

DANIELA DE OLIVEIRA LISBOA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES
ENDOFÍTICAS E PATOGÊNICAS DE *Colletotrichum* ASSOCIADAS A OITI
(*Licania tomentosa*)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

L769c
2015
Lisboa, Daniela de Oliveira, 1988-
Caracterização morfológica e molecular de espécies
endofíticas e patogênicas de *Colletotrichum* associadas a oiti (*Licania tomentosa*) / Daniela de Oliveira Lisboa. – Viçosa, MG,
2015.

vii, 25f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Gleiber Quintão Furtado.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Licania tomentosa*. 2. Filogenia. 3. Antractone. 4.
Colletotrichum. 5. Fungos patogênicos. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de
Pós-graduação em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 632.46

DANIELA DE OLIVEIRA LISBOA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES
ENDOFÍTICAS E PATOGÊNICAS DE *Colletotrichum* ASSOCIADAS A OITI
(*Licania tomentosa*)**

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

APROVADA: 24 de fevereiro de 2015.

Danilo Batista Pinho

Acelino Couto Alfenas

Gleiber Quintão Furtado
(Orientador)

Aos meus pais Maria José e José Geraldo

Ao meu irmão Ítalo

Aos meus amigos e familiares

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas oportunidades e graças alcançadas.

Aos meus pais e ao meu irmão por todo amor, incentivo e por sempre acreditarem em mim.

A toda minha família que sempre me incentivou.

Ao Hέλvio pela paciência, pelo incentivo e carinho.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Fitopatologia e ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia por proporcionarem condições para realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

Ao professor Gleiber pela orientação, pela amizade e pela oportunidade desde a graduação.

Ao pós-doutorando Danilo pelos ensinamentos, pela paciência, pelo apoio e pela amizade.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos e pela contribuição à minha formação profissional.

Às meninas do laboratório de Patologia Florestal, Mariana e Luísa, pela amizade e ajuda na execução deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Patologia de Sementes e de Pós-colheita, pela ajuda, pelos conselhos e pela amizade.

Ao Renildo pela amizade e pelos conselhos.

Aos amigos do mestrado pelo companheirismo e pela ajuda nos estudos.

A todos os amigos que estão sempre por perto.

Aos demais estudantes de Pós-graduação em Fitopatologia pela convivência.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Daniela de Oliveira Lisboa, filha de Maria José de Oliveira Lisboa e José Geraldo Lisboa, nasceu em 14 de junho de 1988, em Ponte Nova, Minas Gerais.

Ingressou em 2008, no curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) onde lhe foi conferido o título de Engenheira Agrônoma. Nesta instituição, foi bolsista de Iniciação Científica no Laboratório de Patologia Florestal/Departamento de Fitopatologia, sob orientação do professor Gleiber Quintão Furtado.

Em agosto de 2013, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na mesma instituição.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS	3
2.1 Coleta, isolamento e preservação dos isolados	3
2.2 Extração de DNA, PCR e sequenciamento	3
2.3 Análises filogenéticas	4
2.4 Caracterização morfológica	5
2.5 Testes de patogenicidade	6
3. RESULTADOS	7
3.1 Isolamento de espécies de Colletotrichum patogênicas e endofíticas	7
3.2 Análises filogenéticas	7
3.3 Caracterização morfológica	8
3.4 Taxonomia	8
3.5 Testes de patogenicidade	10
4. DISCUSSÃO	10
5. CONCLUSÕES	12
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
7. TABELAS E FIGURAS	18

RESUMO

LISBOA, Daniela de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Caracterização morfológica e molecular de espécies endofíticas e patogênicas de *Colletotrichum* associadas a oiti (*Licania tomentosa*).** Orientador: Gleiber Quintão Furtado.

A antracnose é a doença mais importante do oiti (*Licania tomentosa*), esta espécie florestal é utilizada principalmente para arborização de cidades brasileiras. Entretanto, estudos abrangentes para elucidar a etiologia desta doença são escassos. O objetivo desse trabalho foi identificar, com base em caracteres morfológicos e dados moleculares, as espécies endofíticas e patogênicas de *Colletotrichum* em oiti. Amostras de folhas saudáveis e com sintomas típicos de antracnose foram coletadas nos estados de Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro, Goiás, Paraná, Alagoas e no Distrito Federal. Um total de 32 isolados monospóricos (8 endofíticos e 24 patogênicos) foram obtidos por isolamento indireto (folhas assintomáticas e sintomáticas) e direto (folhas sintomáticas). O DNA genômico foi extraído para amplificação da região parcial do gene GAPDH. As sequências foram comparadas no banco de dados Q-Bank Fungi e após uma identificação preliminar, um subconjunto de 6 isolados (patogênicos e endofíticos) foram selecionados para sequenciamento das regiões parciais dos genes ACT, CAL, CHS1, GAPDH, TUB2, SOD2 e ITS. As sete regiões gênicas foram concatenadas para análise por Inferência Bayesiana. Após a identificação molecular, um isolado representativo de cada espécie foi selecionado para caracterização morfológica (taxa de crescimento da colônia, forma e tamanho de conídios e apressórios). Para comprovar a patogenicidade, plantas de *L. tomentosa* foram inoculadas com discos de micélio na superfície adaxial das folhas. A caracterização morfológica e análise filogenética confirmaram que todos os isolados pertenceram ao complexo *C. gloeosporioides*, sendo as espécies *C. fructicola* e *C. tropicale* encontradas apenas endofiticamente, enquanto *Colletotrichum* sp. nov. encontrada tanto de forma endofítica quanto patogênica. De acordo com o teste de patogenicidade, todas as espécies causaram doença em *L. tomentosa*. Porém *Colletotrichum* sp. nov. foi significativamente mais agressiva. Estes resultados sugerem que a antracnose em oiti no Brasil é causada por uma nova espécie de *Colletotrichum*, ainda desconhecida pela comunidade científica.

ABSTRACT

LISBOA, Daniela de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Morphological and molecular characterization of endophytic and pathogenic species of Colletotrichum associated with oiti (*Licania tomentosa*).** Adviser: Gleiber Quintão Furtado.

Anthrachnose is the disease most important of oiti (*Licania tomentosa*), this forest species is mainly used for afforestation Brazilian cities. However, comprehensive studies to elucidate the etiology of this disease are limited. The objective of this study was to identify, based on morphology and molecular data, endophytic and pathogenic species of *Colletotrichum* in oiti. Samples of uninfested leaves and with the typical anthracnose symptoms were collected from trees in the states of Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro, Goiás, Paraná, Alagoas and in Distrito Federal. A total of 32 isolates monosporic (8 endophytic and 25 pathogenic) were obtained by indirect isolation (asymptomatic and symptomatic leaves) and direct isolation (symptomatic leaves). Genomic DNA was extracted for amplification of the partial region of GAPDH. The sequences were compared with the database Q-Bank Fungi and after a preliminary identification, subset of six isolates (pathogenic and endophytic) was selected for partial sequencing of regions of genes ACT, CAL, CHS1, GAPDH, TUB2, SOD2 and ITS. The seven genic regions were concatenated for analysis by Bayesian Inference. Following the molecular identification one isolate representative of each specie was selected for morphologic characterization (colony growth, conidial size and appressoria shape). To prove the pathogenicity, oiti plants were inoculated with mycelial plugs placed on the adaxial surface of the leaves. The morphological characterization and phylogenetic analysis confirmed that all isolates belonged to complex *C. gloeosporioides*, being the species *C. fruticola* and *C. tropicale* found only endophytically, while *Colletotrichum* sp. nov. was found as endophytics and as pathogenics. According to the pathogenicity test, all species caused disease in oiti. However *Colletotrichum* sp. nov. was significantly most aggressive. These results suggest that anthracnose on oiti in Brazil is caused by a new species of *Colletotrichum*, still unknown to scientific community.

1. INTRODUÇÃO

Licania tomentosa (Benth.) Fritsch (Chrysobalanaceae), popularmente conhecida como oiti, é uma espécie arbórea nativa da Mata Atlântica encontrada principalmente nos estados da Bahia, Ceará, Pernambuco, Minas Gerais e Espírito Santo. *L. tomentosa* é utilizada principalmente para recuperação de áreas degradadas, e sua madeira é usada em construção civil e de embarcações, marcenaria e arborização urbana (Rizzini & Mors, 1995).

