

# **UFRB**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**

**CURSO DE BACHARELADO EM BIOLOGIA**

**EMANUELLE BURGOS CARDOSO**

**DIVERSIDADE DE *COLLETOTRICHUM* spp. EM SERINGUEIRA**

**Cruz das Almas - BA  
MARÇO – 2012**

**EMANUELLE BURGOS CARDOSO**

**DIVERSIDADE DE *COLLETOTRICHUM* spp. EM SERINGUEIRA**

Monografia apresentada ao curso de  
Biologia da Universidade Federal do  
Recôncavo da Bahia como requisito  
para obtenção do grau de bacharel  
em Biologia

Orientador: Dr. Jorge Teodoro Souza

**Cruz das Almas - BA  
MARÇO - 2012**

## FICHA CATALOGRÁFICA

C268

Cardoso, Emanuelle Burgos.

Diversidade de *Colletotrichum spp* em seringueira / Emanuelle Burgos Cardoso. \_ . Cruz das Almas, BA, 2012.

51f.; il.

Orientador: Jorge Teodoro Souza.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Seringueira. 2.Seringueira – Fitopatologia. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD: 633.8952

**EMANUELLE BURGOS CARDOSO**

**DIVERSIDADE DE *COLLETOTRICHUM* spp. EM SERINGUEIRA**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Jorge Teodoro de Sousa  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – CCAAB  
(Orientador)

---

Prof. Dr. Phellippe Arthur Santos Marbach  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – CCAAB

---

Prof. MSc. Patrícia Oliveira Santos  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – CETEC

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**Aos meus pais Manoel de Oliveira Cardoso e Lícia Maria Burgos pelo apoio, esforço e compreensão. Aos meus irmãos, tias (os), primas (os), avós, amigos e mestres por todo incentivo durante esta jornada e a todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.**

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela sua presença em todos os momentos da minha vida.

A meus pais, em especial a minha mãe, Lícia, que sempre me apoiou, lutou e compartilhou comigo os momentos difíceis assim como os momentos de alegria.

A meus irmãos pelo incentivo e carinho.

A meus avós, tias(os), primas(os), “primos-cunhados” por sempre torcerem por mim, pelas orações, vibrações positivas e por compreenderem as minhas ausências.

Aos mestres do curso de Biologia pelos ensinamentos e contribuições para a vida profissional. Em especial ao professor Phellippe Marbach pelo auxílio, compreensão e paciência durante a condução deste trabalho.

Ao professor Jorge Teodoro pela orientação e incentivo.

A professora Carla Fernandes Macedo, pela disponibilidade e pelo auxílio.

Ao professor Dr. Carlos Antonio Inácio e Dr. Carlos Ivan Aguilar Vildoso pelas valiosas sugestões para este trabalho.

A toda equipe de funcionários, colegas e professores do laboratório de Microbiologia da UFRB pela injeção de ânimo e principalmente, por auxiliarem em todos os momentos da execução deste trabalho, da água destilada aos ensinamentos para a vida profissional e pessoal. Em especial: Eliane Silva, Élide, Dani, Darcilúcia, Jefferson, Patrícia, Diogo, Lane, Carol e Lene.

A equipe de zeladoras do laboratório de Microbiologia da UFRB em especial a Dona Clarice pela convivência harmoniosa e auxílio.

Aos meus amigos de longas datas, aos meus grandes amigos do curso de Biologia pela convivência tão amistosa, pelo carinho e apoio, em especial Kaliane, pela grande amizade. Ao meu namorado Léo, pela força, apoio e companheirismo.

Ao sr. João pela disponibilidade em ajudar na coleta das folhas de seringueira.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

E a esse gênero de fungos que literalmente me deu um trabalho daqueles, mas, mesmo assim possibilitou-me extrair grandes lições de vida.

**Muito obrigada!**

“Nem tudo o que se enfrenta pode ser modificado, mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado”.

(Autor desconhecido)

## RESUMO

A antracnose da seringueira (*Hevea brasiliensis*), causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, tem causado prejuízos expressivos em diversas áreas produtoras do país. O objetivo deste estudo foi estudar a diversidade de isolados de *Colletotrichum* obtidos de seringueira na Bahia por meio de características morfológicas, moleculares e testes de patogenicidade. Um total de 23 isolados foram caracterizados quanto a cor da colônia, tamanho dos conídios, testes de patogenicidade e análise de sequências de um fragmento do gene 5'-*tef1*. As sequências de 5'-*tef1* tiveram seus íntrons removidos e as sequências dos exons foram unidas e utilizadas para construir árvores filogenéticas por meio dos métodos de Neighbor Joining e Máxima Parcimônia. As análises morfológicas e moleculares não mostraram nenhum tipo de relação entre si e com os testes de patogenicidade. O tamanho dos esporos mostrou sobreposição das medidas e as análises filogenéticas não apresentaram nenhum agrupamento coerente com base nos valores de bootstrap e em relação a nomenclatura das espécies recém descritas dentro do grupo *C. gloeosporioides*. Portanto, não foi possível separar as espécies de *Colletotrichum* com base nas características analisadas nesse trabalho. Mais estudos empregando o sequenciamento de outras regiões do genoma, bem como um maior número de isolados de seringueira serão necessários para a obtenção de mais dados sobre a diversidade de *Colletotrichum* nessa cultura.

**Palavras chave:** antracnose, diversidade genética, 5'-*tef1*

## ABSTRACT

*Colletotrichum* species, agents of the anthracnose disease of rubber (*Hevea brasiliensis*), cause damage to several producing areas of the country. The objective of this study was to investigate the diversity of *Colletotrichum* from rubber in Bahia State by employing morphological and molecular characteristics and pathogenicity tests. Twenty-three isolates were characterized on the basis of color of their colonies, conidial size, pathogenicity tests and analyses of a fragment of the gene 5'-*tef1*. Sequences of 5'-*tef1* had the introns removed and the joined exons were used to build phylogenetic trees with the Neighbor Joining and Maximum Parsimony methods. Morphological and molecular analyses did not show any relation between them nor with the pathogenicity tests performed. The spores showed overlapping sizes and none of the groups obtained in the phylogenetic trees were coherent when the bootstrap values and the names of the recently described species within the *C. gloeosporioides* group are considered. Thus, it was not possible to distinguish the *Colletotrichum* species in the *C. gloeosporioides* group on the basis of the characteristics studied. Additional studies employing sequencing of other genomic regions and a greater number of isolates from rubber are necessary to understand the diversity of *Colletotrichum* in this tree species.

