UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

# **VARIABILIDADE GENÉTICA DE** *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* **EM SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis*) NO BRASIL**

**JUAN FERNAN SIERRA HAYER**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP
Fevereiro – 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

# **VARIABILIDADE GENÉTICA DE** *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* **EM SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis*) NO BRASIL**

**JUAN FERNAN SIERRA HAYER**

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP
Fevereiro – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO – SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Sierra Hayer, Juan Fernan, 1980-
S572v Variabilidade genética de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* em seringueira (*Hevea brasiliensis*) no Brasil / Juan Fernan Sierra Hayer. – Botucatu : [s.n.], 2014
x, 55 f. : ils. color., grafs., tabs., fots. color.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2014
Orientador: Edson Luiz Furtado
Inclui bibliografia

1. Seringueira – Doenças e pragas - Brasil. 2. Fungos - Genética. 3. Borracha. I. Furtado, Edson Luiz. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. III. Título.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS**

**CAMPUS DE BOTUCATU**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO: **"VARIABILIDADE GENÉTICA *Colletotrichum gloeosporioides* E *Colletotrichum acutatum* EM SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis*) NO BRASIL"**

ALUNO: JUAN FERNAN SIERRA HAYER

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO

Aprovado pela Comissão Examinadora

PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO

PROFA. DRA. MARTHA MARIA PASSADOR

PROF. DR. EDUARDO BAGAGLI

PROFA. DRA. MARLI DE FATIMA STRADIOTO PAPA

PROFA. DRA. CHRISTIANE CERIANI APARECIDO

Data da Realização: 07 de fevereiro de 2014.

*Pai Deus muito obrigado por me permitir mais uma vez culminar um logro a teu lado. Obrigado porque sempre você cuida de mim, tanto nos momentos bons e ruins. Obrigado Deus por permitir conhecer pessoas que dia a dia foram enchendo minha vida de felicidade, amor e conhecimento. Obrigado a minha equipe de trabalho por que juntos conseguimos terminar a nossa pesquisa. Obrigado Deus porque dia e noite, junto com as orações da minha família, da Fabiola Ocampo e a de meus amigos conseguimos manter a fé e a motivação para concluir com admiração nossa pesquisa. Obrigado porque durante todo o processo de estudo abriste muitas portas para mim, que me permitiram crescer como pessoa e profissionalmente. Obrigado Deus porque em alguns momentos de fraqueza e desmotivação, não permitiste que a minha vida fosse para o declívio. Te amo Deus.*

*A Deus pela fortaleza, inteligência, fé, amor, compromisso e capacidade derramada na minha vida.*

*Aos meus pais Tomas Sierra e Fidelina Hayer, por estar comigo sempre e pelo apoio incondicional, compreensão e por sua credibilidade para comigo.*

*Aos meus irmãos Maybelline Sierra Hayer, Sandra Sierra Hayer, Frank Sierra Hayer, Alex Sierra, Yobany Sierra e Patricia Sierra por seus apoios, e a meu sobrinho Miguelucho por ser tão especial comigo.*

*Ao Professor Furtado por continuar como orientador, por sua confiança e por seguir-me ensinando os caminhos do sucesso no mundo da seringueira.*

*Aos meus tios, sobrinhos, primos por seu apoio e orgulho.*

*A Fabiola Ocampo, amiga e colega por ser tão bela e tão maravilhosa comigo, e porque sempre e em todo momento e lugar me apoio. Muito obrigado.*

*A meus amigos e colegas da UNESP, amigos do Brasil, da Colômbia e do resto do mundo por me apoiar e pelos momentos vividos.*

*Dedico.*

*As pessoas que dão minha energia, alento, e motivação,*

*Sempre os levo em minha mente e em meu coração,*

*A meu Deus por ser o ser que da nossa energia para continuar cada dia,*

*Aos meus pais Tomas Sierra e Fidelina Hayer,*

*Aos meus irmãos Frank Sierra, Maybelline Sierra e Sandra Sierra,*

*A minha amiga Fabiola Ocampo,*

*A meu amigo, professor e orientador Edson Luiz Furtado.*

*Ofereço*

## AGRADECIMENTOS

Ao nosso Deus por me seguir acompanhando em todo este processo da minha vida e pela oportunidade de seguir aqui no Brasil.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Botucatu, pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

A CAPES e ao programa PEC – PG, por possibilitar o financiamento de meu estudo no doutorado.

Aos meus pais, irmãos, tios e sobrinhos, pelo apoio incondicional, dedicação, força e amor.

À minha amiga Angela Aristizabal por seu amor, confiança e companhia.

Ao meu amigo, companheiro, professor e orientador professor Furtado por seu apoio, confiança e atenção.

A meus amigos: Martha passador, Cristiane do Pieri, Edvar Silva, Taty Mituti, Dario Pineda e ao resto de amigos colombianos que estão aqui em Botucatu e no Brasil.

A meus amigos da morfologia: Bruno Melo, Fernando Yuldi Ashikaga e ao Guiherme Costa Silva pela força, orientação e dedicação, nos analise de filogenia e população.

Ao professor Danillo Pinhal e a seu orientado Pedro Nachtigall, do departamento da Genética por me permitir fazer parte de meus analises em seu laboratório.

Ao professor João Pessoa e sua equipe do departamento de Microbiologia e Imunologia, por nos permitir o sequenciamento das nossas amostras.

Ao professor Celso Luis Marino por nos permitir a quantificação de nosso DNA.

À empresa Hevea – Tec e Cautex e a todos seus empregados, por me permitir a oportunidade de estar coletar a coleção de isolados presentes neste trabalho, e pelo apoio em todas as viagens nas regiões heveícolas.

Aos professores Antonio Carlos Maringoni, Carlos F. Wilcken, Silvia Renata, Gilberto Raetano, Renate Krause, Edson Baldin, Marli Teixeira, pelos conhecimentos oferecidos.

Á equipe da pós-graduação por sua compreensão e paciência.

Aos funcionários do Departamento de Proteção Vegetal (Defesa Fitossanitária).

Aos amigos do programa de Agronomia, Genética e morfologia.

Aos meus amigos do Brasil, Colômbia e o resto do mundo pelo voto de confiança.

# SUMÁRIO

**Página**

LISTA DE TABELAS ..... VIII
LISTA DE FIGURAS ..... IX
1 RESUMO ..... 1
2 SUMARY ..... 3
3 INTRODUÇÃO ..... 5
4 REVISÃO DE LITERATURA ..... 7
3.1 Ocorrência e importância da doença ..... 9
3.2 Técnicas moleculares ..... 13
5 MATERIAL E MÉTODOS ..... 16
4.1 Obtenção e preservação dos isolados ..... 16
4.2 Identificação molecular ..... 20
4.2.1 Isolamento do DNA genômico ..... 20
4.2.2 Quantificação e diluição do DNA ..... 21
4.2.3 Análise por PCR ..... 21
4.2.4 Purificação dos produtos de PCR ..... 23
4.2.5 Reação de Sequenciamento ..... 24
4.2.6 Análise das Sequências ..... 24
4.2.6.1 Sequências consenso ..... 24
4.2.6.2 Metodologia da análise ..... 24
4.2.6.3 Confecção da matriz ..... 25
4.2.6.4 Análises filogenéticas ..... 29
4.2.6.5 Análise populacional e estatística ..... 30
6 RESULTADOS ..... 31
7 DISCUSSÃO ..... 45
8 CONCLUSÕES ..... 49
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 50

# LISTA DE TABELAS

**Página**

Tabela 1. Isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, obtidos de seringueira no Brasil.....18

Tabela 2. Espécies de *Colletotrichum* spp., isolados de diferentes localidades do mundo, procedentes do banco de dados do GenBank. .....25

Tabela 3. Diversidade Gênica (DG), Diversidade Nucleotídica (DN), Número de Haplótipos (NH) e Número amostral (NA). .....39

Tabela 4. Análise de variância molecular (AMOVA) e FST, utilizando marcador *ITS* entre o grupo de *C. acutatum*. *P < 0,05. .....41

Tabela 5. Índices de Fixação Interpopulacional (FST) par a par, entre os grupos de *C. acutatum*. *P < 0.05. .....41

Tabela 6. Diversidade Gênica (DG), Diversidade Nucleotídica (DN), Número de Haplótipos (NH) e Número amostral (NA). .....42

Tabela 7. Análise de variância molecular (AMOVA) e FST, utilizando marcador *ITS* entre o grupo de *C. gloeosporioides*. *P < 0.05. .....44

Tabela 8. Índices de Fixação Interpopulacional (FST) par a par, entre os grupos de *C. gloeosporioides*. *P < 0.05. .....44

# LISTA DE FIGURAS

**Página**

Figura 1. Na figura pode-se visualizar os sintomas causados por *Colletotrichum* spp. acompanhados de manchas, lesões deprimidas, queimação nas folhas e massa de esporo de cor alaranjada. A: Folha; B: Haste; C: Fruto e D: Painel de sangria. (Fonte: Sierra & Furtado, 2010). .....16

Figura 2. Regiões heveícolas onde foram coletadas as amostras. SP: São Paulo; MS: Mato Grosso do Sul; MT: Mato Grosso; GO: Goiás e BA: Bahia. (Fonte: IBGE, 2013). .....17

Figura 3. Árvore filogenética elaborada pelo método de Mister Bayer entre todas as amostras analisadas no presente trabalho: Números presentes nos nós representam os valores de probabilidade a *posteriori*. Os nós com valores inferiores do que 80% foram colapsados, e estão apresentados como politômicos.....32

Figura 4. Árvore filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança entre todas as amostras analisadas no presente trabalho: números presentes nos nós representam os valores de bootstrap (1000 pseudo-réplicas). Os nós com valores inferiores do que 50% foram colapsados e estão representados como politômicos. .....33

Figura 5. Árvore de distância genética pelo método de Neighbour-Joining entre todas as amostras obtidas com base em sequencias da região *ITS*, demonstrando a existência de linhagens dentro de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Números estão presentes nos nós com índice de bootstrap acima de 50%. .....34

Figura 6. Árvore de distância genética pelo método de Neighbour-Joining entre amostras de *C. acutatum* com base em sequências do gene *ITS*, demonstrando a existência de linhagens dentro de *C. acutatum*. Escala representa 0,5% de divergência genética. Cores representam a procedência das amostras. .....35

Figura 7. Árvore de distância genética pelo método de Neighbour-Joining entre amostras de *C. gloeosporioides* com base em sequências do gene *ITS*, demonstrando a existência de linhagens dentro de *C. gloeosporioides*. Escala representa 0,5% de divergência genética. Cores representam a procedência das amostras. .....36

Figura 8. Árvore de distância genética pelo método de Neighbour-Joining entre amostras de *C. acutatum* com base em sequências do gene *ITS*, demonstrando a existência de linhagens

dentro de *C. acutatum*. Escala representa 0,5% de divergência genética. Cores representam o tipo de tecido de onde foram retiradas as amostras. .....37

Figura 9. Árvore de distância genética pelo método de Neighbour-Joining entre amostras de *C. gloeosporioides* com base em sequências do gene *ITS*, demonstrando a existência de linhagens dentro de *C. gloeosporioides*. Escala representa 0,5% de divergência genética. Cores representam o tipo de tecido de onde foram retiradas as amostras. .....38

Figura 10. Rede de haplótipos de *C. acutatum* calculada pelo método Median-Joining. Os círculos coloridos representam as localidades, junto aos haplótipos encontrados no presente estudo. O tamanho do círculo é proporcional à quantidade de indivíduos que compartilham o mesmo haplótipo. Verde = América do Sul; Vermelho = Ásia; Roxo = Europa; Azul = América Centro Norte; Amarelo = Oceania. .....40

Figura 11. Rede de haplótipos de *C. gloeosporioides* calculada pelo método Median-Joining. Os círculos coloridos representam as localidades, junto aos haplótipos encontrados no presente estudo. O tamanho do círculo é proporcional à quantidade de indivíduos que compartilham o mesmo haplótipo. Verde = América do Sul; Vermelho = Ásia; Roxo = Europa; Azul = América Centro Norte; Amarelo = Oceania; Preto = África. .....43

# 1 RESUMO

A seringueira [*Hevea brasiliensis* (Wild. ex Adr. de Juss.) Muell-Arg] é a maior fonte de borracha natural, amplamente cultivada, e de grande importância comercial devido a sua alta capacidade produtiva. Atualmente ela vem sendo atacada por várias doenças que causam enormes prejuízos econômicos. Dentre essas a antracnose, causada pelos fungos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum*, está presente em todos os lugares heveícolas do mundo. Estes fungos causam vários danos na planta como lesões nos folíolos, nos ponteiros, nos ramos, nos frutos e cancros no painel de sangria. Diante desta situação e da alta incidência destes patógenos na cultura da seringueira, o presente trabalho teve como objetivo identificar a variabilidade genética dos isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* associados à seringueira. Ferramentas filogenéticas e populacionais foram utilizados para determinar a distribuição e a frequência de cada um dos possíveis haplótipos. As 79 amostras coletadas em campo foram amplificadas por PCR com *primers* específicos das regiões espaçadores ITS e dos genes 18S, 28S e 5,8S. Posteriormente as regiões amplificadas foram sequenciadas pelo método Sanger. Para complementar as análises foram adicionadas sequências disponíveis no NCBI, totalizando uma matriz de dados de 263 amostras. As árvores geradas, a partir de análises filogenéticas Bayesiana, Máxima Verossimilhança e Neighbour-Joining, mostraram a divisão dos grupos de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, possibilitando a separação da matriz em duas espécies específicas. As análises

de população mostraram alguns haplótipos bem comuns e bem distribuídos pelo mundo, enquanto outros haplótipos mostraram uma distribuição bem restrita, como é o caso do haplótipo H1 de *C. acutatum* que é exclusivo da América. Os resultados concordam em grande parte com hipóteses morfológicas anteriormente já citadas. A partir das análises realizadas, foi possível levantar hipóteses que expliquem esses padrões de distribuição, e consequentemente, foram fornecidos dados que podem levar a um aperfeiçoamento no controle dessa doença. O presente trabalho permitiu a visualização dos isolados a nível mundial, o que leva a estudos posteriores serem muito mais exigentes no tamanho das amostragens a ser estudadas.

**VARIABILITY OF** *Colletotrichum gloeosporioides* AND *Colletotrichum acutatum* **FROM RUBBER (*Hevea brasiliensis*) IN DIFFERENT LOCATIONS OF BRASIL. Botucatu, 2014. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas. Universidade Estadual Paulista.**

Author: Juan Fernan Sierra Hayer
Adviser: Edson Luiz Furtado

## 2 SUMARY

The rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Wild. ex Adr. Than Juss. ) Muell - Arg] is the largest source of natural rubber, widely cultivated, and of great commercial importance due to its high production capacity. Currently the rubber trees are being attacked for various diseases, causing huge economic losses. Among them, the anthracnose, caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum*, is in all rubber crops places of the world. These fungi causes various damage, such as injuries on leaves, branches, fruits, as well as cankers in the taping panel. Given this situation, and the high incidence of this pathogen in the rubber crop, this study aimed to identify the genetic variability of the isolates of *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* associated to rubber crop. Phylogenetic and population tools were performed to determine the distribution and frequency of each possible haplotypes. The 79 samples collected in the field were amplified by PCR by specific primers of the ITS spacers regions and the 18S, 28S and 5.8 S genes. Subsequently, the amplified regions were sequenced by the Sanger method. Several sequences available in NCBI were added, to complement the analysis, totaling a data matrix of 263 samples. Phylogenetic analyses generated by Bayesian, Maximum Likelihood and Neighbour -Joining methods, showed the division of the *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* groups, enabling the separation of the matrix in two specific species. The population analysis showed some very common haplotypes distributed around the world, as well as another haplotypes with very restricted distribution, such as H1 haplotype of

the *C. acutatum*, which is unique to America. The results largely agree with previous morphological hypotheses already mentioned. From performed analysis was possible to make hypotheses to explain the distribution patterns, and consequently data can lead to an improvement in the control of these diseases. This research allowed a preview of isolates worldwide, which leads to further studies to be much more demanding on the size of the sample studied.

# 3 INTRODUÇÃO

Espécies de fungos do gênero *Colletotrichum* e seu teleomorfo *Glomerella* têm sido agentes causadores de doenças em diferentes espécies de plantas em todo o mundo, na maioria das vezes são descritas como a causa de problemas de pré e pós-colheita nos trópicos. Sua capacidade de causar infecções latentes os coloca entre os mais importantes patógenos de pós-colheita. A descrição da espécie normalmente é baseada nas características morfológicas dos fungos em substratos naturais, no tipo de cultivo, na cultura hospedeira, combinado com especificidade no hospedeiro ou na falta dela e mais recentemente, por meio de análise molecular. Isto tem levado a muitos problemas na identificação e dificuldade para a troca de informações precisas (Sutton, 1992). Muitas espécies de *Colletotrichum* infectam mais de um hospedeiro, e, além disso, mais de uma espécie de *Colletotrichum* podem estar presentes em um único hospedeiro (Roberts *et al*., 2012).

Dentre as principais doenças causadas por esse grupo de fungos está a antracnose da seringueira. Causada por *C. gloeosporioides* Penz., constitui um sério problema para a cultura da seringueira no Estado de São Paulo; este fungo ataca diversas partes da planta ou atua como saprófita associado a outros patógenos (Furtado & Silveira, 1992). No Estado de São Paulo verificou-se a sua ocorrência em folhas, ramos e inflorescência (Silveira & Cardoso, 1987), em hastes e placas de enxerto em jardim clonal e viveiros (Furtado &

Silveira, 1992) e, finalmente, em painéis de sangria (Silveira *et al*., 1992a; Sierra-Hayer & Furtado, 2010), detectaram *C. acutatum*, associado aos mesmos sintomas ocasionados por *C. gloeosporioides*.