Dentre as doenças que afetam *L. tomentosa* destaca-se a antracnose. Os sintomas dessa doença em mudas e em árvores são lesões visíveis, principalmente, na superfície adaxial das folhas e nos frutos. As lesões são marrom escuras, irregularmente circulares, isoladas ou interligadas, e à medida que se expandem vão apresentando porções centrais acinzentadas, esbranquiçadas ou marrom claras e bordas marrom escuras. Estas podem apresentar massas de esporos de coloração rosada que exsudam dos acérvulos (Ferreira, 1989).

A causa da antracnose em *L. tomentosa* tem sido atribuída a *Colletotrichum gloeosporioides* (Mendes & Urban, 2015). No entanto, a sistemática das espécies deste gênero sofreu várias mudanças, e têm sido motivo de discussões e estudos no mundo (Sutton, 1992; Cai et al. 2009; Hyde et al. 2009; Damm et al. 2012; Weir et al. 2012). Inicialmente, a identificação de espécies de *Colletotrichum* foi baseada em gama de hospedeiros e características morfológicas, tais como dimensões e formato dos conídios e apressórios, presença ou ausência de setas, taxa de crescimento das culturas, cor das culturas e presença ou não da fase teleomórfica (Hyde et al. 2009; Rojas et al. 2010; Weir et al. 2012). No entanto, essas características são variáveis dependendo de diversos fatores, tais como meio de cultura, temperatura, luminosidade e outros. Além disso, tais características podem ser perdidas por meio de repicagens sucessivas, tornando a taxonomia ambígua e confusa (Cai et al. 2009; Weir et al. 2012).

A partir de dados de sequências de DNA e análises filogenéticas, tem sido proposto que *C. gloeosporioides* é um complexo de espécies, devido à grande variabilidade genotípica (López, 2001; López & Pereira, 2010; Phoulivong et al. 2010; Cannon et al. 2012; Weir et al. 2012). Em um estudo feito por Weir et al. (2012) com o objetivo de esclarecer as relações genéticas e taxonômicas de espécies

dentro do complexo *C. gloeosporioides*, foram aceitas 22 espécies e 2 subclados (*Kahawae* e *Musae*) com base em análise concatenada de oito locus, ITS (região espaçadora interna transcrita), ACT (actina), CAL (calmodulina), GS (glutamina sintetase), CHS1 (quitina sintetase 1), TUB2 (β -tubulina), GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e SOD2 (mangânês superóxido dismutase).

Atualmente, existem vários relatos de fungos do complexo *C. gloeosporioides* causando danos em espécies arbóreas no mundo, tais como em *Syagrus oleracea* (Charchar et al. 2002), *Eugenia dysenterica* (Anjos & Charchar, 2001), *Hevea brasiliensis* (Jayasinghe, 1997), *Callophylum brasiliensis* (Rosa et al. 2008) *Mangifera indica* (Lima et al. 2014) e *Eucalyptus* (Rodrigues et al. 2014). Em mangueira, a antracnose é considerada uma das doenças mais importantes, pois limita sua produtividade (Santos Filho & Matos, 2003), assim como em seringueira, sendo uma das principais causas do declínio da produção de borracha (Jayasinghe et al. 1997). No eucalipto, a antracnose afeta o desenvolvimento de plantas em viveiros, jardins clonais e plantações em diferentes estádios fenológicos (Alfenas et al. 2009).

Além de sua notável importância como patógeno de plantas, há inúmeros relatos de *Colletotrichum* spp. como epífitas, saprófitas e endofíticas (Sutton, 1992; Prihastuti et al. 2009; Damm et al. 2013). *Colletotrichum* spp. são consideradas os endofíticos foliares que possuem maior gama de hospedeiros (Hyde et al. 2009; Lu et al. 2004; Rojas et al. 2010), podendo permanecer latentes nos estágios iniciais e posteriormente exercer parasitismo, levando ao desenvolvimento de lesões (Cannon et al. 2012). Entretanto, a compreensão de como essas espécies mudam seu hábito de vida de não patogênico para patogênico ainda é limitada (Lu et al. 2004; Liu et al. 2007; Hyde et al. 2009; Rojas et al. 2010).

Levando em consideração a nova abordagem proposta para identificação das espécies de *Colletotrichum*, torna-se importante estudos que visam esclarecer a etiologia da antracnose em plantas afetadas pela doença a fim de embasar estratégias de controle. Neste trabalho caracterizaram-se e identificaram espécies de *Colletotrichum* patogênicas e endofíticas associadas a *L. tomentosa* no Brasil, com base em características morfológicas e sequências de DNA.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta, isolamento e preservação dos isolados

As coletas foram realizadas entre os meses de dezembro de 2013 e agosto de 2014. Amostras de folhas com e sem sintomas típicos de antracnose foram coletadas de árvores de *L. tomentosa* em Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro, Goiás, Paraná, Alagoas e no Distrito Federal.

Fungos endofíticos foram obtidos por meio de isolamento indireto a partir de folhas assintomáticas. Fragmentos de folhas foram desinfestados em etanol 70% por 60 s e hipoclorito de sódio (1%) por 3 min. Após a desinfestação, os fragmentos foram enxaguados em água destilada esterilizada durante 30 s e em seguida transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA - Acumedia[®]). Os fungos patogênicos foram obtidos por meio do isolamento direto de estruturas do patógeno em lesões típicas de antracnose, as quais foram transferidas para placas de Petri contendo BDA. Nos casos em que conídios não foram observados em folhas sintomáticas, foi realizado o isolamento indireto, utilizando a mesma metodologia para fungos endofíticos.

Após a obtenção de culturas puras, discos de micélio foram repicados para placas de Petri contendo BDA e mantidos a 25 °C e sob luz fluorescente ($\lambda = 380 - 775 \text{ nm}$) com fotoperíodo de 12 h. Para obtenção das culturas monospóricas, foi preparada uma suspensão de conídios seguida de diluição. Com auxílio de uma pipeta, 5 μL desta suspensão diluída foi transferida para placas de Petri contendo 2 % de ágar água (AA - ágar-água, tipo I Himedia[®]) e, com o auxílio de uma alça esterilizada essa suspensão foi espalhada e as placas incubadas a 25 °C durante 6 h. Posteriormente, um único esporo germinado foi transferido, utilizando agulha esterilizada, para placas contendo BDA. Após 7 dias, 12 discos de micélio de 2 mm foram transferidos para microtubos de 1,5 mL e armazenados a 5 °C (geladeira).

2.2 Extração de DNA, PCR e sequenciamento

Isolados monospóricos foram cultivados em meio BDA a 25 °C por 10 dias. O micélio foi raspado do meio de cultura, com auxílio de palito de dente previamente esterilizado, e transferidos para tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. A extração foi

realizada após o congelamento do micélio com nitrogênio líquido e trituração utilizando um almofariz e um pistilo. Para a extração do DNA total foi utilizado o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Corporation, WI, EUA), de acordo com Pinho et al. (2012).

Os seguintes reagentes foram utilizados para as reações de PCR: 12,5 µL de Dream Taq™ PCR Master Mix 2X (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1 µL de cada primer a 10 µM (senso e antisenso) sintetizados pela Invitrogen (Carlsbad, U.S.A.), 1 µL de dimetil sulfoxido (DMSO, Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.), 5 µL de albumina de soro bovino (BSA, Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) 100 × (10 mg/mL), 2 µL do DNA genômico (25 ng/µl) e 2,5 µL de água livre de nuclease para completar o volume total para 25 µL.

Todos os isolados tiveram a região parcial do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) amplificada e sequenciada, utilizando os primers GDF e GDR (Templeton et al. 1992). Isolados patogênicos e endofíticos foram selecionados para amplificação e sequenciamento de sete regiões gênicas: actina (ACT) primers ACT-512F e ACT-783R (Carbone & Kohn, 1999), calmodulina (CAL) primers CAL-228F (Carbone & Kohn, 1999) e CAL2RD (Groenewald et al. 2013), quitina sintetase 1 (CHS1) primers CHS-79F e CHS-345R (Carbone & Kohn, 1999), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) primers GDF e GDR (Templeton et al. 1992), β-tubulina (TUB2) primers T1 (O'Donnell & Cigelnik, 1997) e 2A ou 2B (Glass & Donaldson, 1995), manganês superóxido dismutase (SOD2) primers SODglo2-F e SODglo2-R (Moriwaki & Tsukiboshi, 2009) e a região espaçadora interna transcrita (ITS) primers ITS-1 e ITS-4 (White et al. 1990).

