

HANNA LORENA ALVARADO MORENO

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* ENDOFÍTICAS DA
SERINGUEIRA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016

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

T

A472d
2016 Alvarado Moreno, Hanna Lorena, 1986-
Diversidade de espécies de *Colletotrichum* endofíticas da
seringueira / Hanna Lorena Alvarado Moreno. – Viçosa, MG,
2016.
v,72f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Marisa Vieira de Queiroz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Seringueira - Doenças e pragas. 2. *Hevea brasiliensis*.
3. *Hevea guianensis*. 4. *Colletotrichum*. 5. Diversidade
genética. 6. Filogenia. 7. Amazônia. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de
Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22 ed. 632.46

HANNA LORENA ALVARADO MORENO

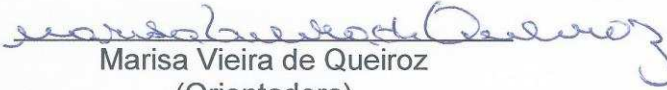
DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* ENDOFÍTICAS DA
SERINGUEIRA

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

APROVADA: 26 de julho de 2016.


Eduardo Seiti Gomide Mizubuti


Olinto Liparini Pereira
(Coorientador)


Marisa Vieira de Queiroz
(Orientadora)

BIOGRAFIA

HANNA LORENA ALVARADO MORENO, filha de José Alejandro Alvarado Gutiérrez e Hermencia Moreno Ramírez, nasceu em 26 de julho de 1986, em Bogotá D.C., Colômbia.

Em fevereiro de 2004, iniciou o curso de Engenharia Agrônômica na Universidade de Cundinamarca, Fusagasugá – Cundinamarca (Colômbia), graduando-se em janeiro de 2010.

Entre 2010 a 2014, fez parte do corpo de pesquisadores do centro de pesquisa do dendezeiro na Colômbia (Centro de Investigación en Palma de aceite – CENIPALMA) atuando como auxiliar de pesquisa no programa de pragas e doenças do dendezeiro.

Em agosto de 2014, iniciou o Curso de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em julho de 2016.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. Introdução	1
2. Material e métodos	7
2.1. Isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.	7
2.2. Extração de DNA	7
2.3. Amplificação e sequenciamento	7
2.4. Identificação molecular e análise filogenética	8
2.5. Análise da diversidade genética	11
3. Resultados	13
3.1. Identificação molecular e análise filogenética	13
3.2. Análise da diversidade genética por meio do marcador IRAP.....	29
4. Discussão	36
5. Conclusões	44
6. Referências bibliográficas	45
Anexos	52

RESUMO

MORENO, Hanna Lorena Alvarado, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* ENDOFÍTICO DA SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis* e *Hevea guianensis*)**. Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Coorientador: Olinto Liparini Pereira.

Colletotrichum é um gênero que apresenta dez complexos de espécies, bem como uma série de pequenos grupos e espécies únicas. Esse gênero inclui importantes patógenos causadores de doenças em plantas. Entretanto, espécies de *Colletotrichum* são também descritas como endofíticas em plantas lenhosas e herbáceas, e têm demonstrado produzir compostos bioativos. A seringueira (*Hevea* spp.) tem como seu centro de origem a região Amazônica e a espécie *H. brasiliensis* apresenta a mais alta produtividade de borracha natural (látex). No Brasil, até hoje, nenhum estudo foi feito para determinar as espécies de *Colletotrichum* endofíticas associadas à seringueira. Diante disso, foram estudados 176 isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas, caule e raízes de *H. brasiliensis* e *H. guianensis*. Para isso, foram sequenciadas quatro regiões gênicas que permitiram compreender os relacionamentos filogenéticos dos isolados estudados. Somado a isso, foi utilizado o marcador IRAP para avaliar a diversidade genética e, finalmente, foi analisada a concordância entre os agrupamentos feitos pelos dois métodos moleculares utilizados. Há diferentes espécies que pertencem aos complexos *C. boninense* e *C. gloeosporioides* e a espécie *C. cliviae* como endofíticas em *Hevea* spp. A análise utilizando o marcador molecular IRAP revelou uma alta variabilidade genética, formando diferentes clusters na análise de agrupamentos. Esses resultados foram condizentes em alguns casos com os agrupamentos observados nas análises filogenéticas. Neste trabalho se descreve pela primeira vez a presença de isolados do complexo *C. gloeosporioides* em caule e raiz de *Hevea* spp.

ABSTRACT

MORENO, Hanna Lorena Alvarado, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Species diversity of *Colletotrichum* fungal endophyte of rubber tree (*Hevea brasiliensis* e *Hevea guianensis*)**. Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Co-adviser: Olinto Liparini Pereira.

Colletotrichum is a genus that features ten species complex, as well as a number of small groups and singletons. This genus includes important pathogens causing diseases in plants. However, *Colletotrichum* spp. are also described as endophytic in woody and herbaceous plants, and have been shown to produce bioactive compounds. Amazon forest is the center of origin of the rubber tree (*Hevea* spp.) and *H. brasiliensis* specie has the highest productivity of natural rubber (latex). In Brazil, until now, no researches about *Colletotrichum* endophytic species associated with rubber tree were done. Therefore, 176 isolates of *Colletotrichum* spp. obtained from leaves, stems and roots of *H. brasiliensis* and *H. guianensis* were studied. For this, in order to understand phylogenetic relationships four gene regions were sequenced. Additionally, to assess the genetic variability the IRAP marker was used and the correlation between the groupings made by two molecular methods were analyzed. There are different species belonging to *C. boninense* and *C. gloeosporioides* species complex and *C. cliviae* as endophytic in *Hevea* spp. The analysis using molecular marker IRAP revealed a high genetic variability, forming different clusters. These results were consistent in some cases with clusters observed in phylogenetic analyzes. Here was described for the first time the presence of the complex isolated in *C. gloeosporioides* stem and roots of *Hevea* spp.

1. Introdução

A seringueira pertence ao gênero *Hevea* (Euphorbiaceae, Malpighiales), tem seu centro de origem na região Amazônica e compreende onze espécies. As espécies *H. brasiliensis* e *H. guianensis* são as únicas que produzem látex comercialmente aceitável e a espécie *H. brasiliensis* é a única plantada comercialmente porque apresenta a mais alta produtividade de borracha natural (látex) (Souza Gonçalves et al., 1990). A borracha natural é utilizada principalmente na indústria do transporte e de elementos médicos, cuja demanda é abastecida principalmente por países do sudeste Asiático e da África, sendo a contribuição do Brasil de apenas 1,9% do total da produção mundial (Valverde et al., 2014).

Na América, a produção de borracha em plantações falhou em grande parte devido à doença mal das folhas causada pelo fungo *Pseudocercospora ulei*, que até hoje consiste num sério risco para a heveicultura mundial. Além do mal das folhas, outras doenças como a antracnose, ocasionada por *Colletotrichum* spp., também tem sido relatada causando lesões foliares, desfolhamento e mortalidade de ramos e galhos em *H. brasiliensis*, *H. pauciflora*, *H. guianensis*, *H. benthamiana* e *H. camargoana* (Gasparotto e Pereira, 2012). Espécies de *Colletotrichum* afetam grande variedade de culturas de interesse econômico ao redor do mundo e por tanto é um gênero com um alto interesse econômico e científico (Dean et al., 2012).

Colletotrichum (Glomerellaceae, Glomerellales, Ascomycota) é um gênero de distribuição cosmopolita em ambientes tropicais, sub-tropicais e temperados, capaz de crescer em uma ampla variedade de plantas hospedeiras (Cannon et al., 2012). Esse gênero inclui importantes patógenos causadores de doenças em plantas cultivadas e frutas, sendo recentemente classificado como o oitavo mais importante gênero de fungo fitopatogênico no mundo (Dean et al., 2012). Entretanto, espécies de

Colletotrichum são também descritas como endofíticas em plantas cultivadas e nativas e tem demonstrado produzir compostos bioativos (Zou et al., 2000; Arnold et al., 2003; Suryanarayanan et al., 2009; Manamgoda et al., 2013; Paul et al., 2014; Vieira et al., 2014). A seringueira não é a exceção, e em árvores nativas no Peru foram relatadas espécies do gênero *Colletotrichum* endofíticas em tecidos de folia e caule (Gazis e Chaverri, 2010).

Segundo Petrini (1991), micro-organismos endofíticos são aqueles que habitam o tecido vegetal durante alguma fase do seu ciclo de vida, podendo colonizar o interior da planta, mas sem causar doença no hospedeiro. Dado que o termo estrito de endofítico define só a localização do organismo e não informa sobre o tipo de relação com a planta, a definição de Petrini (1991) é conveniente porque exclui a relação parasítica com o hospedeiro, restringindo o foco da pesquisa as relações de comensalismo e mutualismo. Parte da ambiguidade na hora de distinguir os micro-organismos endofíticos dos patogênicos ocorre porque vários endofíticos tem uma relação filogenética próxima com os patógenos, o que leva a questionar se alguns endofíticos são fitopatógenos latentes (Kogel et al., 2006; Porrás-Alfaro e Bayman, 2011). Várias pesquisas relatam que espécies patogênicas de *Colletotrichum* mostram uma relação de comensalismo ou mutualismo com plantas que não são seu hospedeiro original (Redman et al., 2001). Também foi relatado que um isolado fitopatogênico tornou-se endofítico mutualista em laboratório pela deleção de um gene (Freeman e Rodriguez, 1993). No entanto, estudos têm relatado que no seu hospedeiro original, os isolados endofíticos podem se diferenciar dos isolados patogênicos mediante análises filogenéticas e técnicas de *fingerprinting* (Rojas et al., 2010; Gonzaga et al., 2015); que isolados de *Colletotrichum* protegem a planta contra doenças (Zou et al., 2000; Arnold et al., 2003) e que promovem o crescimento da planta hospedeira (Hiruma et al., 2016).

A identificação de espécies do gênero *Colletotrichum* baseava-se unicamente em caracteres morfológicos e relacionadas aos seus hospedeiros (Cannon et al., 2012). No entanto, atualmente, os esforços de vários cientistas têm sido focados no uso de múltiplos marcadores genéticos que levem a uma identificação acurada das espécies, tais como as sequências dos genes que codificam actina (ACT), quitina sintetase (CHS1), β -tubulina (TUB2), calmodulina (CAL), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPH), histona 3 (HIS3), glutamina-sintetase (GS) e manganês-superóxido desmutase (SOD2) (Cannon et al. 2012; Damm et al., 2012a; Damm et al., 2012b; Weir et al., 2012). As análises utilizando estes marcadores revelaram que *Colletotrichum* compreende 10 complexos de espécies principais, bem como uma série de pequenos grupos e espécies únicas. Os mesmos autores ressaltam que os marcadores TUB2, GS e GAPDH podem determinar as posições filogenéticas da maioria das espécies do gênero, sendo que regiões codificadoras e seus íntrons frequentemente apresentam mais variações que a região ITS, embora outras regiões como a intergênica entre os genes *apn2* e *MAT-1-2-1* (*ApMat*) possam separar melhor os clados reconhecidos como espécies dentro do complexo *C. gloeosporioides* (Silva et al., 2012; Sharma et al., 2013, 2014).

O método de Reconhecimento de Espécies Filogenéticas baseado em Concordância Genealógica (GCPSR) tem fornecido uma identificação mais acurada para espécies em comparação com a identificação de espécies baseada em morfologia ou em critérios de compatibilidade reprodutiva (Taylor et al., 2000; Damm et al., 2012a, 2012b; Weir et al., 2012; Hyde et al., 2014). No entanto, esses estudos de filogenia multigênica tem sido complementados com caracterizações morfológicas que tem mostrado uma vez mais a variabilidade morfológica presente nas espécies de *Colletotrichum*, entre isolados de uma mesma espécie e mesmo entre culturas monospóricas de um mesmo isolado. Damm et al. (2012a, 2012b) e Weir et al. (2012) nas revisões taxonômicas dos complexos *C. acutatum*,

C. boninense e *C. gloeosporioides*, assinalaram que características morfológicas e culturais foram usadas como meios alternativos no reconhecimento das espécies, porém realçando que características como a forma dos conídios podem ser ambíguas na hora de categorizar espécies nesses complexos. Por exemplo, Weir et al. (2012) observaram para um isolado de *C. kahawae* subsp. *cigarro*, dois tipos de culturas diferentes derivadas de um mesmo conídio ou ascósporo obtido a partir de uma cultura monospórica. Além dessa variação intrínseca de isolados, os mesmos autores também discutem que um isolado pode apresentar setores na colônia e variar a aparência em resposta ao tempo e método de preservação.

Diante disso, estudos de diversidade baseados em morfotipos tem caído em desuso e o método de GCPSR tem sido usado para delimitar espécies em estudos de diversidade de fungos endofíticos, especialmente com fungos do filo Ascomycota (Gazis et al., 2011). A análise filogenética com uma abordagem multigênica utilizando a região ITS e a região intrônica na extremidade 5' do fator de alongação 1 α (5'-*tef1*) tem sido usada para estudar a diversidade genética de isolados de *Colletotrichum* associados a *Theobroma cacao* e outras plantas no Panamá, onde conseguiram distinguir quatro grupos filogenéticos dentro de isolados com um mesmo morfotipo (Rojas et al., 2010).

Outras técnicas moleculares como ap-PCR (*arbitrarily-primed PCR*), microsatelites, AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), ISSR-PCR (*inter-simple-sequence-repeat PCR*), IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*) e REMAP (*retrotransposon-microsatellite amplification polymorphism*) têm sido utilizadas para estudar a diversidade de espécies fitopatogênicas de *Colletotrichum* (Freeman et al., 2000, 2001; Ureña-Padilla et al., 2002; Guerber et al., 2003; Weeds et al., 2003; Anderson et al., 2013; Santana et al., 2013; Alananbeh e Gudmestad, 2016; Moges et al., 2016), e em poucos casos para estudar a diversidade de espécies

endofíticas (Lu et al., 2004; Photita et al., 2004; Gonzaga et al., 2015). Guozhong et al. (2004) utilizando marcadores ISSR-PCR e RAPD estudaram a diversidade e a especificidade pelo hospedeiro de isolados endofíticos obtidos de folhas de arvores da reserva Florestal Iwokrama na Guiana e relataram que as populações de *Colletotrichum* spp. foram altamente variáveis, mostrando pouca evidencia de clonalidade, sem especificidade pelo hospedeiro e diferencas genéticas inclusive entre isolados obtidos da mesma porção da folia da qual foram obtidos.

O marcador IRAP detecta os polimorfismos gerados pela inserção de retrotransposons, amplificando a sequência de DNA entre dois retrotransposons (Kalendar e Schulman, 2006). Santos et al. (2012) usaram com sucesso o marcador molecular IRAP, com base na sequência do retrotransposon *RetroCl1* (retroelemento de *Colletotrichum lindemuthianum* 1) para caracterizar a diversidade genética de *C. lindemuthianum* e mostraram que estes marcadores podem ser usados em outras espécies do gênero *Colletotrichum*. Além disso, esses marcadores também têm mostrado ser capazes de discriminar entre os isolados endofíticos do gênero *Colletotrichum* obtidos de folhas de *Phaseolus vulgaris* e os isolados fitopatogênicos de *C. lindemuthianum* (Gonzaga et al., 2015).

Os fungos são os principais causadores de doenças de importância econômica em seringueira, responsáveis por quase 100% dos casos de doença (Gasparotto e Pereira, 2012). Estudos sobre diversidade de espécies de fungos associados a plantas permitem conhecer a estrutura genética (quantidade e distribuição) das populações e comunidades que refletem a sua história evolutiva e o seu potencial de evoluir (McDonald, 1997). Porém, pouco é conhecido sobre os fungos associados as espécies de *Hevea* spp., o que representa uma interessante área de pesquisa devido à falta de informações sobre a diversidade de espécies de fungos que ocorrem no interior de diferentes tecidos de uma mesma planta e em locais de coleta diferentes. Sendo assim, o objetivo da nossa pesquisa foi identificar isolados do gênero *Colletotrichum* associados como endofíticos

a *H. brasiliensis* e *H. guianensis* silvestres na floresta amazônica do Brasil, e avaliar a variabilidade genética desses isolados por meio do marcador molecular IRAP para estudar a sua diversidade.

2. Material e métodos

2.1. Isolados de *Colletotrichum* spp.

Os fungos endofíticos pertencentes ao gênero *Colletotrichum* foram cultivados a partir de culturas monospóricas antes da preservação pelo método de Castellani e em glicerol 10% mantidos a temperaturas entre 5 e 10 °C. Esses isolados foram obtidos de tecidos de *H. brasiliensis* e *H. guianensis* dos estados do Acre e Amazonas e fazem parte da micoteca do Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos.

2.2. Extração de DNA

Os isolados foram cultivados em meio de cultura YMA [extrato de levedura, 10,0 g (Himedia®); extrato de malte, 2,0 g (Himedia®); ágar, 15,0 g (Himedia®) e água destilada em quantidade suficiente para completar para 1 L] e após 6 a 8 dias de crescimento a 26 °C, um fragmento de micélio foi coletado para extração de DNA por meio do Kit “Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation” da *MoBio Laboratories* seguindo o protocolo indicado pelo fabricante.

2.3. Amplificação e sequenciamento

O DNA extraído foi usado como molde para a amplificação pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) de quatro regiões genômicas: a região espaçadora interna transcrita do rDNA (ITS) usando os *primers* universais ITS1 e ITS4 (White et al., 1990); a região entre os genes AP e MAT1-2-1 (ApMat) usando os *primers* AMF e AMR (Silva et al., 2012); sequências parciais dos genes que codificam a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), usando os *primers* GDF e GDR (Templeton et al., 1992), e a β -tubulina (TUB2) usando os *primers* T1, T2 (O'Donnell e Cigelnik, 1997) e Bt2b (Glass e Donaldson, 1995).

As reações de PCR foram realizadas utilizando um volume total de 25 µL. As reações para a PCR das regiões ITS, ApMat e GAPDH continham 5,0 µL de 5X de tampão *Flexi* (Promega®), 2,5 µL de MgCl₂ 25 mM (Promega®), 1,0 µL de dNTP 10 mM, 1,0 µL de cada primer 5mM, 0,25 µL (1,25 U) de Taq DNA polimerase (Promega®) e 75 ng de DNA. Para o gene TUB2 a reação continha 5,0 µL de 5X de tampão *Reaction* (com 25 mM de MgCl₂) (Promega®), 15 ng de DNA, sem MgCl₂ adicional, e os demais componentes já descritos.

A condição de PCR para a região ITS foi de 3 min a 95 °C para a desnaturação inicial, seguida de 36 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 51 °C, 1 min a 72 °C e extensão final de 72 °C durante 10 min e foi utilizado o Termociclador Mastercycler® ep. As temperaturas de anelamento diferiram para as outras regiões com uma temperatura de anelamento de 55 °C para ApMat, 56 °C para GAPDH e 59 °C para TUB2. Para alguns isolados foi necessária a alteração da temperatura de anelamento, pois apresentaram múltiplas bandas na temperatura estabelecida para a maioria dos isolados. Nesse caso, foi purificada a banda do tamanho esperado a partir do gel de agarose utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega®) e o produto de PCR purificado foi usado como molde para uma nova reação usando as condições descritas anteriormente. Os fragmentos amplificados foram sujeitos a eletroforese em gel de 1,2% de agarose contendo brometo de etídio (0,2 mg mL⁻¹) em tampão TBE 1X. A purificação e o sequenciamento em ambas as direções foi feita pelo método de terminação da cadeia por dideoxinucleotídeos (Sanger et al., 1977) na empresa Macrogen, Inc. (Seul, Coreia do Sul).

2.4. Identificação molecular e análise filogenética

Os produtos dos sequenciamentos de ambas as fitas de DNA foram agrupados em *contigs* usando o programa Geneious® 9.0.2. A identificação molecular foi feita pela comparação das sequências consenso com as sequências das espécies tipo referidas na publicação de Hyde et al. (2014)

e depositadas na base de dados de nucleotídeos *GenBank* do Centro Nacional dos Estados Unidos para a Informação Biotecnológica (NCBI) usando a ferramenta BLAST, com identidades superiores a 97,0% e em alinhamentos superiores à metade do tamanho da sequência (Boratyn et al., 2013) (Anexo 1 e 2).

A análise filogenética foi realizada para cada uma das quatro regiões do DNA sequenciadas separadamente (ITS, GAPDH, TUB2 e ApMat). Para essas análises, as sequências consenso foram alinhadas e editadas com o programa MUSCLE que faz parte do pacote MEGA 6.0. O modelo foi selecionado com base no *Akaike Information Criterion* com o programa MrModelTest 2.3 (Tabela 1). As árvores filogenéticas foram inferidas utilizando o programa Mr Bayes v.3.2.1. (Ronquist et al., 2012) por meio de métodos baseados em inferência bayesiana, e o programa PAUP por meio de métodos baseados em máxima parcimônia e máxima verossimilhança. Para a inferência Bayesiana foram feitas simulações por 1×10^7 gerações, e para Máxima Parcimônia e máxima verossimilhança o número de gerações foi 1×10^6 .

As árvores filogenéticas foram visualizadas e editadas com o programa FigTree v 1.4.0. Sequências das espécies tipo de *C. acutatum*, *C. boninense*, *C. gloeosporioides*, *C. musae*, *C. kahawae*, foram utilizadas para construir diferentes conjuntos de dados, definidos conforme cada complexo de espécies de *Colletotrichum* (Anexo 1). Foi usada a espécie *Monilochaetes infuscans* CBS 869.96 para enraizar as arvores das regiões ITS, GAPDH e TUB2, e *Colletotrichum fragariae* Bra8 para a arvore da região ApMat.

Tabela 1. Genes ou locos utilizados na análise multilocos de fungos do gênero *Colletotrichum*, com os respectivos *primers* iniciadores e modelos de substituição de nucleotídeos usados nas análises filogenéticas.