A antracnose da seringueira ocorre no Norte do País associada ao mal-das-folhas ou em plantas com estresse nutricional (Gasparotto *et al*., 1984; 2012). Em latitude mais elevada, esta doença acarreta danos severos em brotações novas, causando seca descendente e lesionando folhas. A doença pode ser também encontrada nos estados de MS, PR, MG, e ES (Furtado & Trindade, 2005).

O presente trabalho teve como objetivo identificar a variabilidade genética de 79 isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* associados à seringueira, mediante análises filogenéticas e populacionais, e assim determinar a distribuição e frequência de cada um dos possíveis haplótipos. Os materiais estudados foram coletados em diferentes áreas heveícolas do país. Foi realizada a identificação molecular, sequenciamento da região *ITS*, análises das sequencias e análises filogenética.

# 4 REVISÃO DE LITERATURA

A seringueira [*Hevea brasiliensis* (Wild. ex Adr. de Juss.) Muell-Arg], pertence à família Euphorbiaceae, é nativa da região Amazônica, encontrada naturalmente na mata de outros estados da região norte e países vizinhos. O subproduto mais importante, o látex, foi descoberto em meados do século XVIII e atualmente é a principal fonte de borracha natural do mundo (Alvarenga & Carmo, 2008).

A crescente demanda pela borracha natural ocorreu no século XIX com o advento do processo de vulcanização, com o intuito da fabricação de pneumáticos, possibilitou o início da indústria automobilística. Assim, o Brasil passou a explorar os seringais nativos e constituiu-se o maior produtor e exportador de borracha natural (Alvarenga & Carmo, 2008).

Os ingleses vislumbraram então, a possibilidade de cultivar seringueira nas colônias localizadas no sudoeste da Ásia, cujas condições edafoclimáticas são similares às da Amazônia. Enquanto no Brasil utilizava-se o sistema de produção baseado no extrativismo, na Ásia era adotado o sistema de exploração comercial, que foi o principal fator de sucesso na Ásia. Além disso, na Ásia não existia o *Microcyclus ulei*, fungo causador do mal-das-folhas, principal doença dos seringais, sobretudo na Amazônia (Alvarenga & Carmo, 2008).

A baixa produtividade dos seringais brasileiros, em função das técnicas de cultivo adotadas e da ocorrência do mal-das-folhas, provocaram quedas na participação do

mercado mundial. Devido à expansão da produção asiática e o aumento da demanda por borracha, em função do crescimento da indústria automobilística, mudou a condição do Brasil de exportador para importador. Situação que perdura até os dias atuais (Alvarenga & Carmo, 2008).

Além do principal uso da borracha na linha automobilística, no setor de pneus radiais e pneus de avião, também é utilizada na produção de calçados, adesivos e na área medica, como preservativos, luvas, cateteres e outros (IRSG, Novembro 2013).

A maior área plantada de seringueira concentra-se no continente Asiático com 93% do total de *Hevea*, África com 4% e América do Sul e Central com 3% no ano de 2013. O consumo de borracha concentra-se na Ásia Pacifica com 72%, na União Europeia (EU) com 13% e as Américas com 15% no ano 2012. No ranking dos países mais produtivos de em ordem decrescente encontram-se a Tailândia, Indonésia, Vietnã, Malásia, Índia, China, Costa do Marfim, Brasil, e Sri Lanka (IRSG, Novembro 2013).

O continente Asiático com 93% da *Hevea* no mundo é quem contribui com o maior volume de matéria prima. Os países com maior produção em toneladas no ano de 2013 foram: Tailândia (3.512.000 ton), Indonésia (3.015.000 ton), Vietnã (955.000 ton), Malásia (923.000 ton), India (915.000 ton), China (795.000 ton), a Costa do Marfim (255.000 ton), o Brasil (171.000 ton), e a Sri Lanka (150.000 ton). Os países com maior consumo em toneladas no ano de 2013 foram: Tailândia (490.000 ton), Indonésia (488.000 ton), Vietnã (150.000 ton), Malásia (441.000 ton), India (988.000 ton), China (3.853.000 ton), EU-27 (1.065.000), USA (950.000), Japão (720.000), Costa do Marfim (4.000 ton), Brasil (343.000 ton), e a Sri Lanka (110.000 ton) (IRSG, Novembro 2013).

Em 2012, o Brasil apresentou uma produção de 179.500 toneladas de borracha natural, com uma área total de 138.279 hectares. Sendo 137.814 hectares em produção e 2.444 hectares em plantios novos. Segundo o IBGE, o Brasil ao mês de Novembro de 2013, apresenta uma média de produção nacional de 1.285 Kg/ha de borracha seca, sendo que: o estado de São Paulo produz em média 1.880 Kg/ha, Bahia 865 Kg/ha e Goiás 1.920 Kg/ha (IBGE, 2013).

Desde 1960, o Brasil vem tentando atingir autossuficiência na produção de elastômero natural. As tentativas anteriores para produzir borracha natural, em larga escala, na Amazônia, redundaram em fracasso devido a severas epidemias do mal-das-

folhas. Cerca de dezoito doenças de natureza biótica já foram constatadas no Brasil (Reis, 1999). Igualmente se encontram no Estado de São Paulo a antracnoses (*Colletotrichum gloeosporioides*) e Oídio (*Oidium hevea*) (Furtado & Trindade, 2005).

### 3.1 Ocorrência e importância da doença

O gênero *Colletotrichum* contempla diversas espécies distribuídas em muitos lugares do mundo, entre algumas delas temos: *C. acutatum, C. capsici, C. caricae, C. caudatum, C. circinans, C. coccodes, C. coffeanum, C. corchori, C. crassipes, C. curvatum, C. dematium, C. destructivum, C. falcatum, C. fragariae, C. fusarioides, C. fuscum, C. gloeosporioides, C. gloeosporioides* var. *minus, C. gnaphalii, C. graminicola, C. helichrysi, C. higginsianum, C. liliacearum, C. lindemuthianum, C. linicola, C. malvarum, C. musae, C. nigrum, C. nymphaeae, C. orbiculare, C. paludosum, C. phyllachoroides, C. psoraleae, C. spinaciae, C. sublineolum, C. trichellum, C. trifolii, C. truncatum, C.typhae* (Sutto, 2012).

Nas espécies de *Colletotrichum* são encontradas formas saprofíticas e patogênicas, sendo estas últimas, responsáveis por doenças economicamente importantes, comumente denominadas de antracnoses, que ocorrem em extensa gama de hospedeiros. As plantas estão sujeitas a essa doença em todas as fases de desenvolvimento e o patógeno pode ser disseminado de uma planta para outra por meio de vários agentes do ambiente aéreo. As sementes infectadas também podem disseminar o patógeno de uma área para outra e, quando semeadas, poderão transmiti-lo para plântulas, induzindo sintomas de *damping–off* de pré e pós–emergência. Para invadir o tecido hospedeiro, as espécies de *Colletotrichum* desenvolvem estruturas especializadas para penetrar no hospedeiro, como por exemplo, os apressórios. Com o processo de colonização do patógeno, nos tecidos da planta afetada, surgem os sintomas de antracnose, visíveis em folhas, inflorescências e frutos, sendo a doença mais severa em regiões tropicais e subtropicais (Menezes, 2002).

As seguintes espécies fúngicas têm sido relatadas em *Hevea* spp., como causadores da antracnose: *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc., *C.derridis* van Hoof, *C. fícus* Koord., *Gloeosporium albo-rubrum* Petch, *G. brunneum* Petch, *G. elasticae* Chee e Maas e *G. heveae* Petch. Carpenter e Stevenson (1954), estudando as descrições dessas espécies,

concluíram que todas poderiam ser consideradas como *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc. (Ferreira, 1989). Atualmente também se encontra a espécie *C. acutatum* como causadora de antracnose da seringueira, sendo também relatada no Sri Lanka (Jayasinghe, 1997), na India (Saha, 2002) e no Brasil (Sierra-Hayer & Furtado, 2010).

O agente causal da antracnose da seringueira é *Glomerella cingulata* e *Glomerella acutata* fungo da subdivisão Ascomycota, ordem Diaphortales, que na fase anamórfica corresponde ao fungo *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* respectivamente. O patógeno é comum a diversos hospedeiros, o que favorece sua sobrevivência e dificulta seu controle. Seus conídios germinam em quatro a seis horas em água livre e os sintomas aparecem três dias a pós a inoculação. A esporulação ocorre após o quinto dia. A disseminação dá-se, principalmente, através da água da chuva, não se descartando a possibilidade de ser transferido planta a planta por intermédio da faca de sangria. Condições climáticas que favorecem a doença é temperatura média de 21 ºC, umidade relativa acima de 90% por 13 horas e períodos chuvosos (Furtado & Trindade, 2005; Sierra-Hayer & Furtado, 2010).

Os primeiros registros da antracnose na seringueira foram feitos no Brasil (Silveira & Cardoso, 1987); Petch (1906), no Sri Lanka (ex – Ceilão), e na Malásia John (1952). Na Malásia esta doença é conhecia como "*Gloeosporium* leaf disease" (Wastie, 1973). Sua ocorrência é verificada praticamente em todos os países onde a seringueira é cultivada.

No estado de São Paulo, o primeiro relato foi realizado por Silveira & Cardoso (1987), no município de Porto Feliz em folhas, ramos e inflorescência. Hastes e placas de enxerto (Furtado & Silveira, 1991) e em painéis de sangrias (Silveira *et al*., 1992).

No Brasil, a antracnose ocorre com maior severidade nos estados da região Norte associada ao mal-das-folhas ou em plantas com estresse nutricional. Em latitude mais elevada, esta doença acarreta danos severos em viveiro, jardim clonal e plantio definitivo, causando lesões foliares, desfolhamento e mortalidade de ramos e galhos (Furtado & Trindade, 2005). Na região amazônica a doença ocorre associada ao mal das folhas, causada por *M. ulei*, ou em plantas com estresse nutricional (Gasparoto *et al*., 1984; 2012).

Em folhas, ramos e pecíolos os sintomas manifestam-se nas brotações novas, em plantas de várias idades, causando pequenas lesões arredondadas de coloração

marrom-avermelhada que podem coalescer. Nos pecíolos e ramos provocam lesões escuras, necróticas e deprimidas, sob ataque severo, ocorre desfolhamento, morte da gema apical e seca descendente do ramo. Em todos os órgãos afetados há grande quantidade de esporos, envoltos em massa de coloração alaranjada, bastante característica (Furtado & Trindade, 2005).

As lesões podem ocorrer também nos pecíolos, sendo mais alongadas. Nos frutos, as lesões causam rachaduras e apodrecimento na casca. Nos ramos verdes, as infecções geralmente ocorrem nas suas inserções com o galho. Quando as condições de ambiente são muito favoráveis, essas lesões desenvolvem-se rapidamente, causando quebra de ramos na base, à altura a dos locais lesionados, enquanto seus folíolos permanecem completamente verdes. De certa forma, nos ramos, essa doença pode ser confundida com o ataque de *Phytophthora* spp. Em geral, nas lesões de *C. gloeosporioides* podem ser observadas massas róseas, provenientes de abundante esporulação conidial do patógeno que sai dos acérvulos (Gasparotto, 1997).

Quanto aos danos observados pode-se citar, no viveiro e jardim clonal, a morte de hastes destinadas à produção de gemas para enxertia, baixo descolamento de casca, além de provocar o baixo pegamento da enxertia, devido às placas do enxerto estarem infectadas. Local este que o patógeno se desenvolve rapidamente sob o plástico de proteção do enxerto, matando os tecidos do mesmo e lesionando também o cavalinho. Em seringais adultos causam desfolhamento intenso e seca de ramos, debilitando as plantas e provocando um atraso na recuperação da copa, atrasando o reinício da sangria, além de facilitar a penetração de outros patógenos como *Phomopsis* sp. e *Botryodiplodia* sp. (Silveira *et al*., 1992b).

Os sintomas no tronco são lesões secas e deprimidas, com forma elíptica, localizadas acima do corte de sangria. Nota-se também, a presença de tecidos encharcados e de coloração escura na região cambial, acompanhados de estrias longitudinais no lenho. No látex, aderida à canela de sangria, observa-se a presença de esporulação característica do patógeno (Silveira *et al*., 1992).

Nas condições atuais, há a necessidade de se obter estratégias e mecanismos que apoiem uma visão empresarial no fomento do cultivo e com isso melhorar as ofertas para suprir parte do déficit reclamado pela demanda. O aumento deve ser ligado pela assessoria tecnológica de alta qualidade. Este é o resultado do desenvolvimento científico que

orientam os processos produtivos e o benefício da seringueira nas regiões mais favoráveis para o plantio. Isto não é somente o produto da seleção de genótipos altamente rentáveis se não também das adequadas medidas de manejo do cultivo, particularmente as relacionadas com a diminuição da incidência de pragas e doenças limitantes.

Devido à alta variabilidade das espécies de *Colletotrichum*, manifestada pela morfologia da colônia, forma dos conídios, presença e forma de setas, apressórios, pigmentação, patogenicidade, além de outras características, a diferenciação de espécies de *Colletotrichum*, inter e intraespecífica, pode ser feita por outros métodos não morfológicos, os quais ampliam a faixa de caracteres usados para identificá–las, devendo prover uma forma de estimar a diversidade genética e entender melhor a estrutura da população, notadamente a nível subespecífico (Menezes, 2002).

Entre os parâmetros de identificação dos fungos fitopatogênicos, particularmente *Colletotrichum*, estão às técnicas tradicionais de morfologia, como tamanho e formato de conídios (Smith; Black, 1990; Menezes, 2002; Mills *et al*., 1992a). Através dos caracteres morfológicos de *Colletotrichum* é difícil de definir as espécies, pois estas são delimitadas por poucos caracteres, como tamanho e forma de conídios e tipos de apressórios (Sierra-Hayer & Furtado, 2010; Cannon *et al*., 2000).

Métodos moleculares são cada vez mais utilizados como ferramentas para a diferenciação das espécies de fungos tais como as espécies de o gênero *Colletotrichum* (Lopez, 2001). Atualmente, várias técnicas têm sido postas em prática, como uma ferramenta auxiliar da taxonomia clássica de fungos. Dentre elas podem ser citadas: o uso de marcadores moleculares, principalmente, PCR, RAPD, RFLP (Williams *et al*., 1990)

Considerando o aumento da intensidade de antracnose nos seringais e a pouca disponibilidade de informações, há necessidade de mais estudos envolvendo este patossistema. Informações devem ser obtidas sobre a variabilidade do patógeno, o desenvolvimento de metodologia para avaliar o comportamento de clones de seringueira com relação aos componentes de resistência, e conhecimento dos fatores que favorecem o desenvolvimento da doença, entre outros aspectos (Stradioto, 1992).

A partir de métodos moleculares buscamos aprimorar a identificação não somente das espécies do gênero *Colletotrichum*, mas como também buscamos identificar linhagens dentro de cada espécies; Isto poderia refinar as táticas de controle dentro de cada

espécie/linhagem, podendo inclusive se identificar regiões do globo que compartilham haplótipos e, ver para cada região/linhagens quais as mais eficientes estratégias são adotadas no controle das doenças.

### 3.2 Técnicas moleculares

Compatibilidade vegetativa, um mecanismo que controla isolamento genético de populações, tem sido usada extensivamente para examinar relacionamento genético no número de fungos fitopatogênicos de plantas. Grupos de compatibilidade genética (VCG) têm sido usados para análise de subespécies de *Colletotrichum gloeosporioides* de amendoim, *C. graminicola* de milho e *C. acutatum* de morango (Freemam *et al*., 1998).

Nas últimas décadas, várias técnicas moleculares foram usadas sucessivamente para realizar descrições entre espécies. Reação em cadeia de polimerase (PCR) e polimorfismo do núcleo DNA, DNA ribossomo (rDNA), DNA mitocondrial (mtDNA), e A+ T-rici DNA tem sido utilizados para diferenciar populações de *C. gloeosporioides*, *C. coccodes*, *C. kahawae*, *C. magna*, *C. orbiculare* e outras espécies de hospedeiros (Freemam *et al*., 1998; Tozze 2006; 2007).

Técnicas moleculares auxiliam na caracterização e identificação das espécies de *Colletotrichum*, e várias dessas técnicas têm sido utilizadas como sucesso para complementar estudo de diferenciação de populações desses fungos (Bueno, 2005; Lopez, 2001; Tozze, 2006; 2007). Com a utilização de *primers* específicos para espécies de *Colletotrichum* obtidos a partir da análise de sequência da região *ITS*, podem-se confirmar os resultados de morfologia e patogenicidade (Mills; Hodson; Brown, 1992a; Freemam *et al*., 2000, Fremam *et al*., 2001).

Segundo Lowe (2004), a variação genética dentro de uma espécie é um conceito fundamental para a genética aplicada à ecologia e possui três componentes: diversidade genética, diferenciação genética e distância genética dos seus componentes. A diversidade genética mede a quantidade de variação encontrada numa população, a diferenciação genética descreve como esta variação é distribuída entre populações, enquanto a distância genética quantifica o grau de similaridade entre indivíduos ou grupos de indivíduos.

Pelo menos três razões biológicas são sugeridas por Rubin et al. (2001) no que se refere à preservação da variabilidade genética de populações naturais como objetivo da biologia da conservação, relacionando que a perda da variabilidade pode aumentar a probabilidade de extinção, em decorrência de um declínio na fecundidade e na viabilidade. Populações com baixos níveis de variação genética, sobre as quais a seleção natural pode operar, podem ter oportunidades reduzidas para futuras adaptações frente a mudanças evolutivas; e a preservação da variabilidade genética pode ter papel chave na identificação de unidades evolutivas significativas para a conservação.

O grau de identidade de uma população em relação às outras depende do nível de fluxo gênico entre elas (Futuyma, 1997), sendo este dependente da taxa de migração entre as populações. O fluxo gênico homogeniza a variação genética entre as populações (Genovart et al., 2003), verificando-se que quando a taxa de fluxo gênico é baixa ou nula, os efeitos da deriva podem ser mais facilmente visíveis na diferenciação das populações (Slatkin e Barton, 1989).