**Keywords:** anthracnose, genetic diversity, 5'-*tef1*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	<i>Hevea brasiliensis</i>	<b>18</b>
<b>Figura 2.</b>	Apressórios de <i>Colletotrichum</i>	<b>21</b>
<b>Figura 3.</b>	Isolados de <i>Colletotrichum</i> de <i>Hevea brasiliensis</i> em placas de Petri meio em BDA 1/5.	<b>32</b>
<b>Figura 4.</b>	Estruturas dos isolados de <i>Colletotrichum</i> em meio Saboraud	<b>34</b>
<b>Figura 5..</b>	Configuração da inserção de íntrons nos isolados de <i>Colletotrichum</i> em seringueira	<b>36</b>
<b>Figura 6.</b>	Árvore filogenética do gene 5'- <i>tef1</i> construída pelo método Neighbor-Joining	<b>38</b>
<b>Figura 7.</b>	Árvore filogenética do gene 5'- <i>tef1</i> construída pelo método de Máxima Parcimônia	<b>39</b>
<b>Figura 8.</b>	Isolados que causaram a doença em folíolos destacados.	<b>42</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Isolados de *Colletotrichum* provenientes do banco de dados do NCBI. **28, 29 e 30**
- Tabela 2.** Características dos isolados de *Colletotrichum* obtidos de seringueira utilizados nesse estudo. **35**
- Tabela 3.** Teste de patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum* spp **40**

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>Lista de figuras</b>	
<b>Lista de tabelas</b>	
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS</b>	
3.1. Objetivo geral	15
3.2. Objetivos específicos	15
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	
4.1 Doenças da seringueira	16
4.2 Considerações sobre o gênero <i>Colletotrichum</i>	19
4.3 Características morfológicas do gênero <i>Colletotrichum</i>	20
4.4 Processo de infecção de <i>Colletotrichum</i> em seringueira	21
4.5 Métodos de identificação e caracterização de espécies de <i>Colletotrichum</i>	22
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	
5.1. Coleta e isolamento	25
5.2. Análise morfológica	26
5.3. Análise molecular	26
5.4. Teste de patogenicidade	30
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
6.1. Caracterização morfológica	31
6.2. Caracterização molecular	36
6.3. Patogenicidade dos isolados	40
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>42</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>43</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A seringueira (*Hevea brasiliensis*), da família Euphorbiaceae, é originária da região Amazônica. No Brasil, é encontrada naturalmente nas matas dos Estados do Acre, Amazonas, Rondônia, Pará até o norte do Paraná, incluindo todos os estados das Regiões Sudeste e Centro-Oeste e ainda em áreas vizinhas do Peru e Bolívia.

No Nordeste, além da Bahia, existem cultivos em exploração no Estado de Pernambuco. A borracha extraída dessa árvore foi descoberta em meados do século XVIII e atualmente é a principal fonte de borracha natural do mundo. Na Bahia, a seringueira foi introduzida por volta de 1906 (GASPAROTTO, 1997).

Sua importância econômica está relacionada com a alta produtividade, longo período de exploração e facilidade de manejo da cultura. A área total estimada da seringueira plantada no globo é superior a 9 milhões de hectares, tradicionalmente cultivada na área equatorial. Atualmente, Tailândia e Indonésia são os maiores produtores do mundo, respondendo por 27% e 29% da produção mundial, respectivamente. O Brasil, que no início do século XX detinha o monopólio da produção mundial, hoje responde por apenas 1%, não conseguindo sequer suprir as necessidades da indústria consumidora instalada no país (GONÇALVES *et al.*, 2001).

Estima-se que nos primeiros anos desse milênio, a demanda mundial de borracha será bem maior do que a oferta, tornando-se crítica no ano 2020, retratando o valor econômico da cultura (CECÍLIO, 2006).

Um dos maiores obstáculos para a produção de qualquer cultivo é a ocorrência de doenças durante o seu ciclo. No caso particular da seringueira, entre as doenças mais importantes da cultura encontra-se a antracnose, causada por fungos do gênero *Colletotrichum* (SILVA, 2004; ISHIKAWA, 2005; SOUZA, 2007). Estes fungos abrangem várias espécies, incluindo saprófitas e fitopatogênicas, sendo estas responsáveis por muitos danos em culturas economicamente importantes (MENEZES, 2006).

A ocorrência da doença está associada à suscetibilidade da planta hospedeira e da variedade, e às condições de alta umidade do ar como foi relatada na Amazônia por Mota & Gasparotto (1995). O fungo causador da antracnose compromete toda a parte aérea da planta em qualquer fase do seu desenvolvimento

causando desfolha precoce, com perda de vitalidade ou morte ocasionada por lesões necróticas e de tamanho variado (PERES *et al.*, 2002).

A patogenicidade específica a um determinado hospedeiro, ou grupo de hospedeiros, é um dos critérios utilizados em chaves de classificação para espécies de *Colletotrichum* (BAXTER *et al.*, 1983; SUTTON, 1980). Contudo, em grande parte dos casos, a distinção entre espécies de *Colletotrichum* é feita com base em características morfológicas dos esporos e apressórios (SUTTON, 1992).

É possível encontrar, na literatura, um número muito grande de trabalhos sobre a caracterização inter e intraespecífica de *Colletotrichum*. Os métodos mais frequentemente utilizados são a patogenicidade, análise isoenzimática e sensibilidade a fungicidas, além das tradicionais análises morfológica e cultural (CORRELL, 2007). As seguintes espécies encontram-se relatadas como causadoras da antracnose em seringueira: *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. dematium* e *C. crassipes* (GASPAROTTO, 1997; GUYOT, 2005).

Segundo Correll (2007), estudos moleculares têm ajudado a resolver algumas questões dentro do gênero *Colletotrichum*. Nos últimos anos, ferramentas moleculares têm sido empregadas para caracterizar sistematicamente as espécies deste gênero. A construção de uma árvore filogenética indica a história evolutiva de um organismo supondo as relações de ancestralidade de um conjunto de espécies (CROUCH *et al.*, 2009). Os estudos do rDNA (DNA ribossomal) permitem inferências filogenéticas das espécies possibilitando a diferenciação dos isolados dentro de cada espécie. No entanto, há uma lacuna no uso de uma filogenia básica de *Colletotrichum*. Ainda não há consenso a respeito de que regiões do genoma são mais úteis para diferenciar os isolados, delinear limites entre espécies ou para resolver a espinha dorsal deste gênero tão diverso (ROJAS *et al.*, 2010).