Região	Identificação	Sequência 5' – 3'	Referência	Modelo
ITS	ITS1F (Forward)	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes e Bruns (1993)	GTR+G
	ITS4 (Reverse)	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. (1990)	
GADPH	GDF (Forward)	GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA	Templeton et al. (1992)	HKY+I
	GDR (Reverse)	GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT	Templeton et al. (1992)	
TUB2	T1 (Forward)	AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT	O'Donnell and Cigelnik (1997)	HKY+I+G
	T2 (Reverse)	TAG TGA CCC TTG GCC CAGT TG	O'Donnell and Cigelnik (1997)	
	Bt2b (Reverse)	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	Glass e Donaldson (1995)	
ApMat	AMF (Forward)	TCA TTC TAC GTA TGT GCC CG	Silva et al. (2012)	HKY+G
	AMR (Reverse)	CCA GAA ATA CAC CGA ACT TGC	Silva et al. (2012)	

ITS, região espaçadora interna transcrita do rDNA; **TUB2**, sequência parcial do gene que codifica a β -tubulina 2; **GADPH**, sequência parcial do gene que codifica a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; **ApMat**, região espaçadora interna dos genes AP e MAT. **GTR**, tempo reversível geral; **HKY**, Hasegawa-Kishino-Yano; **I**, proporção de sítios invariáveis; **G**, distribuição gamma.

2.5. Análise da diversidade genética

O DNA extraído de todos os isolados também foi usado para analisar a variabilidade genética mediante o uso de marcadores moleculares IRAP. Para essa análise foram utilizados os *primers* CIRAP2 (5'-AATAACGTCTCGGCCTTCAG-3') e CIRAP4 (5'-CTTTTGACGAGGCCATGC-3'). As condições usadas para as reações de PCR foram as descritas anteriormente por Santos et al., (2012). Os fragmentos amplificados foram sujeitos a eletroforese em gel de 1,5% de agarose contendo brometo de etídio (0,2 mg mL⁻¹) em tampão TBE 1X. O marcador de peso molecular utilizado para a comparação do tamanho das bandas foi DNA Ladder (PROMEGA®) 1 Kb. O experimento foi feito em duplicata para confirmar a repetibilidade do perfil de bandas de cada isolado.

Foi criada uma matriz de presença e ausência dos locos amplificados e foi contabilizado o número de haplótipos e *singletons*. A matriz foi utilizada para a análise de variância molecular (AMOVA), que foi realizada após os dados serem corrigidos para clones. Depois a matriz foi resumida como frequências dos haplótipos para as comunidades em cada local de coleta (Acre e Amazonas) e em cada espécie hospedeira (*H. brasilienses* e *H. guianensis*) e corrigidos por rarefação para realizar o teste exato de Fisher e calcular os índices de diversidade Shannon-Wiener e Simpson. Também foram calculados os números efetivos de Hill N1 (exponente do índice de Shannon) e Hill N2 (inverso do índice de Simpson). O erro padrão dos índices de diversidade foi calculado por *bootstrap* (1000 pseudoreplicas) e o intervalo de confiança para cada estimativa foi calculado com um 95% de confiança. Todas essas análises foram feitas utilizando pacotes estatísticos implementados no R.

O padrão de bandas foi analisado utilizando a versão 6.0 do software BioNumerics® (Matemática Aplicada, Kortrijk, Bélgica). A matriz de similaridade foi construída por meio do cálculo das curvas densiométricas

pelo coeficiente de correlação de Pearson que foi usada para construir o dendograma pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). A correlação foi expressa como percentagem de semelhança e a qualidade dos ramos foi determinada calculando a relação cofenética.

3. Resultados

3.1. Identificação molecular e análise filogenética

A partir de uma coleção de fungos endofíticos isolados de *H. brasiliensis* e *H. guianensis*, foi realizada uma triagem baseada nas características das colônias de fungos pertencentes ao gênero *Colletotrichum*. Foram selecionadas 176 colônias, que foram purificadas e tiveram o DNA extraído. Para a identificação molecular, as regiões ITS, GAPDH e TUB2 foram amplificadas e sequenciadas. As sequências da região TUB2 de dois isolados foram de baixa qualidade e não foram usadas nas análises. Foi possível amplificar a região ApMat de 158 dos 176 isolados estudados. O tamanho das sequências amplificadas foi de 590 pares de bases (pb) para ITS, 230 pb para GAPDH, 710 bp para TUB2 e 900 pb para ApMat. No entanto, isolados como 234F6F_AC, 350F1F_AC, e 816F29F_AM, apresentaram sequências menores nas regiões TUB2 e GAPDH.

Todos os isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Colletotrichum* baseado nas regiões ITS, GAPDH, TUB2 e ApMat quando comparados com as sequências depositadas no GenBank, porém quando comparadas com as sequências das espécies tipo, alguns isolados não puderam ser identificados com base às regiões GAPDH e ApMat. Além disso, observou-se que as espécies onde foram obtidos os maiores valores de identidade, foram diferentes para cada região sequenciada de um mesmo isolado (Tabelas 3-5). Dos 176 isolados estudados, quatro tiveram identidade com a espécie *C. cliviae*, 15 com espécies do complexo *C. boninense* e 157 com espécies do complexo *C. gloeosporioides*.

Tabela 2. Fungos endofíticos de *Colletotrichum cliviae* isolados de folhas de *Hevea* spp. coletados no Acre e no Amazonas.

Código do Isolado	Estado	Local de coleta	Hospedeiro	ITS		GAPDH		TUB2	
				Identi. (%)	Espécie	Ident. (%)	Espécie	Ident. (%)	Espécie
234F6F_AC	AC	Reserva	<i>H. guianensis</i>	98,9	<i>C.cliviae</i>	98,9	<i>C.cliviae</i>	98,4	<i>C.cliviae</i>
350F1F_AC	AC	Bonal	<i>H. brasiliensis</i>	99,4	<i>C.cliviae</i>	98,9	<i>C.cliviae</i>	98,4	<i>C.cliviae</i>
816F29F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,6	<i>C.cliviae</i>	98,4	<i>C.cliviae</i>	99,2	<i>C.cliviae</i>

ITS, região espaçadora interna transcrita do rDNA; TUB2, sequência parcial do gene que codifica a β -tubulina 2; GAPDH, sequência parcial do gene que codifica a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; ApMat, região espaçadora interna dos genes AP e MAT. AC, Acre; AM, Amazonas, Ident., Identidade.

Tabela 3. Fungos endofíticos do complexo *Colletotrichum boninense* isolados de folhas de *Hevea* spp. do Acre e do Amazonas

Código do Isolado	Estado	Local de coleta	Hospedeiro	ITS		GAPDH		TUB2		ApMat	
				Ident. (%)	Espécie	Ident. (%)	Espécie	Ident. (%)	Espécie	Ident. (%)	Espécie
5F7F_AC	AC	Reserva	<i>H. brasiliensis</i>	98,4	<i>C. oncidii</i>	SC	SC	97,6	<i>C. annellatum</i>	NA	NA
13F1F_AC	AC	Bonal	<i>H. brasiliensis</i>	99,6	<i>C. annellatum</i>	98,6	<i>C. citricola</i>	99,9	<i>C. karstii</i>	98,4	<i>C. melanocaulon</i>
132F1F_AC	AC	Bonal	<i>H. brasiliensis</i>	99,6	<i>C. annellatum</i>	98,6	<i>C. citricola</i>	99,9	<i>C. karstii</i>	NA	NA
370F1F_AC	AC	Bonal	<i>H. brasiliensis</i>	99,6	<i>C. annellatum</i>	98,6	<i>C. citricola</i>	99,9	<i>C. karstii</i>	SC	SC
381F1F_AC	AC	Bonal	<i>H. brasiliensis</i>	99,6	<i>C. annellatum</i>	98,6	<i>C. citricola</i>	99,7	<i>C. karstii</i>	SC	SC
395F1F_AC	AC	Bonal	<i>H. brasiliensis</i>	99,6	<i>C. annellatum</i>	98,6	<i>C. citricola</i>	99,9	<i>C. karstii</i>	SC	SC
341F29F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,3	<i>C. annellatum</i>	98,6	<i>C. citricola</i>	99,4	<i>C. karstii</i>	NA	NA
379F29F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	98,7	<i>C. annellatum</i>	98,6	<i>C. citricola</i>	99,9	<i>C. karstii</i>	SC	SC
591F21F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	97,8	<i>C. novae-zelandiae</i>	SC	SC	98,6	<i>C. annellatum</i>	NA	NA
129F6F_AC	AC	Reserva	<i>H. guianensis</i>	99,6	<i>C. annellatum</i>	98,6	<i>C. citricola</i>	99,9	<i>C. karstii</i>	NA	NA
343F3F_AC	AC	Xapuri	<i>H. guianensis</i>	97,7	<i>C. citricola</i>	SC	SC	98,4	<i>C. annellatum</i>	NA	NA
367F3F_AC	AC	Xapuri	<i>H. guianensis</i>	98,4	<i>C. oncidii</i>	SC	SC	97,6	<i>C. annellatum</i>	NA	NA
401F6F_AC	AC	Reserva	<i>H. guianensis</i>	97,8	<i>C. oncidii</i>	90,4	<i>C. colombiense</i>	SC	SC	NA	NA
406F6F_AC	AC	Reserva	<i>H. guianensis</i>	98,0	<i>C. novae-zelandiae</i>	SC	SC	97,6	<i>C. annellatum</i>	NA	NA
572F6F_AC	AC	Reserva	<i>H. guianensis</i>	97,8	<i>C. novae-zelandiae</i>	SC	SC	97,6	<i>C. annellatum</i>	NA	NA

ITS, região espaçadora interna transcrita do rDNA; **TUB2**, sequência parcial do gene que codifica a β -tubulina 2; **GAPDH**, sequência parcial do gene que codifica a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; **ApMat**, região espaçadora interna dos genes AP e MAT. **AC**, Acre; **AM**, Amazonas; **Ident**, identidade; **SC**, sem coincidências; **NA**, não amplificado.

Tabela 4. Fungos endofíticos do complexo *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de folhas de *Hevea* spp. do Acre e do Amazonas.

Código do isolado	Estado	Local de coleta	Hospedeiro	ITS		GAPDH		TUB2		ApMat	
				Ident. (%)	Espécie	Ident. (%)	Espécie	Ident. (%)	Espécie	Ident. (%)	Espécie
55F4F_AC	AC	Xapuri	<i>H. brasiliensis</i>	100,0	<i>C. fructicola</i>	98,3	<i>C. endomagniferae</i>	99,1	<i>C. aescychnomenes</i>	SC	SC
65F5F_AC	AC	Xapuri	<i>H. brasiliensis</i>	99,8	<i>C. endomagniferae</i>	98,3	<i>C. endomagniferae</i>	98,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
315F7F_AC	AC	Reserva	<i>H. brasiliensis</i>	100,0	<i>C. fructicola</i>	96,7	<i>C. viniferum</i>	99,6	<i>C. aenigma</i>	SC	SC
322F5F_AC	AC	Xapuri	<i>H. brasiliensis</i>	99,3	<i>C. endomagniferae</i>	98,3	<i>C. endomagniferae</i>	98,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
349F1F_AC	AC	Bonal	<i>H. brasiliensis</i>	99,8	<i>C. endomagniferae</i>	98,3	<i>C. endomagniferae</i>	SD	SD	SC	SC
373F4F_AC	AC	Xapuri	<i>H. brasiliensis</i>	100,0	<i>C. fructicola</i>	97,3	<i>C. viniferum</i>	99,0	<i>C. aescychnomenes</i>	NA	NA
383F4F_AC	AC	Xapuri	<i>H. brasiliensis</i>	100,0	<i>C. fructicola</i>	97,8	<i>C. endomagniferae</i>	97,3	<i>C. gloeosporioides</i>	SC	SC
384F4F_AC	AC	Xapuri	<i>H. brasiliensis</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	97,8	<i>C. endomagniferae</i>	99,4	<i>C. aescychnomenes</i>	SC	SC
405F5F_AC	AC	Xapuri	<i>H. brasiliensis</i>	99,8	<i>C. endomagniferae</i>	98,3	<i>C. endomagniferae</i>	98,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
407F7F_AC	AC	Reserva	<i>H. brasiliensis</i>	99,8	<i>C. endomagniferae</i>	98,3	<i>C. endomagniferae</i>	98,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
443F4F_AC	AC	Xapuri	<i>H. brasiliensis</i>	99,8	<i>C. fructicola</i>	97,8	<i>C. endomagniferae</i>	97,3	<i>C. gloeosporioides</i>	SC	SC
500F4F_AC	AC	Xapuri	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,3	<i>C. aescychnomenes</i>	SC	SC
618F4F_AC	AC	Xapuri	<i>H. brasiliensis</i>	99,6	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	97,3	<i>C. gloeosporioides</i>	SC	SC
636F1F_AC	AC	Bonal	<i>H. brasiliensis</i>	99,5	<i>C. fructicola</i>	98,3	<i>C. endomagniferae</i>	98,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
792F1F_AC	AC	Bonal	<i>H. brasiliensis</i>	98,8	<i>C. fructicola</i>	96,7	<i>C. viniferum</i>	99,4	<i>C. aenigma</i>	SC	SC
8F3F_AC	AC	Xapuri	<i>H. guianensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	97,6	<i>C. viniferum</i>	99,3	<i>C. aenigma</i>	SC	SC
62F3F_AC	AC	Xapuri	<i>H. guianensis</i>	99,5	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
67F10F_AC	AC	Boca do Acre	<i>H. guianensis</i>	99,3	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
344F3F_AC	AC	Xapuri	<i>H. guianensis</i>	100,0	<i>C. fructicola</i>	96,7	<i>C. viniferum</i>	99,4	<i>C. aenigma</i>	SC	SC
347F3F_AC	AC	Xapuri	<i>H. guianensis</i>	99,8	<i>C. fructicola</i>	97,8	<i>C. endomagniferae</i>	98,6	<i>C. aescychnomenes</i>	SC	SC
362F6F_AC	AC	Reserva	<i>H. guianensis</i>	99,8	<i>C. endomagniferae</i>	98,3	<i>C. endomagniferae</i>	98,0	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
368F3F_AC	AC	Xapuri	<i>H. guianensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	97,7	<i>C. viniferum</i>	99,1	<i>C. aenigma</i>	SC	SC
372F3F_AC	AC	Xapuri	<i>H. guianensis</i>	100,0	<i>C. fructicola</i>	97,8	<i>C. endomagniferae</i>	98,8	<i>C. aescychnomenes</i>	SC	SC
402F3F_AC	AC	Xapuri	<i>H. guianensis</i>	100,0	<i>C. fructicola</i>	97,8	<i>C. endomagniferae</i>	SD	SD	SC	SC
571F10F_AC	AC	Boca do Acre	<i>H. guianensis</i>	99,5	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
598F9F_AC	AC	Boca do Acre	<i>H. guianensis</i>	99,8	<i>C. endomagniferae</i>	99,1	<i>C. endomagniferae</i>	98,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
800F8F_AC	AC	Boca do Acre	<i>H. guianensis</i>	99,3	<i>C. endomagniferae</i>	97,6	<i>C. viniferum</i>	99,3	<i>C. aenigma</i>	SC	SC
805F3F_AC	AC	Xapuri	<i>H. guianensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
9F25F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,6	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
34F4F_AM	AM	Itacoatiara	<i>H. brasiliensis</i>	100,0	<i>C. fructicola</i>	98,3	<i>C. endomagniferae</i>	98,6	<i>C. aescychnomenes</i>	SC	SC
43F29F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
285F7F_AM	AM	Itacoatiara	<i>H. brasiliensis</i>	100,0	<i>C. asianum</i>	97,8	<i>C. siamense</i>	99,7	<i>C. asianum</i>	SC	SC

Tabela 4. (Continuação).

Código do isolado	Estado	Local de coleta	Hospedeiro	ITS		GAPDH		TUB2		ApMat	
				Ident. (%)	Espécie	Ident. (%)	Espécie	Ident. (%)	Espécie	Ident. (%)	Espécie
286F22F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,2	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
288F24F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
289F22F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	98,3	<i>C. endomagniferae</i>	99,6	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
292F27F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,5	<i>C. fructicola</i>	99,2	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
297F19F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	98,4	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
299F22F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,3	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
300F9F_AM	AM	Nova Olinda	<i>H. brasiliensis</i>	99,5	<i>C. fructicola</i>	99,1	<i>C. endomagniferae</i>	98,7	<i>C. murrayae</i>	NA	NA
304F25F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,5	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,6	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
306F22F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,2	<i>C. murrayae</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
310F10F_AM	AM	Nova Olinda	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	97,6	<i>C. viniferum</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
323F15F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	98,3	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
330F11F_AM	AM	Nova Olinda	<i>H. brasiliensis</i>	99,3	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
337F29F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,5	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
338F29F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
342F29F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,5	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
348F29F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,6	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
351F29F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
380F19F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
382F29F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,3	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
403F24F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,5	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
404F26F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,3	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
434F11F_AM	AM	Nova Olinda	<i>H. brasiliensis</i>	99,5	<i>C. fructicola</i>	99,1	<i>C. endomagniferae</i>	98,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
436F16F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,5	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
438F9F_AM	AM	Nova Olinda	<i>H. brasiliensis</i>	99,3	<i>C. fructicola</i>	99,1	<i>C. endomagniferae</i>	98,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
440F14F_AM	AM	Nova Olinda	<i>H. brasiliensis</i>	99,3	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,4	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
441F23F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
442F14F_AM	AM	Nova Olinda	<i>H. brasiliensis</i>	99,8	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,1	<i>C. aeschynomenes</i>	SC	SC
446F13F_AM	AM	Nova Olinda	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,3	<i>C. siamense</i>	SC	SC
448F13F_AM	AM	Nova Olinda	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
454F11F_AM	AM	Nova Olinda	<i>H. brasiliensis</i>	99,5	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
457F19F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,5	<i>C. fructicola</i>	98,2	<i>C. viniferum</i>	99,6	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
462F13F_AM	AM	Nova Olinda	<i>H. brasiliensis</i>	99,4	<i>C. murrayae</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	98,2	<i>C. gloeosporioides</i>	SC	SC
463F9F_AM	AM	Nova Olinda	<i>H. brasiliensis</i>	99,4	<i>C. murrayae</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
466F10F_AM	AM	Nova Olinda	<i>H. brasiliensis</i>	99,5	<i>C. fructicola</i>	99,1	<i>C. endomagniferae</i>	98,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
471F10F_AM	AM	Nova Olinda	<i>H. brasiliensis</i>	99,4	<i>C. murrayae</i>	97,6	<i>C. viniferum</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC

Tabela 4. (Continuação).

Código do isolado	Estado	Local de coleta	Hospedeiro	ITS		GAPDH		TUB2		ApMat	
				Ident. (%)	Espécie	Ident. (%)	Espécie	Ident. (%)	Espécie	Ident. (%)	Espécie
475F17F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,8	<i>C. queenstandium</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	98,3	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
478F5F_AM	AM	Itacoatiara	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
481F4F_AM	AM	Itacoatiara	<i>H. brasiliensis</i>	99,8	<i>C. fructicola</i>	98,3	<i>C. endomagniferae</i>	98,0	<i>C. aeschynomenes</i>	SC	SC
483F24F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,5	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
499F18F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	100,0	<i>C. asianum</i>	97,0	<i>C. siamense</i>	97,6	<i>C. asianum</i>	NA	NA
503F14F_AM	AM	Nova Olinda	<i>H. brasiliensis</i>	99,5	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,4	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
511F19F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	98,2	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
516F17F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,5	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
527F13F_AM	AM	Nova Olinda	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	99,2	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
529F24F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,4	<i>C. murrayae</i>	99,1	<i>C. viniferum</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
545F27F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	98,6	<i>C. fructicola</i>	99,1	<i>C. viniferum</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
560F17F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,4	<i>C. murrayae</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,3	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
576F13F_AM	AM	Nova Olinda	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
577F22F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,3	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
578F15F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	100,0	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,7	<i>C. aeschynomenes</i>	SC	SC
579F22F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	98,3	<i>C. endomagniferae</i>	99,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
583F22F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,3	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
590F9F_AM	AM	Nova Olinda	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
608F29F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
611F9F_AM	AM	Nova	<i>H. brasiliensis</i>	99,5	<i>C. fructicola</i>	99,1	<i>C. endomagniferae</i>	98,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
613F17F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,6	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
654F24F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
660F22F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,3	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,6	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
665F29F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,3	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,6	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
670F14F_AM	AM	Nova	<i>H. brasiliensis</i>	99,5	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,7	<i>C. siamense</i>	SC	SC
673F13F_AM	AM	Nova	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
676F14F_AM	AM	Nova	<i>H. brasiliensis</i>	99,5	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	98,3	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
680F15F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,2	<i>C. murrayae</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
707F17F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,4	<i>C. murrayae</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
719F17F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,5	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
725F25F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
736F17F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,3	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
783F21F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	100,0	<i>C. fructicola</i>	99,1	<i>C. endomagniferae</i>	99,7	<i>C. aeschynomenes</i>	SC	SC
784F29F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,7	<i>C. fructicola</i>	98,7	<i>C. endomagniferae</i>	99,4	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
788F27F_AM	AM	Coari	<i>H. brasiliensis</i>	99,3	<i>C. fructicola</i>	99,6	<i>C. endomagniferae</i>	99,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC

ITS, região espaçadora interna transcrita do rDNA; TUB2, sequência parcial do gene que codifica a β-tubulina 2; GAPDH, sequência parcial do gene que codifica a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; ApMat, região espaçadora interna dos genes AP e MAT. AC, Acre; AM, Amazonas, Ident, identidade; SC, sem coincidências; NA, não amplificado.

Tabela 5. Fungos endofíticos do complexo *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de caule e raiz de *Hevea* spp. do Acre e do Amazonas.

Código do Isolado	Região	Local de coleta	Hospedeiro	Tecido da planta	ITS		GAPDH		TUB2		ApMat	
					Ident. (%)	Espécie	Ident. (%)	Espécie	Ident. (%)	Espécie	Ident. (%)	Espécie
336F12R_AC	AC	Cruzeiro	<i>H. brasiliensis</i>	Raiz	99,5	<i>C. fructicola</i>	98,3	<i>C. endomagniferae</i>	98,9	<i>C. murrayae</i>	SC	SC
218F3C_AC	AC	Xapuri	<i>H. guianensis</i>	Caule	99,8	<i>C. fructicola</i>	SC	SC	99,3	<i>C. aenigma</i>	99,5	<i>C. fructicola</i>
435F9C_AM	AM	Nova Olinda	<i>H. brasiliensis</i>	Caule	99,5	<i>C. fructicola</i>	99,1	<i>C. endomagniferae</i>	98,7	<i>C. murrayae</i>	SC	SC

ITS, região espaçadora interna transcrita do rDNA; **TUB2**, sequência parcial do gene que codifica a β -tubulina 2; **GAPDH**, sequência parcial do gene que codifica a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; **ApMat**, região espaçadora interna dos genes AP e MAT. **AC**, Acre; **AM**, Amazonas, **Ident**, identidade; **SC**, sem coincidências.