Estudos relacionados a genética de populações vêm aumentando consideravelmente nos últimos anos. Marcadores moleculares têm sido amplamente aplicados para acessar a repartição genética entre populações geograficamente isoladas para definir unidades evolutivas significativas abaixo do nível de espécie, para formulação de propostas de manejo e conservação e para revisar tradicionais designações de espécies e subespécies (Dantas, 2007). Segundo Perez-Sweeney et al. (2003), avaliações da estrutura populacional proporcionam um retrato genético das populações, fornecendo estimativas do grau de endogamia, diversidade genética e diferenciação entre os espécimes. Estes dados quando associados ao conhecimento de atributos como o tamanho efetivo da população, fluxo gênico e sistemas de acasalamento são particularmente importantes no delineamento das ações de manejo a serem adotadas.

O conhecimento prévio da distribuição da diversidade genética dentro e entre populações de uma espécie obtida por meio da aplicação de marcadores moleculares é uma etapa inicial importante para o desenvolvimento de programas de manejo e conservação *in situ* e de empreendimentos que visem à sua reestruturação. Para isso deve-se levar em conta se uma espécie está representada apenas por uma população, ou se é composta por populações

geneticamente diferenciadas e distribuídas pela área de ocorrência, devendo ser conhecido o grau de interação entre elas (Hilsdorf e Petrere, 2002).

# 5 MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1 Obtenção e preservação dos isolados

As 79 amostras foram coletadas em cinco regiões heveícolas do país, as quais correspondem ao Estado de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Bahia (Tabela 1) (Figura 2). Estas regiões são também consideradas altamente potenciais tanto em área como em produção.

Para o isolamento do fungo foram coletados órgãos como galhos, folhas, frutos e casca do painel de sangria dos clones RRIM 600, PB 235, GT 1, RRIM 937, RRIM 701, PR 255 e IAN 873 presentes nas localidades, assim como de viveiros e jardins clonais (Figura 1 ).

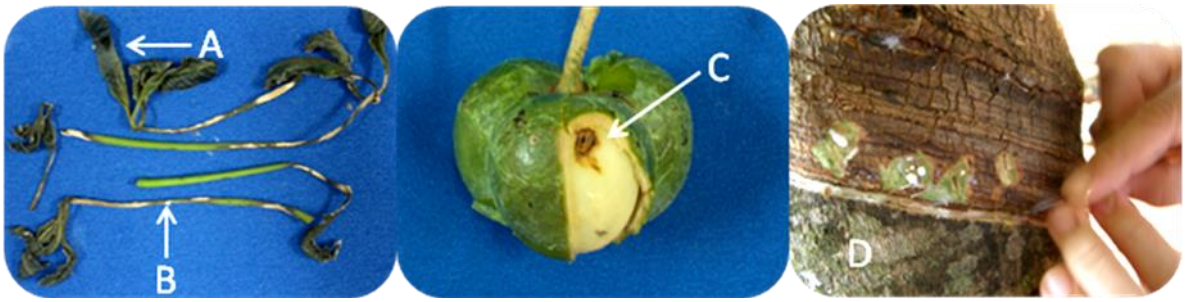


**Figura 1.** Na figura pode-se visualizar os sintomas causados por *Colletotrichum* spp. acompanhados de manchas, lesões deprimidas, queimação nas folhas e massa de esporo de cor alaranjada. A: Folha; B: Haste; C: Fruto e D: Painel de sangria. (Fonte: Sierra & Furtado, 2010).

**Figura 2.** Regiões heveícolas onde foram coletadas as amostras. SP: São Paulo; MS: Mato Grosso do Sul; MT: Mato Grosso; GO: Goiás e BA: Bahia. (Fonte: IBGE, 2013).

As amostras coletadas foram levadas ao Laboratório de Fitopatologia Florestal do Departamento de Defesa Fitossanitária, FCA – UNESP, onde verificou-se a presença dos conídios mediante exame em microscópio ótico. Para isolamento fragmentos de cada amostra foram submetidos à desinfestação superficial, utilizando álcool a 70%, por um minuto, solução de hipoclorito de sódio a 2%, por 2 minutos e por último, água autoclavada estéril. Posteriormente, os fragmentos foram colocados no interior da câmara de fluxo laminar sobre papel toalha para secagem. Logo foram colocados cortes finos em placas de Petri de 8 cm de diâmetro contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) Difco® (39 g/L) e, oxitetraciclina (0,06 g/L), depois foram mantidas em câmara de temperatura controlada BOD

(Biological Oxygen Demand) a temperatura de 25±1 °C, durante 8 dias. Os isolados obtidos foram preservados pelos métodos do óleo mineral, Castellani, e ao frio.

Para a preservação em óleo mineral, tubos de ensaio contendo 5 mL meio BDA e tampados com rolhas de algodão, foram autoclavados por 30 minutos a 120 °C, e posteriormente, após autoclavagem, foram colocados em inclinação para sua solidificação. Em câmara de fluxo laminar, foram colocados discos de 7 mm no centro do meio BDA contido em cada tubo, sendo estes mantidos em BOD a temperatura de 25 °C, durante 5 dias. Após seu crescimento foi depositado 6 mL de óleo mineral autoclavado ate um centímetro acima do crescimento do fungo. A preservação pelo métodos de água destilada (Castellani) foi feita em frascos de penicilina contendo 10 mL de água esterilizada e autoclavada. Foram adicionados oito discos de 7mm da colônia fúngica em cada frasco, e posteriormente foram tampados com tampa de borracha e lacre de alumínio e, finalmente, fechados com alicate de recrave. A preservação ao frio (-80 °C) foi feita em tubos Falcon de 15 mL, onde foram depositados micélios pertencentes a cada isolado, estes foram retirados das placas de Petri com ajuda de um bisturi (Sierra & Furtado, 2010).

**Tabela 1.** Isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, obtidos de seringueira no Brasil.

| Identificação | Espécie | Tecido | Local | Sigla |
|---|---|---|---|---|
| J01 | *C. gloeosporioides* | Galhos | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J02 | *C. acutatum* | Galhos | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J03 | *C. acutatum* | Galhos | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J04 | *C. gloeosporioides* | Painel | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J05 | *C. gloeosporioides* | Fruto | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J06 | *C. acutatum* | Galhos | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J07 | *C. acutatum* | Folha | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J09 | *C. acutatum* | Fruto | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J10 | *C. acutatum* | Galhos | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J11 | *C. acutatum* | Painel | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J12 | *C. acutatum* | Folha | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J13 | *C. gloeosporioides* | Fruto | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J14 | *C. acutatum* | Galhos | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J15 | *C. gloeosporioides* | Painel | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J16 | *C. gloeosporioides* | Galhos | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J17 | *C. gloeosporioides* | Galhos | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J18 | *C. acutatum* | Folha | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J19 | *C. acutatum* | Galhos | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J20 | *C. acutatum* | Painel | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J21 | *C. gloeosporioides* | Painel | Brasil - São Paulo | BRA-SP |

(continua)

**Tabela 1.** Isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, obtidos de seringueira no Brasil.

| Identificação | Espécie | Tecido | Local | Sigla |
|---|---|---|---|---|
| J22 | *C. gloeosporioides* | Painel | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J23 | *C. acutatum* | Painel | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J24 | *C. acutatum* | Painel | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J25 | *C. acutatum* | Painel | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J26 | *C. acutatum* | Painel | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J27 | *C. gloeosporioides* | Folha | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J28 | *C. gloeosporioides* | Folha | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J29 | *C. acutatum* | Fruto | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J31 | *C. acutatum* | Fruto | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J32 | *C. acutatum* | Painel | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J33 | *C. acutatum* | Galhos | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J34 | *C. gloeosporioides* | Folha | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J35 | *C. acutatum* | Folha | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J37 | *C. acutatum* | Galhos | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J38 | *C. acutatum* | Folha | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J39 | *C. acutatum* | Painel | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J40 | *C. acutatum* | Folha | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J41 | *C. acutatum* | Folha | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J42 | *C. acutatum* | Galhos | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J43 | *C. acutatum* | Galhos | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J44 | *C. gloeosporioides* | Fruto | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J46 | *C. gloeosporioides* | Painel | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J47 | *C. acutatum* | Fruto | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J48 | *C. acutatum* | Galhos | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J49 | *C. acutatum* | Painel | Brasil - São Paulo | BRA-SP |
| J50 | *C. acutatum* | Folha | Brasil - Mato Grosso do Sul | BRA-MS |
| J51 | *C. acutatum* | Folha | Brasil - Mato Grosso do Sul | BRA-MS |
| J52 | *C. gloeosporioides* | Folha | Brasil - Mato Grosso do Sul | BRA-MS |
| J53 | *C. acutatum* | Galhos | Brasil - Mato Grosso do Sul | BRA-MS |
| J55 | *C. acutatum* | Folha | Brasil - Mato Grosso do Sul | BRA-MS |
| J57 | *C. gloeosporioides* | Folha | Brasil - Mato Grosso do Sul | BRA-MS |
| J58 | *C. acutatum* | Folha | Brasil - Mato Grosso do Sul | BRA-MS |
| J59 | *C. acutatum* | Galhos | Brasil - Mato Grosso do Sul | BRA-MS |
| J62 | *C. acutatum* | Galhos | Brasil - Mato Grosso do Sul | BRA-MS |
| J63 | *C. gloeosporioides* | Galhos | Brasil - Mato Grosso do Sul | BRA-MS |
| J66 | *C. acutatum* | Galhos | Brasil - Mato Grosso do Sul | BRA-MS |
| J69 | *C. acutatum* | Folha | Brasil - Mato Grosso do Sul | BRA-MS |
| J72 | *C. acutatum* | Painel | Brasil - Mato Grosso | BRA-MT |
| J73 | *C. gloeosporioides* | Painel | Brasil - Mato Grosso | BRA-MT |
| J74 | *C. gloeosporioides* | Galhos | Brasil - Mato Grosso | BRA-MT |
| J75 | *C. gloeosporioides* | Painel | Brasil - Mato Grosso | BRA-MT |
| J76 | *C. acutatum* | Folha | Brasil - Mato Grosso | BRA-MT |
| J77 | *C. acutatum* | Folha | Brasil - Mato Grosso | BRA-MT |
| J78 | *C. gloeosporioides* | Galhos | Brasil - Mato Grosso | BRA-MT |
| J79 | *C. acutatum* | Galhos | Brasil - Mato Grosso | BRA-MT |
| J80 | *C. acutatum* | Galhos | Brasil - Mato Grosso | BRA-MT |
| J81 | *C. acutatum* | Painel | Brasil - Mato Grosso | BRA-MT |

(continua)

**Tabela 1.** Isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum,* obtidos de seringueira no Brasil.

| Identificação | Espécie | Tecido | Local | Sigla |
|---|---|---|---|---|
| J82 | *C. acutatum* | Painel | Brasil - Mato Grosso | BRA-MT |
| J83 | *C. acutatum* | Painel | Brasil - Mato Grosso | BRA-MT |
| J84 | *C. acutatum* | Fruto | Brasil - Mato Grosso | BRA-MT |
| J85 | *C. acutatum* | Galhos | Brasil - Goiás | BRA-GO |
| J86 | *C. acutatum* | Folha | Brasil - Goiás | BRA-GO |
| J87 | *C. acutatum* | Folha | Brasil - Goiás | BRA-GO |
| J88 | *C. acutatum* | Galhos | Brasil - Goiás | BRA-GO |
| J91 | *C. acutatum* | Folhas | Brasil - Bahia | BRA-BA |
| J92 | *C. acutatum* | Folhas | Brasil - Bahia | BRA-BA |
| J93 | *C. gloeosporioides* | Folhas | Brasil - Bahia | BRA-BA |
| J96 | *C. acutatum* | Folhas | Brasil - Bahia | BRA-BA |
| J97 | *C. acutatum* | Folhas | Brasil - Bahia | BRA-BA |

## 4.2 Identificação molecular

### 4.2.1 Isolamento do DNA genômico

Micélios de todos os isolados foram estocados a -80°C no momento da repicagem dos experimentos anteriores, e transferidos para tubos Falcon de 15 mL. A extração de DNA genômico total foi realizada para 79 amostras utilizando-se o método de Dellaporta *et al*. (1983).

Os micélios dos isolados foram colocados em tubos de microcentrífuga de 1500 μL, contendo 500 μL de tampão de extração (NaCl 0,5M; EDTA 0,05M; Tris-HCl 0,1M pH 8,0; β-mercaptoetanol 0,2%), este foi macerado com um pistilo plástico. Após a maceração foram adicionados 33 μL de SDS 20% a cada um dos tubos, os quais foram agitados por dois minutos e incubados a 65°C, por dez minutos. Em seguida foram adicionados 160 μL, de acetato de potássio 5M, e agitados por dois minutos, logo foram colocados na centrifuga a 12000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de microcentrífuga, sendo adicionados 600 μL de isopropanol, a fim de precipitar o DNA. Os tubos foram agitados e submetidos à microcentrífuga a 12000 rpm, durante dez minutos. O sobrenadante foi removido cuidadosamente sem remover o "pellet", o qual foi lavado com 500 μL de etanol a 70%. Posteriormente, os tubos foram centrifugados por cinco minutos, e o sobrenadante foi cuidadosamente removido

cuidadosamente o sobrenadante. Finalmente as amostras foram secas a temperatura ambiente e ressuspendidos em 100 µL de água MilliQ.

A qualidade e concentração do DNA foram verificados colocando-se alíquotas de 4 µL de cada amostra de DNA, misturadas com 2 µL de tampão carregamento Orange DNA Loading Dye da Fermentas, em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE (0,1M Tris-HCl, 0,1M ácido bórico e 0,02mM EDTA pH 8,3). O gel foi submetido à eletroforese por 80 V/ 90 minutos, as bandas foram coradas com Neotaq Brilliant Green Plus DNA Stain (6 µL/100mL) e observadas através de transluminador UV.

Outra metodologia utilizada empregou diretamente os esporos dos isolados, para isso, com a ajuda de uma alça estéril, dentro da câmara de fluxo laminar, foi feita uma raspagem da colônia fúngica. Em seguida esta foi colocada em um tubo Eppendorf de 1.5 mL contendo 50 µL de água MilliQ, após leve agitação para homogeneização da solução, foram preservados a – 20°C (Sierra & Furtado, 2010).

### 4.2.2 Quantificação e diluição do DNA

A quantificação e a qualidade do DNA foram realizadas no espectrofotômetro (Nanodrop® - ND 1000 Spectrophotometer - Thermo Fisher Scientific), através da comparação de absorbância a 260 - 280nm. A solução estoque de DNA foram diluídas numa concentração final de 25 ng/µL e estocadas em freezer a –20ºC, a fim de evitar a degradação do DNA, sendo descongeladas no momento das reações de PCR.

### 4.2.3 Análise por PCR

Para a identificação molecular pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) foram utilizados *primer* específicos para *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e para a região *ITS* para a identificação de todos os isolados.

Para todas as análises o reagente de extração utilizado foi PCR Master Mix (2X) da Fermentas®. Composto de 0,05 uni/ µL *Taq* DNA polimerase, 4 mM $MgCl_2$, 0,4 mM dATP, 0,4 mM dCTP, 0,4 mM dGTP e 0,4 mM dTTP. Também foi usado o PCR Marter

Mix (2X) da PROMEGA®. Composto de 3 mM $MgCl_2$, 0,4 mM dATP, 0,4 mM dCTP, 0,4 mM dGTP e 0,4 mM dTTP. Para ambos reagentes o volume total foi de 25 µL, sendo 12,5 do reagente Master Mix.

A identificação de *C. acutatum* foi realizada com os *primers* Calnt2 (5'- GGG GAA GCC TCT CGC GG-3') e ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3') Sreenivasaprasad *et al*. (1996). A reação foi realizada utilizando 25 µL de volume total por amostra, contendo 12,5 µL de Master Mix (2X), 0,5 µL de cada um dos *primer*, 3 µL de DNA extraído e 8,5 µL de água livre de nuclease. O programa do termociclador foi programado para um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 62 °C e 90 segundos a 72 °C, seguido de um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 60 °C e 90 segundos a 72 °C finalizando com 33 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 58 °C e 90 segundos a 72 °C.

Para a identificação de *C. gloeosporioides* foi utilizado os *primers* Cglnt (5'- GGC CTC CCG CCT CCG GGC GG-3') e ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') descritos por Mills *et al*., (1992b). A reação foi realizada utilizando 25 µL de volume total por amostra, contendo 12,5 µL de Master Mix (2X), 0,50 µL de cada um dos *primer*, 3 µL de DNA extraído e 8,5 µL de água livre de nuclease. O programa do termociclador programado para um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 62 °C e 90 segundos a 72 °C, seguido de um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 60 °C e 90 segundos a 72 °C finalizando com 33 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 58 °C e 90 segundos a 72 °C.

Para todos os isolados foi detectada a região *ITS*, utilizando os *primers* ITS1 (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') que permitiram a amplificação de uma pequena região (18S) e uma grande região (28S), e estes também permitiram a amplificação da região 5.8S do rDNA e os espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) White *et al.* (1990).

A reação foi realizada utilizando-se 25 µL de volume total por amostra, contendo 12,5 µL de Master Mix (2X), 0,50 µL de cada um dos *primer*, 3 µL de DNA extraído e 8,5 µL de água livre de nuclease. O termociclador foi programado para um ciclo de 94 °C por 3 minutos, seguido de 45 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos, com uma extensão final de 72 °C por 7 minutos.

Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1,2% contendo 6 µL/100mL de Neotaq. A eletroforese foi realizada a 80 v / 250 mA / 90 minutos. Após a corrida, o gel foi colocado em um transluminador tipo STRATAGENE EAGLEEYE II de ultravioleta.