No Brasil, pouco se sabe a respeito da diversidade de espécies de *Colletotrichum* associadas à seringueira principalmente no estado da Bahia, onde não existem estudos relatados. Os estudos de diversidade genética e patogenicidade de espécies de *Colletotrichum* associados à seringueira propostos neste projeto, poderão ser úteis para a compreensão da morfologia, filogenia e patogenicidade deste gênero de fungos.

## **2. JUSTIFICATIVA**

A antracnose, causada por fungos do gênero *Colletotrichum* é uma doença que causa prejuízos significativos em diversas áreas produtoras do país, incluindo o estado da Bahia. Entretanto, poucas informações estão disponíveis sobre a diversidade do fungo em seringueira, principalmente neste estado.

Os estudos de diversidade genética de *Colletotrichum* spp. isolados de *Hevea brasiliensis*, possibilitarão uma compreensão acerca da morfologia, filogenia e patogenicidade do fungo.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo geral:**

Estudar a diversidade e patogenicidade de *Colletotrichum* spp. em seringueira no estado da Bahia.

### **3.2 Objetivos Específicos:**

Caracterizar por meio dos métodos morfológicos e moleculares as espécies do gênero *Colletotrichum* obtidas de seringueira no estado da Bahia;

Estudar a patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum* spp.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Doenças da seringueira

O mal das folhas, causado pelo fungo *Microcyclus ulei* é reconhecido por diversos fitopatologistas como a mais grave enfermidade da seringueira. Embora 90% dos plantios se localizem nos países do extremo oriente (Tailândia, Indonésia e Malásia), sua ocorrência ainda está restrita ao continente americano, abrangendo de El Panamá, no México (18<sup>o</sup> N), ao município de Jacupiranga (SP), no vale do Ribeira (24<sup>o</sup> 48'S). Nos países asiáticos essa doença é abordada como assunto de segurança nacional, pois a borracha natural tem grande importância na balança comercial daqueles países. Além disso, o germoplasma lá utilizado é suscetível ao patógeno e o clima da região é extremamente favorável à doença (KIMATI *et al.*, 2005).

O mal das folhas inviabiliza o estabelecimento da cultura em muitas regiões, pois causa o secamento descendente dos ramos e, em um a dois anos a morte da planta. Nas regiões Centro Oeste e Sudeste brasileiros, a implantação de seringais é favorecida pelo clima impróprio ao desenvolvimento de *M. ulei*. Apesar de não haver incidência do mal-das-folhas, outros problemas, como doenças de tronco, secamento-do-painel e, recentemente, os nematóides, continuam afetando a heveicultura. Atualmente, cerca de 60% da borracha natural do País é produzida naquelas regiões (GASPAROTTO *et al.*, 1997).

Também podem ser mencionadas a requeima e podridão dos frutos ocasionadas por *Phytophthora spp.* Além destes problemas, o patógeno é também responsável pelo cancro estriado (cancro do painel) cujo sintoma é a interrupção das sangrias durante o período chuvoso, prejudicando a produção e até mesmo levando as árvores à morte. Ainda há a mancha aureolada causada pelo fungo *Thanatephorus cucumeris*, a podridão vermelha por *Ganoderma philipii*, a podridão parda por *Rigidoporus lignosus* e a podridão branca pelo *Phellinus noxius* (GASPAROTTO *et al.*, 1997; CI FLORESTAS, 2010).

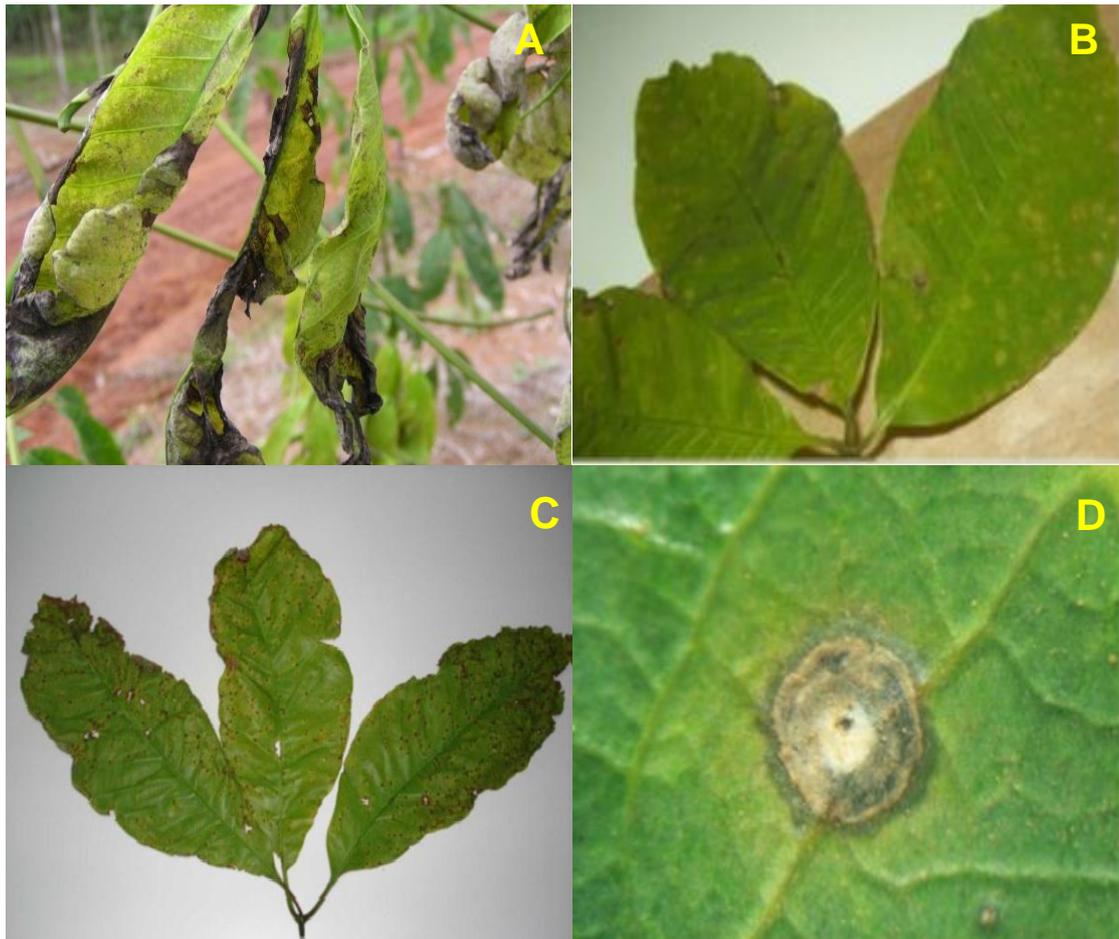
A antracnose, causado por fungos do gênero *Colletotrichum*, também apresenta importância econômica. É uma das doenças mais comuns no gênero *Hevea* na região do baixo Amazonas sendo descrita primeiramente no norte do país,

