Tropical Plant Pathology 33:265-272.

Sreenivasaprasad S, Talhinhos P (2005) Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. Molecular Plant Pathology 6:361-378.

Sterling A, Rodríguez C (2011) Nuevos clones de caucho natural para la Amazonia colombiana: énfasis en la resistencia al mal suramericano de las hojas (*Microcyclus ulei*). Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas – SINCHI. 196 p.

Sterling A, Rodríguez C, Betancurt B, Mazorra A, Dussan I, Galindo L, Hernandez J, Plaza C, Polo F, Gamboa A, Castro D, Martínez O (2011) Capítulo 4. Evaluación del desempeño y comportamiento fitosanitario de genotipos élites de *H. brasiliensis* de origen franco en Campo Clonal a Pequeña Escala CCPE. In: Sterling A, Rodríguez C (Eds). Nuevos clones de caucho natural para la Amazonia colombiana: énfasis en la resistencia al mal suramericano de las hojas (*Microcyclus ulei*). Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas – SINCHI. pp. 85-138.

Sutton BC (1980) The Coelomycetes: Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Kew, Surrey. Commonwealth Mycological Institute.

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* 28:2731-2739.

Tao G, Hyde KD, Cai L (2012) Species-specific real-time PCR detection of *Colletotrichum kahawae*. *Journal of Applied Microbiology* 114: 828-835.

Thambugala TADP, Deshappriya N (2009) The role of *Colletotrichum* species on the *Colletotrichum* leaf disease of *Hevea brasiliensis* a preliminary study. *Journal of the National Science Foundation Sri Lanka* 37:135-138.

Vossen RHAM, Aten E, Roos A, den Dunne JT (2009) High-Resolution Melting Analysis (HRMA)—More Than Just Sequence Variant Screening. *Human Mutation* 30:860-866.

Ward E, Foster SJ, Fraaije BA, McCartney HA (2004) Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. *Annals of Applied Biology* 145:1-16.

Wastie RL, Janardhanan PS (1970) Pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporoides*, *C. dematium* and *C. crassipes* to leaves of *Hevea brasiliensis*. Transactions of the British Mycological Society 54:150-152.

Wastie RL (1967). *Gloeosporium* leaf disease of rubber in West Malaysia. Planter. Kuala Lumpur: 43:553-565.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: A guide to methods and amplifications. Innis. M. A., Gelfand. D. H. & Sninsky. J.J (eds). Academic press San Diego C.A. pp. 315-322.

Wittwer CT (2009) High-Resolution DNA Melting Analysis: Advancements and Limitations. Human Mutation 30:857-859.

Yuan ZL, Su ZZ, Mao LJ, Peng YQ, Yang GM (2011) Distinctive endophytic fungal assemblage in stems of wild rice (*Oryza granulata*) in China with special reference to two species of *Muscodora* (*Xylariaceae*). Journal of Microbiology 49:15–23.

Zabalgogezcoa I (2008) Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens Spanish. Journal of Agricultural Research 6:138-14.