### 4.2.4 Purificação dos produtos de PCR

A purificação do produto de PCR foi realizada com o kit da Promega® Wizard® SV Gel and PCR Clean – Up Sytem. Os passos foram os seguintes: 1) em tubos de Minicoluna encaixados em tubos coletores, adicionou-se o volume de 50 µl da PCR o mesmo volume de Membrane Binding Solution; 2) Este foi deixado à temperatura ambiente durante um minuto; 3) Foi centrifugado durante um minuto a 14.000 rpm e, em seguida foi removido o SV minicoluna e descartado o sobrenadante do tubo coletor; 4) Posteriormente foi encaixado o SV minicoluna no tubo coletor e adicionados 700 µl de Membrana Wash Solution diluído com etanol 95% e centrifugado durante um minuto a 14.000 rpm. Descartou-se o que passou no tubo coletor e posteriormente se fez mais uma lavagem adicionando 500 µl da mesma solução, e centrifugado durante cinco minutos a 14.000 rpm; 5) O coletor foi removido com cuidado para o que passou não toque o SV Minicoluna. Descartou-se o que passou, e foi recentrifugado por um minuto a 14.000 rpm com a tampa aberta, com a finalidade de evaporar o etanol residual; e 6) O SV Minicoluna foi transferido cuidadosamente, para um novo tubo de Eppendorf de 1.5 mL. Depois disso foi colocado 50 µl de água MilliQ. Incubou-se por um minuto a temperatura ambiente, após isso foram centrifugadas durante um minuto a 14.000 rpm. Por ultimo descartou-se o SV Minicoluna e as amostras foram estocadas a -20° até o uso.

### 4.2.5 Reação de Sequenciamento

A solução de PCR purificada teve sua concentração de DNA estimada através do espectrofotômetro Nanodrop® - ND 1000. Esta solução foi diluída aproximadamente a 10 ng/ µL. 10 µL de amostra foram colocadas em tubos de 0.5 mL, juntamente com o primer na concentração de 5 µM/ µL. As amostras sequenciadas no Laboratório de Diagnóstico Molecular e Sequenciamento do Departamento de Microbiologia e Imunologia / Instituto de Biociências de Botucatu / UNESP para o sequenciamento. Para o sequenciamento foi utilizado o par de oligonucleotídeos ITS1 (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') no sequenciador capilar 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystem), BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit versão 3,1 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### 4.2.6 Análise das Sequências

#### 4.2.6.1 Sequências consenso

As sequências consenso de cada isolado foram comparadas entre si e com outras sequências de isolados do gênero *Colletotrichum* do GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). A edição das sequências consenso do segmento gênico foi realizada no programa Geneious 4.8.

#### 4.2.6.2 Metodologia da análise

Dentro do GenBank foram separadas um conjunto grande de sequências pertencentes a grupos próximos daqueles que já foram analisados, no caso de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. Com as sequencias já selecionadas e somadas ao nosso banco de dados, foi gerada uma única matriz no programa MUSCLE, após isso foram feitas análises filogenéticas Bayesiana, Máxima Verossimilhança e Neighbor Joining as mais precisas possíveis. Essa metodologia teve o objetivo de encontrar dentro do banco de dados disponível,

aquelas sequências que eram filogeneticamente mais aparentadas com aquelas de nosso banco de dados, as quais foram adquiridas em campo. Isto permitiu gerar matrizes específicas por espécies com a menor quantidade de ruído e interferência no alinhamento, assim, foi possível separar em duas matrizes distintas, uma de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, excluindo algumas amostras do banco de dados total levantado. Posterior a isso foram geradas duas matrizes específicas para o estudo de populações de *C. gloeosporioides* e de *C. acutatum*.

#### 4.2.6.3 Confecção da matriz

O alinhamento foi executado pelo algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) e correções manuais dos erros de alinhamentos evidentes foram realizadas no programa BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999). Após o alinhamento o melhor modelo de evolução nucleotídica foi estimado com o programa Modeltest 3.06 (Posada e Crandall, 1998) implementado no PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2003). Foi realizado uma corrida, com 5 milhões de repetições, sendo cada árvore amostrada a cada mil gerações.

O teste de saturação foi realizado no Dambe 5.3.38 (Xia, 2013), tanto pelo método gráfico quanto pelos métodos de Xia *et al.* (2003) e Xia e Lemey (2009). As frequências de nucleotídeos foram calculadas no programa Mega 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Com a finalidade de comparar sua distribuição territorial, dentro do GenBank também foram selecionadas sequências depositadas de espécies de *Colletotrichum* para comparação com nosso banco de dados (Tabela 2).

**Tabela 2.** Espécies de *Colletotrichum* spp., isolados de diferentes localidades do mundo, procedentes do banco de dados do GenBank.

| Identificação GenBank | Espécie | Hospedeiro | Local | Sigla |
|---|---|---|---|---|
| JQ814356 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Hevea brasiliensis* | Brasil – Bahia | BRA-BA |
| JQ814351 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Hevea brasiliensis* | Brasil – Bahia | BRA-BA |
| JQ814346 | *C. gloeosporioides* | *Hevea brasiliensis* | Brasil – Bahia | BRA-BA |
| JQ814345 | *C. gloeosporioides* | *Hevea brasiliensis* | Brasil – Bahia | BRA-BA |
| JQ814344 | *C. gloeosporioides* | *Hevea brasiliensis* | Brasil – Bahia | BRA-BA |
| JQ814343 | *C. gloeosporioides* | *Hevea brasiliensis* | Brasil – Bahia | BRA-BA |
| JQ814342 | *C. gloeosporioides* | *Hevea brasiliensis* | Brasil – Bahia | BRA-BA |
| JQ814341 | *C. gloeosporioides* | *Hevea brasiliensis* | Brasil – Bahia | BRA-BA |

**(continua)**

**Tabela 2**. Espécies de *Colletotrichum* spp., isolados de diferentes localidades do mundo, procedentes do banco de dados do GenBank.

| Identificação GenBank | Espécie | Hospedeiro | Local | Sigla |
|---|---|---|---|---|
| JQ814340 | *C. gloeosporioides* | *Hevea brasiliensis* | Brasil – Bahia | BRA-BA |
| JQ814338 | *C. gloeosporioides* | *Hevea brasiliensis* | Brasil – Bahia | BRA-BA |
| JQ814337 | *Colletotrichum theobromicola* | *Hevea brasiliensis* | Brasil – Bahia | BRA-BA |
| JQ814336 | *C. gloeosporioides* | *Hevea brasiliensis* | Brasil – Bahia | BRA-BA |
| JQ814332 | *Colletotrichum theobromicola* | *Hevea brasiliensis* | Brasil – Bahia | BRA-BA |
| JQ814354 | *Colletotrichum acutatum* | *Hevea brasiliensis* | Brasil – Bahia | BRA-BA |
| JQ814355 | *Colletotrichum acutatum* | *Hevea brasiliensis* | Brasil – Bahia | BRA-BA |
| FJ798598 | *Glomerella cingulata* | *Hevea brasiliensis* | Brasil – Bahia | BRA-BA |
| FJ798602 | *Glomerella cingulata* | *Hevea brasiliensis* | Brasil | BRA |
| FJ798596 | *Glomerella cingulata* | *Hevea brasiliensis* | Brasil – Bahia | BRA-BA |
| JX844074 | *Colletotrichum gossypii* | Algodão | Brasil – Goiás | BRA-GO |
| JX844081 | *Colletotrichum gossypii* | Algodão | Brasil – Goiás | BRA-GO |
| GU120390 | *Colletotrichum acutatum* | Citros | Brasil | BRA |
| GU223179 | *Glomerella cingulata* | Citros | Brasil | BRA |
| GU223178 | *Glomerella cingulata* | Citros | Brasil | BRA |
| GU223177 | *Glomerella cingulata* | Citros | Brasil | BRA |
| GU223176 | *Glomerella cingulata* | Citros | Brasil | BRA |
| JQ814365 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Hevea brasiliensis* | Brasil – Bahia | BRA-BA |
| JQ814363 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Hevea brasiliensis* | Brasil – Bahia | BRA-BA |
| JX010285 | *C. theobromicola* | Morango | USA | USA |
| JX010286 | *Colletotrichum theobromicola* | Morango | USA | USA |
| EU168904 | *Colletotrichum acutatum* | Citros | Usa | USA |
| EU168903 | *Colletotrichum acutatum* | Citros | Usa | USA |
| EU168902 | *Colletotrichum acutatum* | Citros | Usa | USA |
| FN566877 | *C. acutatum* | Citros (limão Tahiti) | Portugal | PRT |
| AM991134 | *Colletotrichum acutatum* | Oliveira | Portugal | PRT |
| AM404279 | *Colletotrichum acutatum* | Videiro | Portugal | PRT |
| FJ884085 | *Colletotrichum sp* | *Hevea* | Peru | PER |
| FJ884083 | *Colletotrichum sp* | *Hevea* | Peru | PER |
| FJ884081 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Hevea* | Peru | PER |
| HQ022474 | *Colletotrichum aff. boninense* | *Hevea guianensis* | Peru | PER |
| HQ022504 | *Colletotrichum cf. gloeosporioides* | *Hevea guianensis* | Peru | PER |
| HQ022503 | *Colletotrichum cf. gloeosporioides* | *Hevea guianensis* | Peru | PER |
| HQ022392 | *Colletotrichum cf. gloeosporioides* | *Hevea* | Peru | PER |
| EF221832 | *Colletotrichum acutatum* | Abacate | México | MEX |
| EF221831 | *Colletotrichum acutatum* | Abacate | México | MEX |
| EU056740 | *Colletotrichum capsici* | *Carica papaya* | México | MEX |
| EU056739 | *Colletotrichum capsici* | *Carica papaya* | México | MEX |
| HM450129 | *Colletotrichum capsici* | *Carica papaya* | México | MEX |
| HM562711 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Carica papaya* | México | MEX |
| HM562710 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Carica papaya* | México | MEX |
| JQ658887 | *Colletotrichum sublineola* | Sorgo | México | MEX |
| JQ658886 | *Colletotrichum musae* | Banana | México | MEX |
| JQ658876 | *Colletotrichum boninense* | Amora | México | MEX |
| JQ658875 | *Colletotrichum boninense* | Amora | México | MEX |
| JQ658871 | *Colletotrichum jasminigenum* | Vários | México | MEX |

**(continua)**

**Tabela 2**. Espécies de *Colletotrichum* spp., isolados de diferentes localidades do mundo, procedentes do banco de dados do GenBank**.**

| Identificação GenBank | Espécie | Hospedeiro | Local | Sigla |
|---|---|---|---|---|
| JQ658869 | *Colletotrichum cliviae* | Feijão | México | MEX |
| JQ658862 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Citrus sinensis* | México | MEX |
| GU227813 | *Colletotrichum trichellum* | *Hedera SP* | Guatemala | GTM |
| DQ286152 | *Colletotrichum trichellum* | *Hedera* | Guatemala | GTM |
| JX476955 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Theobroma cacao* L. | Equador | ECU |
| JN543069 | *Colletotrichum acutatum* | *Solanum betacea* | Equador | ECU |
| JN543070 | *Colletotrichum acutatum* | *Solanum betacea* | Equador | ECU |
| JN543067 | *Colletotrichum acutatum* | *Solanum betacea* | Equador | ECU |
| HM999897 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Tectaria incisa* | Equador | ECU |
| JN715838 | *Colletotrichum kahawae subsp. ciggaro* | Amora | Colômbia | COL |
| JQ005222 | *Colletotrichum annellatum* | *Hevea brasiliensis* | Colômbia | COL |
| JN715846 | *Colletotrichum karstii* | *Rubus glaucus* | Colômbia | COL |
| JN715847 | *Colletotrichum kahawae subsp. ciggaro* | *Rubus glaucus* | Colômbia | COL |
| JN715844 | *Colletotrichum brassicicola* | *Rubus glaucus* | Colômbia | COL |
| JN715843 | *Colletotrichum fructicola* | *Rubus glaucus* | Colômbia | COL |
| JN715834 | *Colletotrichum godetiae* | *Rubus glaucus* | Colômbia | COL |
| AF534466 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Coffea arábica* | Colômbia | COL |
| AY739025 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Annona muricata* | Colômbia | COL |
| JN715840 | *C. SP* | Amora | Colômbia | COL |
| JQ005174 | *Colletotrichum colombiense* | *Passiflora edulis* | Colômbia | COL |
| JQ005173 | *Colletotrichum colombiense* | *Passiflora edulis* | Colômbia | COL |
| HE655511 | *Colletotrichum siamense* | *Coffea* SP | Colômbia | COL |
| FR717705 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Coffea* SP | Colômbia | COL |
| AF534467 | *Colletotrichum acutatum* | *Coffea arábica* | Colômbia | COL |
| AF521210 | *Colletotrichum acutatum (26s)* | Manga | Colômbia | COL |
| AY245021 | *Glomerella cingulata* | *Coffea arábica* | Colômbia | COL |
| JQ948290 | *Colletotrichum laticiphilum* | *Hevea brasiliensis* | Colômbia | COL |
| JX515292 | *Colletotrichum ignotum* | *Theobroma cação* | Bolívia | BOL |
| KC820802 | *Colletotrichum queenslandicum* | Mango | Sri Lanka | LKA |
| KC820803 | *Colletotrichum asianum* | Manga | Sri Lanka | LKA |
| KC820802 | *Colletotrichum queenslandicum* | Manga | Sri Lanka | LKA |
| GU227879 | *Colletotrichum truncatum* | *Capsicum annuum* | Indonésia | IND |
| FJ972615 | *Colletotrichum asianum* | *Coffea arábica* | Tailândia | THA |
| FJ972614 | *Colletotrichum siamense* | *Coffea arábica* | Tailândia | THA |
| FJ972613 | *Colletotrichum siamense* | *Coffea arábica* | Tailândia | THA |
| FJ972612 | *Colletotrichum asianum* | *Coffea arábica* | Tailândia | THA |
| JN050243 | *Colletotrichum thailandicum* | *Alocasia* sp. | Tailândia | THA |
| JN050242 | *Colletotrichum thailandicum* | *Hibiscus* | Tailândia | THA |
| JN050241 | *Colletotrichum tropicicola* | Orquídea | Tailândia | THA |
| JN050240 | *Colletotrichum tropicicola* | *Citrus maxima* | Tailândia | THA |
| AY266404 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Herbaceous* | Tailândia | THA |
| AY266369 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Herbaceous* | Tailândia | THA |
| JQ005206 | *Colletotrichum karstii* | *Anthurium* sp. | Tailândia | THA |
| JX010194 | *Colletotrichum asianum* | *Mangifera indica* | Tailândia | THA |
| JX010256 | *Colletotrichum siamense* | *Capsicum annuum* | Tailândia | THA |
| FR717706 | *Colletotrichum fructicola* | *Coffea arábica* | Tailândia | THA |

**(continua)**

**Tabela 2**. Espécies de *Colletotrichum* spp., isolados de diferentes localidades do mundo, procedentes do banco de dados do GenBank**.**

| Identificação GenBank | Espécie | Hospedeiro | Local | Sigla |
|---|---|---|---|---|
| DQ463367 | *Colletotrichum gloeosporioides* | Espécies Tropicais | Tailândia | THA |
| DQ463366 | *Colletotrichum gloeosporioides* | Espécies Tropicais | Tailândia | THA |
| JN007803 | *Colletotrichum fructicola* | Espécies Tropicais | Tailândia | THA |
| DQ463362 | *Colletotrichum acutatum* | Espécies Tropicais | Tailândia | THA |
| JN050239 | *Colletotrichum brevisporum* | *Pandanus pygmaeus* | Tailândia | THA |
| JN050238 | *Colletotrichum brevisporum* | *Neoregelia* sp. | Tailândia | THA |
| AF488777 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Hevea brasiliensis* | Tailândia | THA |
| FJ968590 | *C. gloeosporioides* | *Coffea* | Vietnã | VNM |
| AB704781 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Homo sapiens* | Vietnã | VNM |
| AB705152 | *Colletotrichum dematium* | *Homo sapiens* | Vietnã | VNM |
| FJ968605 | *Colletotrichum boninense* | *Coffea arábica* | Vietnã | VNM |
| FJ968604 | *Colletotrichum boninense* | *Coffea arábica* | Vietnã | VNM |
| FJ968602 | *Colletotrichum capsici* | *Coffea arábica* | Vietnã | VNM |
| FJ968597 | *Colletotrichum kahawae* | *Coffea arábica* | Vietnã | VNM |
| FJ968596 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Coffea arábica* | Vietnã | VNM |
| FJ968595 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Coffea arábica* | Vietnã | VNM |
| FJ968594 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Coffea arábica* | Vietnã | VNM |
| FJ968592 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Coffea arábica* | Vietnã | VNM |
| FJ968589 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Coffea arábica* | Vietnã | VNM |
| FJ968579 | *Colletotrichum capsici* | *Coffea arábica* | Vietnã | VNM |
| FJ968601 | *Colletotrichum acutatum* | *Coffea arábica* | Vietnã | VNM |
| FJ968598 | *Colletotrichum acutatum* | *Coffea arábica* | Vietnã | VNM |
| GU066671 | *C. gloeosporioides* | Talos | Malásia | MYS |
| JQ685746 | *Colletotrichum capsici* | *Brassica chinensis* | Malásia | MYS |
| JX971163 | *Colletotrichum truncatum* | Legumes | Malásia | MYS |
| JX971162 | *Colletotrichum truncatum* | Legumes | Malásia | MYS |
| JX669450 | *Colletotrichum gloeosporioides* | Soja | Malásia | MYS |
| JX669449 | *Colletotrichum gloeosporioides* | Soja | Malásia | MYS |
| JX669445 | *Colletotrichum gloeosporioides* | Soja | Malásia | MYS |
| JQ685749 | *Colletotrichum capsici* | Vegetais | Malásia | MYS |
| JX567509 | *Colletotrichum dematium* | Cowpea (Feijão) | Malásia | MYS |
| JX567508 | *Colletotrichum dematium* | Cowpea (Feijão) | Malásia | MYS |
| GU066699 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Carica papaya* | Malásia | MYS |
| GU066679 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Citrus aurantifolia* | Malásia | MYS |
| GU066676 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Citrus aurantifolia* | Malásia | MYS |
| GU066645 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Annona squamosa* | Malásia | MYS |
| JX402175 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Mangifera indica* | Malásia | MYS |
| JX902424 | *Colletotrichum cymbidiicola* | Orquídeas | Índia | IND |
| JX902423 | *Colletotrichum cymbidiicola* | Orquídeas | Índia | IND |
| HQ437664 | *Colletotrichum truncatum* | *Homo sapiens* | Índia | IND |
| HQ437663 | *Colletotrichum truncatum* | *Homo sapiens* | Índia | IND |
| EF025960 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *C. papaya* | Índia | IND |
| EF025955 | *Colletotrichum gloeosporioides* | Goiaba | Índia | IND |
| AB242419 | *Glomerella tucumanensis* | Várias | Índia | IND |
| AB242422 | *Glomerella tucumanensis* | Várias | Índia | IND |
| GU810509 | *Glomerella cingulata* | Várias | Índia | IND |