associada ao mal das folhas, comum também na Bahia e Vale do Ribeira, ou em plantas com estresse nutricional; entretanto, na forma de surtos esporádicos ou eventuais, em viveiro, jardim clonal e plantio definitivo. Em São Paulo, a doença foi constatada em 1998, em painéis de sangria, causando cancos na casca em regeneração. Hoje a doença pode ser também encontrada em nos estados de MS, PR, MG e ES (ALVARENGA & CARMO, 2008; CAIXETA *et al*, 1985; SILVA, 2004; ISHIKAWA, 2005; SOUZA, 2007; KIMATI *et al.*, 2005).

De acordo com GASPAROTTO *et al.* (1997), os primeiros registros da antracnose foram feitos por Petch, em 1906, no Sri Lanka, e por Beeley, em 1937, na Malásia. Sua ocorrência é verificada praticamente em todos os países onde a seringueira é cultivada. Foi constatada no Brasil, Costa Rica, México, Costa do Marfim, Camboja, Vietnã, Índia, Indochina, Filipinas, Zaire e Uganda (KIMATI *et al.*, 2005)

Em elevadas latitudes, a doença foi encontrada causando danos severos em brotações novas, seca descendente e lesão nas folhas, nas inflorescências e nos ponteiros. Quando o ataque é severo, muitas lesões se interligam, necrosando e acarretando enrugamento de porção ou de todo o folíolo, que normalmente cai acarretando desfolhamentos, morte da gema apical e seca descendente do ramo, causando pequenas lesões arredondadas de coloração marrom-avermelhadas que podem coalescer (ALVARENGA & CARMO, 2008).

Em todos os órgãos afetados há grande produção de esporos, envoltos em massa alaranjada, bastante característica. De acordo com Saha (2001), os sintomas descritos para a antracnose da seringueira podem ser três diferentes tipos: lesões deprimidas, lesões concêntricas e lesões diminutas marrons com halo clorótico (Figura1).



**Figura 1.** *Hevea brasiliensis*. **A:** Muda de seringueira com sintomas de antracnose. **B e C:** folhas com 2 lesões: deprimidas e lesões com halo clorótico. **D:** lesão concêntrica apresentando abundante esporulação na folha de seringueira.

As lesões nas folhas são bem caracterizadas: geralmente abundantes e dispersas no limbo; medem de 1 a 3 mm de diâmetro, apresentam porção central escura e margem estreita marrom, com presença de halo clorótico. Quando os folíolos são infectados quase maduros, suas margens e especialmente seus ápices secam e tornam-se enrugados. Em lesões causadas por *C. gloeosporioides*, geralmente podem ser observadas massas róseas, originárias de abundante esporulação conidial do patógeno que sai dos acérvulos. (GASPAROTTO *et al.*, 1997).

Os sintomas iniciam-se a partir da canaleta de corte, sobre a casca que recobre o tecido cambial, onde surgem pequenos pontos escuros. Estes tornam-se elípticos, resultando em lesões secas e deprimidas que atingem o lenho na forma de pequenos cancos (ALVARENGA & CARMO, 2008).

O agente etiológico da antracnose em seringueira é responsável por diversos prejuízos em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Apresenta grande variabilidade patogênica e genética, o que dificulta o manejo da doença. O patógeno afeta grande variedade de outras plantas, que são fontes de inóculo permanentes para as seringueiras (ALVARENGA & CARMO, 2008; GASPAROTTO *et al.*, 1997; KIMATI *et al.*, 2005).

Em seringueira, o patógeno tem sido encontrado em *H. brasiliensis*, *H. pauciflora*, *H. guianensis*, *H. benthamiana* e *H. camargoana*. As seguintes espécies têm sido relatadas como causadoras da antracnose na cultura: *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. derridis*, *C. ficus*, *Gloeosporium albo-rubrum*, *G. brunneum*, *G. elasticae* e *G. hevea*. No entanto, pesquisas consideram que todas poderiam ser classificadas como *C. gloeosporioides* (GASPAROTTO *et al.*, 1997).

#### **4.2 Considerações sobre o gênero *Colletotrichum***

Taxonomicamente, os fungos do gênero *Colletotrichum* pertencem ao domínio Eukariota, reino fungi, subreino Dikarya, filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, ordem Phyllachorales e família Phyllachoraceae (HIBBETT *et al.*, 2007). O agente causal da antracnose da seringueira é *Glomerella cingulata*, na fase anamórfica, corresponde ao fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (ALVARENGA & CARMO, 2008).

O gênero *Colletotrichum* tem atraído muita atenção, provavelmente devido a sua diversidade, distribuição e devastação representada particularmente por *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. graminicola* e *C. falcatum* (THAUNG, 2008). As espécies deste gênero têm sido relatadas ocorrendo como endófitos, saprófitas, patógenos de plantas e até mesmo patógenos de humanos, todavia ocorrem mais comumente como endófitos de planta terrestres, havendo aproximadamente 2.200 espécies de plantas como hospedeiras deste fungo (FARR & ROSSMAN, 2009; SUTTON, 1992; TEBEEST *et al.*, 1997; CANO *et al.*, 2004; KUMAR & HYDE, 2004; PHOTITA *et al.*, 2004, 2005; PROMPUTTHA *et al.*, 2007).

Os microrganismos endofíticos podem agir como simbiossiontes, protegendo as plantas hospedeiras contra pragas e patógenos, ou após serem estimulados ecológica e fisiologicamente podem atuar como parasitas, manifestar-se como

patógenos e causar danos irreversíveis às plantas hospedeiras (AZEVEDO *et al.*, 2000; OKANE *et al.*, 1998).