Os parâmetros do ciclo de PCR foram os mesmos descritos por Weir et al. (2012). Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em géis com 2 % de agarose e corados com GelRed™ (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) em tampão TAE 1 × e visualizadas sob luz UV para verificar o tamanho e pureza das amplificações. Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados pela MacroGen Inc., Coréia do Sul ([http:// www.MacroGen.com](http://www.MacroGen.com)).

2.3 Análises filogenéticas

As sequências de nucleotídeos foram editadas com o software DNAbaser. Todas as sequências foram analisadas e o arranjo dos nucleotídeos em posições

ambíguas foram corrigidos por comparação das sequências senso e anti-senso. Os isolados foram previamente identificados pela análise das sequências GAPDH por comparação com outros isolados de *Colletotrichum* do banco de dados Q-Bank Fungi.

Após a identificação inicial, foi selecionado um isolado representativo de cada espécie e mais três isolados da mesma localidade (patogênicos e endofítico) para realizar as análises filogenéticas multilocus, envolvendo os genes ACT, CAL, CHS1, GAPDH, TUB2, SOD2 e ITS. Sequências destas regiões de espécies adicionais foram selecionadas a partir de Weir et al. (2012) e obtidas do GenBank (Tabela 2). As sequências foram alinhadas utilizando o software MUSCLE (Edgar, 2004), implementado no programa MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura et al. 2011).

A análise de Inferência Bayesiana (IB) empregando o método da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) foi realizada. MrMODELTEST 2.3 (Posada & Buckley, 2004) foi utilizado para selecionar o modelo de substituição de nucleotídeos para análise de IB. Os modelos foram estimados separadamente para cada região gênica. Os valores de verossimilhança foram calculados e o modelo foi selecionado de acordo com Akaike Information Criterion (AIC). A análise de IB foi concluída com MrBayes v. 3.1.2 (Rannala & Yang, 1996, Mau et al. 1999, Ronquist & Huelsenbeck, 2001). As quatro cadeias MCMC foram conduzidas simultaneamente, iniciando as árvores aleatoriamente até 10.000.000 de gerações. As árvores foram amostradas a cada 1.000 gerações, resultando em 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas da análise. Os valores de probabilidade posterior (Rannala & Yang, 1996) foram determinados da árvore consenso através das 7.500 árvores remanescentes. A árvore foi visualizada no software FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) e exportada para programas gráficos. A espécie *Colletotrichum salsolae* ICPM 19051 foi utilizada como grupo externo (outgroup).

2.4 Caracterização morfológica

Avaliaram-se as dimensões e o formato dos conídios, formato dos apressórios, morfologia das colônias e esporulação de cada isolado representativo de cada espécie identificada por análises filogenéticas.

Durante 10 dias, os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo BDA, a 25 °C com fotoperíodo de 12 h de luz negra ($\lambda = 320 - 400 \text{ nm}$), para induzir a esporulação. Posteriormente, os conídios foram transferidos para lâminas de vidro contendo ácido láctico e cobertos com uma lamínula. Trinta conídios por isolado foram medidos em microscópio de luz (Olympus CX31) e as imagens foram obtidas usando um microscópio de luz (Olympus BX 53) equipado com uma câmera digital (Olympus Q-COLOR5).

Os apressórios foram observados em microculturas. Para isso, uma pequena porção de meio de cultura BDA foi transferida para uma lâmina de vidro depositada em uma placa de Petri contendo papel filtro umedecido. Fragmentos miceliais foram transferidos para a borda do meio de cultura e, então, cobertos com uma lamínula esterilizada. As microculturas foram incubadas a 25 °C e sob luz fluorescente ($\lambda = 380 - 775 \text{ nm}$) com fotoperíodo de 12 h. Após 14 dias a lamínula foi removida e depositada sobre uma gota de ácido láctico em uma lâmina de vidro. As imagens foram obtidas usando um microscópio de luz como previamente descrito.

Para observação das características culturais, um disco de micélio de 5 mm de diâmetro oriundo de cultura com 5 dias de idade, foi transferido para o centro de uma placa de Petri contendo BDA e incubados a 25 °C e sob luz fluorescente ($\lambda = 380 - 775 \text{ nm}$) com fotoperíodo de 12 h. O diâmetro das colônias foi avaliado após 4 e 7 dias e a coloração, formato, tipo de micélio e produção de esporos após 7 dias. Foram utilizadas 4 repetições para cada isolado, sendo cada repetição uma placa de Petri.

2.5 Testes de patogenicidade

Para avaliar a patogenicidade, um isolado de cada espécie, foi cultivado por sete dias em BDA, a 25 °C e sob luz fluorescente ($\lambda = 380 - 775 \text{ nm}$) com fotoperíodo de 12 h. Discos de micélio de 4 mm de diâmetro foram depositados sobre ferimentos, na superfície adaxial das folhas de oiti. Os ferimentos foram realizados com uma ferramenta cilíndrica de 10 mm de diâmetro, contendo um conjunto de agulhas. As plantas foram incubadas por 24 h em câmara de nevoeiro a 25 °C e, posteriormente transferidas para câmara de crescimento a 25 °C e sob luz fluorescente ($\lambda = 380 - 775 \text{ nm}$) com fotoperíodo de 12 h. Cada isolado foi inoculado

em 10 folhas de cada planta. Na planta utilizada como testemunha, discos de BDA foram depositados sobre os ferimentos.

3. RESULTADOS

3.1 Isolamento de espécies de *Colletotrichum* patogênicas e endofíticas

Um total de 32 isolados, 8 endofíticos e 24 patogênicos, foram obtidos por isolamento indireto (folhas assintomáticas e sintomáticas) e isolamento direto (folhas sintomáticas) (Tabela 1).

3.2 Análises filogenéticas

A análise inicial da sequência parcial do gene GAPDH dos 32 isolados revelou que estes pertencem ao complexo *C. gloeosporioides*. Os isolados endofíticos C20 e C25 apresentaram um elevado grau de similaridade com sequências das espécies *C. fruticola* (100%) e *C. tropicale* (98,46%), respectivamente. Para os demais isolados não foi possível identificá-los com segurança com base apenas nesta região genômica.

Com base na análise inicial, foram selecionados um subconjunto de 6 isolados (C10, C11, C12, C19, C20 e C25), sendo um isolado de cada espécie e mais três isolados da mesma localidade (patogênicos e endofíticos), para realizar análises multilocus utilizando sequências parciais dos genes GAPDH (1-231), TUB2 (232-658), ITS (659-1129), CHS1 (1130-1397), ACT (1398-1628), CAL (1629-2201), SOD2 (2202-2501), juntamente com sequências das espécies de *Colletotrichum* depositadas no GenBank (Tabela 2). A sequência concatenada foi composta de 2501 pb e depois das análises foi gerada a árvore filogenética (Figura 1). Os isolados de *Colletotrichum* oriundos de *L. tomentosa* estão posicionados em 3 clados bem suportados com valores superiores a 94 % de probabilidade posterior. O isolado endofítico C20 agrupou-se no mesmo ramo da espécie *C. fruticola* e o isolado endofítico C25 ao mesmo ramo da espécie *C. tropicale*, ambos dentro do complexo *C. gloeosporioides*. Os isolados patogênicos C10, C11 e C19 e o endofítico C12 agruparam-se em um clado distinto que não pertence a qualquer espécie descrita, indicando ser uma espécie nova dentro do complexo *C. gloeosporioides*.

3.3 Caracterização morfológica

Os isolados das espécies *C. fructicola* (C20), *C. tropicale* (C25) e *Colletotrichum* sp. nov. (C10, C11, C12 e C19) apresentaram conídios subcilíndricos com extremidades arredondadas, típicos de *C. gloeosporioides* sensu lato. Todos os isolados formaram apressórios em microculturas, variando entre os formatos subglobosos, clavados e fusiformes (Tabela 3).

Em relação às características culturais, os isolados apresentaram diferenças principalmente no crescimento e na coloração das colônias. Os isolados de *C. fructicola*, *C. tropicale* e *Colletotrichum* sp. nov. apresentaram ao 7º dia, respectivamente, 88 mm e coloração esbranquiçada, 79 mm e coloração variando de branco a acinzentada e 72 mm coloração variando de branco a rosada (Figura 1 A, D, G).

3.4 Taxonomia

Colletotrichum fructicola Prihastuti, L. Cai & K.D. Hyde. (Figura 2 A-C)

Sinônimo: *Colletotrichum ignotum* E.I. Rojas, S. A. Rehner & Samuels.