Por meio da análise das sequências, determinou-se que os isolados têm identidade com 37 das 160 espécies tipo revisadas por Hyde et al. (2014). Para a região ITS a maioria dos isolados foi identificada como *C. murrayae* e *C. clidemiae*; para a região GAPDH como *C. endomagniferae*; para a região TUB2 como *C. siamense* e *C. murrayae* e para a região ApMat como *C. salsolae*.

Para a análise filogenética foram usadas unicamente sequências de alta qualidade corroborada pelo eletroferograma, sem ambiguidades na formação das sequências consenso, sendo que todos os isolados tinham pelo menos duas sequências com alta qualidade. Porém, o isolado 401F6F_AC não foi incluso nas análises porque as suas sequências não puderam ser alinhadas com as outras sequências. Para todas as regiões gênicas foram eliminadas as sequências repetidas, isto é, com 100% de identidade, apresentando-se nas árvores geradas um representante para cada grupo de sequências idênticas.

Para a região ITS um total de 636 nucleotídeos foram alinhados, dos quais 455 foram conservados, 153 foram sítios variáveis, 93 foram informativos para a parcimônia e 59 foram *singletons*. Para a região GAPDH, um total de 300 nucleotídeos foram alinhados, dos quais 94 foram conservados, 189 sítios foram variáveis, 137 foram informativos para parcimônia e 51 foram *singletons*. Para a região TUB2, um total de 771 nucleotídeos foram alinhados, dos quais 394 foram conservados, 351 foram sítios variáveis, 250 foram informativos para parcimônia e 771 foram *singletons*. Para a região ApMat, um total de 935 nucleotídeos foram alinhados, dos quais 561 foram conservados, 347 foram sítios variáveis, 171 foram informativos para a parcimônia e 174 foram *singletons*.

A análise bayesiana, de máxima parcimônia e de máxima verossimilhança para as regiões ITS, GAPDH e TUB2 resultou na formação de três grupos bem diferenciados (Anexos 3-8; Figura 1-3). Um grupo foi formado pelos isolados identificados como *C. cliviae* na tabela 2, suportado

robustamente com valores de probabilidade *a posteriori* (PP) de 1,00 e de *bootstrap* (BS) superiores a 99. O segundo grupo foi formado com a espécie tipo *C. boninense* junto com 15 isolados deste estudo, fortemente suportados com valores de PP de 1,00 e BS superiores a 95, nas árvores das sequências das regiões GAPDH e TUB2. Porém, apresentando valores menores de PP e BS nas árvores da região ITS.

O terceiro grupo foi robustamente formado com a espécie tipo *C. gloeosporioides* suportado por valores de PP maiores a 0,90 nas árvores de todas as regiões sequenciadas e BS maior que 83 nas regiões de ITS, GAPDH e ApMat. No entanto, para a região TUB2, o suporte foi menor; de 91,5 com o método de máxima parcimônia e de 61,0 para o método de máxima verossimilhança (Anexos 3-10; Figura 1-4). Estes resultados corroboram a identificação dos isolados como pertencentes à espécie *C. cliviae*, ao complexo *C. boninense* e ao complexo *C. gloeosporioides*.

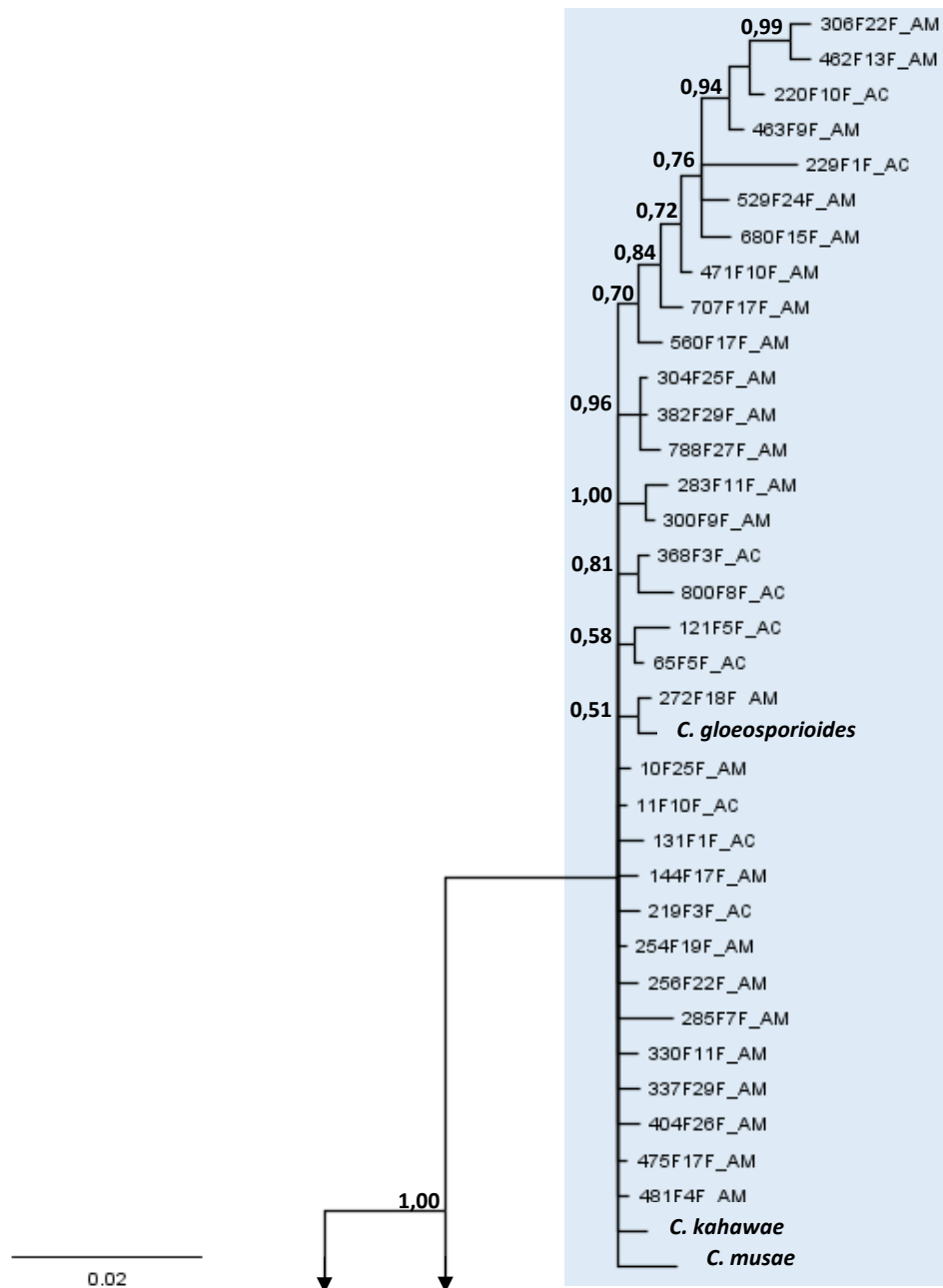


Figura 1. Árvore de espécies de inferência bayesiana para a região ITS. Os números presentes em cada nó representam as probabilidades a posteriori. Cor rosa: Grupo *Colletotrichum cliviae*; cor amarelo: grupo do complexo *Colletotrichum boninense*; cor azul: grupo do complexo *Colletotrichum gloeosporioides*.

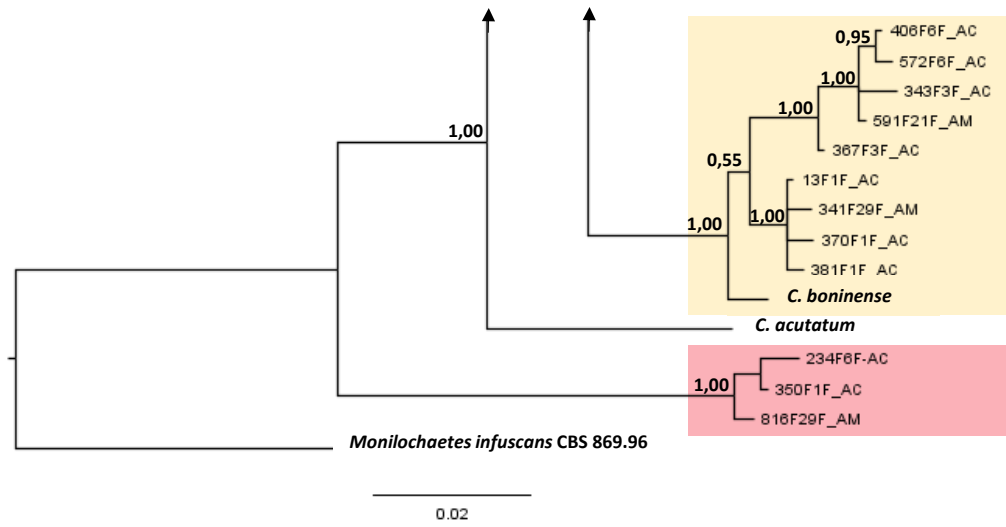


Figura 1. (Continuação)

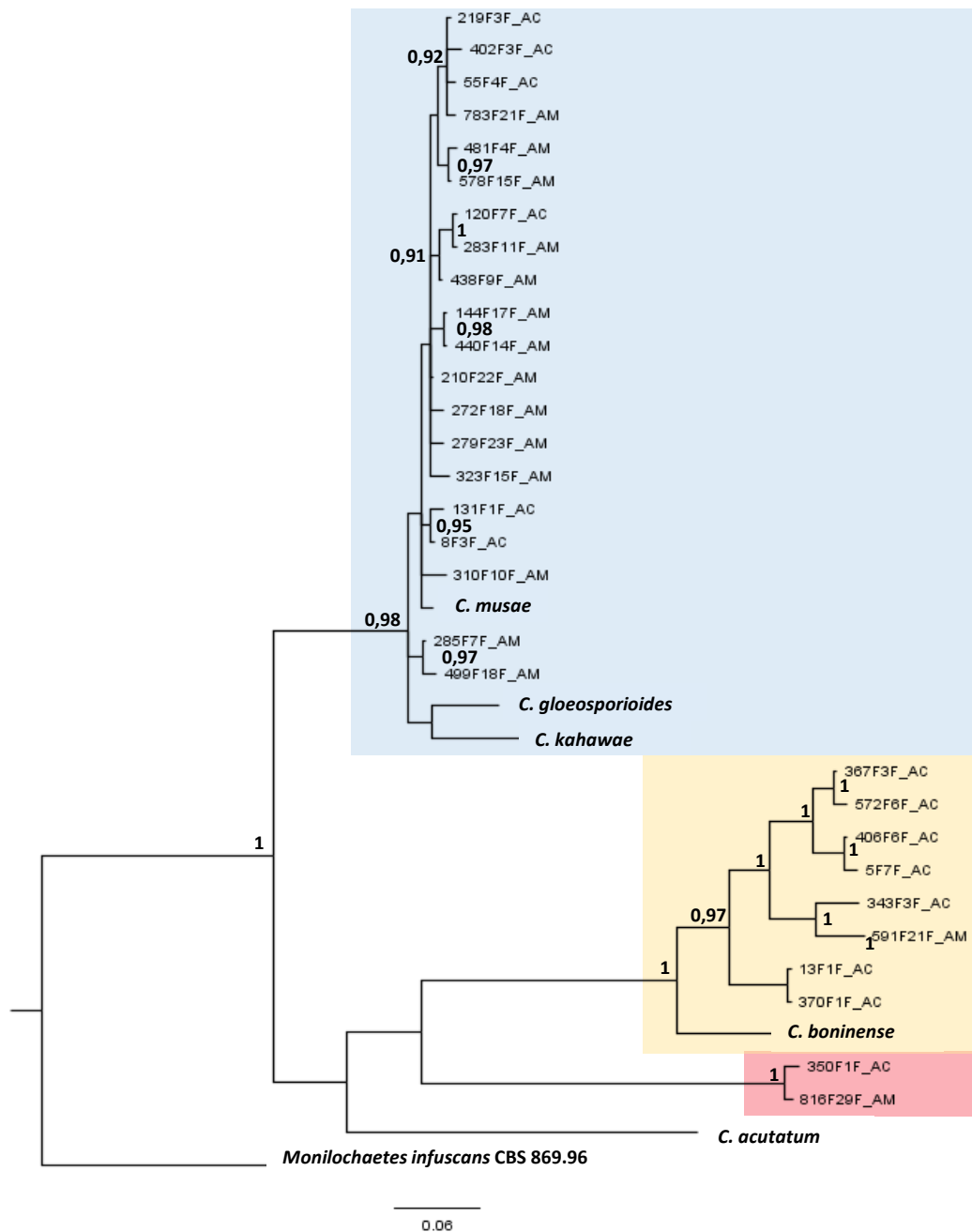
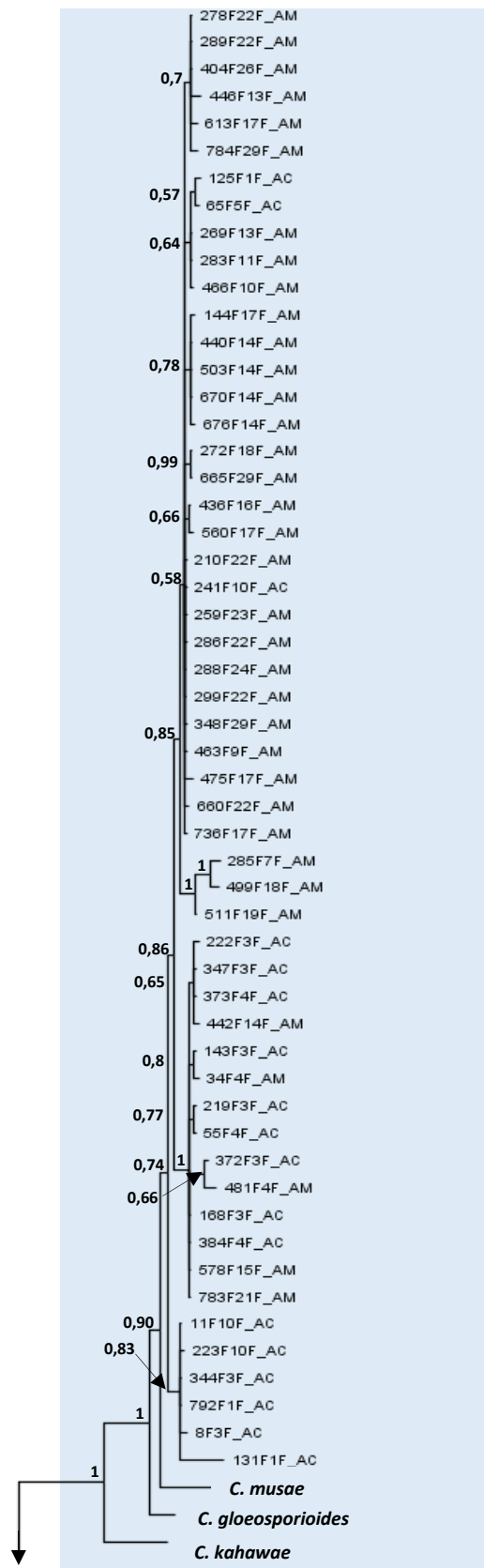


Figura 2. Árvore de espécies de inferência bayesiana para a região GAPDH. Os números presentes em cada nó representam as probabilidades *a posteriori*. Cor rosa: Grupo *Colletotrichum cliviae*; cor amarelo: grupo do complexo *Colletotrichum boninense*; cor azul: grupo do complexo *Colletotrichum gloeosporioides*.

Figura 3. Árvore de espécies de inferência bayesiana para a região TUB2. Os números presentes em cada nó representam as probabilidades a posteriori. Cor rosa: Grupo *Colletotrichum cliviae*; cor amarela: grupo do complexo *Colletotrichum boninense*; cor azul: grupo do complexo *Colletotrichum gloeosporioides*.

0.03



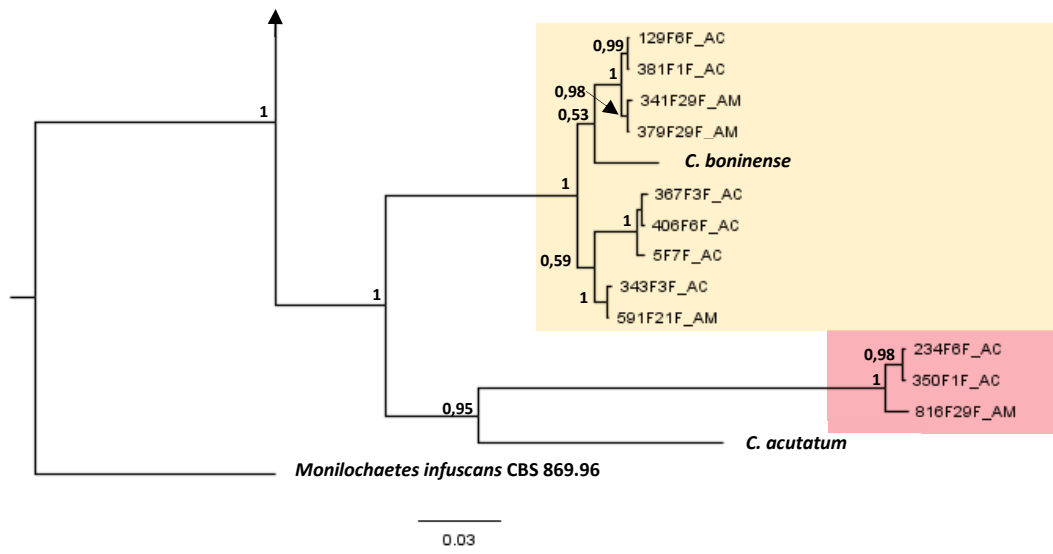


Figura 3. (Continuação)

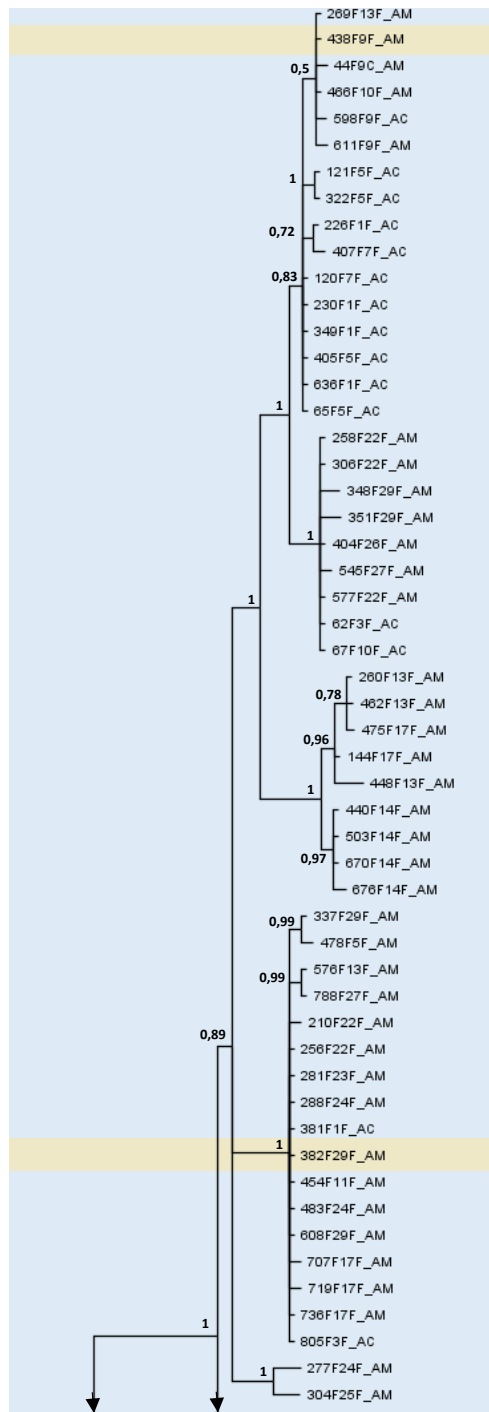


Figura 4. Árvore de espécies de inferência bayesiana para a região ApMat. Os números presentes em cada nó representam as probabilidades a *posteriori*. Cor amarela: grupo do complexo *Colletotrichum boninense*; cor azul: grupo do complexo *Colletotrichum gloeosporioides*.

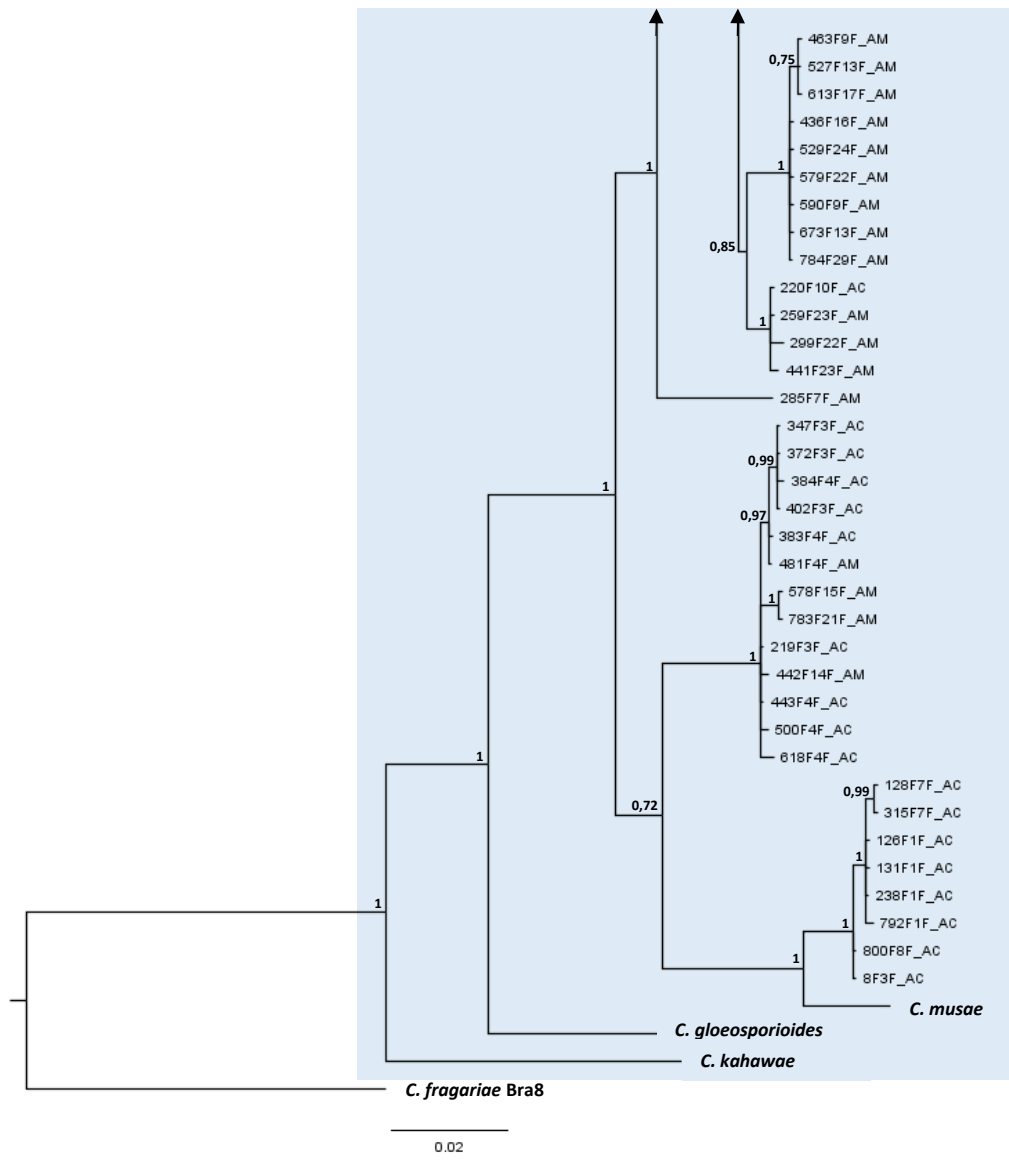


Figura 4. (Continuação)

Embora a árvore de ApMat represente os isolados do complexo *C. gloeosporioides*, os isolados 381F1F_AC e 13F1F_AC (representado pelo isolado 381F1F_AC na árvore) do complexo *C. boninense* amplificaram essa região. Os isolados 300F9F_AM e 499F18F_AM que pertencem ao complexo *C. gloeosporioides* não amplificaram a referida região. Excluindo esses isolados, nem os isolados identificados como *C. cliviae*, nem os do complexo *C. boninense* amplificaram a região ApMat (Tabelas 2 e 3).