Como o gênero *Colletotrichum* abrange muitas espécies, um dos critérios fundamentais para a sua identificação é fundamentado, principalmente, na determinação da planta hospedeira. Neste sentido é válido dizer que uma simples espécie pode causar doença em vários hospedeiros, como também, um único hospedeiro pode ser atacado por várias espécies de *Colletotrichum*, o que favorece sua sobrevivência e dificulta seu controle. (ALVARENGA & CARMO, 2008; MENEZES, 2006; FREEMAN, 1998).

A identificação das espécies patogênicas de *Colletotrichum* em um determinado hospedeiro, bem como a determinação de sua variabilidade, é fundamental para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de controle, além de propiciar um melhor entendimento da epidemiologia da doença (ANDRADE, 2007; TOZZE JÚNIOR, 2007).

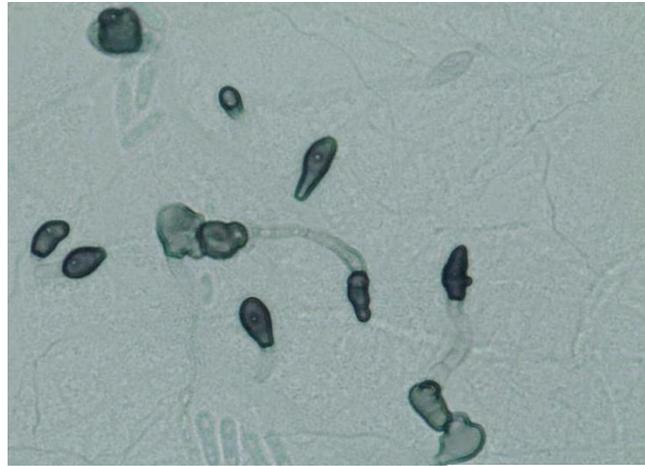
#### **4.3 Características morfológicas do gênero *Colletotrichum***

As principais características morfológicas que identificam o gênero são os seus conidiomas acervulares. As células conidiogênicas das espécies de *Colletotrichum* também podem ser formadas em ramificações laterais do micélio (CANO *et al.*, 2004; MENEZES, 2006).

As setas e células conidiogênicas parecem ser similares, pelo menos em sua função. Em determinadas condições ambientais, as setas podem produzir conídios na sua extremidade, como já observado em *C. gloeosporioides* e *C. gossypii*. A presença de setas férteis e, portanto, com função semelhante a de um conidióforo fialídico, já foi descrita por alguns pesquisadores (LENNÉ *et al.*, 1984; MENEZES & HANLIN a, 1996, citado por MENEZES, 2006).

Os conídios provenientes dos acérvulos estão envolvidos por uma matriz gelatinosa composta de polissacarídeos e proteínas solúveis em água. Essa matriz, provavelmente, protege os conídios da dissecação, aumentando a eficiência de germinação e penetração no tecido hospedeiro. A germinação dos conídios ocorre somente na presença de água livre ou em umidade relativa maior que 90% (MENEZES, 2006). Segundo Cano *et al.* (2004), quando crescem em cultura, as

espécies do gênero *Colletotrichum* não costumam produzir seus conidiomas típicos, porém, podem ser reconhecidas pela presença de apressórios (Figura 2).



**Figura 2.** Apressórios de *Colletotrichum*

Na terminação do tubo germinativo do conídio há formação de um apressório, que também pode ser produzido na extremidade de hifas do micélio. Durante o desenvolvimento do apressório há síntese de proteínas requeridas para a produção de melanina que confere a cor escura da estrutura, tornando-o infectivo. Há relatos de que os apressórios hialinos, sem cor, não são infectivos (MENEZES, 2006).

Comumente, os apressórios atuam como estruturas de sobrevivência, sendo resistentes às condições adversas do ambiente. Além das propriedades de sobrevivência, adesão e infecção do hospedeiro, os apressórios podem germinar originando outros apressórios em cadeia, ou ainda, um simples tubo germinativo, com potencial para produzir conídios fialídicos na sua extremidade, como observado em *C. gloeosporioides* por MENEZES & HANLIN (1996b).

#### **4.4 Processo de infecção de *Colletotrichum* em seringueira**

No processo infectivo, o apressório adere-se à superfície do hospedeiro por meio de uma mucilagem hemicelulósica, emitindo hifas de penetração e colonização do tecido (MENEZES, 2006). Os conídios de *Colletotrichum* germinam em 4 a 6 horas, na presença de água livre. Estes, não formam estruturas de sobrevivência, porque sua viabilidade diminui rapidamente. No entanto, o micélio pode permanecer

viável por um longo período em sementes infectadas, em restos de cultura, ou ainda, em infecções latentes, onde as plantas não mostram sintomas. Contudo, a formação de microesclerócios por algumas espécies, como exemplo, *C. coccodes*, desempenha um importante papel na sobrevivência. Os sintomas aparecem três dias após a inoculação e a esporulação ocorre após o quinto dia (BLAKEMAN & HORNBY, 1966).

A disseminação dá-se, principalmente, através da água da chuva, não se rejeitando a possibilidade de ser transferido planta a planta por intermédio da faca de sangria. Condições climáticas que favorecem a doença são temperatura média de 21<sup>o</sup> C, umidade relativa acima de 90% por 13 horas e períodos chuvosos (ALVARENGA & CARMO, 2008).

#### **4.5 Métodos de identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum***

Tradicionalmente, as espécies de *Colletotrichum* tem sido diagnosticadas e delimitadas principalmente pelas características morfológicas como: a cor da colônia, tamanho e forma dos conídios e apressórios, temperatura ideal para o crescimento, presença ou ausência de cerdas, e existência do teleomorfo *Glomerella*. Devido a influências ambientais na estabilidade das características morfológicas e da existência de formas intermediárias, estes critérios nem sempre são adequados para a diferenciação confiável entre as espécies de *Colletotrichum*. A sobreposição de caracteres morfológicos e fenótipos entre espécies torna difícil sua classificação (THAUNG, 2008; SMITH E BLACK, 1990; GUNNELL & GUBLER, 1992; SUTTON, 1992).