Descrição: Colônias em BDA de coloração branca, circulares em torno da margem e seu diâmetro aos 4 dias a 25 °C pode atingir 51 mm e em 7 dias, no máximo 88 mm. Micélio aéreo branco a cinza pálido, denso, sem massas de conídios visíveis. Escleródios ausentes. Setas ausentes. Acérvulos ausentes em cultura. Conídios 13-14,5 × 4,5-5,0 µm, unicelulares, de parede lisa, não gutulados, hialinos, subcilíndricos e extremidades arredondadas. Apressórios produzidos em microculturas, sua maioria formados em micélios, coloração variando de marrom a marrom escuro, com formato clavado e fusiforme.

Fase sexual: Não produzida em cultura.

Distribuição geográfica e gama de hospedeiros: Originalmente relatado a partir de frutos de café na Tailândia (Prihastuti et al. 2009) e como um endofítico em folhas de várias plantas na América Central (Rojas et al. 2010). Outros hospedeiros *Pyrus pyrifolia* no Japão, *Limonium* em Israel, *Malus domestica* e *Fragaria* × ananassa nos EUA, *Persea americana* na Austrália, *Ficus* na Alemanha, *Malus domestica* no

Brasil, Dioscorea na Nigéria, e Theobroma e Tetragastris no Panamá (Weir et al. 2012).

Material examinado: Brasil, Distrito Federal, Brasília, endofítico em folhas de Licania tomentosa, 15 março 2014, Coll. Firmino A. L.

Colletotrichum tropicale E.I. Rojas, S.A. Rehner & Samuels. (Figura 2 D-F)

Descrição: Colônias em BDA de coloração variando de branca a cinza claro, circulares em torno da margem e seu diâmetro aos 4 dias a 25 °C pode atingir 46 mm, em 7 dias no máximo 79 mm. Micélio aéreo cinza, abundante, com massas de conídios visíveis ao centro. Escleródios ausentes. Setas ausentes. Acérvulos ausentes em cultura. Conídios 15,5-17,0 × 3,5-4,5 µm, unicelulares, de parede lisa, não gutulados, hialinos, subcilíndricos e com extremidades inferiores ligeiramente arredondadas e estreitamento em direção ao ápice com uma cicatriz evidente. Apresórios produzidos em microculturas, sua maioria formados em micélios, coloração variando de marrom a marrom escuro, com formato subgloboso, clavado e fusiforme.

Fase sexual: Não produzida em cultura.

Distribuição geográfica e gama de hospedeiros: Distribuição conhecida no Panamá. Comumente isolado como endofítico de folhas em uma ampla gama de espécies hospedeiras em florestas tropicais do Panamá, incluindo Theobroma cacao, Trichilia tuberculata, Viola surinamensis e Cordia alliodora, também isolado a partir de frutos podres de Annona muricata (Rojas et al. 2010)

Material examinado: Brasil, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, endofítico em folhas de Licania tomentosa, 19 maio 2014, Coll. Pinho D. B.

Colletotrichum sp. Nov. (Figura 2 G-I)

Descrição: Colônias em BDA de coloração variando de branca a rosada, circulares em torno da margem e seu diâmetro aos 4 dias a 25 °C pode atingir 43 mm em 7 dias no máximo 72 mm. Micélio aéreo branco a rosado, denso, sem massas de conídios visíveis. Escleródios ausentes. Setas ausentes. Acérvulos ausentes em cultura. Conídios 10,0-23,0 × 3,5-6,0 µm, unicelulares, de parede lisa, gutulados, hialinos, cilíndricos e extremidades arredondadas. Apresórios produzidos em microculturas,

sua maioria formados em micélios, coloração variando de marrom a marrom escuro, com formato subgloboso e clavado.

Fase sexual: Não produzida em cultura.

Distribuição geográfica e gama de hospedeiros: Espécie ainda não relatada.

Material examinado: Brasil, Minas Gerais, Viçosa, patogênico em folhas de *Licania tomentosa*, 16 dezembro 2013, Coll. Lisboa D. O.; Brasil, Minas Gerais, Piraúba, patogênicos e endofítico em folhas de *Licania tomentosa*, 24 janeiro 2014, Coll. Pereira O. L.

3.5 Testes de patogenicidade

Os isolados de *C. fructicola*, *C. tropicale* e *Colletotrichum* sp. nov. foram patogênicos quando inoculados em folhas de *Licania tomentosa*. Os primeiros sintomas foram visualizados 7 dias após a inoculação. Para todos os isolados, os sintomas induzidos foram semelhantes, com lesões marrom escuras a negras (Figura 3). A espécie patogênica *Colletotrichum* sp. nov. foi significativamente mais agressiva que os isolados das espécies endofíticas (Figura 4). No entanto, não houve diferença de agressividade entre os demais isolados endofíticos. A partir das lesões em folhas inoculadas foi possível reisolar os fungos inoculados.

4. DISCUSSÃO

Os resultados das análises filogenéticas e morfológicas sugerem que uma nova espécie de *Colletotrichum*, denominada *Colletotrichum* sp. nov., seja o agente causal da antracnose em *L. tomentosa* no Brasil. As espécies *C. fructicola*, *C. tropicale* e *Colletotrichum* sp. nov. foram obtidas pela metodologia de isolamento de fungos endofíticos em folhas assintomáticas de *L. tomentosa*, mas somente *Colletotrichum* sp. nov. foram isolados de folhas sintomáticas.

Todas as espécies isoladas apresentaram aspectos morfológicos típicos de espécies pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides*. No entanto, não foi possível identificar as espécies patogênicas e endofíticas dentro deste complexo com base nas características morfológicas de conídios e apressórios, ou características de crescimento da colônia. Estudos realizados por Sutton (1992), sem uso de dados

moleculares, comprovam a inadequação das características morfológicas para a sistemática de *Colletotrichum*. Esta avaliação foi confirmada por estudos moleculares recentes, que demonstram que várias espécies identificadas anteriormente são complexos de espécies de *Colletotrichum* morfológicamente indistinguíveis (Du et al., 2005, Crouch et al. 2009). No presente estudo, as características culturais das espécies de *Colletotrichum* foram divergentes. Porém, segundo Weir et al. (2012), essas características podem ser variáveis dentro de uma mesma espécie, formando setores distintos, com diferenças na produção de pigmento, micélio aéreo, acérvulos e conídios. Portanto, características morfológicas e culturais, embora úteis, não são suficientes para descrever novas espécies de *Colletotrichum* (Crouch et al. 2009, Yang et al. 2009). Uma identificação definitiva só é possível com base em análises filogenéticas de sequências multilocos (Rojas et al. 2010; Weir et al. 2012).

A análise filogenética multilocos revelou que 100% dos isolados patogênicos e 75% dos endofíticos pertencem a uma espécie desconhecida dentro do complexo *C. siamense*. Este complexo, proposto por Sharma et al. (2014), pertence ao subclado *Musae* do complexo *C. gloeosporioides* (Weir et al. 2012). Esta nova espécie (*Colletotrichum* sp. nov.) é morfológicamente similar às demais espécies do complexo *C. siamense*, no entanto, somente essas características não são suficientes para diferenciá-las. Com base na árvore filogenética, *Colletotrichum* sp. nov. apresentou uma maior similaridade com a espécie *C. murrayae*. Ambas são semelhantes na forma e largura dos conídios, porém *C. murrayae* apresenta conídios mais curtos (10 - 15 μm) que *Colletotrichum* sp. nov. (10 - 23 μm).

Duas outras espécies endofíticas, *C. fructicola* e *C. tropicale*, foram encontradas em folhas de *L. tomentosa*, ambas pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides*, subclado *Musae*. Apenas um isolado de cada espécie foi obtido pela técnica de isolamento de endofíticos, sendo necessárias mais coletas de amostras de *L. tomentosa* e/ou aperfeiçoamento da metodologia de isolamento de endofíticos para tentar esclarecer o real papel de *C. fructicola* e *C. tropicale* na patogenicidade de plantas de *L. tomentosa*.

A espécie *C. fructicola* foi originalmente relatada causando antracnose em frutos do cafeeiro na Tailândia (Prihastuti et al. 2009). Recentemente, foi relatada como endofítica em folhas de diversas espécies de plantas na América Central (Rojas

et al. 2010) e como um dos agentes causais de antracnose em frutos manga no nordeste do Brasil (Lima et al 2013).