A maioria dos isolados estudados foi obtida de tecidos de folhas, no entanto três isolados identificados dentro do complexo *C. gloeosporioides* foram isolados de tecidos de caule e raiz (Tabela 5). O isolado 218F3C_AC foi isolado de tecidos de caule de *H. brasiliensis*, o isolado 435F9C_AM foi isolado de tecidos de caule de *H. guianensis* e o isolado 336F12R_AC foi isolado de tecidos de raiz de *H. brasiliensis*.

3.2. Análise da diversidade genética por meio do marcador IRAP

Um total de 28 locos foram amplificados para os 176 isolados estudados, em perfis reproduzíveis em todos os casos. Desses locos, 96,4% foram polimórficos em 108 haplótipos dos quais 77 foram *singletons*. Nos isolados de *C. cliviae* observou-se diferenciação genética em relação ao local de coleta e não com relação à espécie hospedeira, dado que o perfil de bandas dos isolados 350F1F_AC e 234F6F_AC do Acre, que eram provenientes de *H. brasiliensis* e *H. guianensis*, respectivamente, foram iguais, e esses perfis foram diferentes do perfil do isolado 816F29F_AM proveniente do Amazonas (Figura 5). Esses três isolados não foram considerados nas subseqüentes análises por apresentarem haplótipos únicos e ter uma baixa representação.

A diversidade genética das espécies dos complexos *C. boninense* e *C. gloeosporioides* foi analisada quanto ao local de coleta e à espécie hospedeira (Tabela 6). Os isolados do complexo *C. boninense* apresentaram maior diversidade, representada nos números efetivos Hill

N1 e Hill N2, quando associados a *H. guianensis*, contrário aos isolados do complexo *C. gloeosporioides* que foram mais diversos quando associados a *H. brasiliensis*. Com relação ao local de coleta os resultados também foram diferentes, já que os isolados do complexo *C. boninense* foram mais diversos no Acre e os isolados de *C. gloeosporioides* foram mais diversos no Amazonas (Tabela 6). Dado que o número efetivo de Hill N1 representa as espécies “comuns” e o número efetivo de Hill N1 representa as espécies “abundantes” (Hill, 1973), de modo geral, no complexo *C. boninense* observou-se tanto espécies comuns quanto espécies abundantes nas duas plantas hospedeiras e no Amazonas, diferente do Acre, onde as espécies foram mais abundantes. Pelo contrário, no complexo *C. gloeosporioides* em todos os casos as espécies foram mais comuns do que abundantes (Tabela 6).

Contudo, para esses mesmos isolados, com a análise de AMOVA determinou-se que não houve evidência de diferenciação genética em relação ao local de coleta e em relação à espécie hospedeira, dado que apenas 4,27% da variância total se deveu a diferenças entre estados e 4,04% se deveu a diferenças entre espécies hospedeiras (Anexo 11). Também não foram observadas diferenças significativas na distribuição da frequência de haplótipos quanto à espécie hospedeira (Teste exato de Fisher: $P > 0,05$). No entanto, determinou-se que a distribuição da frequência variou com o local de coleta (Teste exato de Fisher: $P < 0,05$) (Anexo 12).

Tabela 6. Índices de diversidade estimada para os haplótipos de isolados de *Colletotrichum* spp. endofíticos de *Hevea* spp. no Acre e no Amazonas.

		N	Shannon-Wiener (H') (Lm _i -Lm _s)	Simpson (1-D) (Lm _i -Lm _s)	Hill N1 (Lm _i -Lm _s)	Hill N2 (Lm _i -Lm _s)
Complexo	<i>H. brasiliensis</i>	6	1,02 - 1,47	0,22 - 0,45	2,92 - 4,01	2,48 - 3,52
	<i>H. guianensis</i>	6	1,60 - 1,98	0,10 - 0,23	5,36 - 6,64	5,32 - 6,68
<i>C. boninense</i> *	Acre	12	1,98 - 2,21	0,11 - 0,17	7,54 - 8,71	6,57 - 7,83
	Amazonas	3	0,76 - 1,43	0,13 - 0,53	2,33 - 3,67	2,32 - 3,68
Complexo	<i>H. brasiliensis</i>	31	2,60 - 2,70	0,08 - 0,09	13,65 - 14,63	11,33 - 12,40
	<i>H. guianensis</i>	27	2,44 - 2,54	0,09 - 0,10	11,56 - 12,48	10,10 - 11,03
<i>C. gloeosporioides</i> *	Acre	58	2,99 - 3,04	0,05 - 0,06	20,00 - 20,79	17,11 - 17,93
	Amazonas	99	4,11 - 4,14	0,02 - 0,02	61,42 - 62,73	48,97 - 50,53

O limite inferior (lado esquerdo) e superior (lado direito) dos índices de diversidade (Lm_i-Lm_s) apresentam intervalos de 95% de confiança, com 1.000 pseudoreplicas de bootstrap para o erro padrão. **N**, tamanho da amostra.

*Os cálculos dos índices para os isolados obtidos de cada espécie hospedeira foram feitos para isolados somente do Acre.

Nas análises de agrupamento, observou-se a formação de grupos indistintos da espécie de *Hevea*, no entanto, alguns grupos foram formados por isolados do mesmo complexo de espécies e do mesmo local de coleta. Os isolados identificados como *C. cliviae* do Acre, foram agrupados e separados do outro isolado de *C. cliviae* do Amazonas, e isolados do complexo *C. gloeosporioides* também conformaram alguns grupos de acordo ao local de coleta. Igualmente, alguns dos isolados do complexo *C. boninense* foram agrupados e separados em dois grupos e os isolados 591F21F_AM, 379F29F_AM, 367F3F_AC, 343F3F_AC e 13F1F_AC foram agrupados com isolados do complexo *C. gloeosporioides* (Figura 6).

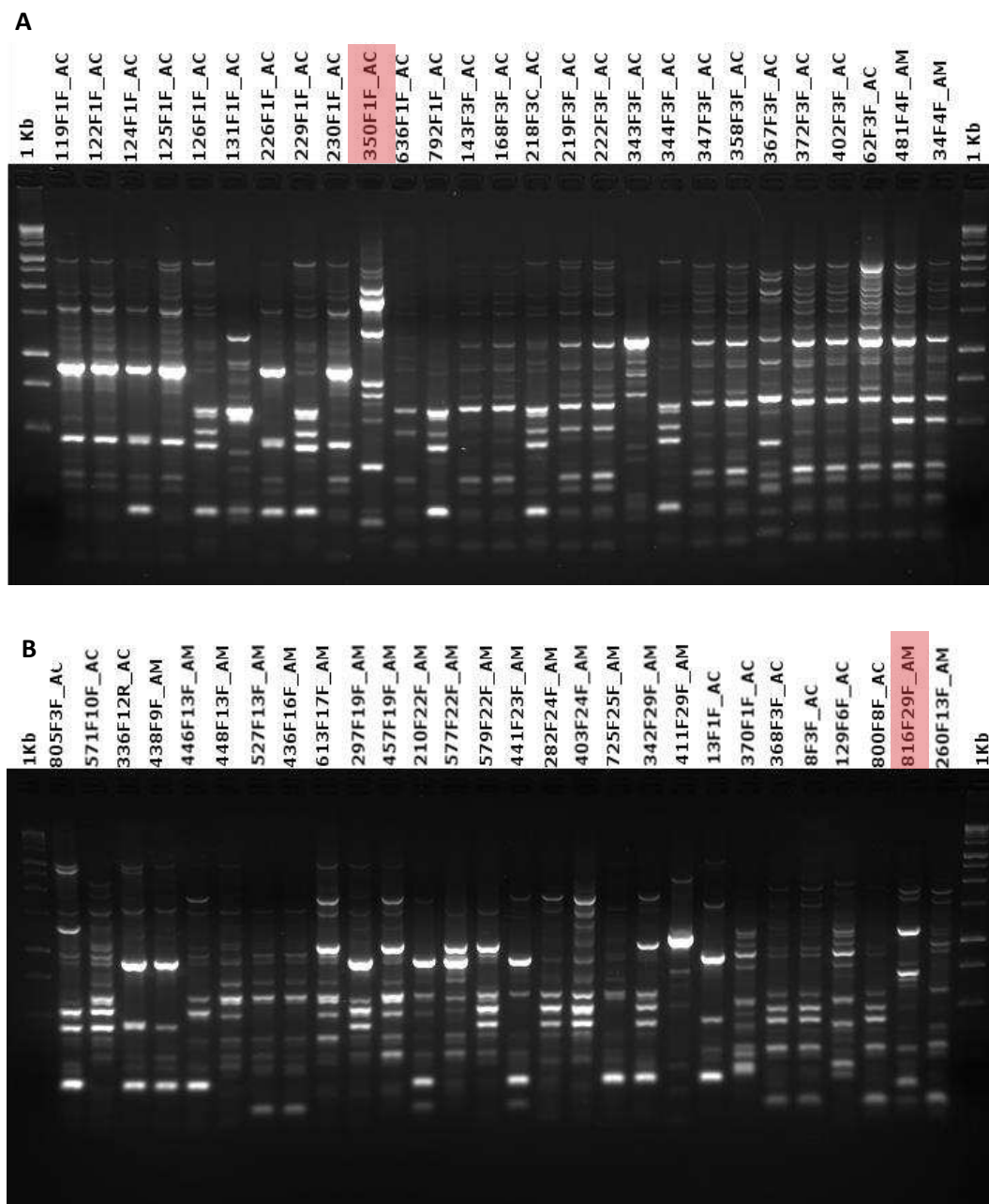


Figura 5. Perfil eletroforético de amplificação do DNA de isolados de *Colletotrichum* spp. gerado por meio da técnica IRAP. Os isolados 350F1F_AC (**A**) e 816F29F_AM (**B**) de *C. cliviae*, marcados em vermelho, foram isolados no Acre (AC) e no Amazonas (AM), respectivamente.

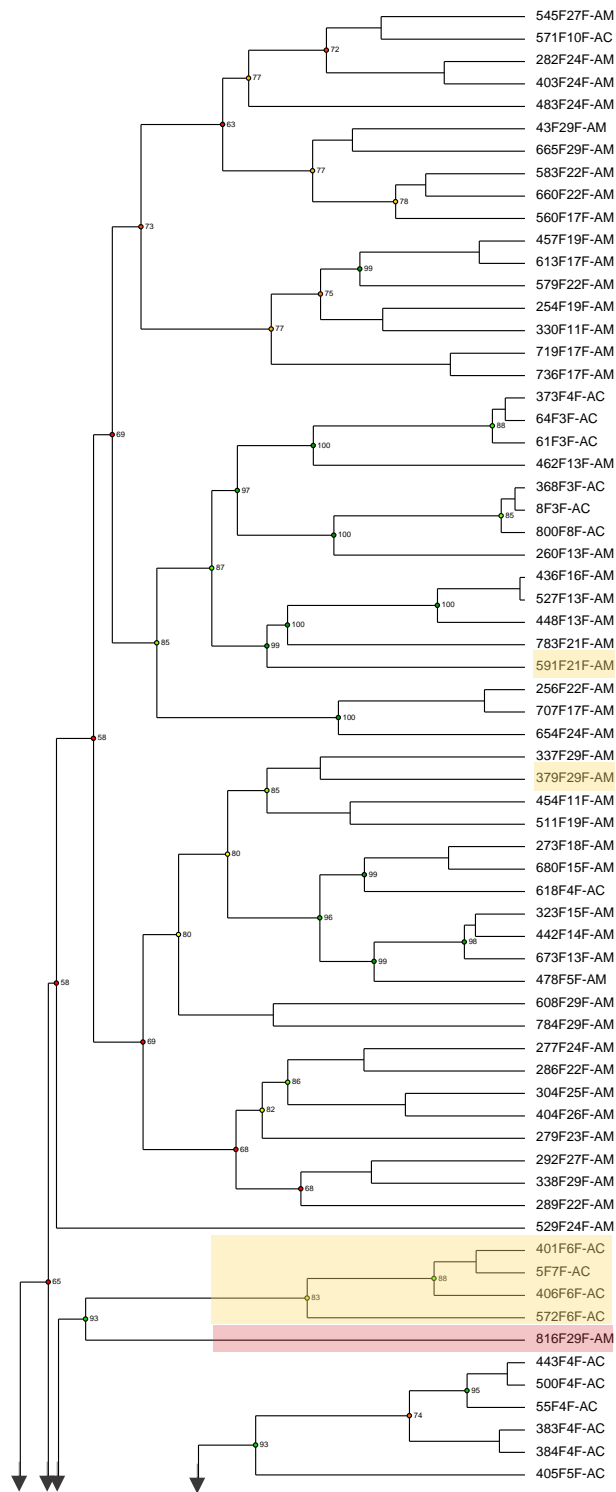


Figura 6. Dendrograma de distância genética baseada nos locos obtidos por meio de IRAP. O dendrograma foi construído pelo método UPGMA com o coeficiente de correlação de Pearson e 6% de tolerância. Cor amarela, complexo *Colletotrichum boninense*; Cor rosa, *Colletotrichum cliviae*.

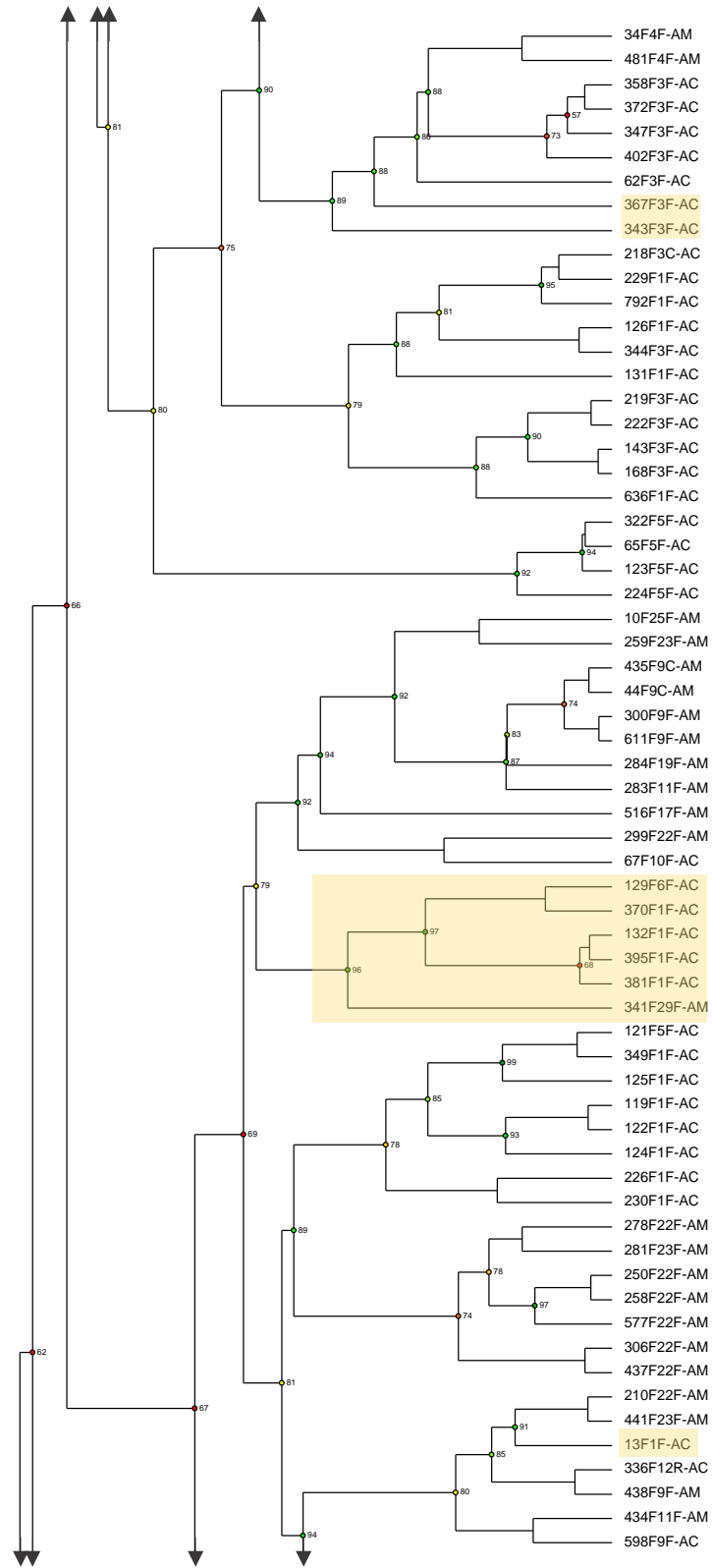


Figura 6. (Continuação).

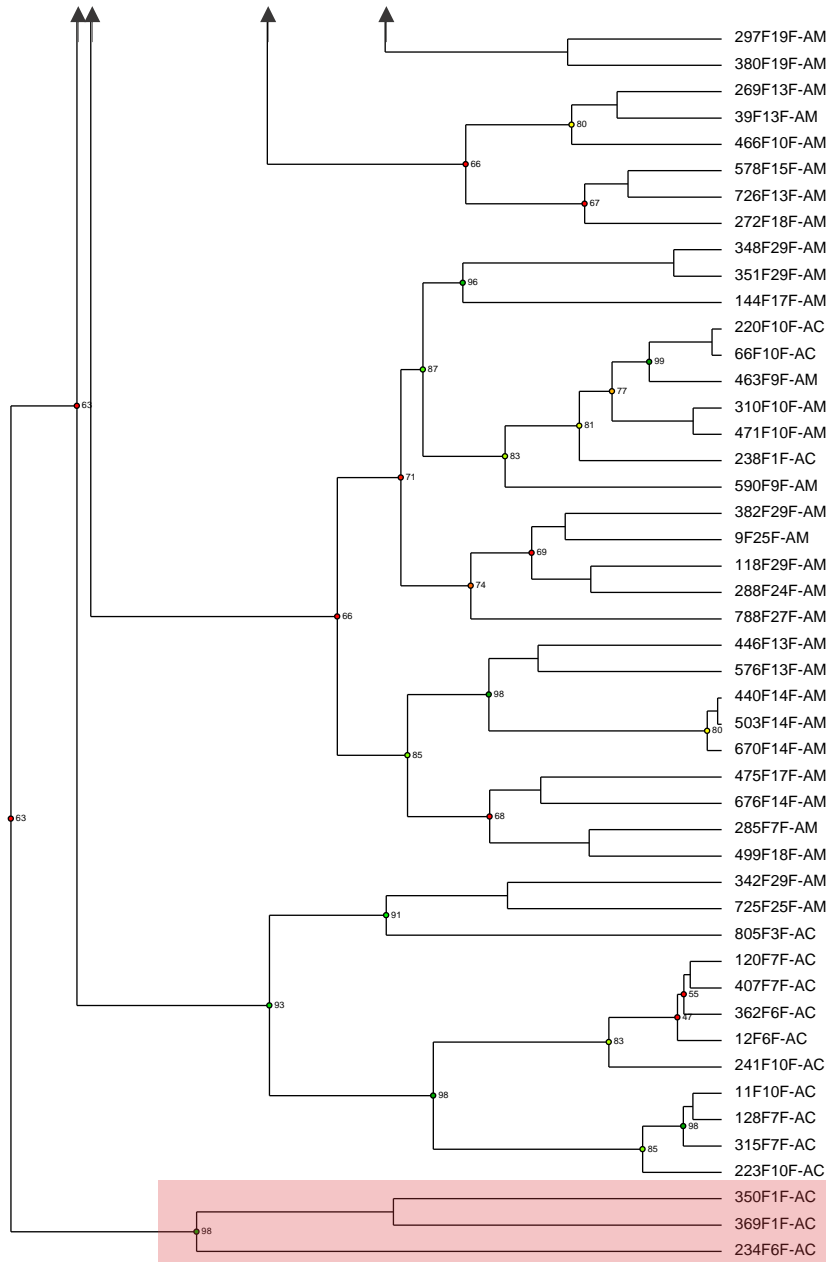


Figura 6. (Continuação).

4. Discussão

Fungos endofíticos existem em plantas herbáceas e lenhosas produzindo compostos bioativos (Hyde e Soyton, 2008). Conhecer essas comunidades de endofíticos associadas a plantas, em particular aquelas em plantas silvestres de ecossistemas nativos como a floresta amazônica, é importante para o entendimento das relações de plantas e micro-organismos e dos micro-organismos associados. Contudo, quando essas comunidades são estudadas, diante da possibilidade de novas espécies serem descritas, são necessários procedimentos acurados de estudo e identificação, que também sejam eficientes, dado o alto número de isolados que podem ser obtidos.