Os critérios de Reconhecimento Morfológico de Espécies (MSR) e Reconhecimento Biológico de Espécies (BSR) têm sido muito difíceis de desenvolver para muitos taxa endófitos, pois são fenotipicamente simples e muitas vezes não desenvolvem estruturas vegetativas ou reprodutivas taxonomicamente informativas *in vitro* (BURNETT, 2003; LACAP *et al.*, 2003; MAYR, 1942; WANG & GUO 2007; THOMAS *et al.*, 2008; REYNOLDS 1993; TAYLOR *et al.*, 1999).

O uso exclusivo da morfologia para se determinar os limites de espécies fúngicas, tem se mostrado inadequado por diversas razões: todos os caracteres se baseiam em uma única parte do ciclo de vida – o corpo de frutificação, o qual é

relativamente simples e, portanto, oferece um número limitado de caracteres para a separação de espécies; fungos de linhagens evolutivas divergentes podem compartilhar características morfológicas similares como consequência da convergência evolutiva; e, finalmente, a extensão da plasticidade fenotípica infra-táxon é praticamente desconhecida (PETTERSEN & HUGHES, 1999).

O Reconhecimento Biológico de Espécie (BSR), publicado por Mayr em 1963, define espécie como grupos de populações naturais intercruzáveis isolados reprodutivamente de outros grupos (HARRINGTON & RIZZO, 1999), esse conceito tem sido utilizado para identificar grupos que pareiam, os quais são então igualados a espécies (TAYLOR *et al.*, 2000). É um critério difícil porque os sistemas de acasalamento são frequentemente desconhecidos e a maioria das espécies não podem ser induzidas a produzir seus estados sexuais em cultura. Além das espécies estreitamente relacionadas poderem reter cruzamento específico como caráter ancestral (ZERVAKIS *et al.*, 2004; DETTMAN *et al.*, 2008 CITADO POR GAZIS *et al.*, 2011).

A diferenciação entre espécies de *Colletotrichum* com base em sua gama de hospedeiros, ou hospedeiro de origem pode não ser um critério confiável para fungos deste gênero. Alguns taxa parecem ser restritos a família do hospedeiro, gêneros ou espécies dentro dessas famílias, ou mesmo cultivares, a exemplo do feijão, enquanto outros possuem faixas mais extensas de hospedeiros, e muitas vezes são morfológicamente variáveis em cultura (FREEMAN, 1998; SIMMONDS, 1965; BAILEY & JEGER, 1992; TEBEEST *et al.*, 1997; FREEMAN *et al.*, 2000; LATUNDE-DADA, 2001; Du *et al.*, 2005; THAUNG, 2008).

Os métodos para a caracterização inter e intraespecíficas encontrados na literatura, são os mais variados. Além das tradicionais análises morfológicas e culturais a patogenicidade, análise isoenzimática e sensibilidade a fungicidas são os mais frequentes (SUSSEL, 2005).

Diferentemente do BSR e do MSR, o critério de Reconhecimento Filogenético de Espécies (PSR) utiliza a variação dos ácidos nucleicos para circunscrever espécies de fungos fenotipicamente uniformes, assexuados e até mesmo linhagens não cultiváveis (O'DONNELL *et al.*, 1998; ARNOLD & LUTZONI, 2007). De acordo com este conceito, as espécies são consideradas como "um cluster irreduzível de organismos diagnosticavelmente diferentes de outros grupos e dentro do qual existe um padrão parental de ancestralidade e descendência" (CRACRAFT, 1983, 1989).

Nos últimos anos, ferramentas moleculares tem sido empregadas para caracterizar sistematicamente espécies de *Colletotrichum*, começando com a metodologia baseada na aplicação de marcadores no final dos anos 80, seguida da análise do espaçador interno transcrito do rDNA (ITS), no início da década de 1990 (SHERRIFF *et al.*, 1994, 1995; SREENIVASAPRASAD *et al.*, 1996), e, mais recentemente, filogenias moleculares com dois ou mais loci (CROUCH *et al.*, 2009; DU *et al.*, 2005; FARR *et al.*, 2006). Dentre esses loci estão incluídos os genes que codificam as proteínas  $\beta$ -tubulina, actina e o fator de alongação 1 $\alpha$  (MICHEREFF, BARROS *et al.*, 2001).

Vários estudos de sistemática molecular que usaram RFLP, rDNA e análises de RAPD têm sido usados para identificação de *Colletotrichum* spp. Em seu trabalho Ribeiro *et al.* (2009), confrontaram as técnicas PCR-RFLP e sequenciamento da região ITS-rDNA para análise filogenética de *Colletotrichum* spp. concluindo que a técnica de PCR-RFLP não se mostrou eficiente na diferenciação das espécies. A técnica de sequenciamento possibilitou a separação filogenética eficiente das espécies dos isolados de *Colletotrichum* spp., vinculados à doença mancha da gala da macieira.

Barguil *et al.* (2009) utilizaram caracteres morfológicos e também técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleotídeos específicos para identificar isolados de *Colletotrichum* coletados em antúrio (*Anthurium andraeanum*), bastão do imperador (*Etilingera elatior*) e helicônia (*Heliconia* spp.) analisando a variabilidade genética por meio de oligonucleotídeos arbitrários (RAPD). A utilização de PCR com oligonucleotídeos espécie-específicos capazes de amplificar uma região do DNA nuclear ribossomal possibilitou a identificação de *C. gloeosporioides* como o agente causal da antracnose em inflorescências de plantas ornamentais tropicais. Os pares de primers Calnt/ITS4 e Calnt2/ITS4 foram utilizados por Pereira (2009) para amplificação da região ITS do DNA ribossômico de isolados originários de frutos de goiabeira constatando que *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* são espécies causadoras de antracnose nestes frutos no Estado de São Paulo.

Rojas *et al.* (2010), utilizaram sequências de 7 genes nucleares para a filogenia de *Colletotrichum* associados ao cacaueiro e outras plantas tropicais no Panamá comprovando a limitação da região ITS no delineamento de espécies no gênero. Entretanto, sequências do gene que codifica para o fator de alongamento da tradução, o tef 1 $\alpha$ , foram bastante úteis na delimitação de espécies, principalmente

dentro do grupo atualmente classificado com *C. gloeosporioides*, resultando em diversas espécies ainda não descritas.