Colletotrichum tropicale, descrita por Rojas et al. (2010), foi relatada como o endofítico mais comumente encontrado na floresta do Panamá, ocorrendo em folhas assintomáticas de uma ampla gama de hospedeiros. No entanto, essa espécie também foi relatada causando manchas foliares em folhas velhas de *Persea americana* e podridão em frutos maduros de *Annona muricata*. No nordeste do Brasil, *C. tropicale* foi relatado causando antracnose em frutos de manga (Lima et al. 2013).

Colletotrichum sp. nov., única espécie isolada diretamente de folhas apresentando sintomas típicos de antracnose em *L. tomentosa*, também foi isolada de forma endofítica, sugerindo que o endofitismo desempenha um papel importante no seu ciclo de vida. Essa hipótese é corroborada por Delaye et al. (2013), que estudou as relações genéticas entre os endofíticos, biotróficos e patógenos necrotróficos. Os autores concluíram que os fungos poderiam alternar entre endofíticos e necrotróficos durante sua evolução.

O teste de patogenicidade mostrou que as 3 espécies, *Colletotrichum* sp. nov., *C. fructicola* e *C. tropicale*, foram patogênicas a *L. tomentosa*. Segundo Cannon et al. (2012), estes fungos endofíticos permanecem latentes nos tecidos do hospedeiro e quando em condições adequadas exercem o parasitismo, ocasionando o surgimento de lesões.

5. CONCLUSÕES

- Os resultados do presente trabalho demonstram que todas as espécies de *Colletotrichum* encontradas em *L. tomentosa* pertencem ao complexo *C. gloeosporioides*;

- *Colletotrichum fructicola* e *C. tropicale* foram encontradas apenas de forma endofítica em *L. tomentosa*;

- *Colletotrichum* sp. nov. foi encontrada tanto de forma endofítica quanto patogênica, e será proposta, segundo o Código internacional de nomenclatura para algas, fungos e plantas, como uma nova espécie de *Colletotrichum*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, Assis TFA (2009) Clonagem e Doenças do Eucalipto. Viçosa. UFV. 500p.
- Anjos JRN, Charchar MJA (2001) First Report of Anthracnose of Cagaita Caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Brazil. *Plant Disease* 85:801p.
- Cai L, Hyde KD, Taylor PWJ, Weir B, Waller J, Abang MM, Zhang JZ, Yang YL, Phoulivong S, Liu ZY, Prihastuti H, Shivas RG, McKenzie EHC, Johnston PR (2009) A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39:183-204.
- Cannon PF, Damm U, Johnston PR, Weir BS (2012) *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology* 73:181-213.
- Cannon PF, Simmons CM (2002) Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycology* 94:210-220.
- Carbone I, Kohn LM (1999) A method for designing primer sets for the speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553-556.
- Charchar MJd'A, Anjos JRN, Akimoto AK (2002) First Report of Anthracnose Caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on Gueroba in Brazil. *Plant Disease* 86:72p.
- Crouch JA, Clarke GG, White JD Jr, Hillman BI (2009) Systematic analysis of the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species from warm season grasses. *Mycologia* 101:717-732.
- Damm U, Cannon PF, Liu F, Barreto RW, Guatimosim E, Crous PW (2013) The *Colletotrichum orbiculare* species complex: important pathogens of field and weeds. *Fungal Diversity* 61:29-59.
- Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC, Johnston PR, Weir BS, Shivas RG, Crous PW (2012) The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology* 73:1-36.
- Delaye L, García-Guzmán G, Heil M (2013) Endophytes versus biotrophic and necrotrophic pathogens - are fungal lifestyles evolutionarily stable traits? *Fungal Diversity* 60:125-135.
- Du M, Schardl CL, Nuckles EM, Vaillancourt LJ (2005) Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. *Mycologia* 97:641-658.

- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792-1797.
- Ferreira, FA (1989) *Patologia florestal; principais doenças florestais no Brasil*. Viçosa. Sociedade de Investigações Florestais. 570p.
- Glass NL, Donaldson GC (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied Environmental Microbiology* 61:1323-1330.
- Groenewald JZ, Nakashima C, Nishikawa J, Shin HD, Park JH, Jama AN, Groenewald M, Braun U, Crous PW (2013) Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. *Studies in Mycology* 75:115-170.
- Hyde KD, Cai L, Cannon PF, Crouch JA, Crous PW, Damm U, Goodwin PH, Chen H, Johnston PR, Jones EBG, Liu ZY, McKenzie EHC, Moriwaki J, Noireung P, Pennycook SR, Pfenning LH, Prihastuti H, Sato T, Shivas RG, Tan YP, Taylor PWJ, Weir BS, Yang YL, Zhang JZ (2009) *Colletotrichum* - names in current use. *Fungal Diversity* 39:147-182.
- Jayasinghe CK, Fernando THPS, Priyanka UMS (1997) *Colletotrichum acutatum* is the main cause of *Colletotrichum* leaf disease of rubber in Sri Lanka. *Mycopathologia* 137:53-56.
- Lima NB, Batista MVA, Morais MA Jr, Barbosa MAG, Michereff SJ, Hyde KD, Camara MPS (2013) Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. *Fungal Diversity* 61:75-88.
- Lima NB, Lima WG, Tovar-Pedraza JM, Michereff SJ, Câmara MPS (2014) Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from mango in northeastern Brazil. *European Journal of Plant Pathology* pp.1-10.
- Liu B, Wasilwa LA, Guerber JC, Morelock TE, O'Neill NR, Correll JC (2007) Comparison of *Colletotrichum orbiculare* and allied *Colletotrichum* species for mtDNA RFLPs, intron RFLPs and sequence variation, vegetative compatibility, and host specificity. *Phytopathology* 97:1305-1314.
- López AMQ (2001) Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 9:291-337.
- López AMQ, Pereira DST (2010) Interação entre *Colletotrichum gloeosporioides* e ecótipos de pinha. *Bragantia* 69:105-114.

- Lu G, Cannon PD, Reid A, Simmons CM (2004) Diversity and molecular relationships of endophytic *Colletotrichum* isolates from Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycological Research* 108:53-63.
- Mau B, Newton M, Larget B (1999) Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics* 55:1-12.
- Mendes MAS, Urban AF (2015) Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp>. Acesso em: 20/1/2015.
- Moriwaki J, Tsukiboshi T (2009) *Colletotrichum echinochloae*, a new species on Japanese barnyard millet (*Echinochloa utilis*). *Mycoscience* 50:273–280.
- O'Donnell K, Cigelnik E (1997) Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7:103-116.
- Phoulivong S, Cai L, Chen H, McKenzie EHC, Abdelsalam K, Chukeatirote E, Hyde KD (2010) *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity* 44:33-43.
- Pinho DB, Firmino AL, Pereira OL, Ferreira Junior WG (2012) An efficient protocol for DNA extraction from Meliolales and the description of *Meliola centellae* sp. nov. *Mycotaxon* 122:333-345.
- Posada D, Buckley TR (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology* 53:793-808.
- Prihastuti H, Cai L, Chan H, McKenzie EHC, Hyde KD (2009) Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Diversity* 39:89-109.
- Rannala B, Yang Z (1996) Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution* 43:304-311.
- Rizzini CT, Mors WB (1995) Botânica econômica brasileira. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições 248p.
- Rodrigues AL, Pinho DB, Lisboa DO, Nascimento RJ, Pereira OL, Alfenas AC, Furtado GQ (2014) *Colletotrichum theobromicola* causing defoliation, stem rot

- and death of seedlings on nurseries of eucalyptus in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 39:326-330.
- Rojas EI, Rehner SA, Samuels GJ, Van Bael SA, Herre EA, Cannon A, Chen R, Pang J, Wang R, Zhang Y, Peng Y, Sha T (2010) *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia* 102:1318-1338.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics applications note* 17:754-755.
- Rosa DD, Masson MV, Ohto CT, Basseto MA, Avellar RVB, Furtado EL (2008) First occurrence of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in *Callophylum brasiliensis* in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes* 3:105-106.
- Santos Filho HP, Matos AP (2003) Doenças da mangueira. In: Freire FCO, Cardoso JE, Viana FMP (Eds.) *Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial*. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília. pp.435-491.
- Sharma G, Pinnaka AK, Shenoy BD (2014) Resolving the *Colletotrichum siamense* species complex using ApMat marker. *Fungal Diversity* pp.1-18.
- Souza VC, Lorenzi H (2005) *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da Flora Brasileira, baseado em APG II*. Nova Odessa: Instituto Plantarum 640p.
- Sutton BC (1992) The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum Biology, Pathology and Control*. In: Bailey JA, Jeger MJ (Eds.) CAB International, Wallingford. pp.1-26.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology Evolution* 28:2731-2739.
- Templeton MD, Rikkerink EHA, Solon SL, Crowhurst RN (1992) Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. *Gene* 122: 225-230.
- Vieira WAS, Michereff SJ, Morais MA Jr, Hyde KD, Câmara MPS (2014) Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. *Fungal Diversity* 67:181-202.