No caso de comunidades de fungos endofíticos cultiváveis, representantes do gênero *Colletotrichum* são frequentemente isolados por crescerem facilmente em meios de cultivo usados rotineiramente (Abang et al., 2009). Para selecionar unicamente os isolados representativos do local estudado, o uso de caracteres morfológicos pode ser ambíguo, dado que o gênero *Colletotrichum* apresenta espécies crípticas e que vários desses caracteres são observados indistintamente nas diferentes espécies (Cannon et al., 2012; Weir et al., 2012). Nesse cenário, uma abordagem com ferramentas moleculares oferece a possibilidade de identificar fielmente novos isolados.

Neste estudo, foi estudada a diversidade de espécies do gênero *Colletotrichum* isoladas como endofíticas de seringueiras silvestres da floresta amazônica. Especificamente, foram estudados 176 isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas, caule e raízes de *H. brasiliensis* e *H. guianensis*. O interesse principal foi então garantir a representatividade dos isolados a serem descritos como pertencentes à comunidade fúngica associada a *Hevea* spp. no seu centro de origem, que é a região Amazônica (Souza Gonçalves et al., 1990). Nessa perspectiva, foram escolhidas para serem sequenciadas duas regiões não codificadoras (a ITS do rDNA e

ApMat do cDNA), e duas sequências parciais de dois genes codificadores (sequência parcial do gene que codifica a β -tubulina 2 e sequência parcial do gene que codifica a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) que permitiram compreender os relacionamentos filogenéticos dos isolados obtidos. Somado a isso, foi utilizado o marcador IRAP para avaliar a variabilidade genética que pode-se apresentar abaixo do nível de espécie quando identificadas pelo método de GCPSR (Taylor et al., 2000). Finalmente, foi analisada a concordância entre os agrupamentos feitos pelos dois métodos moleculares utilizados.

Antes de estudar os relacionamentos filogenéticos dos isolados de *Colletotrichum* spp., as sequências consenso foram comparadas com as sequências dos isolados tipificados depositadas no GenBank. Não foram incluídas nos resultados as análises feitas com todas as sequências depositadas no GenBank porque foram encontrados erros nos nomes das espécies. Observou-se que o uso das sequências como *barcodes* foi útil unicamente para a identificação de três isolados como pertencentes à espécie *C. cliviae*, visto que com os outros isolados foi possível a identificação somente ao nível de complexo. Isto é explicado por Weir et al. (2012) pelo fato de várias espécies de um mesmo complexo apresentarem sequências idênticas para a região ITS como *C. fructicola* e *C. siamense*, e que para diferenciar espécies como *C. fructicola* de *C. alienum* e *C. aeschynomenes* de *C. siamense* é preciso a sequência da glutamina sintetase (GS).

Algumas sequências dos isolados nas regiões GAPDH e ApMat não apresentaram coincidências quando comparados com as sequências da espécie tipo no GenBank. Para as sequências de ApMat isso pode ser devido ao fato que a maioria das espécies tipificadas não possuem essa região sequenciada, não obstante numa análise concatenada com outras sequências poderia se determinar a relação com as espécies tipo que tem a sequência e não foram ainda consideradas como espécies reconhecidas do gênero *Colletotrichum* na revisão de Hyde et al. (2014). Os isolados que

não apresentaram coincidências na região GAPDH (5F7F_AC, 401F6F_AC, 406F6F_AC, 572F6F_AC e 591F21F_AM) pertencem ao complexo *C. boninense* e tem que ser comparados com sequências de novas espécies reportadas depois da revisão de Hyde et al. (2014), antes de serem considerados como possíveis isolados de espécies não descritas.

Nas análises filogenéticas foram identificados três grupos fortemente suportados pelos valores de *bootstrap* e probabilidade *a posteriori* nas árvores de todas as regiões estudadas. Na maioria dos casos, os valores de probabilidade *a posteriori* das árvores de inferência bayesiana foram consistentes com os valores de *bootstrap* das análises de máxima parcimônia e máxima verossimilhança, e a topologia das árvores foi similar, o que indica que os dados têm sinal filogenético.

Por outro lado, observou-se também que a árvore da região ITS diferenciou claramente os complexos, mas só nas árvores das outras regiões estudadas foram observados *clados* fortemente suportados dentre esses complexos, especialmente com a região ApMat. Os *primers* para amplificar esta região foram desenhados para identificar espécies dentro do complexo *C. gloeosporioides*, razão pela qual não houve amplificação desta região a partir do DNA de isolados de outros complexos (Silva et al., 2012). Não obstante, a região ApMat foi amplificada em dois isolados do complexo *C. boninense*, possivelmente porque os complexos *C. boninense* e *C. gloeosporioides* são *clados* que compartilham um ancestral comum (Cannon et al., 2012).

Desde que Silva et al. (2012) sugeriram o uso da região entre os genes Ap e MAT1-2-1, esta região tem sido usada em outros estudos junto com outras seis regiões, para identificar espécies dentro do complexo *C. siamense sensu lato*, que inclui as espécies *C. jasmini-sambac*, *C. hymenocallidis*, *C. melanocaulon*, *C. siamense sensu stricto* e *C. communis*. Os resultados observados demonstraram que a região ApMat,

junto com outros dois genes, pode ser utilizado para diferenciar espécies dentro do complexo *C. gloeosporioides* (Sharma et al. 2013; 2015).

A diversidade genética observada nas análises filogenéticas também foi observada nas análises feitas com os haplótipos amplificados com o marcador IRAP. Dos 176 isolados de *Colletotrichum* spp. estudados, apenas três foram considerados duplicados por apresentarem sequências e haplótipos de IRAP idênticos aos apresentados por outros isolados do mesmo ponto de coleta e tecido da planta. Além desses três isolados, 18 isolados também apresentaram sequências idênticas às apresentadas por outros isolados, porém apresentavam haplótipos de IRAP diferentes. Esses resultados mostram que em torno de 97% dos isolados apresentam variabilidade genética nas regiões sequenciadas e na análise de IRAP, sendo eles provenientes até de um mesmo tecido ou ponto de coleta. Esses resultados corroboram que o marcador IRAP pode revelar variabilidade genética embaixo do nível de espécie (Weir et al., 2012; Sharma et al. 2015) e evidencia a alta variabilidade genética de espécies de *Colletotrichum* como já foi relatado para espécies endofíticas de árvores florestais da reserva Iwokrama na Guiana (Lu et al. 2004).

O marcador molecular IRAP é vantajoso no estudo de variabilidade genética de *Colletotrichum* spp. pelo fato de que eles se baseiam em elementos transponíveis e marcadores desse tipo são capazes de detectar grandes mudanças no genoma (Kalendar e Schulman, 2006). Essas mudanças são relacionadas com atividades de transposição, pois cada evento de transposição gera um polimorfismo, que é útil na avaliação da variabilidade intraespecífica (Grzebeleus, 2006).

Com os haplótipos amplificados com o marcador IRAP também foi analisada a diversidade genética quanto à espécie hospedeira e ao local de coleta. Nos três isolados de *C. cliviae* observou-se diferenciação genética em relação ao local de coleta e não com relação à espécie hospedeira. Não obstante, com a análise de AMOVA para os complexos de

espécies *C. boninense* e *C. gloeosporioides*, determinou-se que não houve evidência de diferenciação genética em relação ao local de coleta e em relação à espécie hospedeira. Esses resultados mostram que os isolados neste estudo não apresentam especificidade pelo hospedeiro como já tinha sido reportado por Gazis et al. (2011) para isolados endofíticos das mesmas duas espécies de seringueira no Peru e por Lu et al. (2004) para espécies endofíticas de árvores florestais na Guiana.

Quanto aos índices de diversidade os isolados do complexo *C. boninense* apresentaram maior diversidade, quando associados a *H. guianensis* e quando foram provenientes do Acre, diferindo dos isolados do complexo *C. gloeosporioides* que foram mais diversos quando associados a *H. brasiliensis* e quando foram provenientes do Amazonas. Também foram observadas estimativas de diversidade para *C. gloeosporioides* maiores do que para *C. boninense* em todos os casos com estimativas de Shannon de até 4,14 e do número efetivo de Hill N1 de 62. Estes resultados mostram uma diversidade genética alta, dado que de acordo com Gazis e Chaverri (2010) os valores do índice de Shannon usualmente apresentam um intervalo entre 1,5 e 3,5, sendo esse último valor considerado como uma alta diversidade. Esses valores altos podem ser explicados pelo fato dos haplótipos usados para calcular os índices de diversidade terem sido obtidos por IRAP, técnica que mostra a variabilidade genética abaixo do nível de espécie e pela origem dos isolados, que são provenientes de plantas silvestres no centro da origem da espécie. A alta variabilidade genética pode explicar a plasticidade desse gênero de fungos para se associar com diferentes hospedeiros ao redor do mundo, devido a suas populações terem uma alta diversidade de recursos genéticos que pode aumentar seu potencial para evoluir (McDonald, 1997).

Nas análises de agrupamento, observou-se a formação de grupos indistintos da espécie de *Hevea*, no entanto, alguns grupos foram formados por isolados do mesmo complexo de espécies e do mesmo local de coleta. Igualmente, com o teste exato de Fisher determinou-se que a distribuição

da frequência de haplótipos variou só com o local de coleta. Esses resultados mostram mais uma vez que os isolados deste estudo não apresentam especificidade pelo hospedeiro, mas que em alguns casos, as diferenças reveladas nas análises do padrão de bandas forneceram indicadores fiáveis de ascendência filogenética e de limites geográficos, mas não em todos, já que é analisado tudo o genoma e não uma região informativa (Bridge e Arora, 1998). A estrutura geográfica para a diversidade de espécies de *Colletotrichum* em seringueira também foi relatada por Gazis et al. (2011) quando analisaram a diversidade mediante análise filogenética e foi explicado que o resultado observado foi devido aos isolados serem do Cameron e do Peru, lugares muito distantes geograficamente para pensar em uma possível recente recombinação.

Dos 173 isolados remanescentes, três isolados foram identificados como *C. cliviae*, 14 como pertencentes ao complexo *C. boninense* e 156 como pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides*. A espécie *C. cliviae* foi descrita pela primeira vez por Yang et al. (2009), causando Antracnose em folhas de *Clivia miniata*, e constitui uma linhagem monofilética próxima ao clado orbiculare descrito por Cannon et al. (2012). O complexo *C. boninense* compreende 18 espécies entre fitopatogênicas e endofíticas de diversas plantas distribuídas ao redor do mundo (Damm et al., 2012b). O complexo *C. gloeosporioides* compreende 22 espécies e uma subespécie definidas geneticamente. As espécies do complexo *C. gloeosporioides* são separadas dos outros *clados* do gênero *Colletotrichum* pela análise filogenética da região ITS, e compartilham a sequência 5'-GGGCGGGT-3', cerca de 139 a 142 bases depois do sítio de anelamento do primer ITS1F, como foi observado neste trabalho (Weir et al. 2012). Isolados associados a antracnose da seringueira também foram descritos como pertencentes aos complexos *C. boninense* e *C. gloeosporioides*, mas a maioria dos isolados foi identificada como pertencentes ao complexo *C. acutatum*, complexo ao qual nenhum dos isolados deste estudo foi associado (Sarmiento 2013).

Os isolados 234F6F_AC, 350F1F_AC e 816F29F_AM identificados como *C. cliviae* apresentaram sequências menores nos alinhamentos das regiões GAPDH e TUB2 quando comparadas com as sequências dos isolados dos complexos *C. boninense* e *C. gloeosporioides*. No alinhamento da região GAPDH é observada uma deleção de 15 nucleotídeos e outras cinco pequenas deleções de três nucleotídeos. Para estes isolados também são observadas deleções e mutações pontuais quando comparadas com os outros isolados. Os tamanhos dessas sequências são correspondentes ao tamanho relatado no artigo que descreveu a espécie pela primeira vez (Yang et al. 2009).

A maioria dos isolados estudados foi obtida de tecidos de folhas, não obstante três isolados foram obtidos de tecidos de caule e raiz, e foram identificados dentro do complexo *C. gloeosporioides*. Espécies de *Colletotrichum* já tinham sido descritas em associações endofíticas em tecidos não fotossintéticos. Exemplos disso são *C. acutatum lato sensu* em galhos de *Quercus ilex* (Fisher et al., 1994), *C. coccodes* em raízes de *Solanum tuberosum* (Götz et al., 2006) e *C. tofieldiae* em raízes de *Arabidopsis thaliana* (Hiruma et al., 2016), mas nenhuma delas pertencente ao complexo *C. gloeosporioides*. Igualmente já tinha sido descrito um isolado do gênero *Colletotrichum* identificado só a nível de gênero em tecidos de caule de *H. brasiliensis* no Peru (Gazis e Chaverri, 2010), porém nenhum associado a tecidos de caule de *H. guianensis* e a tecidos de raízes de *H. brasiliensis*. Neste estudo então se descreve pela primeira vez um isolado obtido de tecido de caule de *H. guianensis* (435F9C_AM) e de raiz de *H. brasiliensis* (336F12R_AC).

Os resultados deste estudo são a base para a identificação acurada de espécies de *Colletotrichum* associados à seringueira na floresta amazônica brasileira e igualmente podem ser utilizados para selecionar isolados para estudos que determinem seu potencial biotecnológico. A variabilidade genética observada mostra que mais de uma espécie de *Colletotrichum* spp. está associada a seringueira na área geográfica

estudada e os marcadores moleculares usados neste estudo permitiram averiguar eficazmente a variabilidade genética dos isolados estudados, especialmente os marcadores TUB2, ApMat e IRAP. Assim, depois de fazer um análises de congruência entre as regiões sequenciadas neste estudo, pode ser feita uma análise multigênica usando o método GCPSR para definir unidades taxonômicas operacionais (OTUs) e selecionar isolados dentro de *clados* monofiléticos para serem caracterizados morfologicamente e sequenciar um ou mais genes para os isolados de *clados* polifiléticos. Nessa abordagem, pode ser determinada a identidade de isolados como 401F6F_AC que com as análises feitas neste trabalho não foi possível determinar com clareza a sua identidade.

5. Conclusões

- Há diferentes espécies de *Colletotrichum* associadas como endofíticas a folha, caule e raiz da seringueira (*H. brasiliensis* e *H. guianensis*);
- Os isolados endofíticos pertencem aos complexos *C. boninense* e *C. gloesporioides* e a espécie *C. cliviae*;
- Isolados do complexo *C. gloesporioides* foram encontrados mais frequentemente associados como endofíticos de *Hevea* spp.;
- Foi descrita pela primeira vez a presença de isolados do complexo *C. gloesporioides* em caule e raiz de *Hevea* spp.

6. Referências bibliográficas

- Abang, M.M., Abraham, W.-R., Asiedu, R., Hoffmann, P., Wolf, G., Winter, S., 2009. Secondary metabolite profile and phytotoxic activity of genetically distinct forms of *Colletotrichum gloeosporioides* from yam (*Dioscorea* spp.). *Mycol. Res.* 113, 130–140.
- Alananbeh, K.M., Gudmestad, N.C., 2016. Genetic diversity of *Colletotrichum coccodes* in the United States using amplified fragment length polymorphism analysis. *J. Gen. Plant Pathol.* 1–13.
- Anderson, J.M., Aitken, E.A.B., Dann, E.K., Coates, L.M., 2013. Morphological and molecular diversity of *Colletotrichum* spp. causing pepper spot and anthracnose of lychee (*Litchi chinensis*) in Australia. *Plant Pathol.* 62, 279–288.
- Arnold, A.E., Mejía, L.C., Kyllö, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N., Herre, E.A., 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 15649–15654.
- Boratyn, G.M., Camacho, C., Cooper, P.S., Coulouris, G., Fong, A., Ma, N., Madden, T.L., Matten, W.T., McGinnis, S.D., Merezhuk, Y., Raytselis, Y., Sayers, E.W., Tao, T., Ye, J., Zaretskaya, I., 2013. BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Res.* 41, W29–W33. doi:10.1093/nar/gkt282
- Bridge, P.D., Arora, D.K., 1998. Interpretation of PCR methods for species definition. *Appl. PCR Mycol.* 63–84.
- Cannon, P.F., Damm, U., Johnston, P.R., Weir, B.S., 2012. *Colletotrichum*—current status and future directions. *Stud. Mycol.* 73, 181–213.
- Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C., Crous, P.W., 2012a. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Stud. Mycol.* 73, 37–113.

Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C., Johnston, P.R., Weir, B.S., Tan, Y.P., Shivas, R.G., Crous, P.W., 2012b. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Stud. Mycol.* 73, 1–36.

Dean, R., Van Kan, J.A., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., others, 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 414–430.

Fisher, P.J., Petrini, O., Petrini, L.E., Sutton, B.C., 1994. Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Majorca and Switzerland. *New Phytol.* 127, 133–137.

Freeman, S., Minz, D., Jurkevitch, E., Maymon, M., Shabi, E., 2000. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathology* 90, 608–614.

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

Freeman, S., Rodriguez, R.J., 1993. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. *Science* 260, 75–78.

Gasparotto, L., Pereira, J.C.R., 2012. Doenças da seringueira no Brasil. EMBRAPA. Brasília, Brasil.

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

Gazis, R., Rehner, S., Chaverri, P., 2011. Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. *Mol. Ecol.* 20, 3001–3013.

Glass, N.L., Donaldson, G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1323–1330.

Gonzaga, L.L., Costa, L.E.O., Santos, T.T., Araújo, E.F., Queiroz, M.V., 2014. Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. *J. Appl. Microbiol.* 118, 485–496.

Götz, M., Nirenberg, H., Krause, S., Wolters, H., Draeger, S., Buchner, A., Lottmann, J., Berg, G., Smalla, K., 2006. Fungal endophytes in potato roots studied by traditional isolation and cultivation-independent DNA-based methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58, 404–413.

Guerber, J.C., Liu, B., Correll, J.C., Johnston, P.R., 2003. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia* 95, 872–895.

Hill, M.O., 1973. Diversity and Evenness: A Unifying Notation and Its Consequences. *Ecology* 54, 427–432. doi:10.2307/1934352

Hiruma, K., Gerlach, N., Sacristán, S., Nakano, R.T., Hacquard, S., Kracher, B., Neumann, U., Ramírez, D., Bucher, M., O'Connell, R.J., Schulze-Lefert, P., 2016. Root Endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. *Cell* 165, 464–474. doi:10.1016/j.cell.2016.02.028

Hyde, K.D., Nilsson, R.H., Alias, S.A., Ariyawansa, H.A., Blair, J.E., Cai, L., de Cock, A.W., Dissanayake, A.J., Glockling, S.L., Goonasekara, I.D., others, 2014. One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera: I (2014). *Fungal Divers.* 67, 21–125.

Hyde, K.D., Soyong, K., 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers* 33, 163–173.

- Kalendar, R., Schulman, A.H., 2006. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nat. Protoc.* 1, 2478–2484.
- Kogel, K.-H., Franken, P., Hückelhoven, R., 2006. Endophyte or parasite—what decides? *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 358–363.
- Lu, G., Cannon, P.F., Ride, A., Simmons, C.M., 2004. Diversity and molecular relationships of endophytic *Colletotrichum* isolates from the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycol. Res.* 108, 53–63.
- Manamgoda, D.S., Udayanga, D., Cai, L., Chukeatirote, E., Hyde, K.D., 2013. Endophytic *Colletotrichum* from tropical grasses with a new species *C. endophytica*. *Fungal Divers.* 61, 107–115.
- McDonald, B.A., 1997. The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87, 448–453.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7, 103–116.
- Paul, N.C., Lee, H.B., Lee, J.H., Shin, K.S., Ryu, T.H., Kwon, H.R., Kim, Y.K., Youn, Y.N., Yu, S.H., 2014. Endophytic Fungi from *Lycium chinense* mill and characterization of two new Korean records of *Colletotrichum*. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 15272–15286.
- Petrini, O., 1991. Fungal Endophytes of Tree Leaves, in: Andrews, J.H., Hirano, S.S. (Eds.), *Microbial Ecology of Leaves*, Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. Springer New York, pp. 179–197.
- Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D., 2004. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens. *Fungal Divers* 16, 131–140.
- Porrás-Alfaro, A., Bayman, P., 2011. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Phytopathology* 49, 291.

Redman, R.S., Dunigan, D.D., Rodriguez, R.J., 2001. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytol.* 151, 705–716.

Rojas, E.I., Rehner, S.A., Samuels, G.J., Bael, S.A.V., Herre, E.A., Cannon, P., Chen, R., Pang, J., Wang, R., Zhang, Y., Peng, Y.-Q., Sha, T., 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia* 102, 1318–1338. doi:10.3852/09-244

Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539–542.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463–5467.

Santana, M.F., Batista, A.D., Ribeiro, L.E., de Araújo, E.F., de Queiroz, M.V., 2013. Terminal repeat retrotransposons as DNA markers in fungi. *J. Basic Microbiol.* 53, 823–827.

Santos, L.V., de Queiroz, M.V., Santana, M.F., Soares, M.A., de Barros, E.G., de Araújo, E.F., Langin, T., 2012. Development of new molecular markers for the *Colletotrichum* genus using RetroCI1 sequences. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1087–1095.

Sarmiento, S.S. 2013. Identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose foliar da seringueira. 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG).

Sharma, G., Kumar, N., Weir, B.S., Hyde, K.D., Shenoy, B.D., 2013. The ApMat marker can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*. *Fungal Divers.* 61, 117–138.

- Sharma, G., Pinnaka, A.K., Shenoy, B.D., 2014. Resolving the *Colletotrichum siamense* species complex using ApMat marker. *Fungal Divers.* 71, 247–264. doi:10.1007/s13225-014-0312-7
- Silva, D.N., Talhinhos, P., Várzea, V., Cai, L., Paulo, O.S., Batista, D., 2012. Application of the Apn2/MAT locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: an example from coffee (*Coffea* spp.) hosts. *Mycologia* 104, 396–409.
- Souza Gonçalves, P., Cardoso, M., Ortolani, A.A., 1990. Origem, variabilidade e domesticação da *Hevea*; uma revisão. *Pesqui. Agropec. Bras.* 25, 135–156.
- Suryanarayanan, T.S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M.B., Sasse, F., Jansen, R., Murali, T.S., 2009. Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biol. Rev.* 23, 9–19.
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S., Fisher, M.C., 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 31, 21–32.
- Templeton, M.D., Rikkerink, E.H.A., Solon, S.L., Crowhurst, R.N., 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. doi:10.1016/0378-1119(92)90055-T
- Ureña-Padilla, A.R., MacKenzie, S.J., Bowen, B.W., Legard, D.E., 2002. Etiology and population genetics of *Colletotrichum* spp. causing crown and fruit rot of strawberry. *Phytopathology* 92, 1245–1252.
- Valverde, S.R., da Silva Miranda, M.A., Fonseca Faleiro, P.H., 2014. Aspectos econômicos, mercadológicos, e gerenciais da heveicultura, in: Seringueira. EPAMIG Zona da Mata, Viçosa, MG.