**(continua)**

**Tabela 2**. Espécies de *Colletotrichum* spp., isolados de diferentes localidades do mundo, procedentes do banco de dados do GenBank**.**

| Identificação GenBank | Espécie | Hospedeiro | Local | Sigla |
|---|---|---|---|---|
| GU222376 | *Glomerella cingulata* | Várias | Índia | IND |
| EF025968 | *Colletotrichum acutatum* | Uva | Índia | IND |
| EU672822 | *Colletotrichum graminicola* | Gramíneas | Índia | IND |
| JQ948289 | *Colletotrichum laticiphilum* | *Hevea* | Índia | IND |
| FJ025802 | *Colletotrichum acutatum* | *Capsicum* | Índia | IND |
| AF488778 | *Colletotrichum acutatum* | *Hevea* | Índia | IND |
| HQ330982 | *Colletotrichum acutatum* | *Capsicum* | Índia | IND |
| JN390867 | *C. sp* | Romã | Índia | IND |
| JN390876 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Capsicum* | Índia | IND |
| HQ264184 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Capsicum* | Índia | IND |
| JQ926743 | *Colletotrichum boninense* | Pimenta | China | CHN |
| EU622278 | *Colletotrichum lagenaria* | Varias | China | CHN |
| EU427042 | *Colletotrichum gloeosporioides* | Árvores | China | CHN |
| KC913201 | *Colletotrichum spaethianum* | *Peucedanum* | China | CHN |
| KF112044 | *Colletotrichum gloeosporioides* | Vários | China | CHN |
| KF112043 | *Colletotrichum gloeosporioides* | Vários | China | CHN |
| KC845290 | *Colletotrichum fructicola* | *Camellia sinensis* | China | CHN |
| EU781666 | *Colletotrichum capsici* | *Aquilaria sinensis* | China | CHN |
| KC845289 | *Colletotrichum crassipes* | Planta de chá | China | CHN |
| KC845288 | *Colletotrichum fructicola* | *Camellia sinensis* | China | CHN |
| KC845287 | *Colletotrichum fioriniae* | *Camellia sinensis* | China | CHN |
| KC845285 | *Colletotrichum siamense* | *Camellia sinensis* | China | CHN |
| EU294027 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Hevea* | China | CHN |
| JX546819 | *Colletotrichum lindemuthianum* | Feijão | China | CHN |
| JX546818 | *Colletotrichum lindemuthianum* | Feijão | China | CHN |
| JX546817 | *Colletotrichum lindemuthianum* | Feijão | China | CHN |
| JX546816 | *Colletotrichum lindemuthianum* | Feijão | China | CHN |
| KC816048 | *C. acutatum* | Manga | China | CHN |
| EU727318 | *Colletotrichum acutatum* | *Hevea brasiliensis* | China | CHN |
| EU727317 | *Colletotrichum acutatum* | *Hevea brasiliensis* | China | CHN |
| FJ972610 | *Colletotrichum acutatum* | *Carica papaya* | Austrália | AUS |
| FJ972601 | *Colletotrichum acutatum* | *Carica papaya* | Austrália | AUS |
| AB269945 | *C. acutatum* | | Austrália | AUS |
| FJ972609 | *Colletotrichum gloeosporioides* | *Citrus sinensis* | Itália | ITA |
| FJ972608 | *Colletotrichum kahawae* | *Coffea arábica* | Quênia | KEN |
| FJ972607 | *Colletotrichum kahawae* | *Coffea arábica* | Quênia | KEN |
| JX009426 | *Colletotrichum sp* | *Carica Papaya* | Nova Zelândia | NZL |
| FR717698 | *Colletotrichum fragariae* | *Coffea arábica* | Angola | AGO |

#### 4.2.6.4 Análises filogenéticas

Para a análise filogenética Bayesiana foi utilizado o programa MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001; Ronquist and Huelsenbeck, 2003) com 5 milhões de gerações, descartando os 20% iniciais no burning. Os nós com valores de

probabilidade a posteriori inferiores a 80% foram colapsados. A análise de Máxima Verossimilhança foi realizada pelo método de busca RAxML (Stamatakis, 2006) implementado no servidor online do CIPRES Sience Gateway (http://www.phylo.org) (Miller *et al*., 2010) Nessa análise foi utilizado o teste estatístico de Bootstrap (Felsenstein, 1985) com 1000 pseudoréplicas. Por último para todas as análises de Neighbour-Joining (NJ) foi utilizado o programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) com modelo de evolução nucleotídica de Tamura três parâmetros. Na análise de NJ da matriz total foi utilizado como teste estatístico de Bootstrap com 1000 pseudoréplicas. E os nós cujos valores de suporte estatísticos eram inferiores a 50% foram colapsados.

#### 4.2.6.5 Análise populacional e estatística

A construção das matrizes foi feita seguindo os mesmos passos do ponto 4.2.6.3. Dentro das análises foram tomadas as matrizes correspondentes aos grupos de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. Também foram excluídas sequências que apresentavam diferenças significativas quanto ao tamanho de bases, sendo que as sequencias resultantes foram editadas manualmente para padronizar o tamanho total das sequências. A presença de "gaps" foi considerada como polimorfismos de bases. As sequencias foram alinhadas e editadas pelo software BioEdit v.7.1.3.0. A análise de variância molecular (AMOVA), índices de diversidade gênica e nucleotídica e, os índices de fixação interpopulacional foram feitos no programa Arlequin v.3.5.1.2. Para a construção das redes de haplótipos foram empregados os programas DNAsp v.5.10.01 e Network v.4.6.1.1.

# 6 RESULTADOS

A identificação molecular mediante a utilização de *primers* específicos permitiu detectar 53 isolados para a espécie *C. acutatum* e 19 para *C. gloeosporioides*. Os outros 4 isolados de *C. acutatum* e 3 de *C. gloeosporioides* foram identificados por meio de comparações das sequências obtidas, com outras existentes no GenBank, uma vez que os *primer* específicos não terem sido suficientemente específicos para eles.

A partir dos isolados foram utilizadas 79 sequências, sendo 57 de *C. acutatum* e 22 de *C. gloeosporioides* coletadas em campo, além de 184 sequências obtidas a partir do GenBank, sendo 26 de *C. acutatum* e 65 de *C. gloeosporioides*, e o restante entre outras espécies do gênero *Colletotrichum*, assim o total de sequências trabalhadas foi de 263.

A partir do alinhamento e edição final obteve-se uma matriz com 742 caracteres, sendo 367 variáveis e destes 235 informativos para Máxima Parcimônia. A constituição nucleotídica dessa matriz é: Timina 23,7%, Citosina 28,1%, Adenina 23,4% e Guanina 24,8%. Os testes de saturação, pelo método gráfico, demonstraram que os dados não se encontram saturados, com valores de $R^2$ das transições igual a 0,94 e das transversões igual a 0,96. Da mesma forma, o teste de saturação pelos métodos estatísticos de Xia *et al*. (2003) demonstrou que os valores de ISS são menores do que os de ISSc o que indica que os dados são adequados para a realização da análises filogenéticas. O resultado da análise do Modeltest

indicou, pelo método de Akaike Information Criterion (AIC) e pelo de Hierarchical Likelihod Ratio Tests (hLRT), que o melhor modelo de evolução nucleotídica é o Tamura Nei+ I+Gama (TrN+I+G).

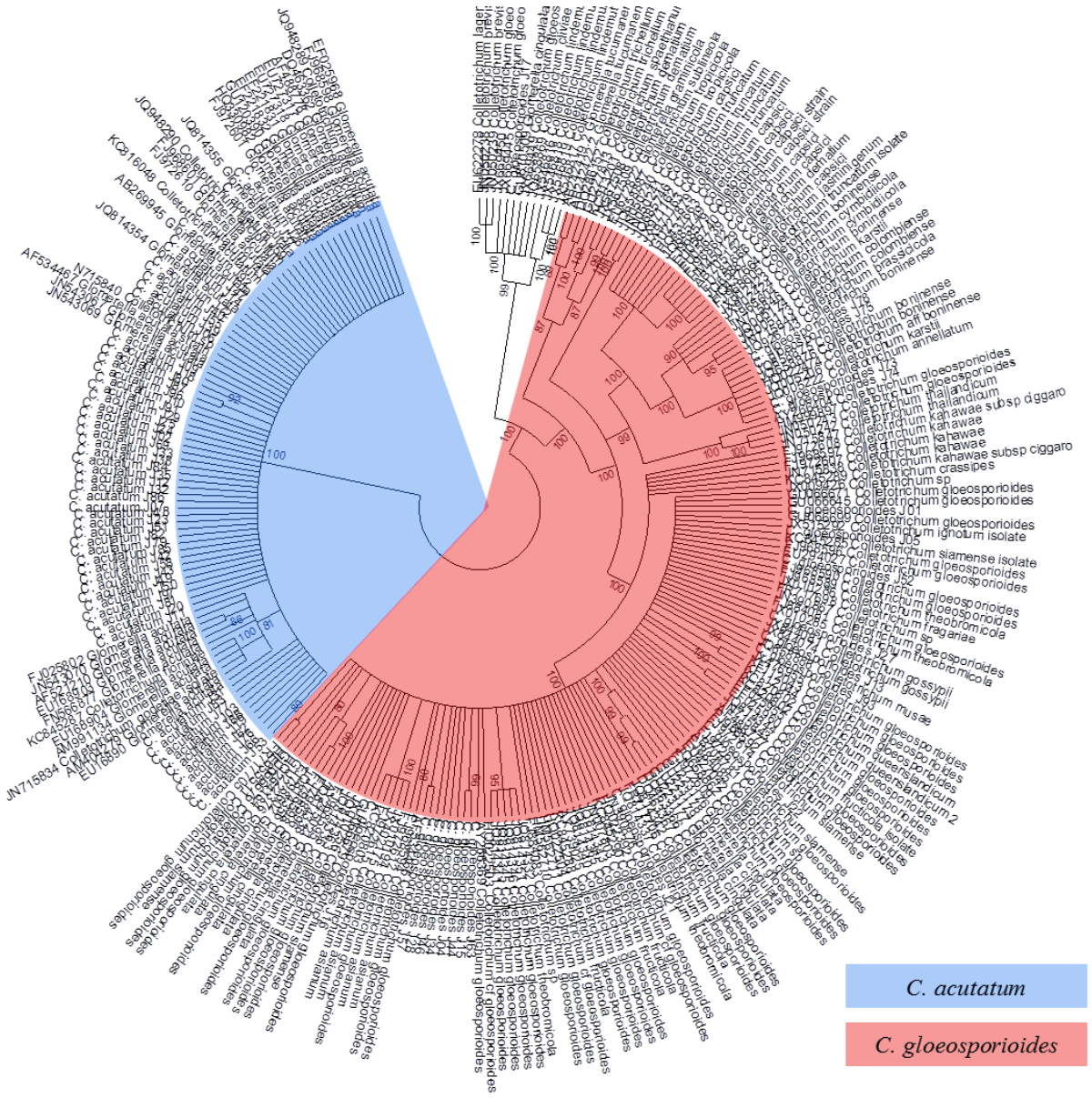


**Figura 3.** Árvore filogenética elaborada pelo método de Mister Bayer entre todas as amostras analisadas no presente trabalho: Números presentes nos nós representam os valores de probabilidade a *posteriori*. Os nós com valores inferiores do que 80% foram colapsados, e estão apresentados como politômicos.

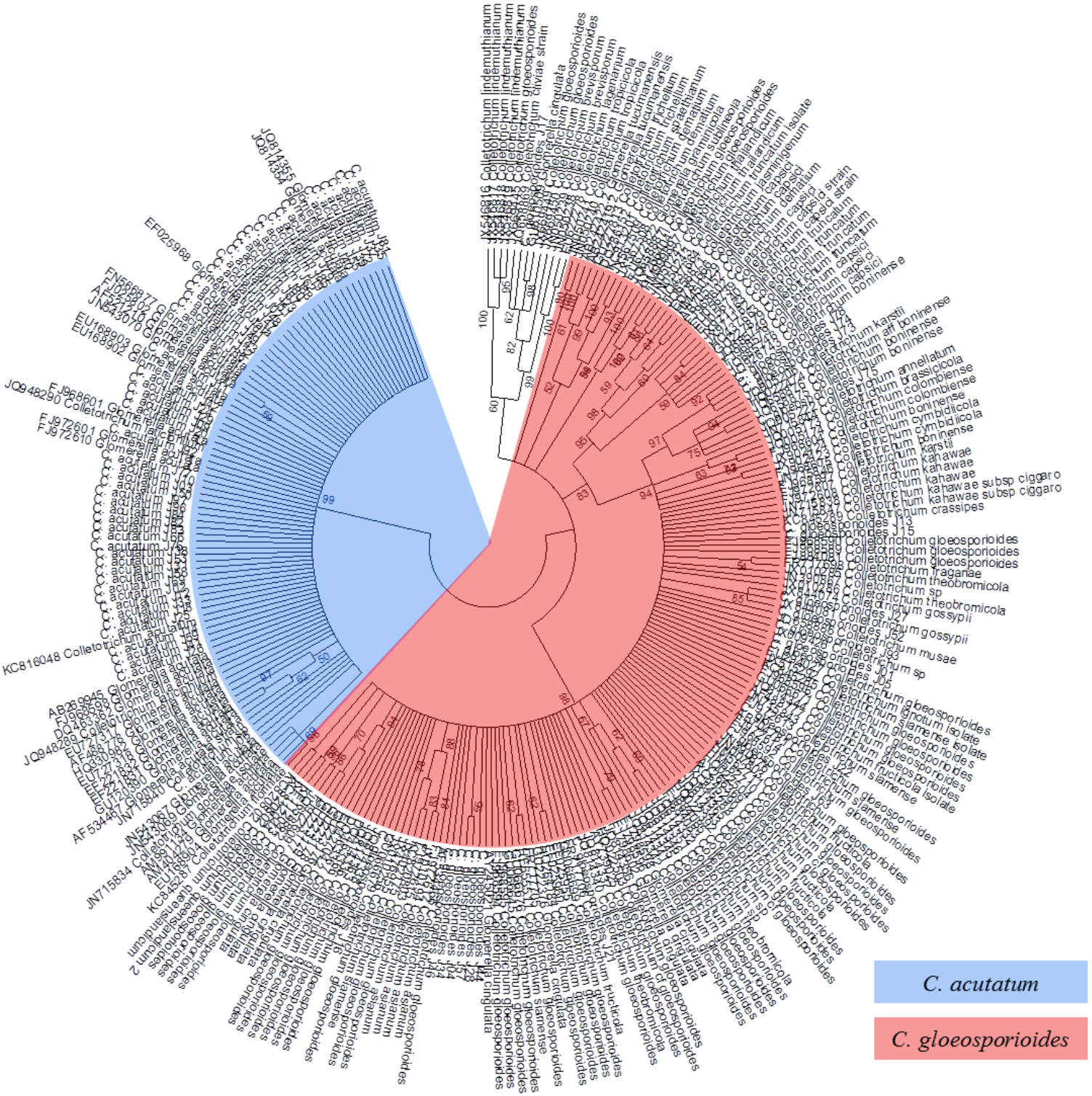


**Figura 4.** Árvore filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança entre todas as amostras analisadas no presente trabalho: números presentes nos nós representam os valores de bootstrap (1000 pseudo-réplicas). Os nós com valores inferiores do que 50% foram colapsados e estão representados como politômicos.