- Weir B, Johnston PR, Damm U (2012) The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73:115-180.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press:New York. pp.315-322.
- Yang YL, Liu ZY, Cai L, Hyde KD, Yu ZN, McKenzie EHC (2009) *Colletotrichum* anthracnose of Amaryllidaceae. *Fungal Diversity* 39:123-146.

7. TABELAS E FIGURAS

TABELA 1. Relação dos isolados de *Colletotrichum*, endofíticos e patogênicos, oriundos de folhas de *Licania tomentosa*.

ISOLADO	ORIGEM	COLETOR	DATA DE COLETA
C1 (Patogênico)	Araguari - MG	Rodrigues F. A.	10/04/2014
C2 (Patogênico)	Araguari - MG	Rodrigues F. A.	10/04/2014
C3 (Patogênico)	Governador Valadares - MG	Pinho D. B.	26/07/2014
C4 (Endofítico)	Ipatinga - MG	Pinho D. B.	17/06/2014
C5 (Patogênico)	Itutinga - MG	Pereira O. L.	03/02/2014
C6 (Patogênico)	Itutinga - MG	Pereira O. L.	03/02/2014
C7 (Endofítico)	Itutinga - MG	Pereira O. L.	03/02/2014
C8 (Patogênico)	Paula Cândido - MG	Lisboa D. O.	13/01/2014
C9 (Patogênico)	Paraopeba - MG	Pereira O. L.	05/02/2014
C10 (Patogênico)	Piraúba - MG	Pereira O. L.	24/01/2014
C11 (Patogênico)	Piraúba - MG	Pereira O. L.	24/01/2014
C12 (Endofítico)	Piraúba - MG	Pereira O. L.	24/01/2014
C13 (Patogênico)	Rubelita - MG	Pereira O. L.	17/06/2014
C14 (Patogênico)	São João del Rei - MG	Pereira O. L.	03/02/2014
C15 (Endofítico)	São João del Rei - MG	Pereira O. L.	03/02/2014
C16 (Patogênico)	Viçosa - MG	Lisboa D. O.	22/01/2014
C17 (Endofítico)	Viçosa - MG	Lisboa D. O.	22/01/2014
C18 (Patogênico)	Viçosa - MG	Lisboa D. O.	11/12/2013
C19 (Patogênico)	Viçosa - MG	Lisboa D. O.	16/12/2013
C20 (Endofítico)	Brasília - DF	Firmino A. L.	15/03/2014
C21 (Patogênico)	Campos dos Goytacases - RJ	Pinho D. B.	11/02/2014
C22 (Patogênico)	Frade - RJ	Pinho D. B.	26/03/2014
C23 (Patogênico)	Frade - RJ	Pinho D. B.	26/03/2014
C24 (Patogênico)	Itaperuna - RJ	Pinho D. B.	11/02/2014
C25 (Endofítico)	Rio de Janeiro - RJ	Pinho D. B.	19/05/2014
C26 (Patogênico)	Feira de Santana - BA	Gomes A.	09/02/2014
C27 (Patogênico)	Mrilândia - ES	Salcedo S.	25/05/2014
C28 (Patogênico)	Maceió - AL	Sobrinho R. R.	15/07/2014
C29 (Patogênico)	Lndrina - PR	Pinho D. B.	19/08/2014
C30 (Endofítico)	Taubaté - SP	Pinho D. B.	05/03/2014
C31 (Patogênico)	Ubatuba - SP	Pinho D. B.	05/03/2014
C32 (Patogênico)	Morrinhos - GO	Caires N. P.	02/01/2014

TABELA 2. Números de acesso do GenBank de sequências de DNA de *Colletotrichum* utilizados na análise filogenética.

Espécies	isolados	Hospedeiros	Número de acesso no Genbank							
			ITS	GAPDH	CAL	ACT	CH-1	GS	SOD2	TUB2
<i>C. aenigma</i>	ICMP 18608*	<i>Persea americana</i>	JX010244	JX010044	JX009683	JX009443	JX009774	JX010078	JX010311	JX010389
<i>C. aenigma</i>	ICMP 18686	<i>Pyrus pyrifolia</i>	JX010243	JX009913	JX009684	JX009519	JX009789	JX010079	JX010312	JX010390
<i>C. aeschynomenes</i>	ICMP 17673*	<i>Aeschynomene virginica</i>	JX010176	JX009930	JX009721	JX009483	JX009799	JX010081	JX010314	JX010392
<i>C. alienum</i>	ICMP 12071*	<i>Malus domestica</i>	JX010251	JX010028	JX009654	JX009572	JX009882	JX010101	JX010333	JX010411
<i>C. alienum</i>	ICMP 18691	<i>Persea americana</i>	JX010217	JX010018	JX009664	JX009580	JX009754	JX010074	JX010307	JX010385
<i>C. dianesei</i>	CMM4083*	<i>Mangifera indica</i>	KC329779	KC517194	KC517209	KC517298	KJ155469	-	-	KC517254
<i>C. endomangiferae</i>	CMM3814*	<i>Mangifera indica</i>	KC702994	KC702955	KC992372	KC702922	KC598113	-	-	KM404170
<i>C. endomangiferae</i>	CMM3740	<i>Mangifera indica</i>	KC702978	KC702954	KC992371	KC702921	KC598098	-	-	KM404169
<i>C. fructicola</i>	ICMP 18581*	<i>Coffea arabica</i>	JX010165	JX010033	FJ917508	FJ907426	JX009866	JX010095	JX010327	JX010405
<i>C. fructicola</i>	ICMP17921	<i>Ficus edulis</i>	JX010181	JX009923	JX009671	JX009495	JX009839	JX010090	JX010322	JX010400
<i>C. hymenocallidis</i>	CSSN 2	<i>Hymenocallis americana</i>	GQ485600	GQ856757	GQ849463	GQ856775	GQ856730	-	-	GQ849438
<i>C. hymenocallidis</i>	CSSN 3	<i>Hymenocallis americana</i>	GQ485601	GQ856759	GQ849451	GQ856776	GQ856729	-	-	GQ849439
<i>C. jasmini-sambac</i>	ICMP 19118*	<i>Jasminum sambac</i>	HM131511	HM131497	JX009713	HM131507	JX009895	-	-	JX010415
<i>C. murrayae</i>	GZAAS5.09538	<i>Murraya</i> sp.	JQ247633	JQ247608	JQ247597	JQ247656	-	JQ247620	-	JQ247645
<i>C. murrayae</i>	GZAAS5.09506*	<i>Murraya</i> sp.	JQ247632	JQ247609	JQ247596	JQ247657	-	JQ247621	-	JQ247644
<i>C. musae</i>	ICMP 19119	<i>Musa</i> sp.	JX010146	JX010050	JX009742	JX009433	JX009896	JX010103	JX010335	HQ596280
<i>C. musae</i>	ICMP 17817	<i>Musa sapientum</i>	JX010142	JX010015	JX009689	JX009432	JX009815	JX010084	JX010317	JX010395