- Vieira, W.A., Michereff, S.J., de Moraes Jr, M.A., Hyde, K.D., Câmara, M.P., 2014. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. *Fungal Divers.* 67, 181–202.
- Weeds, P.L., Chakraborty, S., Fernandes, C.D., d'A. Charchar, M.J., Ramesh, C.R., Kexian, Y., Kelemu, S., 2003. Genetic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes* spp. at centers of origin and utilization. *Phytopathology* 93, 176–185.
- Weir, B.S., Johnston, P.R., Damm, U., 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud. Mycol.* 73, 115–180.
- White T J, Bruns T, Lee S, Taylor J W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Em: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J, editors. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York, N.Y: Academic Press, Inc.; 1990. pp. 315–322
- Yang, Y.L., Liu, Z.Y., Cai, L., Hyde, K.D., Yu, Z.N., McKenzie, E.H.C., 2009. *Colletotrichum* anthracnose of Amaryllidaceae. *Fungal Divers.* 39, 123.
- Yeh, F.C., Boyle, T., Yang, R.C., 1999. POPGENE: Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, version 1.31.
- Zou, W.X., Meng, J.C., Lu, H., Chen, G.X., Shi, G.X., Zhang, T.Y., Tan, R.X., 2000. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. *J. Nat. Prod.* 63, 1529–1530.

Anexos

Anexo 1. Informação dos isolados das espécies ex-tipo classificadas dentro de complexos, usadas nas análises. Modificada de Hyde et al. (2014).

Espécie	Complexo	Isolado	Número de acesso no GanBank			
			ITS	GAPDH	TUB2	ApMat
<i>C. acerbum</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS 128530	JQ948459	JQ948790	JQ950110	
<i>C. acutatum</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS112996	JQ005776	JQ948677	JQ005860	
<i>C. aenigma</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 18608	JX010244	JX010044	JX010389	
<i>C. aeshynomenes</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 17673	JX010176	JX009930	JX010392	
<i>C. alatae</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 17919	JX010190	JX009990	JX010383	KC888932
<i>C. alcorni</i>	<i>C. caudatum</i>	IMI 176619	JX076858			
<i>C. alienum</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 12071	JX010251	JX010028	JX010411	KC888927
<i>C. annellatum</i>	<i>C. boninense</i>	CBS 129826	JQ005222	JQ005309	JQ005656	
<i>C. anthrisci</i>	<i>C. dematium</i>	CBS 125334	GU227845	GU228237	GU228139	
<i>C. aotearoa</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 18537	JX010205	JX010005	JX010420	KC888930
<i>C. asianum</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 18580	FJ972612	JX010053	JX010406	FR718814
<i>C. australe</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS116478	JQ948455	JQ948786	JQ950106	
<i>C. baltimoreense</i>	<i>C. caudatum</i>	SD11	JX076866			
<i>C. beeveri</i>	<i>C. boninense</i>	CBS 128527	JQ005171	JQ005258	JQ005605	
<i>C. bidentis</i>	<i>C. orbiculare</i>	COAD 1020	KF178481	KF178506	KF178602	
<i>C. bleitillum</i>	<i>C. spaethianum</i>	CGMCC 315117	JX625178	KC843506	JX625207	
<i>C. boninense</i>	<i>C. boninense</i>	CBS 123755	JQ005153	JQ005240	JQ005588	
<i>C. brasiliense</i>	<i>C. boninense</i>	CBS 128501	JQ005235	JQ005322	JQ005669	
<i>C. brassicola</i>	<i>C. boninense</i>	CBS 101059	JQ005172	JQ005259	JQ005606	
<i>C. brisbanense</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS 292.67	JQ948291	JQ948621	JQ949942	
<i>C. carthami</i>	<i>C. acutatum</i>	SAPA100011	AB696998		AB696992	
<i>C. caudasporum</i>	<i>C. graminicola</i>	CGMCC 315106	JX625162	KC843512	JX625190	
<i>C. caudatum</i>	<i>C. caudatum</i>	BPI423339	JX076860			
<i>C. cereale</i>	<i>C. graminicola</i>	CBS 129663	JQ005774		JQ005858	
<i>C. chrysanthemi</i>	<i>C. acutatum</i>	IMI 364540	JQ948273	JQ948603	JQ949924	
<i>C. circinans</i>	<i>C. dematium</i>	CBS 221.81	GU227855	GU228247	GU228149	
<i>C. citri</i>	<i>C. acutatum</i>	ZJUC41	KC293581	KC293741	KC293661	
<i>C. citricola</i>	<i>C. boninense</i>	SXC151	KC293576	KC293736	KC293656	
<i>C. clidemiae</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 18658	JX010265	JX009989	JX010438	KC888929
<i>C. colombiense</i>	<i>C. boninense</i>	CBS 129818	JQ005174	JQ005261	JQ005608	
<i>C. constrictum</i>	<i>C. boninense</i>	CBS 128504	JQ005238	JQ005325	JQ005672	
<i>C. cordylinicola</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 18579	JX010226	JX009975	JX010440	JQ899274
<i>C. cosmi</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS 853.73	JQ948274	JQ948604	JQ949925	
<i>C. costaricense</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS 330.75	JQ948180	JQ948510	JQ949831	
<i>C. curcumae</i>	<i>C. truncatum</i>	IMI 288937	GU227893	GU228285	GU228187	
<i>C. cuscutae</i>	<i>C. acutatum</i>	IMI 304802	JQ948195	JQ948525	JQ949846	
<i>C. cymbidiicola</i>	<i>C. boninense</i>	IMI 347923	JQ005166	JQ005253	JQ005600	
<i>C. dacrycarpi</i>	<i>C. boninense</i>	CBS 130241	JQ005236	JQ005323	JQ005670	
<i>C. dematium</i>	<i>C. dematium</i>	CBS 125.25	GU227819	GU228211	GU228113	

Anexo 1. (Continuação)

Espécie	Complexo	Isolado	Número de acesso no GanBank			
			ITS	GAPDH	TUB2	ApMat
<i>C. destructivum</i>	<i>C. destructivum</i>	CBS 149.34	AJ301942		JQ005848	
<i>C. dianensei</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	CMM4083	KC329779	KC517194	KC517254	KJ155461
<i>C. duyunensis</i>	<i>C. graminicola</i>	CGMCC315105	JX625160	KC843515	JX625187	
<i>C. echinochloae</i>	<i>C. graminicola</i>	MAFF 511473	AB439811			
<i>C. eleusines</i>	<i>C. graminicola</i>	MAFF 511155	JX519218		JX519243	
<i>C. endomagniferae</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	MFLUCC140563	KC702994	KC702955	KC702922	KJ155453
<i>C. endophytica</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	LC0324	KC633854	KC832854		
<i>C. endophyllum</i>	<i>C. graminicola</i>	CGMCC 315108	JX625177	KC843521	JX625206	
<i>C. eremochloae</i>	<i>C. graminicola</i>	CBS 129661	JX519220		JX519245	
<i>C. falcatum</i>	<i>C. graminicola</i>	CBS 147945	JQ005772		JQ005856	
<i>C. fiorinae</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS 128517	JQ948292	JQ948622	JQ949943	
<i>C. fructi</i>	<i>C. dematium</i>	CBS 346.37	GU227844	GU228236	GU228138	
<i>C. fructicola</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 18581	JX010165	JX010033	JX010405	JQ807838
<i>C. fructivorum</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	Coll1414	JX145145		JX145196	
<i>C. fuscum</i>	<i>C. destructivum</i>	CBS 130.57	JQ005762		JQ005846	
<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	CBS 112999	JQ005152	JQ005239	JQ005587	JQ807843
<i>C. godetiae</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS 133.44	JQ948402	JQ948733	JQ950053	
<i>C. graminicola</i>	<i>C. graminicola</i>	CBS 130836	JQ005767		JQ005851	
<i>C. grevilleae</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	CBS 132879	KC297078	KC297010	KC297102	
<i>C. guajave</i>	<i>C. acutatum</i>	IMI 350839	JQ948270	JQ948600	JQ949921	
<i>C. guizhouensis</i>	<i>C. spaethianum</i>	CGMCC 315112	JX625158	KC843507	JX625185	
<i>C. hanaii</i>	<i>C. graminicola</i>	MAFF 305404	JX519217		JX519242	
<i>C. hemerocallidis</i>	<i>C. dematium</i>	CDLG5	JQ400005	JQ400012	JQ400019	
<i>C. higginsianum</i>	<i>C. destructivum</i>	IMI 349063	JQ005760		JQ005844	
<i>C. hippeastri</i>	<i>C. boninense</i>	CBS 125376	JQ005231	JQ005318	JQ005665	
<i>C. horii</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 10492	GQ329690	GQ329681	JX010450	JQ807840
<i>C. incanum</i>	<i>C. spaethianum</i>	ATCC 64682	KC110789	KC110807	KC110816	
<i>C. indonesiense</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS 127551	JQ948288	JQ948618	JQ949939	
<i>C. jacksonii</i>	<i>C. graminicola</i>	MAFF 305460	JX519216		JX519241	
<i>C. jasiminigenum</i>	<i>C. truncatum</i>	MFU 10-0273	HM131513	HM131499	HM153770	
<i>C. johnstonii</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS 128532	JQ948444	JQ948775	JQ950095	
<i>C. kahawae</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP17816	JX010231	JX010012	JX010444	JQ899282
<i>C. karstii</i>	<i>C. boninense</i>	CORCG6	HM585409	HM585391	HM585428	
<i>C. kinghornii</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS 198.35	JQ948454	JQ948785	JQ950105	
<i>C. lacticiphilum</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS 112989	JQ948289	JQ948619	JQ949940	
<i>C. lillii</i>	<i>C. spaethianum</i>	CBS 109214	GU227810	GU228202	GU228104	
<i>C. limetticola</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS 114.14	JQ948193	JQ948523	JQ949844	
<i>C. lindemuthianum</i>	<i>C. orbiculare</i>	CBS 144.31	JQ005779	JX546712	JQ005863	
<i>C. lineola</i>	<i>C. dematium</i>	CBS 125337	GU227829	GU228221	GU228123	
<i>C. linicola</i>	<i>C. destructivum</i>	CBS 172.51	JQ005765		JQ005849	
<i>C. liriopes</i>	<i>C. spaethianum</i>	CBS 119444	GU227804	GU228196	GU228098	
<i>C. lupini</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS 109225	JQ948155	JQ948485	JQ949806	
<i>C. malvarum</i>	<i>C. orbiculare</i>	CBS 527.97	KF178480	KF178504	KF178601	

Anexo 1. (Continuação)

Espécie	Complexo	Isolado	Número de acesso no GanBank			
			ITS	GAPDH	TUB2	ApMat
<i>C. melanocaulon</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	Coll131				JX145313
<i>C. melonis</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS 159.84	JQ948194	JQ948524	JQ949845	
<i>C. miscanthi</i>	<i>C. graminicola</i>	MAFF 510857	JX519221		JX519246	
<i>C. murrayae</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	GZAAS5.09506	JQ247633	JQ247609	JQ247644	
<i>C. musae</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP19119	JX010146	JX010050	HQ596280	KC888926
<i>C. navitas</i>	<i>C. graminicola</i>	CBS 125086	JQ005769		JQ005853	
<i>C. nicholsonii</i>	<i>C. graminicola</i>	MAFF 511115	JQ005770		JQ005854	
<i>C. novae-zelandiae</i>	<i>C. boninense</i>	CBS 128505	JQ005228	JQ005315	JQ005662	
<i>C. nupharicola</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 18187	JX010187	JX009972	JX010398	JX145319
<i>C. nymphaeae</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS 515.78	JQ948197	JQ948527	JQ949848	
<i>C. ochracea</i>	<i>C. graminicola</i>	CGMCC 315104	JX625156	KC843513	JX625183	
<i>C. oncidii</i>	<i>C. boninense</i>	CBS 129828	JQ005169	JQ005256	JQ005603	
<i>C. orbiculare</i>	<i>C. orbiculare</i>	CBS 570.97	KF178466	KF178490	KF178587	
<i>C. parsonsiae</i>	<i>C. boninense</i>	CBS 128525	JQ005233	JQ005320	JQ005667	
<i>C. paspali</i>	<i>C. graminicola</i>	MAFF 305403	JX519219		JX519244	
<i>C. paxtonii</i>	<i>C. acutatum</i>	IMI 165753	JQ948285	JQ948615	JQ949936	
<i>C. petchii</i>	<i>C. boninense</i>	CBS 378.94	JQ005223	JQ005310	JQ005657	
<i>C. phormii</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS 118194	JQ948446	JQ948777	JQ950097	
<i>C. phyllanthi</i>	<i>C. boninense</i>	CBS 175.67	JQ005221	JQ005308	JQ005655	
<i>C. proteae</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	CBS132882	KC297079	KC297009	KC297101	
<i>C. psidii</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 19120	JX010219	JX009967	JX010443	
<i>C. pyricola</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS 128531	JQ948445	JQ948776	JQ950096	
<i>C. queenslandium</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 1778	JX010276	JX009934	JX010414	KC888928
<i>C. rhexiae</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	Coll 1026	JX145128		JX145179	JX145290
<i>C. rhombiforme</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS 129953	JQ948457	JQ948788	JQ950108	
<i>C. salicis</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS 607.94	JQ948460	JQ948791	JQ950111	
<i>C. salsolae</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 19051	JX010242	JX009916	JX010403	KC888925
<i>C. scovillei</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS 126529	JQ948267	JQ948597	JQ949918	
<i>C. siamense</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 18578	JX010171	JX009924	JX010404	JQ899289
<i>C. sidae</i>	<i>C. orbiculare</i>	CBS 504.97	KF178472	KF178497	KF178593	
<i>C. simmondsii</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS 122122	JQ948276	JQ948606	JQ949927	
<i>C. sloanei</i>	<i>C. acutatum</i>	IMI 364297	JQ948287	JQ948617	JQ949938	
<i>C. somersetense</i>	<i>C. caudatum</i>	JAC 11-11	JX076862			
<i>C. spaethianum</i>	<i>C. spaethianum</i>	CBS 167.49	GU227847	GU228239	GU228141	
<i>C. spinosum</i>	<i>C. orbiculare</i>	CBS 515.97	KF178474	KF178498	KF178595	
<i>C. sublineola</i>	<i>C. graminicola</i>	CBS 131301	JQ005771		JQ005855	
<i>C. syzygicola</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	DNCL021	KF242094	KF242156	KF254880	
<i>C. tabacum</i>	<i>C. destructivum</i>	CBS 161.53	JQ005763		JQ005847	
<i>C. tamarilloi</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS 129814	JQ948184	JQ948514	JQ949835	
<i>C. tanacetii</i>	<i>C. destructivum</i>	CBS 132693		JX218243	JX218233	
<i>C. tebeestii</i>	<i>C. orbiculare</i>	CBS 522.97	KF178473	KF178505	KF178594	

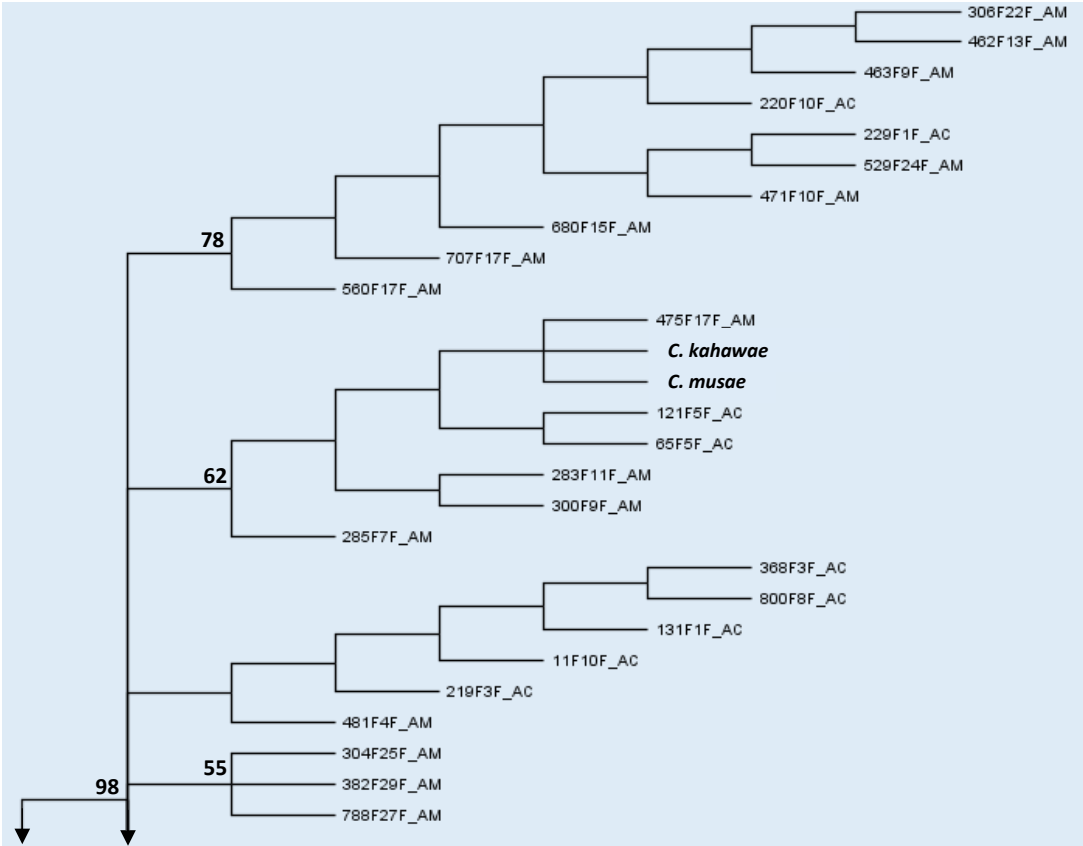
Anexo 1. (Continuação)

Espécie	Complexo	Isolado	Número de acesso no GanBank			
			ITS	GAPDH	TUB2	ApMat
<i>C. temperatum</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	Coll883	JX145159		JX145211	JX145298
<i>C. theobromicola</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 18649	JX010294	JX010006	JX010447	KC790726
<i>C. ti</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 4832	JX010269	JX009952	JX010442	
<i>C. tofieldiae</i>	<i>C. spaethianum</i>	CBS 495.85	GU227801	GU228193	GU228095	
<i>C. torulosum</i>	<i>C. boninense</i>	CBS 128544	JQ005164	JQ005251	JQ005598	
<i>C. trifolii</i>	<i>C. orbiculare</i>	CBS 158.83	KF178478	KF178502	KF178599	
<i>C. tropicale</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP18653	JX010264	JX010007	JX010407	KC790728
<i>C. truncatum</i>	<i>C. truncatum</i>	CBS 151.35	GU227862	GU228254	GU228156	
<i>C. verruculosm</i>	<i>C. spaethianum</i>	IMI 45525	GU227806	GU228198	GU228100	
<i>C. viniferum</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	GZAAS5.08601	JN412804	JN412798	JN412813	
<i>C. walleri</i>	<i>C. acutatum</i>	CBS 125472	JQ948275	JQ948605	JQ949926	
<i>C. xanthorrhoeae</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 17903	JX010261	JX009927	JX010448	KC790689
<i>C. zoysia</i>	<i>C. caudatum</i>	MAFF 238573	JX076871			
<i>C. spinaceae</i>	<i>C. dematium</i>	CBS 128.57	GU227847	GU228239	GU228141	
<i>Glomerella</i>						
<i>cingulata</i> "f.sp. <i>camelliae</i> "	<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 10643	JX010224	JX009908	JX010436	

Anexo 2. Informação dos isolados das espécies ex-tipo classificadas fora de complexos, usadas nas análises. Modificada de Hyde et al. (2014).