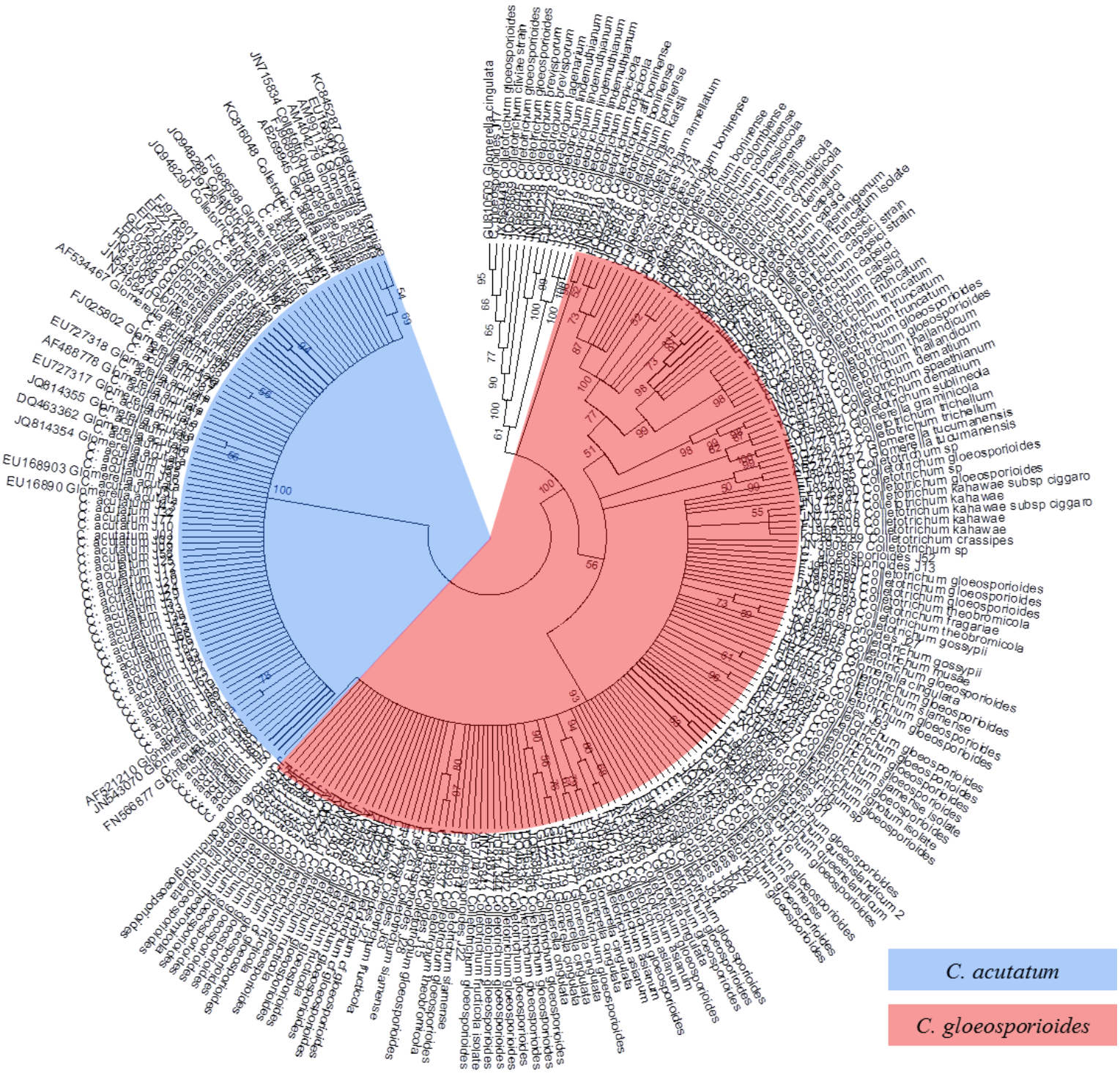


**Figura 5.** Árvore de distância genética pelo método de Neighbour-Joining entre todas as amostras obtidas com base em sequencias da região *ITS*, demonstrando a existência de linhagens dentro de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Números estão presentes nos nós com índice de bootstrap acima de 50%.

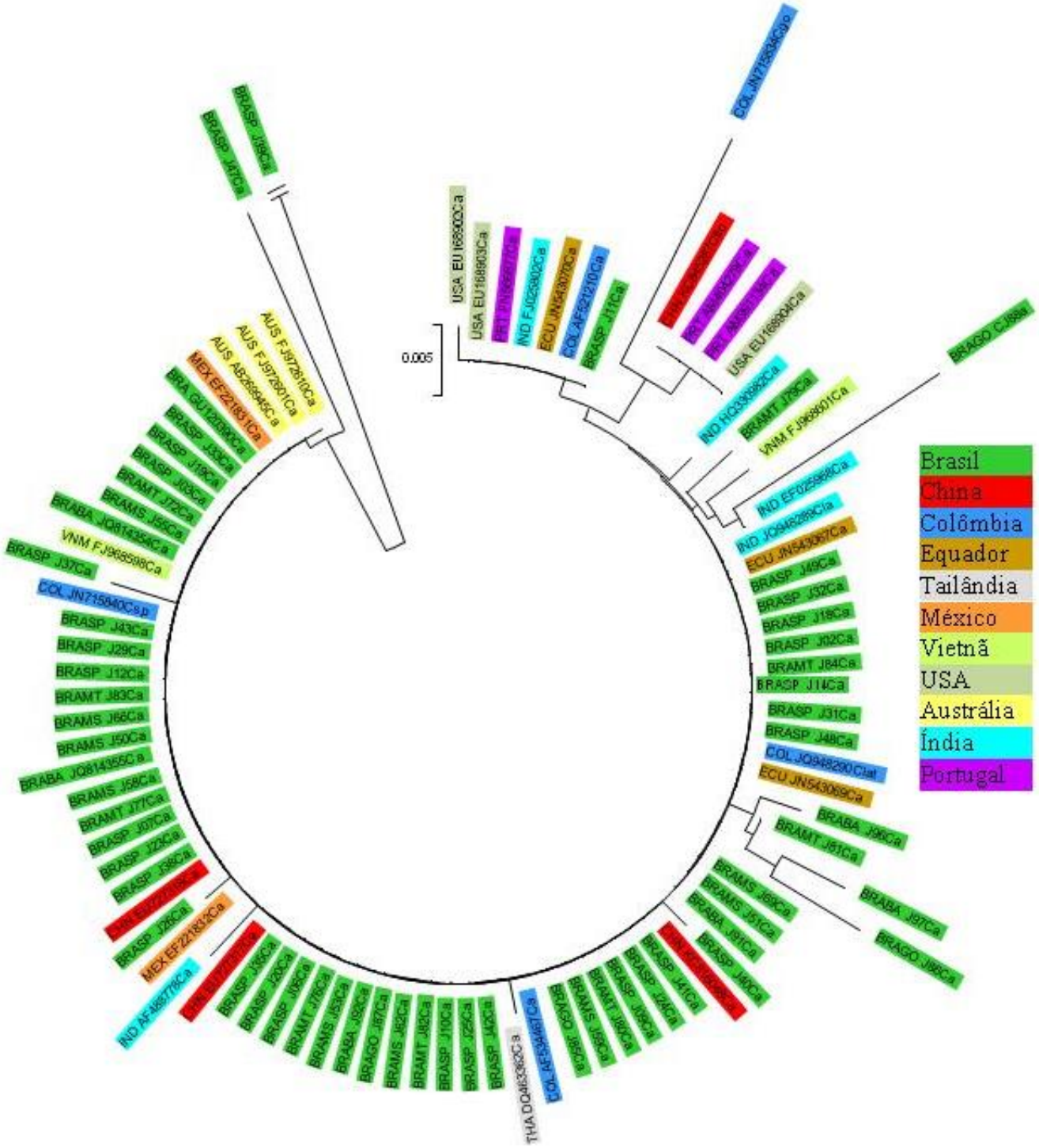


**Figura 6.** Árvore de distância genética pelo método de Neighbour-Joining entre amostras de *C. acutatum* com base em sequências do gene *ITS*, demonstrando a existência de linhagens dentro de *C. acutatum*. Escala representa 0,5% de divergência genética. Cores representam a procedência das amostras.

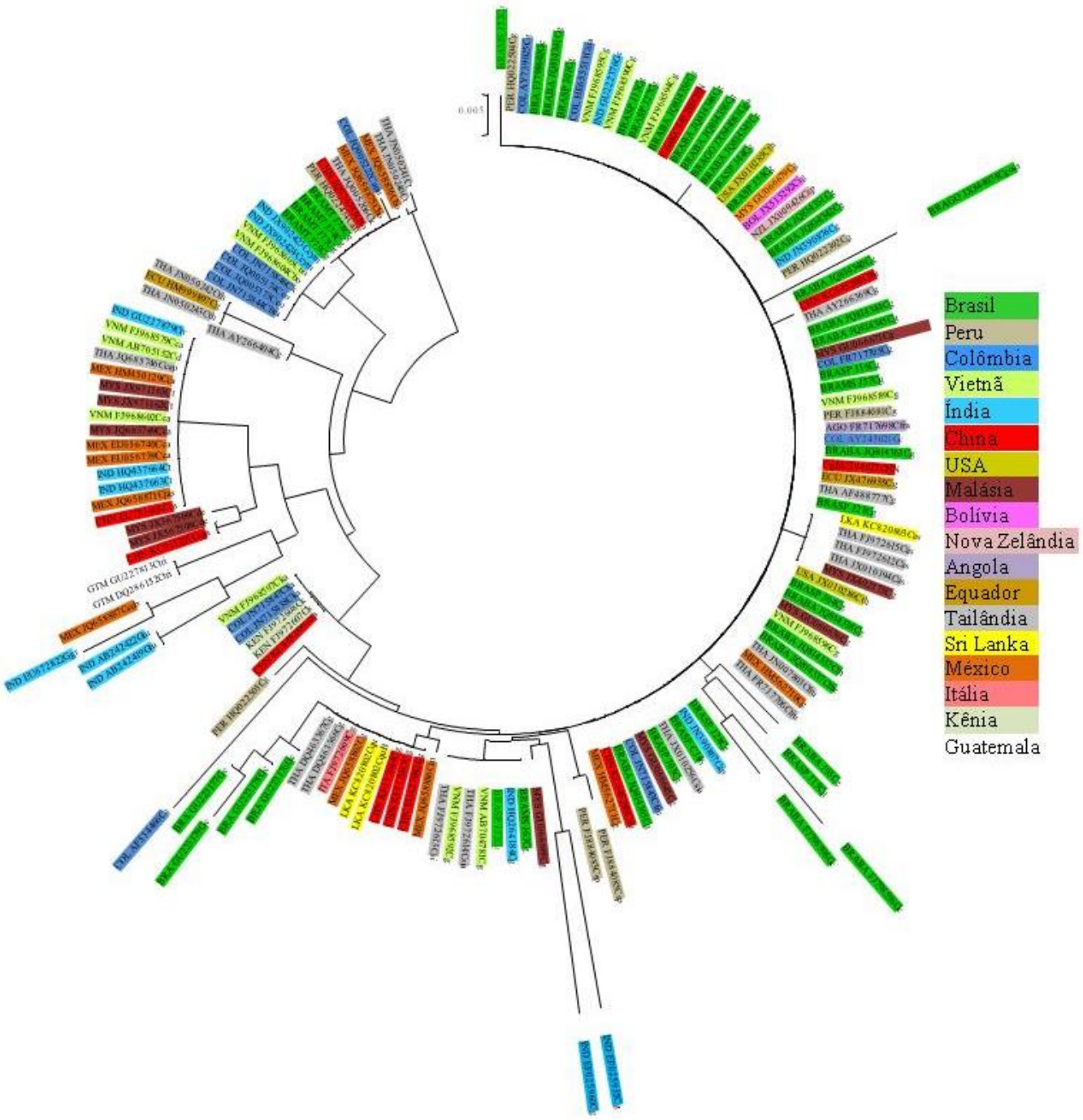


**Figura 7.** Árvore de distância genética pelo método de Neighbour-Joining entre amostras de *C. gloeosporioides* com base em sequências do gene *ITS*, demonstrando a existência de linhagens dentro de *C. gloeosporioides*. Escala representa 0,5% de divergência genética. Cores representam a procedência das amostras.

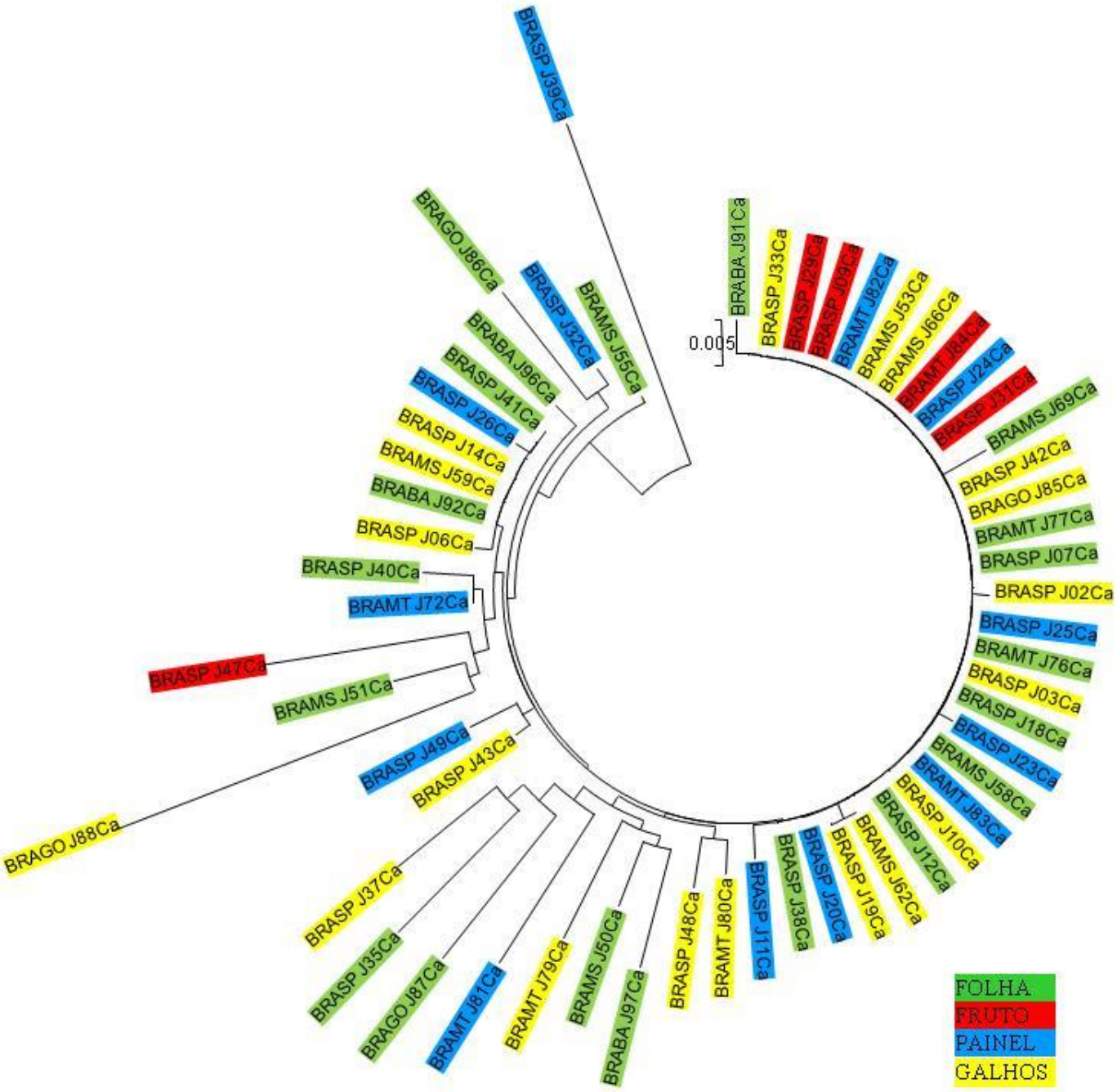


**Figura 8.** Árvore de distância genética pelo método de Neighbour-Joining entre amostras de *C. acutatum* com base em sequências do gene *ITS*, demonstrando a existência de linhagens dentro de *C. acutatum*. Escala representa 0,5% de divergência genética. Cores representam o tipo de tecido de onde foram retiradas as amostras.

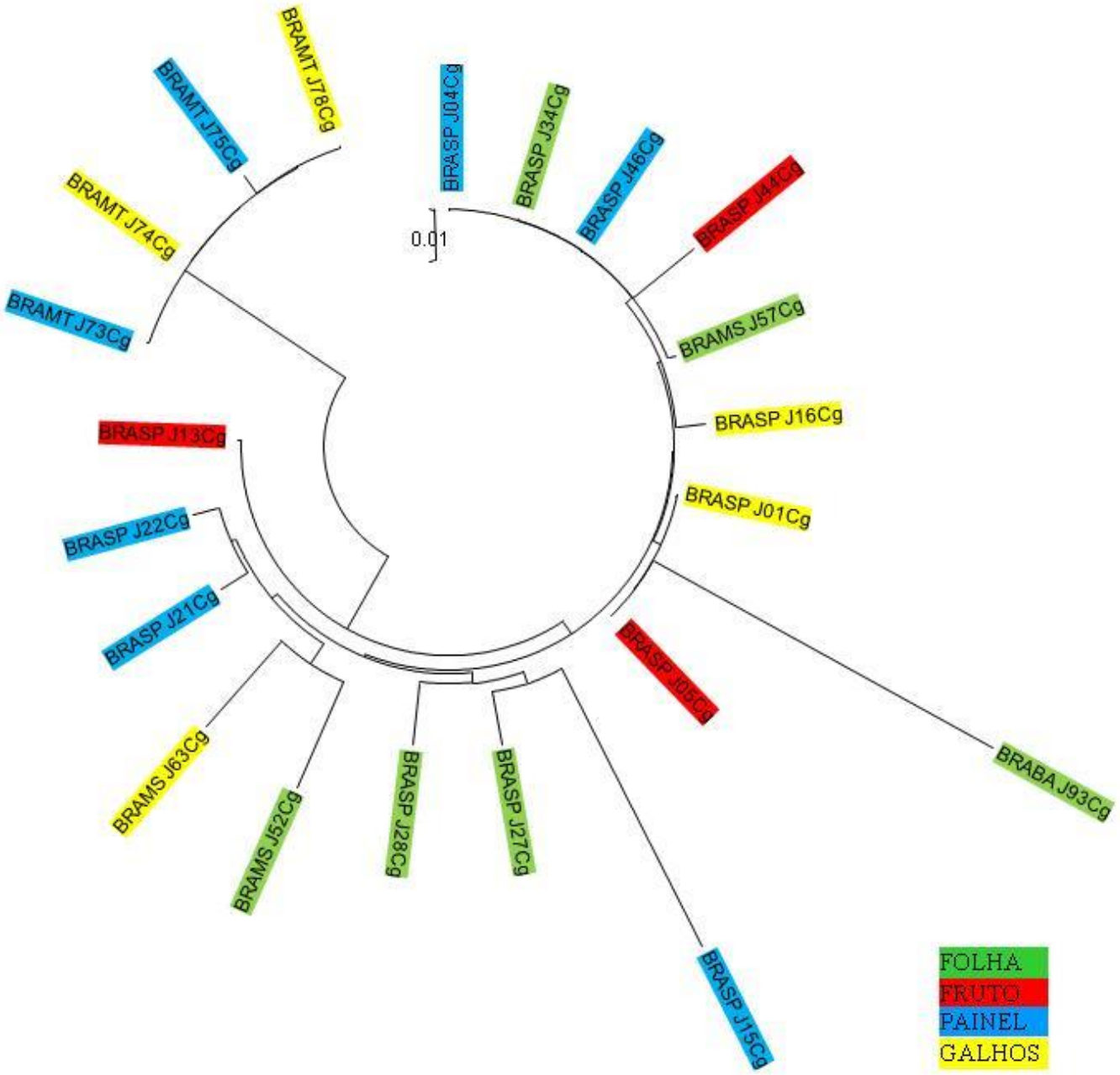


**Figura 9.** Árvore de distância genética pelo método de Neighbour-Joining entre amostras de *C. gloeosporioides* com base em sequências do gene *ITS*, demonstrando a existência de linhagens dentro de *C. gloeosporioides*. Escala representa 0,5% de divergência genética. Cores representam o tipo de tecido de onde foram retiradas as amostras.