TABELA 2. Continuação

Espécies	isolados	Hospedeiros	Número de acesso no Genbank							
			ITS	GAPDH	CAL	ACT	CH-1	GS	SOD2	TUB2
<i>C. nupharicola</i>	CMP 17938	<i>Nuphar lutea</i> subsp. <i>Polysepala</i>	JX010189	JX009936	JX009661	JX009486	JX009834	JX010087	JX010319	JX010397
<i>C. nupharicola</i>	ICMP 18187	<i>Nuphar lutea</i> subsp. <i>Polysepala</i>	JX010187	JX009972	JX009663	JX009437	JX009835	JX010088	JX010320	JX010398
<i>C. queenslandicum</i>	ICMP 17921	<i>Carica papaya</i>	JX010185	JX010036	JX009694	JX009490	JX009890	JX010102	-	JX010412
<i>C. queenslandicum</i>	ICMP 1778*	<i>Carica papaya</i>	JX010276	JX009934	JX009691	JX009447	JX009899	JX010104	JX010336	JX010414
<i>C. salsolae</i>	ICMP 19051*	<i>Salsola tragus</i>	JX010242	JX009916	JX009696	JX009562	JX009863	JX010093	JX010325	JX010403
<i>C. siamense</i>	ICMP 18578*	<i>Coffea arabica</i>	JX010171	JX009924	FJ917505	FJ907423	JX009865	JX010094	JX010326	JX010404
<i>C. siamense</i>	ICMP 18642	<i>Hymenocallis americana</i>	JX010278	JX010019	JX009709	GQ856775	GQ856730	JX010100	JX010332	JX010410
<i>C. tropicale</i>	ICMP 18653	<i>Theobroma cacao</i>	JX010264	JX010007	JX009719	JX009489	JX009870	JX010097	JX010329	JX010407
<i>C. tropicale</i>	ICMP 18672	<i>Litchi chinensis</i>	JX010275	JX010020	JX009722	JX009480	JX009826	JX010086	JX010318	JX010396
<i>C. viniferum</i>	GZAAS 5.08601*	<i>Vitis vinifera</i>	JN412804	JN412798	JQ309639	JN412795	-	JN412787	-	JN412813
<i>C. viniferum</i>	GZAAS 5.08608	<i>Vitis vinifera</i>	JN412802	JN412800	JN412782	JN412793	-	JN412784	-	JN412811
<i>C. communis</i>	GS01	<i>Citrus</i> sp. (Laranja)	JN248668	KC790736	KF451955	KC790622	KF451990	-	-	KC790869
<i>C. communis</i>	GS06	<i>Citrus</i> sp. (Laranja)	JN248673	KC790739	KF451956	KC790625	KF451991	-	-	KC790872

*Culturas Ex-tipo.

TABELA 3. Características morfológicas das espécies de *Colletotrichum*.

Espécies	Conídios			Apressórios
	Comprimentos (µm)	Largura (µm)	Forma	Forma
<i>C. fruticola</i>	13,0 – 14,5	4,5 – 5,0	Subcilíndricos	Clavados/ fusiformes
<i>Colletotrichum</i> sp. nov.	10,0 – 23,0	3,5 – 6,0	Subcilíndricos	Subglobosos/ clavados
<i>C. tropicale</i>	15,5 – 7,0	3,5 – 4,5	Subcilíndricos	Subglobosos/ clavados/ fusiformes

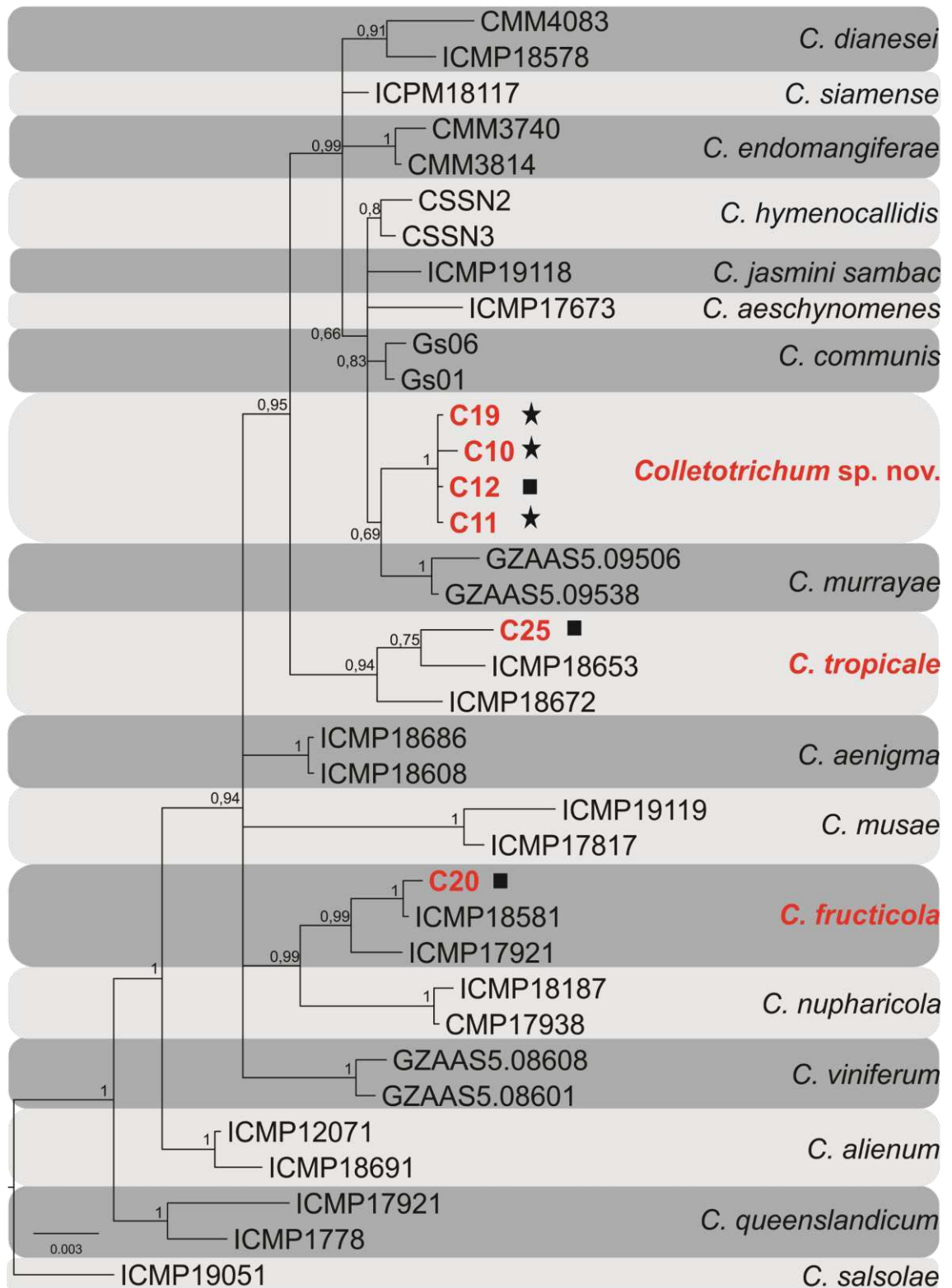


Figura 1. Árvore filogenética multilocus inferida a partir da análise Bayesiana com base nas sequências combinadas dos genes ACT, CAL, CHS1, GAPDH, TUB2, SOD2 e ITS. Probabilidade posterior são indicadas acima dos nós. A árvore foi enraizada com *Colletotrichum salsolae* ICMP19051. As espécies deste estudo estão destacadas de vermelho.