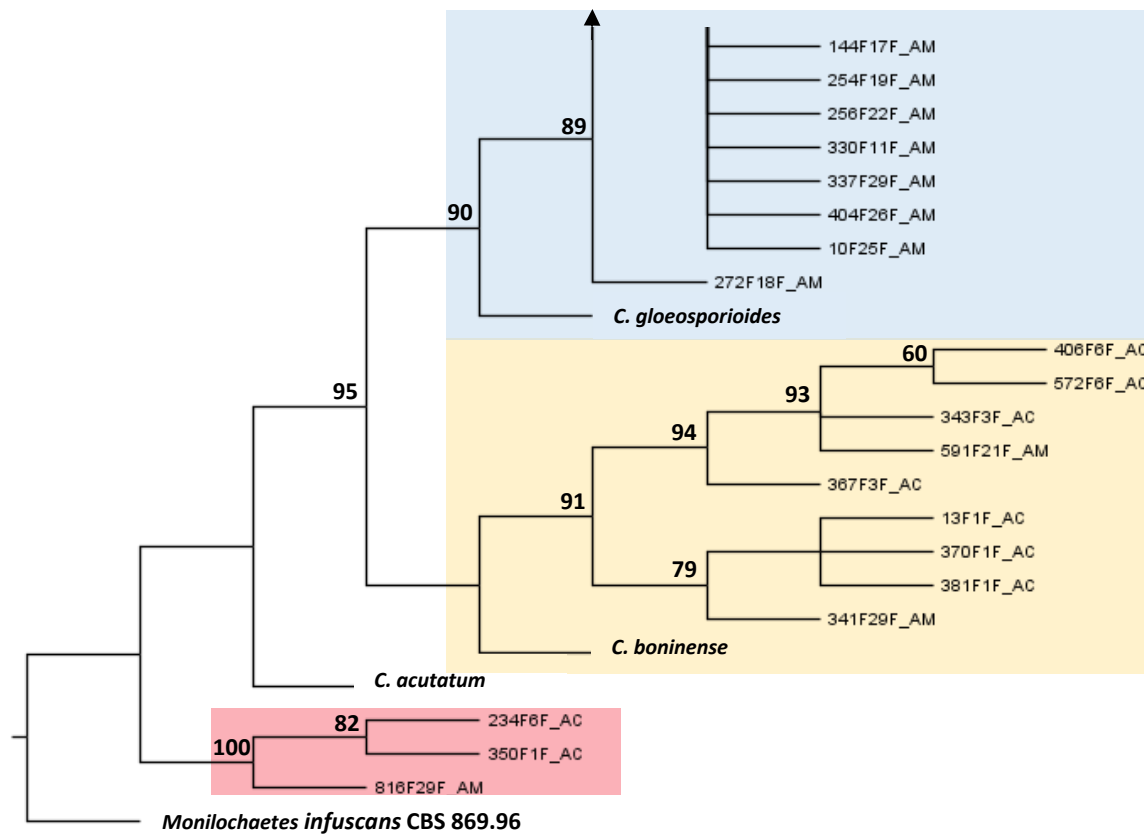
Espécie	Isolado	Número de acesso no GanBank			
		ITS	GAPDH	TUB2	ApMat
<i>C. agaves</i>	CBS 118190	DQ286221			
<i>C. axonopodi</i>	IMI 279189	EU554086			
<i>C. brevisporum</i>	BCC 38876	JQ247623	JQ247599	JQ247635	
<i>C. chlorophyti</i>	IMI 103806	GU227894	GU228286	GU228188	
<i>C. cliviae</i>	CBS 125375	JX519223	GQ856756	JX519249	
<i>C. coccodes</i>	ITCC 6079				KC790652
<i>C. coccodes</i>	CBS 369.75	JQ005775	HM171673	JQ005859	
<i>C. dracaenophilum</i>	CBS 118199	JX519222		JX519247	
<i>C. excelsum altitudum</i>	CGMCC 315130	HM751815	KC843502	JX625211	
<i>C. gigasporum</i>	MUCL 44947	AM982797		FN557442	
<i>C. hsienjenchng</i>	MAFF 243051	AB738855			
<i>C. metake</i>	NBRC 8974	AB738859			
<i>C. nigrum</i>	CBS 169.49	JX546838	JX546742	JX546885	
<i>C. orchidophilum</i>	CBS 632.80	JQ948151	JQ948481	JQ949802	
<i>C. phaseolorum</i>	CBS 157.36	GU227896	GU228288	GU228190	
<i>C. pseudoacutatum</i>	CBS 436.77	JQ948480	JQ948811	JQ950131	
<i>C. rusci</i>	CBS 119206	GU227818	GU228210	GU228112	
<i>C. sansevieriae</i>	MAFF 239721	AB212991			
<i>C. thailandicum</i>	MFUCC110113	JN050242	JN050231	JN050248	
<i>C. trichellum</i>	CBS 217.64	GU227812	GU228204	GU228106	
<i>C. tropicicola</i>	BCC 38877	JN050240	JN050229	JN050246	
<i>C. yunnanense</i>	CGMCC AS3.9167	EF369490		JX519248	

Anexo 3. Árvore filogenética usando o método de parcimônia para a região ITS. Os números presentes em cada nó representam o *bootstrap*. Cor rosa: Grupo *Colletotrichum cliviae*; cor amarela: grupo do complexo *Colletotrichum boninense*; cor azul: grupo do complexo *Colletotrichum gloeosporioides*.



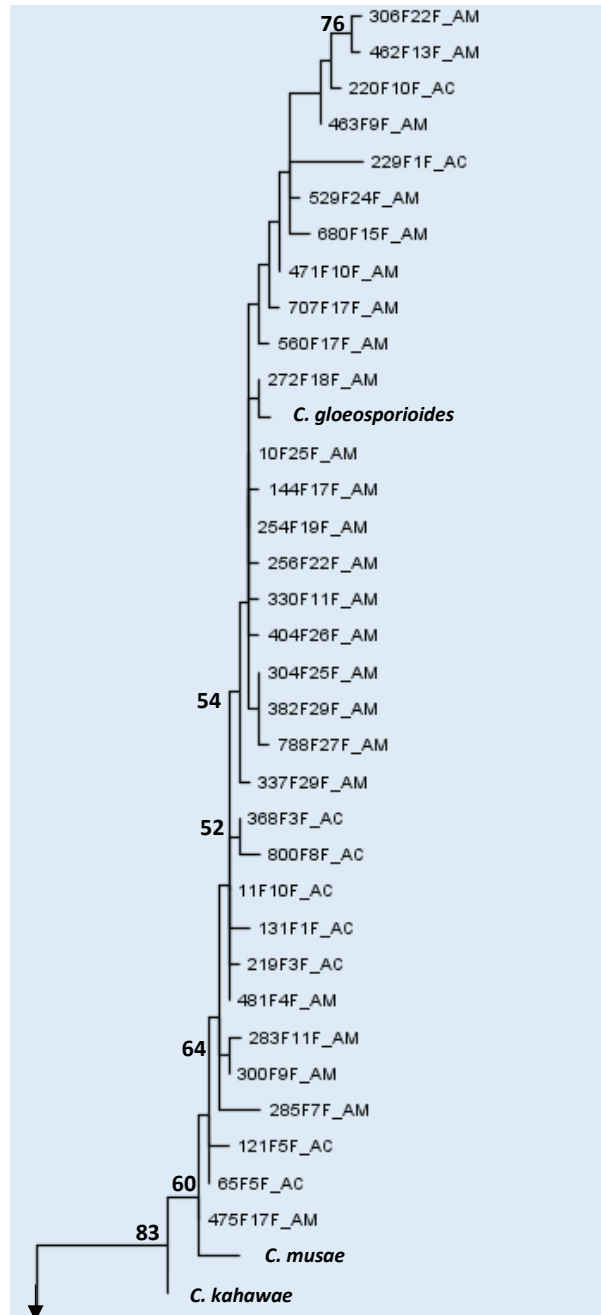
1.1

Anexo 3. (Continuação)



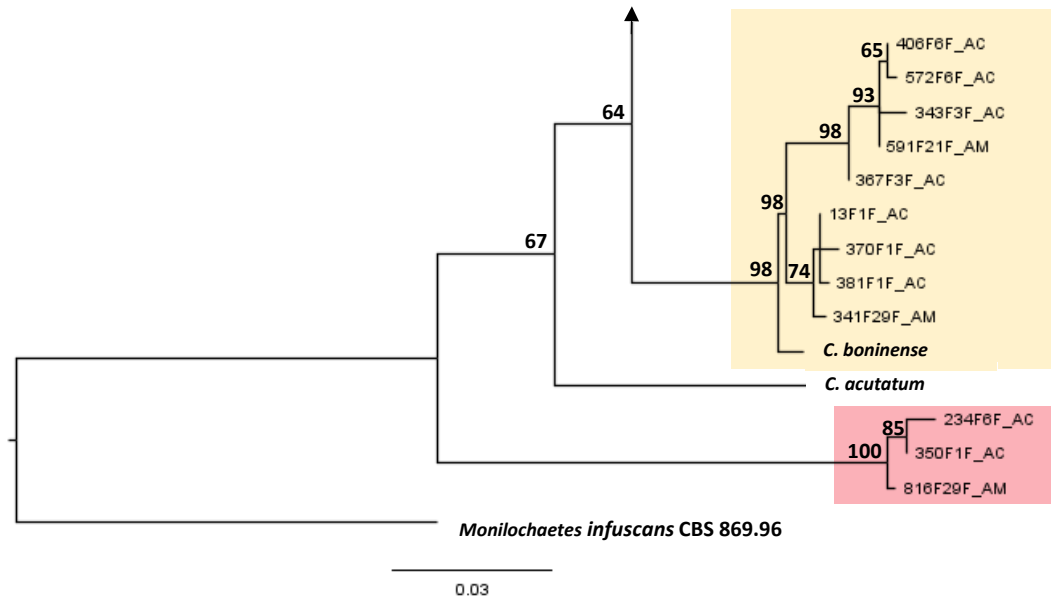
1.1

Anexo 4. Árvore filogenética usando o método de máxima verossimilhança para a região ITS. Os números presentes em cada nó representam o *bootstrap*. Cor rosa: Grupo *Colletotrichum cliviae*; cor amarela: grupo do complexo *Colletotrichum boninense*; cor azul: grupo do complexo *Colletotrichum gloeosporioides*.

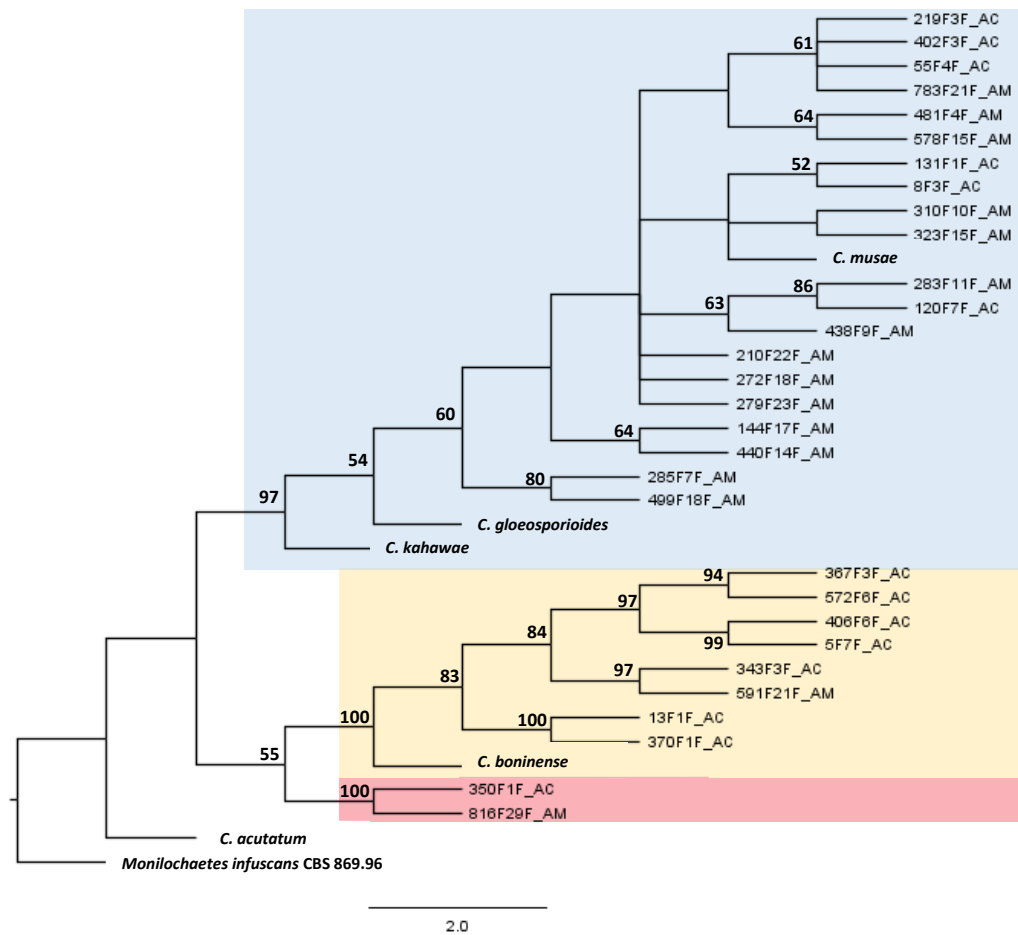


0.03

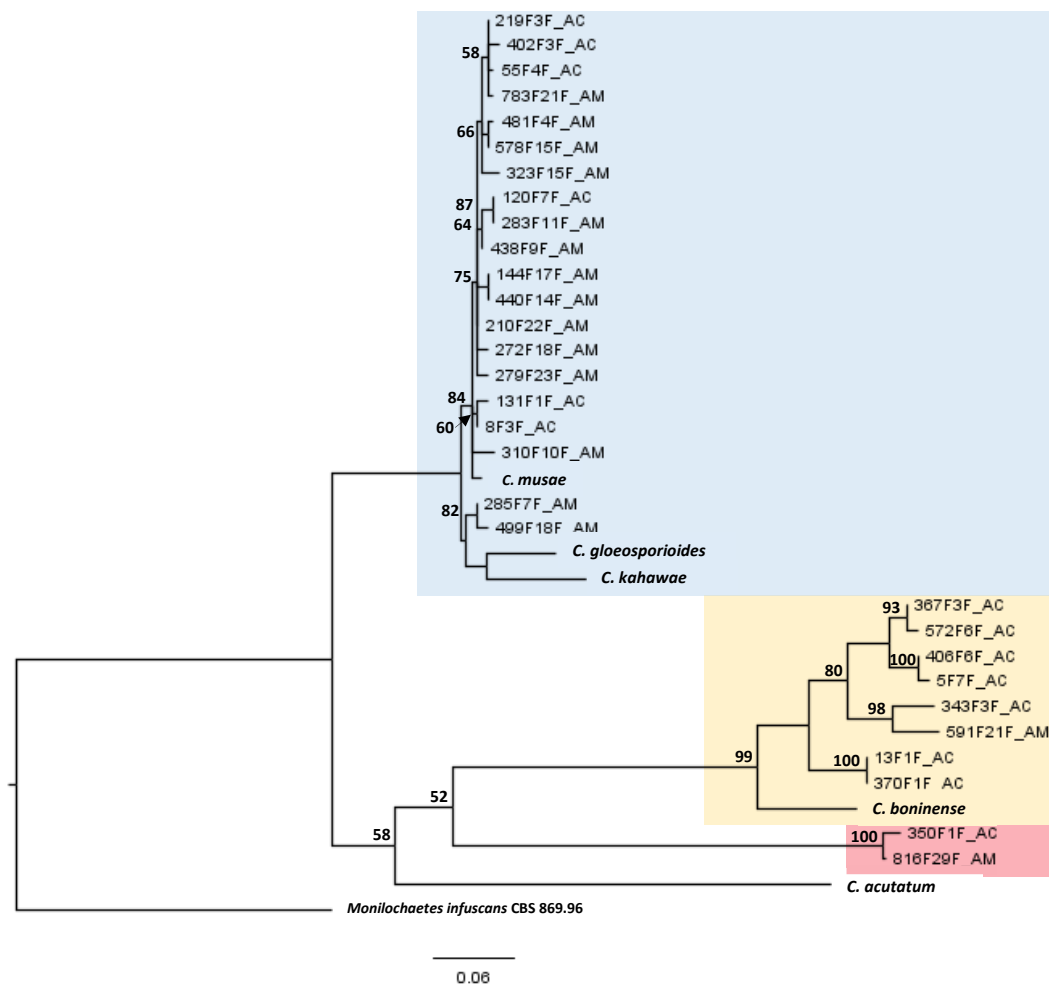
Anexo 4. (Continuação)



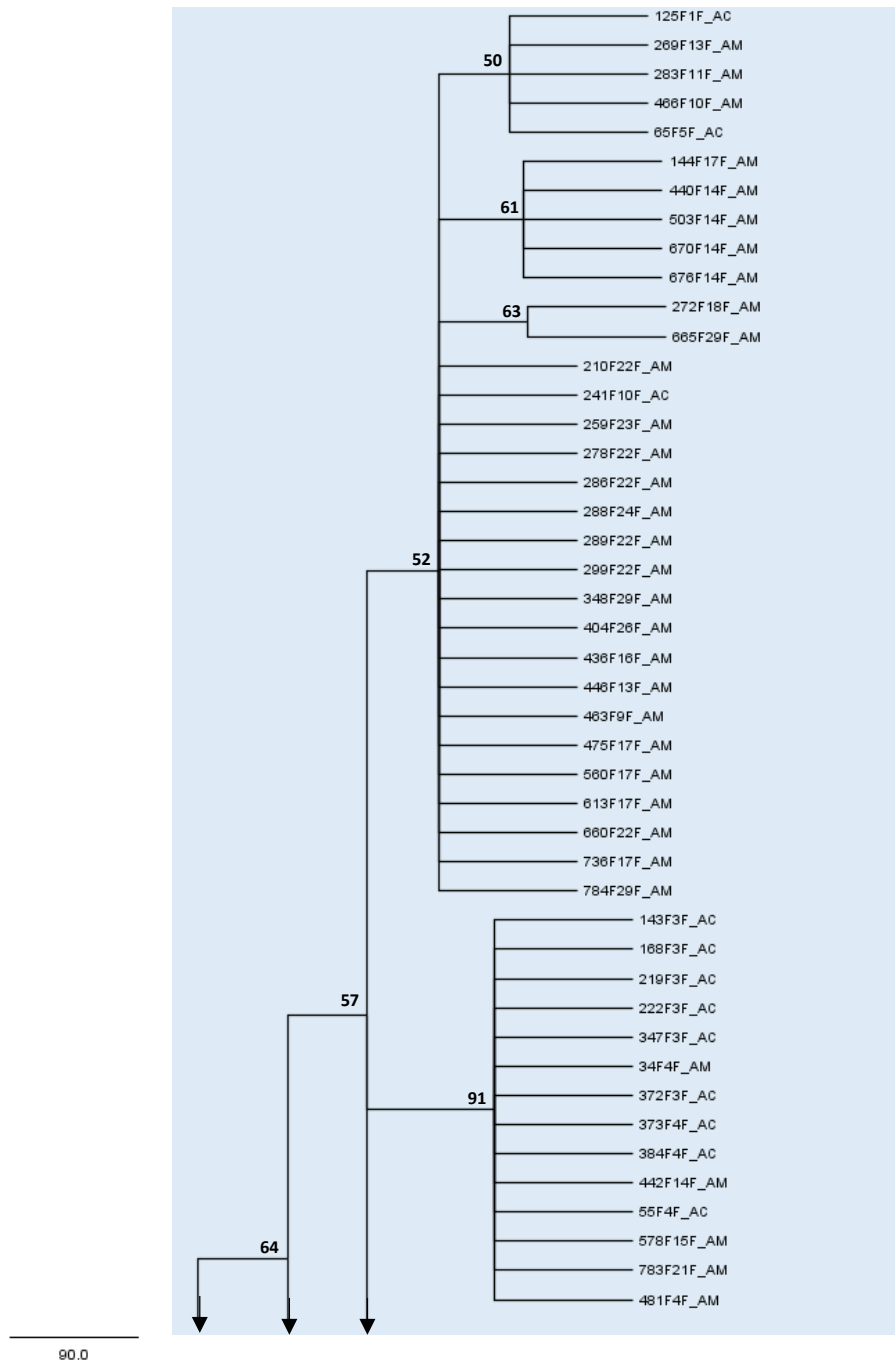
Anexo 5. Árvore filogenética usando o método de máxima parcimônia para a região GAPDH. Os números presentes em cada nó representam o *bootstrap*. Cor rosa: Grupo *Colletotrichum cliviae*; cor amarela: grupo do complexo *Colletotrichum boninense*; cor azul: grupo do complexo *Colletotrichum gloeosporioides*.



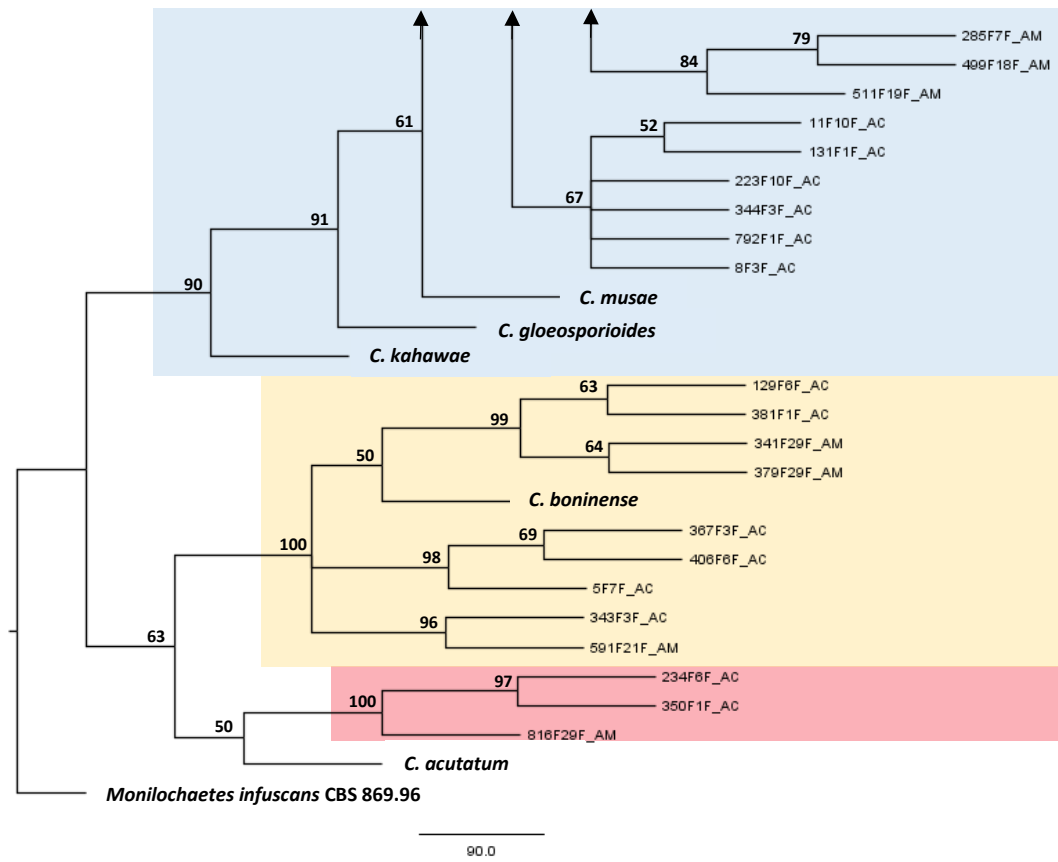
Anexo 6. Árvore filogenética usando o método de máxima verossimilhança para a região GAPDH. Os números presentes em cada nó representam o *bootstrap*. Cor rosa: Grupo *Colletotrichum cliviae*; cor amarela: grupo do complexo *Colletotrichum boninense*; cor azul: grupo do complexo *Colletotrichum gloeosporioides*.