Em seu trabalho, Gazis *et al.* (2011). Também realizou estudos de filogenia multilocus de três grupos de taxa endofíticos: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pestalotiopsis microspora*, e espécies de *Trichoderma harzianum* com objetivo de examinar como a escolha e o número de marcadores genéticos e critérios de delimitação de espécies podem influenciar nas estimativas de biodiversidade e na compreensão da ecologia de uma comunidade. Para testar a hipótese, foram aplicados critérios de Reconhecimento filogenético de espécies, explorando a congruência de genealogias de genes para três independentes loci: ITS, *tef1α* e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPD). Esse estudo demonstrou que a região ITS sozinha geralmente subestima o número de espécies previsto por outros loci nuclear. Estes resultados questionam a utilização de ITS e os limiares arbitrários de divergência para a delimitação das espécies.

Vários projetos genoma de larga escala estão em andamento para as espécies de *Colletotrichum*, a fim de fornecer recursos para a genômica comparativa e análise molecular de patogenicidade de fungos, o que permitirá a identificação de genes e proteínas relevantes para cada estágio da infecção de plantas (DAMM *et al.*, 2010).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Coleta e isolamento

Folhas de seringueira foram coletadas em seringal comercial na Fazenda Michelin, em Igrapiúna, BA. Fragmentos das bordas das lesões foram retirados, desinfestados superficialmente em álcool 70%, hipoclorito de sódio 1% e enxaguados por três vezes em água destilada esterilizada. Estes fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar). As placas foram mantidas a temperatura ambiente por, aproximadamente, sete dias após os quais foi realizada a repicagem para a purificação das amostras. Os isolados purificados foram preservados tanto em água à temperatura ambiente quanto em óleo mineral.

## 5.2 Análise morfológica

Para a observação das estruturas dos fungos, foi feita a técnica de microcultivo em lâmina (técnica de Ridell), onde foi criada uma câmara úmida na placa de Petri com auxílio do papel toalha contendo água destilada esterilizada. Em seguida, foi depositado sobre a lâmina um pequeno disco de 6 mm de diâmetro do meio de cultura (BDA 1/5 e Sabourad), assepticamente, com o auxílio de pinça. Cada isolado de *Colletotrichum* foi semeado ao redor do meio de cultura sobre a lâmina e coberto com a lamínula sendo suavemente comprimido sobre a preparação, utilizando-se uma pinça. Os isolados foram incubados em BOD durante aproximadamente 10 dias. Para o exame microscópico, um pequeno fragmento da colônia foi retirado com auxílio de uma alça de platina (em gancho) e a lamínula foi colocada sobre a lâmina contendo lactofenol. Em seguida as lâminas foram examinadas em microscópio óptico.

Os conídios obtidos a partir de culturas das placas contendo meio BDA 1/5, preparando-se 2 lâminas de cada isolado, coradas com lactofenol (contendo azul de metileno) e medindo-se 25 conídios por lâmina, em microscópio óptico por meio da lente objetiva de 40X. As características avaliadas foram: cor da colônia, tamanho dos conídios (relação comprimento/largura) e a presença de apressórios.

## 5.3 Análise molecular

Para a extração do DNA genômico, os fungos foram cultivados em meio líquido BD (batata-dextrose) durante 5 dias. O micélio foi coletado, mantido em freezer -20 °C por 24 horas, liofilizado e macerado em contato com nitrogênio líquido. Em seguida foi adicionado ao macerado 800 µL do tampão de lise constituído por: água Milli-Q, Tris-HCl 200 mM e EDTA 25 mM, com pH 8,0, dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%, NaCl 250 mM e β-mercaptoetanol 1% e misturado com o auxílio do Vortex. Os tubos foram mantidos em banho-maria (70 °C) por 30 min, sendo agitados a cada 10 min. Em seguida, foi realizada a desproteíntização, adicionando-se 700 µL de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 24:1. As amostras foram agitadas, por suaves inversões, por 10 min e centrifugadas a 4 °C, a

14000 rpm, por 10 min. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos de 1,5 mL. Para a precipitação do DNA foi adicionado ao sobrenadante NaCl a 100 mM e isopropanol absoluto gelado. Os tubos foram mantidos a -80 °C por 30 min e, a seguir, centrifugados. O sobrenadante foi vertido e o pellet foi lavado duas vezes com etanol 70% e seco em capela por 30 min. Os pellets foram ressuspensos em 100 µL de solução contendo água Milli-Q e RNase, na concentração de 40 µg/mL, e colocados em banho-maria a 37<sup>o</sup> C por 30 min para dissolver. As amostras foram quantificadas em gel 0,8% de agarose onde foram visualizadas bandas de DNA genômico total, separadas por eletroforese, como indicadoras da integridade do DNA extraído. Após esse processo, uma alíquota das amostras de DNA de cada isolado foi diluída para o volume final de 50 µL.

A identificação molecular dos isolados obtidos de seringueira foi realizada utilizando-se os primers 2218 (5´ATGACACCRACRGCACRGTYTG-3´) e EF2T (5´-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3´), descritos por Rojas et al (2010), para a amplificação e sequenciamento de um fragmento de aproximadamente 600 pb do gene 5´fator de transcrição e alongação 1 (5´-*tef1*). As amplificações foram realizadas em um volume total de 50 µL contendo 50 mM de KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de cada dNTP (Promega), 20 pmol de cada primer, 6 µL de DNA genômico (10ng.µL<sup>-1</sup>), e 2.0 U de Taq DNA polimerase (Promega). Todas as reações foram feitas em termociclador PTC-100 (MJ Research). As amplificações consistiram de desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, 10 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento de primers a 62 °C por 1 min, diminuindo 1 °C a cada ciclo sucessivo, alongamento a 72 °C por 2 min, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 52 °C por 1 min, alongamento a 72 °C por 2 min e uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose de baixo ponto de fusão (NuSieve) a 1,5%. Em seguida, as bandas foram cortadas do gel, congeladas a -8 °C por 1 h e centrifugadas por 15 min a 1400 rpm. O sobrenadante foi usado diretamente para o sequenciamento com os primers anteriormente descritos.

O sequenciamento foi feito com o BigDye Deoxy terminator sequencing kit (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante em um Sequenciador Automático de DNA.