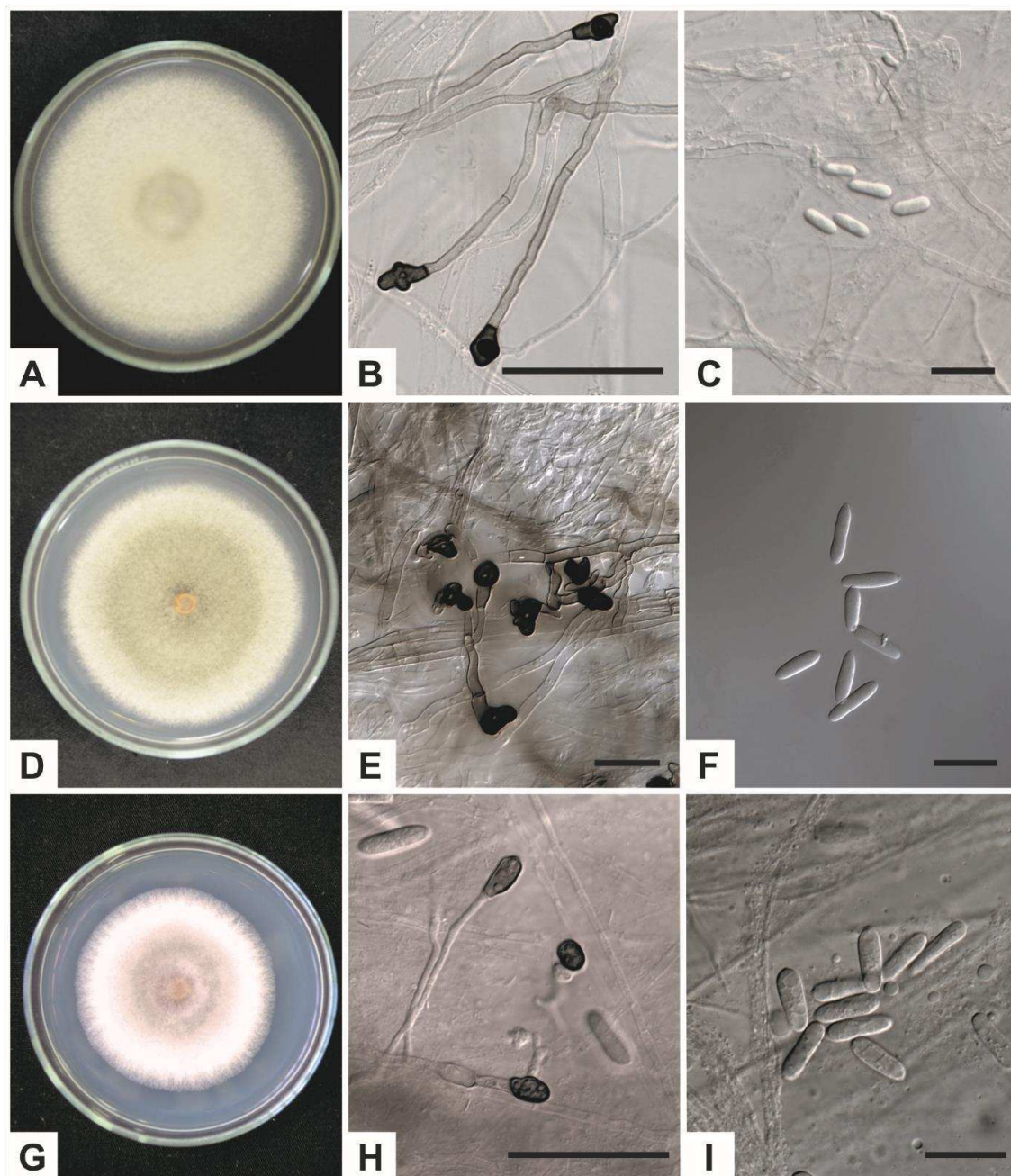


Figura 2. A, B, C - *Colletotrichum fructicola*, A - crescimento micelial em BDA aos 7 dias, B - apressórios, C - conídios; D, E, F - *Colletotrichum tropicale*, D - crescimento micelial em BDA aos 7 dias, E - apressórios, F - conídios; G, H, I - *Colletotrichum* sp. nov., G - crescimento micelial em BDA aos 7 dias, H - apressórios, I - conídios. Escala = 20 μ m.

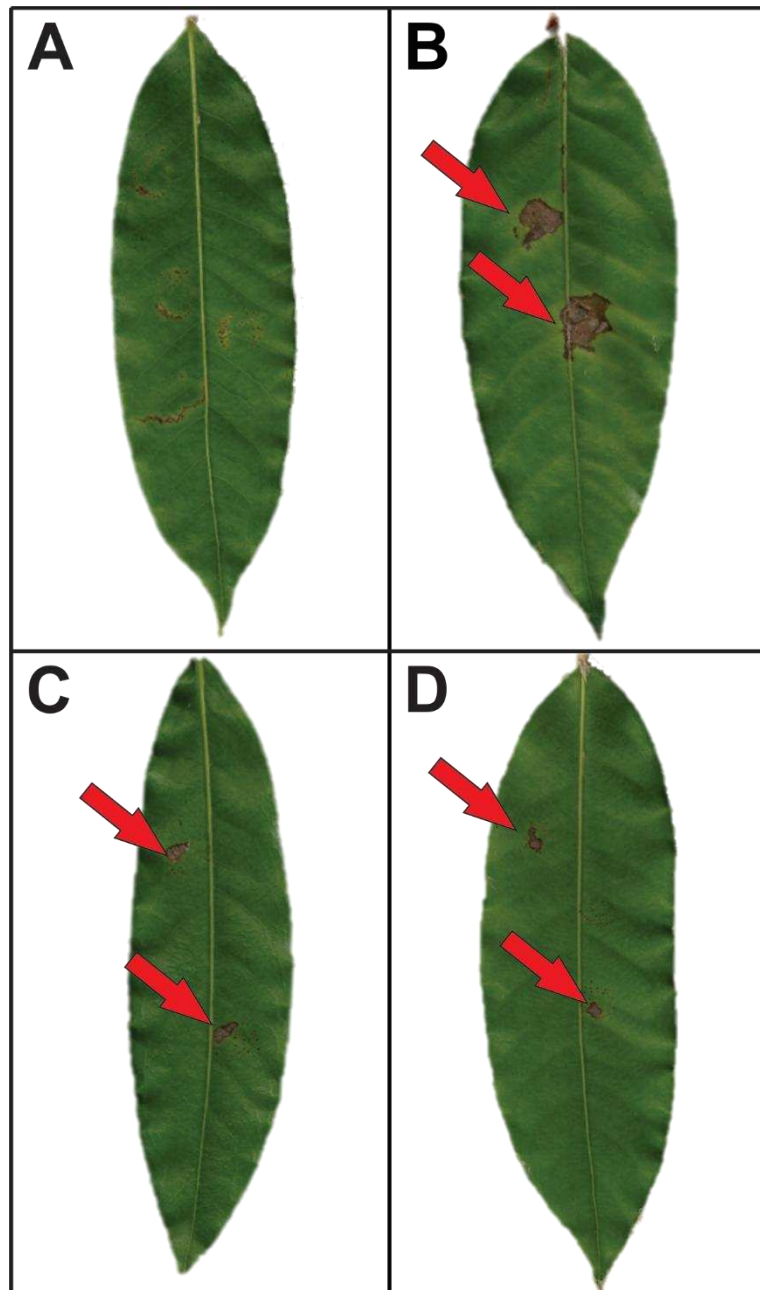


Figura 3. Resultados do teste de patogenicidade. A - Testemunha; B - sintomas causados por *Colletotrichum* sp. nov. (C10); C - sintomas causados por *Colletotrichum fruticola* (C20); D - sintomas causados por *Colletotrichum tropicale* (C25).

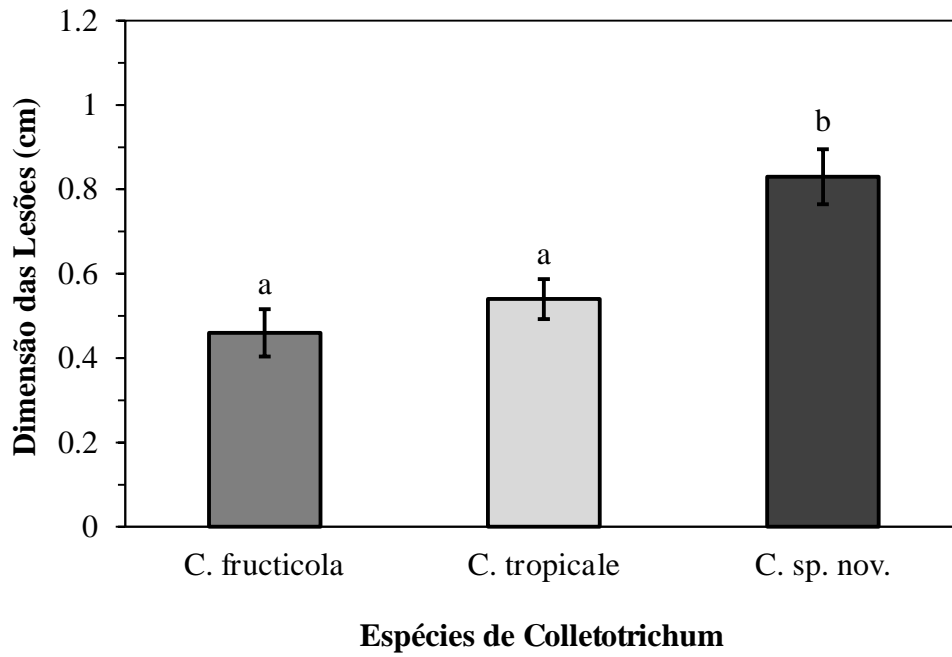


Figura 4. Dimensão média das lesões (cm) na superfície abaxial das folhas de *L. tomentosa* aos 10 dias após a inoculação com discos de micélio de *Colletotrichum* spp.. As barras em cada coluna representam o erro padrão da média. Colunas com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% de probabilidade.