Os grupos de indivíduos de *C. acutatum* provenientes das localidades Ásia, América Centro Norte e América do Sul revelam alta diversidade gênica (0,9455; 0,9000 e 0,8187 respectivamente) e diversidade nucleotídica (0,47866; 0,036735; 0,042303, respectivamente), indicativo de alta variabilidade genética nestes grupos (Tabela 3). Por outro lado, o grupo de indivíduos provenientes da Europa mostra uma média variabilidade genética e a Oceania com um nulo índice de diversidade genética.

**Tabela 3.** Diversidade Gênica (DG), Diversidade Nucleotídica (DN), Número de Haplótipos (NH) e Número amostral (NA).

| | **DG** | **DN** | **NH** | **NA** |
|---|---|---|---|---|
| **América do Sul** | 0,8187 +/- 0,0454 | 0,042303 +/- 0,023622 | 28 | 68 |
| **Ásia** | 0,9455 +/- 0,0659 | 0,047866 +/- 0,028640 | 9 | 11 |
| **Europa** | 0,6667 +/- 0,3143 | 0,020408 +/- 0,019241 | 2 | 3 |
| **América Centro Norte** | 0,9000 +/- 0,1610 | 0,036735 +/- 0,026119 | 4 | 5 |
| **Oceania** | 0,0000 +/- 0,0000 | 0,000000 +/- 0,000000 | 1 | 3 |

Pela análise da Tabela 3 e da Figura 10, é possível verificar a heterogeneidade da distribuição dos 44 haplótipos dentro dos cinco grupos. O da América do Sul foi o que apresentou a maior quantidade de haplótipos (NH=28), enquanto que os grupos Oceania e Europa foram os que apresentaram menor quantidade de haplótipos (NH = 1 e 2, respectivamente).

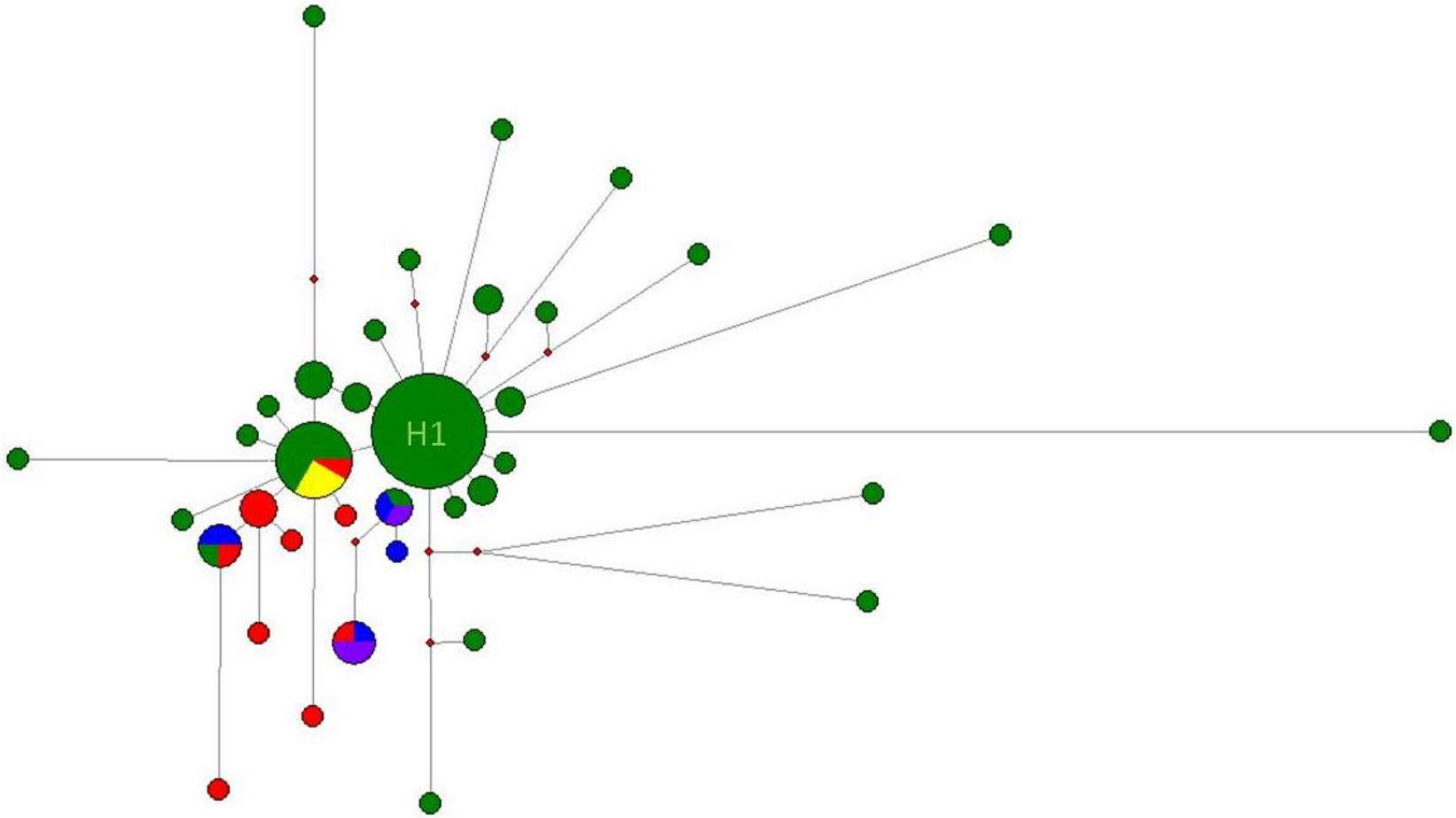


**Figura 10.** Rede de haplótipos de *C. acutatum* calculada pelo método Median-Joining. Os círculos coloridos representam as localidades, junto aos haplótipos encontrados no presente estudo. O tamanho do círculo é proporcional à quantidade de indivíduos que compartilham o mesmo haplótipo. Verde = América do Sul; Vermelho = Ásia; Roxo = Europa; Azul = América Centro Norte; Amarelo = Oceania.

A análise de variância molecular (AMOVA) entre todos os cinco grupos de amostras revelou um valor do índice de fixação interpopulacional moderado (FST = 0,0505), indicando uma média estruturação genética entre os componentes dos diferentes grupos (Tabela 4).

**Tabela 4.** Análise de variância molecular (AMOVA) e FST, utilizando marcador *ITS* entre o grupo de *C. acutatum*. *P < 0,05.

| População | Fonte de variação | Soma dos quadrados | Componentes de variação | % de variação | FST |
|---|---|---|---|---|---|
| Grupos | **Entre os grupos** | 4,715 | -0,38519 | -18,04 | 0,05505* |
| | **Entre indivíduos dentro de grupos** | 16,114 | 0,50275 | 23,54 | |
| | **Dentro de grupos** | 171,537 | 2,01808 | 94,50 | |
| | **Total** | 1482,763 | 5,48480 | | |

Quando comparados estes mesmos índices par a par (Tabela 5), nota-se que para a maioria das comparações entre os grupos há indicações da existência de baixo, médio e alto nível de estruturação genética populacional, exceto para a comparação entre os grupos América do Sul – Ásia e Ásia – Europa (FST = 0,00000).

**Tabela 5.** Índices de Fixação Interpopulacional (FST) par a par, entre os grupos de *C. acutatum*. *P < 0.05.

| | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,00000 | * | * | - | - |
| 2 | 0,00000+-0,0000 | 0,00000 | * | - | - |
| 3 | 0,04505+-0,0244 | 0,00000+-0.0000 | 0.00000 | - | - |
| 4 | 0,23423+-0,0278 | 0,12613+-0,0388 | 0,47748+-0,0718 | 0,00000 | - |
| 5 | 0,29730+-0,0385 | 0,64865+-0,0446 | 0,09910+-0,0286 | 0,18018+-0,0271 | 0,00000 |

1 = América do Sul; 2 = Ásia; 3 = Europa; 4 = América Centro Norte; 5 = Oceania

Os grupos de indivíduos de *C. gloeosporioides* provenientes das localidades Ásia, América do Sul e América Centro Norte revelam alta diversidade gênica (0,9227; 0,8932; 0,8736 respectivamente) e diversidade nucleotídica (0,100270; 0,076364; 0,105547, respectivamente), indicativo de alta variabilidade genética nestes grupos (Tabela 6). Por outro lado, o grupo da África mostra uma média variabilidade genética, a Europa e a Oceania com um nulo índice de diversidade genética.

**Tabela 6.** Diversidade Gênica (DG), Diversidade Nucleotídica (DN), Número de Haplótipos (NH) e Número amostral (NA).

| | **DG** | **DN** | **NH** | **NA** |
|---|---|---|---|---|
| **Europa** | 0,0000 +/- 0,0000 | 0,000000 +/- 0,000000 | 1 | 2 |
| **Oceania** | 0,0000 +/- 0,0000 | 0,000000 +/- 0,000000 | 1 | 2 |
| **África** | 0,6667 +/- 0,2041 | 0,017391 +/- 0,014589 | 2 | 4 |
| **América do Sul** | 0,8932 +/- 0,0201 | 0,076364 +/- 0,039305 | 27 | 112 |
| **América Centro Norte** | 0,8736 +/- 0,0310 | 0,105547 +/- 0,054607 | 8 | 30 |
| **Ásia** | 0,9227 +/- 0,0111 | 0,100270 +/- 0,050646 | 25 | 128 |

Pela análise da Tabela 6 e da Figura 11 é possível verificar a heterogeneidade da distribuição dos 64 haplótipos dentro dos seis grupos. O da América do Sul foi o que apresentou a maior quantidade de haplótipos (NH=27), enquanto que os grupos Oceania e Europa foram os que apresentaram menor quantidade de haplótipos (NH=1).

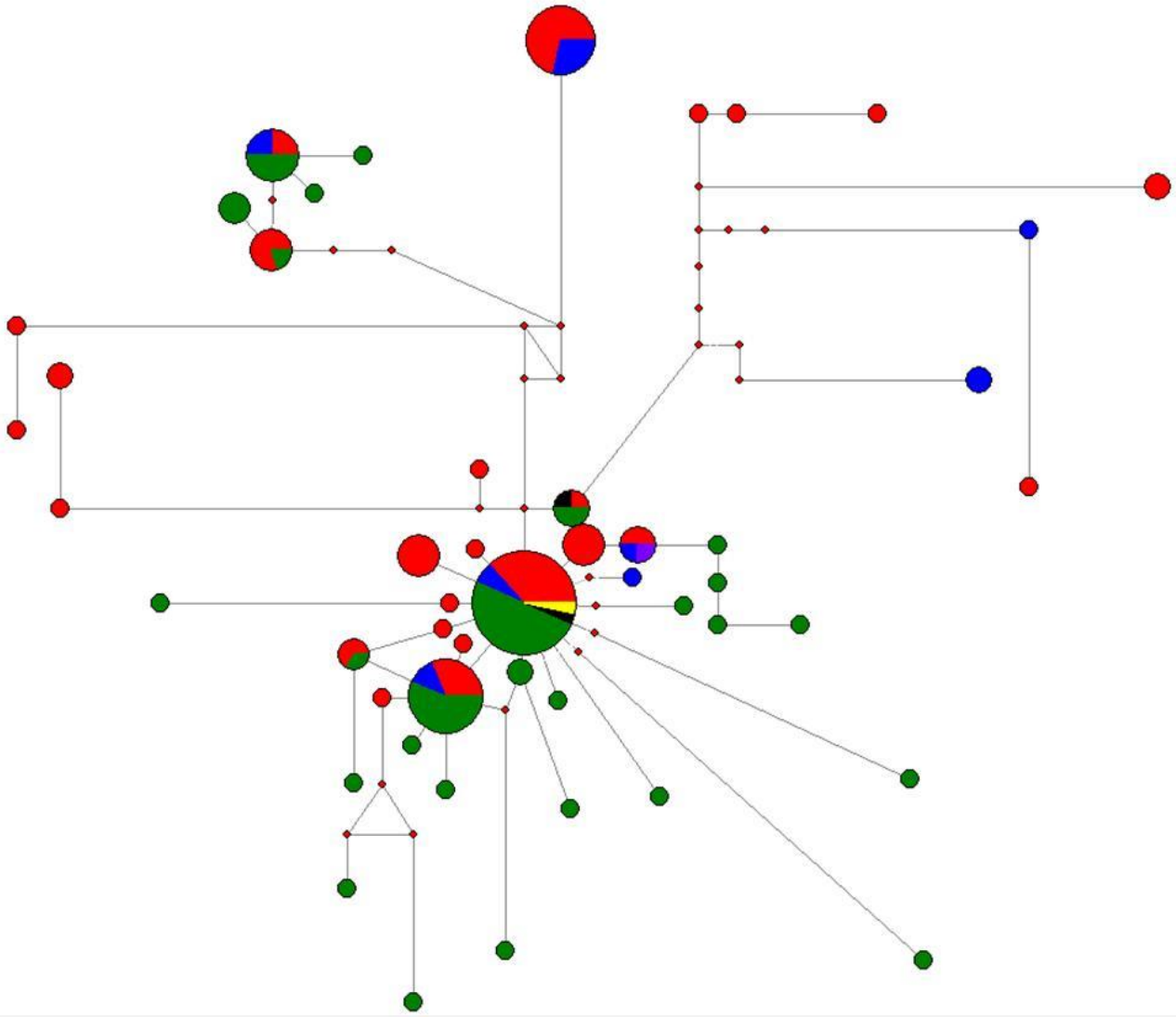

**Figura 11.** Rede de haplótipos de *C. gloeosporioides* calculada pelo método Median-Joining. Os círculos coloridos representam as localidades, junto aos haplótipos encontrados no presente estudo. O tamanho do círculo é proporcional à quantidade de indivíduos que compartilham o mesmo haplótipo. Verde = América do Sul; Vermelho = Ásia; Roxo = Europa; Azul = América Centro Norte; Amarelo = Oceania; Preto = África.

A análise de variância molecular (AMOVA) entre todos os cinco grupos de amostras revelou um valor do índice de fixação interpopulacional moderado (FST = 0,06251), indicando uma media estruturação genética entre os componentes dos diferentes grupos (Tabela 7).

**Tabela 7.** Análise de variância molecular (AMOVA) e FST, utilizando marcador *ITS* entre o grupo de *C. gloeosporioides*. *P < 0.05.

| População | Fonte de variação | Soma dos quadrados | Componentes de variação | % de variação | FST |
|---|---|---|---|---|---|
| Grupos | **Entre os grupos** | 82.151 | 1.91383 | 34.89 | 0.06251* |
| | **Entre indivíduos dentro de grupos** | 2.000 | -1.57098 | -28.64 | |
| | **Dentro de grupos** | 1398.612 | 5.14195 | 93.75 | |
| | **Total** | 1482.763 | 5.48480 | | |

Quando comparados estes mesmos índices par a par (Tabela 8), nota-se que para a maioria das comparações entre os grupos há indicações da existência de baixo, médio e alto nível de estruturação genética populacional.

**Tabela 8.** Índices de Fixação Interpopulacional (FST) par a par, entre os grupos de *C. gloeosporioides*. *P < 0.05.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 0.00000 | - | - | - | - | - |
| **2** | 1.00000 | 0.00000 | - | - | - | - |
| **3** | 0.59322 | 0.11111 | 0.00000 | - | - | - |
| **4** | -0.09607 | -0.21644 | -0.02135 | 0.00000 | * | * |
| **5** | 0.08365 | 0.05916 | 0.13181 | 0.15814 | 0.00000 | * |
| **6** | -0.01811 | -0.08930 | 0.01974 | 0.06073 | 0.02668 | 0.00000 |

1 = Europa; 2 = Oceania; 3 = África; 4 = América do Sul; 5 = América Centro Norte; 6 = Ásia

# 7 DISCUSSÃO

Em países como: Brasil, Malásia, Tailândia, Indonésia e Índia, além de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, foi encontrado *Oidium heveae* causador da queda secundária das folhas "Secondary Leaf Fall", atingindo as folhas novas em desenvolvimento as quais são altamente suscetíveis ao ataque do fungo.

Nas Figuras 3, 4 e 5 podemos observar como os três tipos de análises, ainda sendo diferentes, resgatam topologia bastante semelhante, separando as amostras em dois grandes grupos, com composições idênticas, permitindo a nítida distinção dos grupos de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, semelhante aos resultados encontrados em outros trabalhos de genética com *Colletotrichum* (Jayasinghe, 1997; Damm, 2012; Weir, 2012; Ribeiro, 2009).