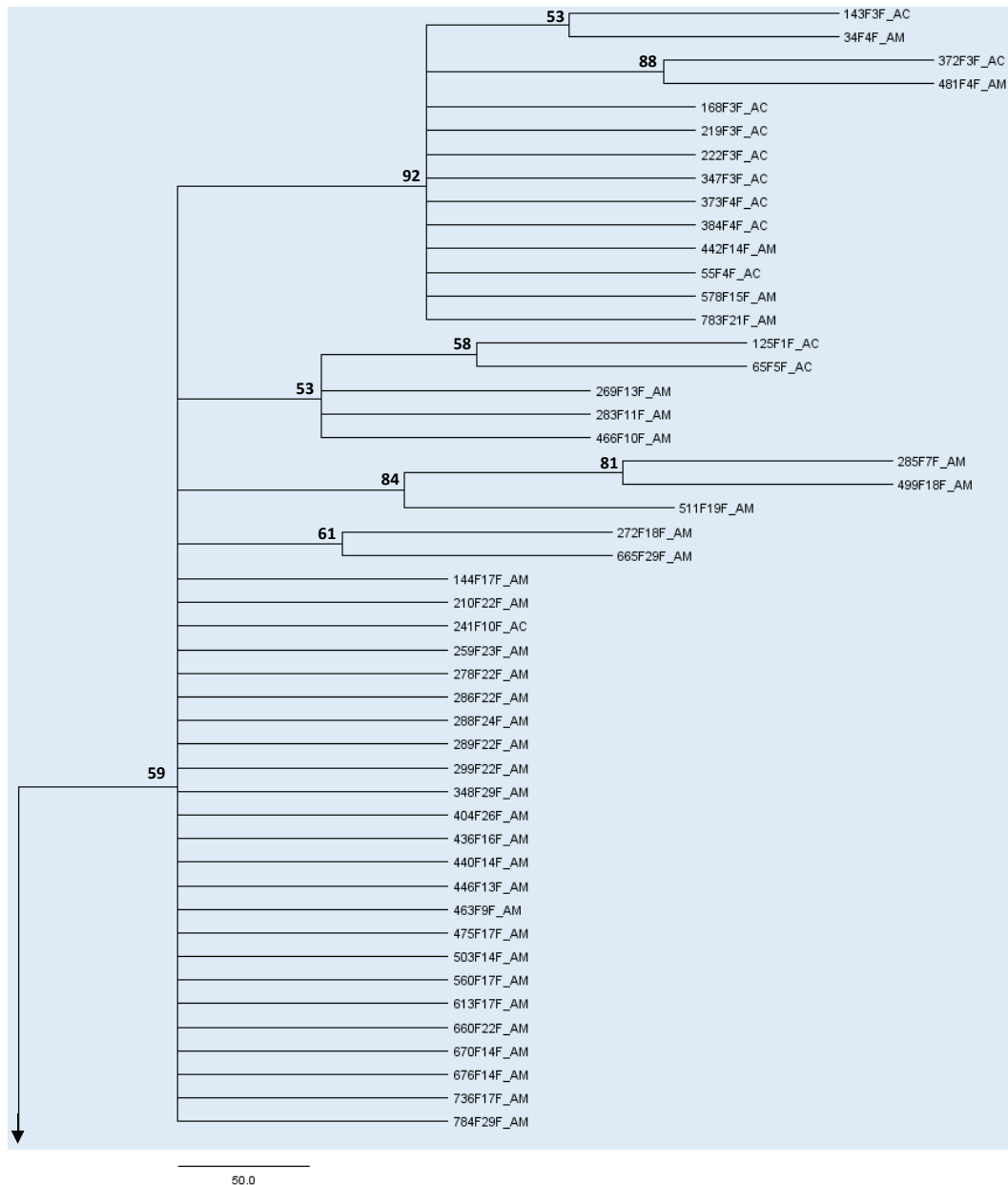
Anexo 7. Árvore filogenética usando o método de máxima parcimônia para a região TUB2. Os números presentes em cada nó representam o *bootstrap*. Cor rosa: Grupo *Colletotrichum cliviae*; cor amarela: grupo do complexo *Colletotrichum boninense*; cor azul: grupo do complexo *Colletotrichum gloeosporioides*.



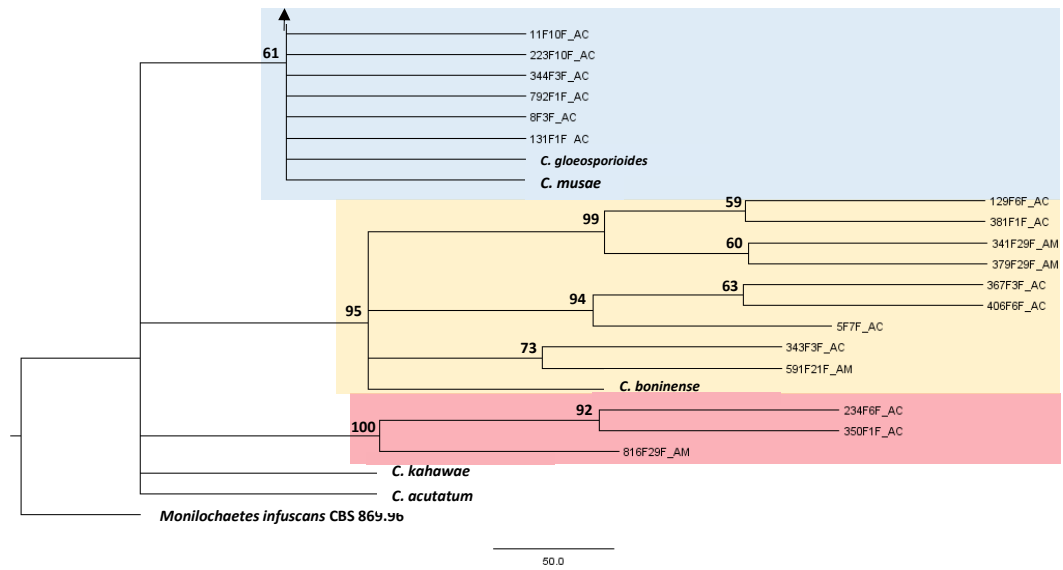
Anexo 7. (Continuação)



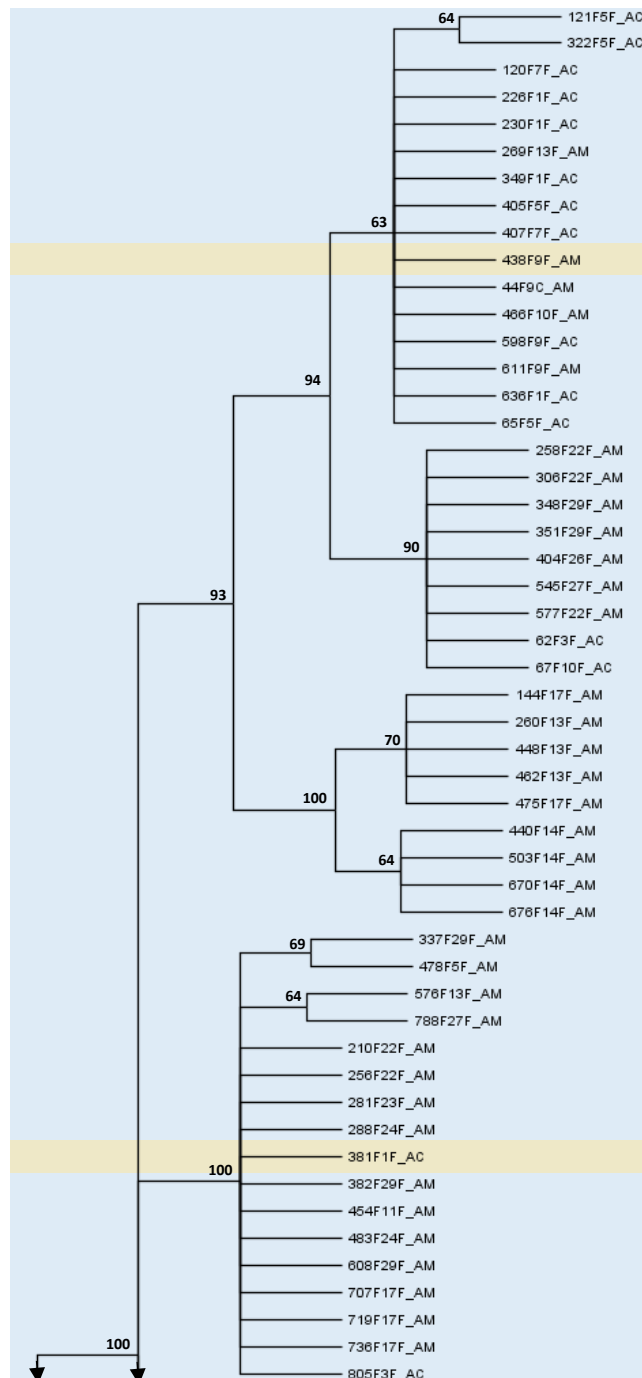
Anexo 8. Árvore filogenética usando o método de máxima verossimilhança para a região TUB2. Os números presentes em cada nó representam o *bootstrap*. Cor rosa: Grupo *Colletotrichum cliviae*; cor amarela: grupo do complexo *Colletotrichum boninense*; cor azul: grupo do complexo *Colletotrichum gloeosporioides*.



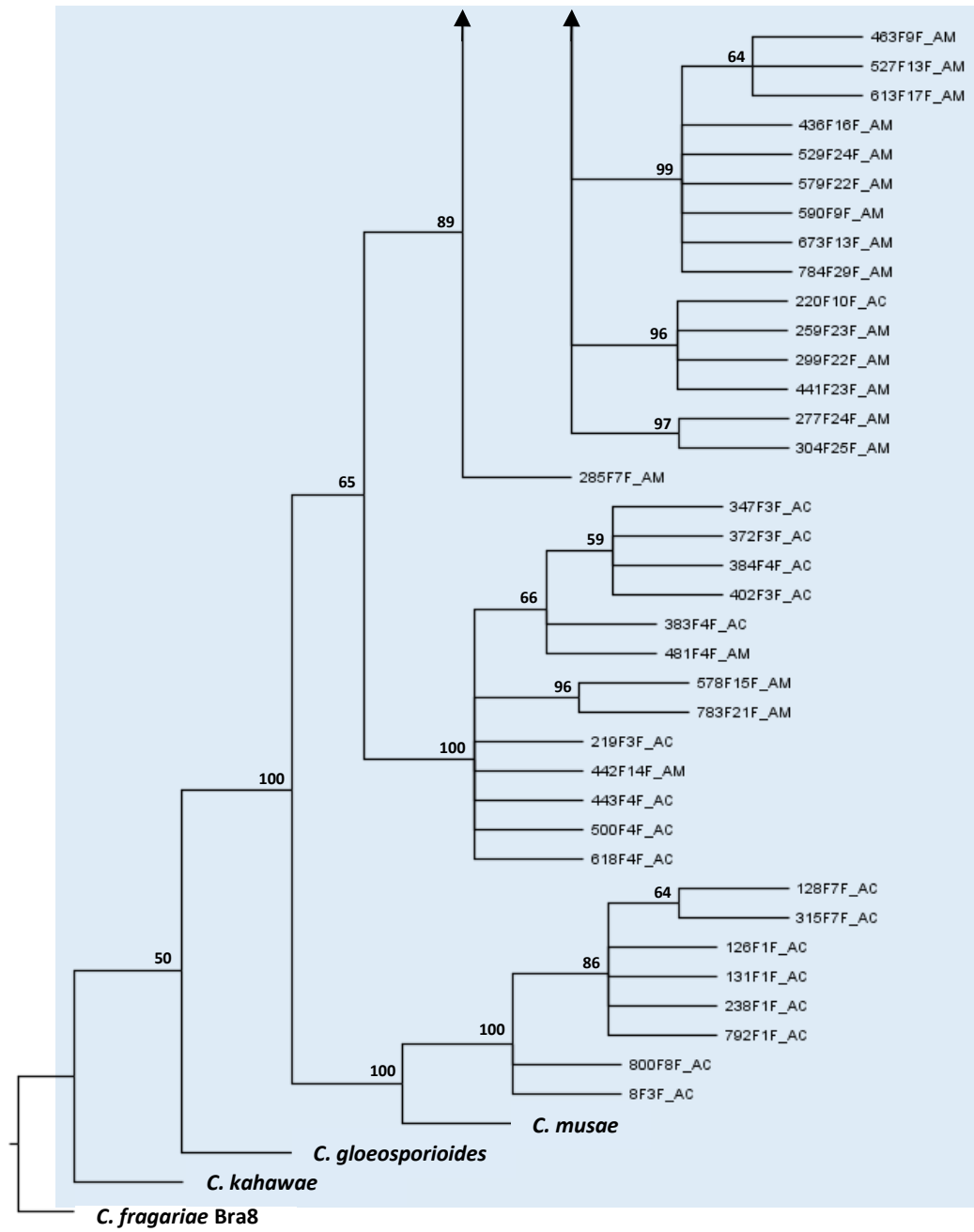
Anexo 8. (Continuação)



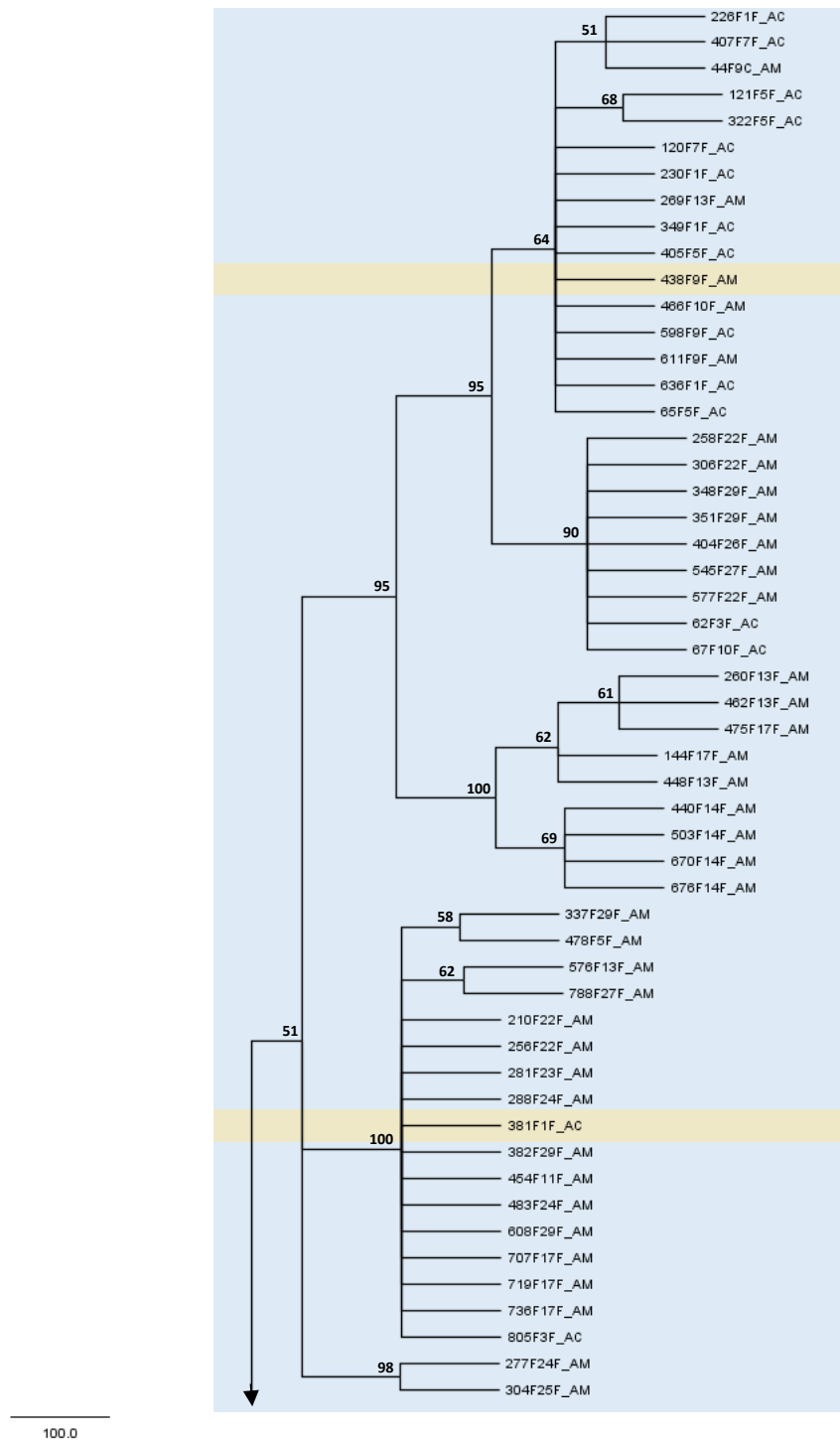
Anexo 9. Árvore filogenética usando o método de máxima parcimônia para a região ApMat. Os números presentes em cada nó representam o *bootstrap*. Cor amarela: grupo do complexo *Colletotrichum boninense*; cor azul: grupo do complexo *Colletotrichum gloeosporioides*.



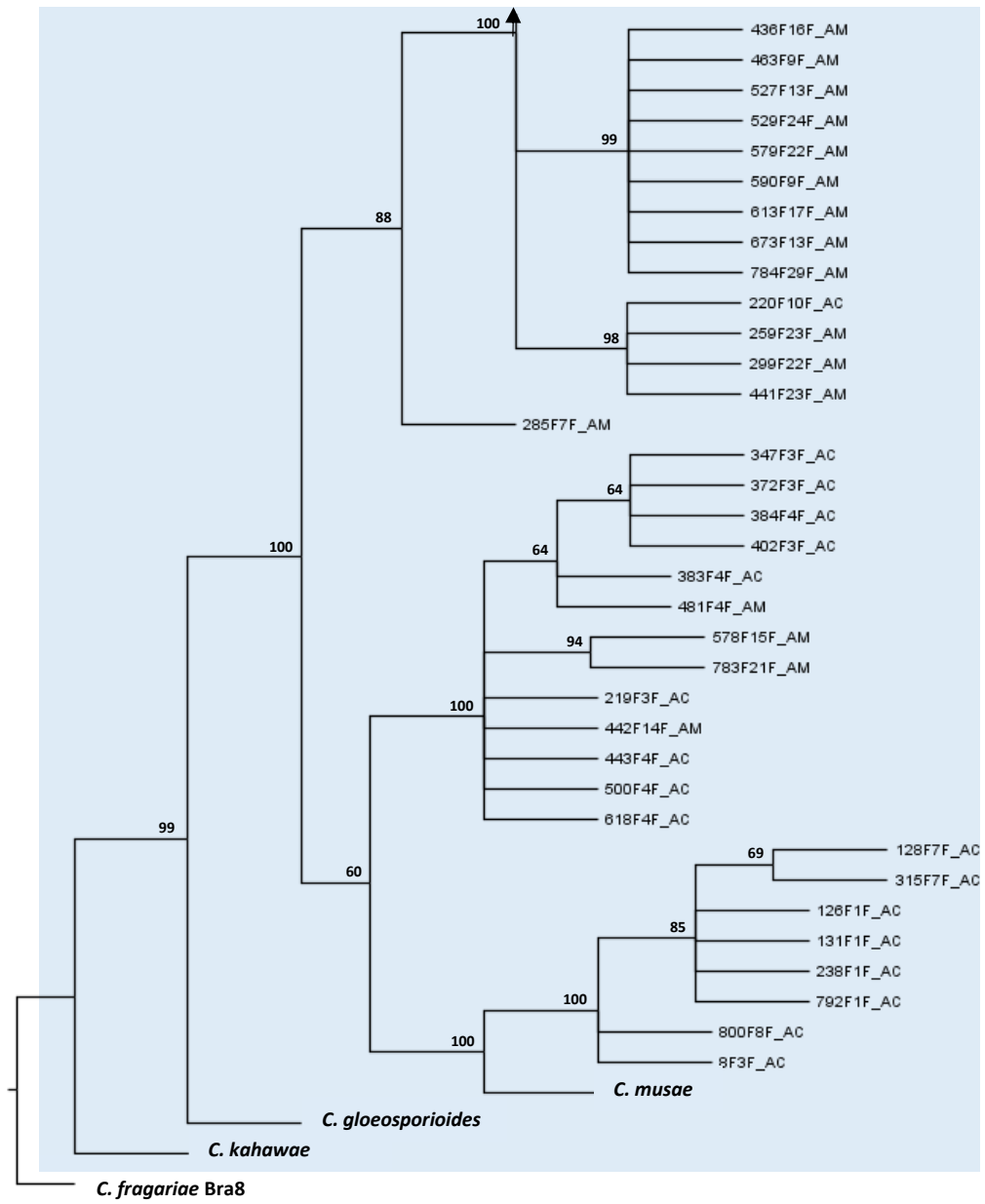
Anexo 9. (Continuação)



Anexo 10. Árvore filogenética usando o método de máxima verossimilhança para a região ApMat. Os números presentes em cada nó representam o *bootstrap*. Cor amarela: grupo do complexo *Colletotrichum boninense*; cor azul: grupo do complexo *Colletotrichum gloeosporioides*.



Anexo 10. (Continuação)



100.0

Anexo 11. Análise de variância molecular (AMOVA) dos haplótipos obtidos pela técnica de IRAP, dos isolados dos complexos *Colletotrichum boninense* e *C. gloeosporioides* obtidos de *Hevea brasiliensis* e *H. guianensis* nos estados de Acre e Amazonas.

	gl	SQ	Meia da SQ
ESTADO			
Entre as amostras	1	7,69751	7,69751
Dentro das amostras	106	267,93212	2,52766
Total	107	275,62963	2,57598
HOSPEDEIRO			
Entre as amostras	1	7,79493	7,79493
Dentro das amostras	170	408,21670	2,40128
Total	171	416,01163	2,43282
<i>Componente da covariância</i>	Sigma	%	
ESTADO			
Varição entre as amostras	0,11280	4,27186	
Varição dentro das amostras	2,52766	95,72814	
Varição total	2,64046	100,00000	
Phi total das amostras	0,043		
HOSPEDEIRO			
Varição entre as amostras	0,10112	4,04107	
Varição dentro das amostras	2,40127	95,95893	
Varição total	2,50240	100,00000	
Phi total das amostras	0,04		

As siglas: **gl**, grados de liberdade; **SQ**, somatória de quadrados.

Anexo 12. Teste exato de Fisher das frequências de haplótipos obtidos pela técnica de IRAP, dos isolados dos complexos *Colletotrichum boninense* e *C. gloeosporioides* obtidos de *Hevea brasiliensis* e *H. guianensis* nos estados de Acre e Amazonas.

	ESTADO	HOSPEDEIRO
Valor de P	0,00175	1,00000
Intervalo de confiança (95%)	0,02574-0,57959	0,20609-3,69237
Amostra estimada (Taxa de probabilidade)	0,14809	0,8726939