As amostras do ramo menos derivado foram retiradas da análise sobrando dois grupos identificados como *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. Um total de 13 sequências, foram removidas das análises subsequentes, das quais 12 foram selecionadas do GenBank e uma amostra J17 coletada em campo, a qual apresentava um tamanho menor em comparação com as outras, e muitos "gaps". As 12 amostras do GenBank possivelmente podiam estar mal sequenciadas ou mal identificadas.

As análises filogenéticas também nos permitiram observar que as sequências selecionadas como espécies diferentes no GenBank, apresentaram problemas falsos de identificação, já que elas foram colocadas dentro dos dois grandes grupos.

Dentro das análises filogenéticas vemos que a divergência máxima entre os haplótipos de *C. gloeosporioides* é muito maior do que a existente dentro de *C. acutatum*. Isto pode nos indicar que controle para *C. gloeosporioides* pode ser bem mais difícil, devido a essa grande variabilidade genética, tal como observado por Freeman (2000).

Nas análises populacionais, como ilustrado nas Figuras 6 e 10, observa-se que *C. acutatum* possui muitos haplótipos bastantes distribuídos pelo mundo. Por outro lado, na América do Sul, possui vários exclusivos, incluindo o haplótipo mais frequente encontrado dentre as amostras analisadas da espécie.

Duas hipóteses principais podem explicar esse cenário, além do porquê um haplótipo tão frequente na América do Sul é exclusivo dessa região. Uma primeira hipótese é que haplótipo H1 poderia ter surgindo no Brasil e não ter sido exportado para o resto do mundo. A segunda hipótese seria que esse haplótipo ter sido produzido no Brasil e não se adaptado ao resto do mundo. Acredita-se que a segunda hipótese dois seja mais plausível, uma vez que, embora o Brasil não seja grande exportador de borracha como os países do sudeste asiático. O Brasil é um grande exportador de muitos outros cultivares nos quais também poderiam ser levados fungos portadores desse haplótipo, sugerindo que o mesmo possa ter sido exportado com outros cultivares e não se adaptado à condições de outros continentes. Essas linhagens mostram que a maior diversidade encontrada no Brasil, resultam da alta amostragem realizada nessa região.

Tais informações são extremadamente importantes, pois a identificação de linhagens adaptadas à determinada região ambiental, pode dar referência de como podem ser realizados controles eficientes nas linhagens que são bastante frequentes na América do Sul. Pensando em medidas de controle adotadas em outras regiões do mundo, poderíamos desenvolver mecanismos mais eficientes no controle do fungo no Brasil.

O segundo haplótipo mais frequente de *C. acutatum* está presente na Oceania, na América do Sul e na Ásia. Possivelmente esse haplótipo esteja presente em uma linhagem mais generalista, que consegue se adaptar em qualquer uma dessas três condições ambientais.

Em *C. gloeosporioides* existem algumas semelhanças com *C. acutatum*, principalmente quanto à existência de um haplótipo com uma frequência muita mais elevada. Por outro lado esse haplótipo não é exclusivo da América como no caso do *C.*

*acutatum*. Esse haplótipo bastante frequente em *C. gloeosporioides* está amplamente distribuído, em todas as regiões analisadas (Weir, 2012).

Esse haplótipo tão frequente e distribuído no mundo pode ser indicio de seleção de uma linhagem resistente a tratamentos de controle. O que pode nos levar a necessidade nas mudanças de métodos de controle diferentes dos atuais. Isso mostra indícios desse haplótipo pertencer a uma região específica exportadora de linhagens altamente adaptáveis ao meio.

Essa troca de haplótipos entre as regiões geográficas, que em geral são bastante altas, e estão bem distribuídas no mundo, pode ser consequência de toda essa troca de cultivares entre as regiões produtoras de seringueira. Um fato disso é que alguns haplótipos de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* estão presentes em diversos países heveícolas do mundo, e com uma frequência bastante elevada. É o caso da Colômbia e Brasil que tem apresentado nos últimos anos (2009, 2010, 2011, 2012, e 2013) ataques severos de antracnoses das folhas em todos seus cultivares.

Na Figura 8 e 9, pudemos observar dentro da análise referente aos tecidos que não existem linhagens de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* exclusivas para cada tecido vegetal específico. O que quer dizer que linhagens que estão presentes em folha, podem estar presentes em fruto, ramos e painel de sangria e vise versa. Isto reforça as conclusões por Sierra & Furtado (2010), onde foram realizados testes de patogenicidade, com isolados coletados de diferentes tecidos da planta (Painel, folha, fruto e ramos) e que levou a infecção dos tecidos sem se importar com a especificidade.

Sierra & Furtado (2010), relataram que existe uma população alta de *C. acutatum* dentro das amostras coletadas em campo em comparação com *C. gloeosporioides* que sempre é encontrado em baixa quantidade nos tecidos coletados. Isto não significa que as linhagens de *C. gloeosporioides* sejam menos patogênicas. Pelo contrário, o estudo permitiu observar a alta agressividade das linhagens de *C. gloeosporioides* frente a *C. acutatum*.

Nas Figuras 10 e 11, podemos observar também como algumas linhagens são bem independentes das outras. Tendo claro que o tamanho da amostra ainda é muito pequeno para um diagnóstico profundo, mas que permite ter ideia do que se trata. Na rede de haplótipos da Figura 11 é possível detectar a tendência de formação de agrupamentos,

sendo clara constatar a separação de três grandes grupos: América do Sul (verde), América Centro Norte (Azul) e Ásia (vermelho).

Os outros dois grupos de menor representatividade são Oceania (amarelo) e África (preto). Para esses dois grupos se fazem necessário mais sequências para a construção de uma rede mais fidedigna e consistente.

Na Tabela 6, nota-se que os grupos da Ásia e América do Sul, são aqueles com melhores índices de variabilidade genética, embora não necessariamente os grupos com maior diversidade nucleotídica. Isto pode ser explicado talvez, pelo reduzido número de amostras dos outros grupos, impossibilitaram detectar a presença de mais haplótipos por uma simples falha de amostragem. Isto pode ser verificado pela presença de vários haplótipos hipotéticos presentes nas redes.

Na Tabela 7, nota-se que a maior fonte de variação genética está contida dentro dos grupos (93,75%). Com base nessa informação, juntamente com o FST global (0,06251) estatisticamente significativo ao nível de 1% de significância, é possível sugerirmos que a maior parte da variação genética detectada está contida dentro de cada grupo e não entre eles.

Para saber se estes valores correspondem a grupos estruturados geneticamente ou não, Wright (1978) propôs uma escala que determinava qualitativamente as comparações par a par: 0,05 pequena diferenciação genética; 0,05 - 0,15 moderada diferenciação; 0,15 - 0,25 grande diferenciação; acima de 0,25 diferenciação muito elevada.

Agrupamentos e diferenciação de espécies vêm sendo estudados em relação a *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. O que tem permitido visualizar dentro de análises filogenéticos conceitos e resultados contundentes, resultando assim raças e complexos importantes para o estudo de linhagens dentro e fora de *Colletotrichum* (Damm, 2012; Freeman, 2000; Weir, 2012).

# 8 CONCLUSÕES

- ✓ Análises filogenéticas e estudo populacional revelam a confiabilidade dos resultados, mostrando que é possível visualizar grupos de haplótipos distintos dentro de espécies;
- ✓ O haplótipo H1 de *C. acutatum* é uma linhagem aparentemente exclusiva da região americana, o que pode revelar origem e dispersão dos haplótipos. Esse Haplótipo é importante, já que para métodos de diagnose se converte em uma ferramenta importante para o controle da antracnose nas áreas produtoras de seringueira;
- ✓ A rede de haplótipos permite a visualização dos haplótipos em grupos e sua dispersão genética nas localidades;
- ✓ A análise de rede de haplótipos de tecidos não foi estatisticamente significativa, pelo número de amostras serem insuficientes;
- ✓ Dentro do trabalho podemos observar como existe uma alta variabilidade genética e diversidade espalhada por todo o mundo;
- ✓ Trabalhos futuros se fazem necessários para avaliar outras possíveis regiões que permitam um estudo mais aprofundado, caracterizar e agrupar novas linhagens dentro de grupos de haplótipos distintos.

# 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


ALVARENGA, A. A.; CARMO, C. A. F. **Seringueira**. Viçosa: **Epamig**, 2008. 894p.

BUENO, C. R. N. C. **Identificação e caracterização das espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose em hortaliças solanáceas**. 2005. 61 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

CANNON, P. F.; BRIDGE, P. D.; MONTE, E. Linking the past, present, and future of Colletotrichum Systematics. In: Prusky, D.; Freeman, S; DICKMAN, M. B. ***Colletotrichum*: Host Specificity, Pathology and Host–Pathogen Interaction**. St. Paul. APS Press. 2000. pp.1–19.

CARPENTER, J. B.; STEVENSON, J. A. A secondary leaf spot of the Hevea rubber tree caused by *Glomerella cingulate*. **Plant Disease Reporter**, v. 38, n. 7, p. 494-499, 1954.

DAMM, U. et al. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**. 2012. V. 73, p. 37 – 113.

DANTAS GPM. **Biologia Reprodutiva, Estrutura Populacional e Variabilidade Genética de *Larus dominicanus***. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo, São Paulo. 2007. 120 pp.

DAVIS, W. **El rio**. Colômbia**: El Áncora Editores**, 2005. p. 353-393.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 1, n. 1, p. 19-21, 1983.

EDGAR, R. C. Muscle: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics**. 2004. 5, 1–19.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**. 1985. 39, 783–791.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal**: **principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa, MG: p.570, 1989.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, v. 82, p. 596-605, 1998.

FREEMAN, S. et al. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 6, p. 608-614, 2000.

FREEMAN, S. et al. Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum* sensu Simmonds. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, n. 6, p. 586-592, 2001.

FURTADO, E. L.; SILVEIRA, A. P. Doenças do painel de sangria da seringueira. In: BERNARDES, M. S. **Sangria da seringueira.** ESALQ/USP: FEALQ, Piracicaba, 1991. p. 111-125.

FURTADO, E. L.; SILVEIRA, A. P. 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, 1992. p. 52-64.

FURTADO, E. L.; TRINIDADE, D. R. Doenças da seringueira. In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 559-569.

FUTUYMA, D. J. Biologia Evolutiva. 2ª ed. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto. 1997. 646 p.

GASPAROTTO, L. *et al*. **Doenças da seringueira no Brasil**. Brasília, DF: EMBRAPA, SPI; EMBRAPA, CPAA, 1997. 168 p.

GASPAROTTO, L. et. al. Doenças das Folhas. In: GASPAROTTO, L; REZENDE PEREIRA, J.C. **Doenças da seringueira no Brasil.** 2. ed. rev. atual. Brasília, DF: Editora Embrapa, 2012. cap. 3, p. 35 – 176.

GASPAROTTO, L.; RODRIGUES, T. D.; MARTINS, H. **Doenças da seringueira**. Manaus: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Seringueira e Dendê, 1984. p. 24-34.

GASPAROTTO, L.; TRINDADE, D. R.; SILVA, H. M. **Doenças da seringueira**. Manaus: Embrapa/CNPSD, 1984. 71 p. (CNPSDS. Circular Técnica, 4).

GENOVART, ML.; ORO, D.; BONHOMME, F. Genetic and morphological differentiation between two largest breeding colonies of audouin's gull larus audouinii. **Ibis**. 2003. 145:448–456.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Oxford University Press.** Nucleic Acids Symposium. Ser. 41. 1999. p. 95–98.

HILSDORF, A.W.; PETRERE JR, M. **Conservação de Peixes na Bacia do Rio Paraíba do Sul**. Ciência Hoje. 2002. 30:62–67.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Oxford University Press.** Bioinformatics. 2001. 17, 754–755.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/: Acesso em: 30/11/2013.

IRSG. International Rubber Study Group. Disponível em: http://www.rubberstudy.com: Acesso em: 25/11/2013.

JAYASINGHE, C. K.; FERNANDO, T. H. P. S; PRIYANKA, U. M. S. *Colletotrichum acutatum* is the main cause of *Colletotrichum* leaf disease of rubber in Sri Lanka. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 137, p. 53-56, 1997.

JOHN, K. P. A hitherto undescribed leaf disease of hevea rubber caused by a species of *Colletotrichum*. **J. Rubber Res.** Inst. Malaya, Kuala Lumpur, v. 14, p. 11-19, 1952.

LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Revisão Anual de Patologia de Planta,** Passo Fundo, v. 9, p. 291-337, 2001.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. Ecological Genetics: Design, Analysis and Application. **Blackwell Publishing**, Malden. 2004. 326 pp.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum.* **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, p. 23-24, 2002.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees. In Gateway Computing Environments Workshop (GCE). 2010.

MILLS, P. R.; HODSON, A.; BROWN, A. E. 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, p. 269-288. 1992a.

MILLS, P. R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 98. n. 1/3, p. 137-144, 1992b.

PEREZ-SWEENEY, BM.; RODRIGUES, FP.; MELNICK, DJ. Metodologias Moleculares Utilizadas em Genética da Conservação. In: Cullen LJ, Rudran R e Valadares-Padua C (Orgs.) **Métodos de Estudos em Biologia da Conservação e Manejo da Vida Silvestre**. Ed. UFPR, Curitiba. 2003. 343-380 pp.

PETCH, T. Description of new Ceylon fungi. **Annual report of botanical gardens**, Peradeniya, 3: 1-10, 1906.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Oxford University Press**. Bioinformatics. 1998. 14, 817–818.

REIS, D. M. L. **Doenças de plantas no trópico úmido Brasileiro**. Belém: EMBRAPA, 1999.

RIBEIRO, D. C. et al. Comparação das técnicas de PCR-RFLP e sequenciamento de região ITS-rDNA para análise filogenética de isolados de *Colletotrichum* spp. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. 2009. v.8, n.1,p. 43-52.

ROBERTS, P.D.; PERNEZNY, K. L.; KUCHAREK, T. Anthracnose on pepper in Florida1. **University of Florida**, PP-178, 2012.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Oxford University Press**. Bioinformatics. 2003. 19, 1572–1574.

RUBIN, CS. et al. Population Structure of Blanding's Turtles (Emydoidea blandingü) in a Urban Landscape. **Biol. Conserv**. 2001. 99:323 – 330.

SAHA, T. et al. Identification of *Colletotrichum acutatum* from rubber using random amplified polymorphic DNAs and ribosomal DNA polymorphisms. **Mycol. Res**. Kerala, India, v. 106, n. 20, p. 215-221, 2002.

SIERRA HAYER, J.F; FURTADO, E.L. **CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE *Colletotrichum* spp. EM SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis*).** 2010. 68 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

SILVEIRA, A. P.; CARDOSO, R.M.G. Ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* em seringueira (*Hevea brasiliensis*) no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 13, n1-2, p. 19, 1987. Resumo.

SILVEIRA, A. P.; FURTADO, E.L; LOPES, M. E. B. M. Antracnose: nova doença do painel de sangria da seringueira. São Paulo: **Instituto Biológico**, v. 18, p. 196-200, 1992a.

SILVEIRA, A. P.; FURTADO, E. L; LOPES, M. E. B. M. **Antracnose da seringueira no Estado de São Paulo**. CAMPINAS: Instituto Biológico, 1992b. 3 p (Comunicativo técnico, 1).

SILVEIRA, A. P.; FURTADO, E. L.; LOPES, M. E. B. M. Antracnose: nova doença do painel de sangria da seringueira. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 18, p. 196-200, 1992.

SLATKIN M.; BARTON, HH. A comparision of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. **Evolution.** 1989. 43:1349-1368.

SMITH, B. J.; BLACK, L. L. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. **Plant Disease**, v. 74, p. 69-76, 1990.

SREENIVASAPRASAD, S. et al. PCR: based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. **Plant Pathology**, London, v. 45, n. 4, p. 650-655, 1996.

STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Oxford University Press**. Bioinformatics 22. 2006. 2688–2690.

STRADIOTO, M. F. **Variabilidade de *Colletotrichum gloeosporioides* e resistência de seringueira (*Hevea brasiliensis)* ao patógeno**. 1992. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia)–Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1992.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum.* In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.). ***Colletotrichum***: biology, pathology and control. Wallingford: CAB international, 1992. p. 1-26.

SWOFFORD, D.L. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4. **Sinauer Associates Inc**., Sunderland, MA. 2003.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Oxford University Press**. Mol. Biol. Evol. 28. 2011. 2731–2739.

TOZZE JÚNIOR, H. J. **Caracterização e identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do pimentão (*Capsicum annuum*) no Brasil**. 2007. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

TOZZE JÚNIOR, H. J.; MELLO, M. B. A.; MASSOLA JUNIOR, N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 71-79, 2006.

WASTIE, R. L. Nursery screening of hevea for resistance to *Gloeosporium* leaf disease. **Rubber. Res. Inst. Malaya**, v. 23, n. 5, p. 339-350, 1973.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, V. 73. 2012. P. 115 – 180.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. (Eds.). **PCR protocols: a guide to methods and applications.** San Diego: Academic, 1990. p. 315-322.

WILLIAMS, J. G. K. el al. DNA polimorphysms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic acids research** 18:6531–6535. 1990.

WRIGHT S. Evolution and the Genetics of Populations. Volume 4. Variability Within and Among Natural Populations. **The University of Chicago Press**, Chicago, 1978. 9-103 pp.

XIA, X. DAMBE5: A Comprehensive Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. **Oxford University Press**.**Mol.** Biol. Evol. 30. 2013. (7), 1720–1728.

XIA, X.; LEMEY, P. Assessing substitution saturation with DAMBE. In: LEMEY, P.; SALEMI, M.; VANDAMME, A. M. (Eds.), **The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny, second ed**. University Press, Cambridge. 2009. pp. 615–630.

XIA, X. et al. An index of substitution saturation and its application. **Mol. Phylogenet**. Evol. 26. 2003. 1–7.