Para a análise das sequências provenientes dos dois primers (*forward* e *reverse*), foi utilizado o programa Bioedit v.7.0.9 (HALL, 1999) para unir e corrigir as

sequências nos cromatogramas. O programa BLAST (ALTUSCHL *et al.*, 1997) foi usado para comparar as sequências dos isolados do presente trabalho 5'-*tef1* com as sequências de *tef1* encontradas nos bancos de dados públicos (Tabela1). Ajustes manuais nas sequências foram feitos por meio do programa MEGA 5 (TAMURA *et al.*, 2011) a fim de alinhar corretamente os limites entre íntrons e exons. Deste ajuste, 106 sequências do banco de dados foram alinhadas com as sequências de nucleotídeos deste trabalho.

As análises filogenéticas foram realizadas no programa MEGA 5 (TAMURA *et al.*, 2011). As análises de suporte não paramétrico foram feitas com o método de bootstrap. As árvores filogenéticas foram geradas pelos métodos Neighbor-Joining (NJ), utilizando o modelo evolutivo Jukes-Cantor, e Máxima Parcimônia (MP) feitos com 1000 reamostragens.

**Tabela 1.** Isolados de *Colletotrichum* provenientes do banco de dados do NCBI

<b>Espécie</b>	<b>Isolado</b>	<b>Nº de acesso<sup>1</sup></b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Local</b>
<i>Colletotrichum theobromicola</i>	strain GJS08_50	gij 312264664	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum theobromicola</i>	strain GJS08_48	gij 312264663	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum theobromicola</i>	strain GJS08_43	gij 312264662	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum theobromicola</i>	strain GJS08_45	gij 312264661	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum theobromicola</i>	strain GJS08_46	gij 312264660	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum theobromicola</i>	strain GJS08_47	gij 312264659	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum theobromicola</i>	strain GJS08_51	gij 312264658	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	strain IMI356878	gij 312264636	<i>Citrus sinensis</i>	Panamá
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain 4226	gij 312264635	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain E649	gij 312264634	<i>Tetragastris panamensis</i>	Panamá
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain E406	gij 312264631	<i>Pentagonia macrophylla</i>	Panamá
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain 5283	gij 312264630	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain 7423	gij 312264629	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain 8364	gij 312264628	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain GJS08_42	gij 312264627	<i>Annona muricata</i>	Panamá
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain 8453	gij 312264626	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain 5101	gij 312264625	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain 2126	gij 312264624	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain 5087	gij 312264623	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain 7585	gij 312264622	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain E449	gij 312264621	<i>Pentagonia macrophylla</i>	Panamá
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain 3870	gij 312264618	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain E1533	gij 312264617	<i>Viola surinamensis</i>	Panamá
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain E347	gij 312264616	<i>Pentagonia macrophylla</i>	Panamá
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain E704	gij 312264615	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá

<b>Espécie</b>	<b>Isolado</b>	<b>Nº de acesso<sup>1</sup></b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Local</b>
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain Q633	gij 312264612	<i>Cordia alliodora</i>	Panamá
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain Z1080	gij 312264611	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain E1164	gij 312264610	<i>Trichilia tuberculata</i>	Panamá
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain 8416	gij 312264608	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain 5806	gij 312264613	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain CM42	gij 308211270	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain CM22	gij 308211269	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain 8401	gij 312264642	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum tropicale</i>	strain E2303	gij 312264639	<i>Virola surinamensis</i>	Panamá
<i>Colletotrichum sp.</i>	E1456	gij 312264638	<i>Virola surinamensis</i>	Panamá
<i>Colletotrichum boninense</i>	strain Z1090	gij 312264674	<i>Zamia obliqua</i>	Panamá
<i>Colletotrichum boninense</i>	strain LCM232	gij 312264673	<i>Quercus</i>	Panamá
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain IQ19	gij 308211266	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain LA5	gij 308211265	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain IQ97	gij 308211264	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain LA27	gij 308211263	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain IQ98	gij 308211262	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain IQ25	gij 308211261	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain IQ26	gij 308211260	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain IQ22	gij 308211259	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain CM152	gij 308211257	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain CM181	gij 308211255	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain CM73	gij 308211254	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain CM23	gij 308211252	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain IQ95	gij 308211219	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain IB235	gij 308211217	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum ignotum</i>	strain E183	gij 312264657	<i>Genipa americana</i>	Panamá
<i>Colletotrichum ignotum</i>	strain 8395	gij 312264656	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum ignotum</i>	strain 3679	gij 312264649	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum ignotum</i>	strain 1087	gij 312264648	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum ignotum</i>	strain 3589	gij 312264647	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum ignotum</i>	strain 7574	gij 312264646	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum ignotum</i>	strain E1418	gij 312264645	<i>Trichilia tuberculata</i>	Panamá
<i>Colletotrichum ignotum</i>	strain E886	gij 312264644	<i>Tetragastris panamensis</i>	Panamá
<i>Colletotrichum ignotum</i>	strain E42	gij 312264643	<i>Anacardium excelsum</i>	Panamá
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain IQ37	gij 308211239	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain IQ60	gij 308211234	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain IQ42	gij 308211233	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain IB76	gij 308211221	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain LA129	gij 308211230	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain IQ218	gij 308211227	<i>Hevea</i>	Peru

<b>Espécie</b>	<b>Isolado</b>	<b>Nº de acesso<sup>1</sup></b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Local</b>
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain LA171	gi 308211224	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain IB45a	gi 308211220	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain LA92	gi 308211231	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain IQ165	gi 308211226	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain CM45	gi 308211241	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain CM44a	gi 308211240	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain CM63	gi 308211237	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain CM3	gi 308211236	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain CM163	gi 308211235	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>	strain IB43a	gi 308211238	<i>Hevea</i>	Peru
<i>Colletotrichum sp.</i>	E2550	gi 312264683	-	-
<i>Colletotrichum sp.</i>	Q882	gi 312264684	-	-
<i>Colletotrichum sp.</i>	GJS08_143	gi 312264655	<i>Mangifera indica</i>	Panamá
<i>Colletotrichum sp.</i>	GJS08_145	gi 312264654	<i>Mangifera indica</i>	Panamá
<i>Colletotrichum sp.</i>	GJS08_146	gi 312264653	<i>Mangifera indica</i>	Panamá
<i>Colletotrichum sp.</i>	GJS08_148	gi 312264652	<i>Mangifera indica</i>	Panamá
<i>Colletotrichum sp.</i>	GJS08_147	gi 312264651	<i>Mangifera indica</i>	Panamá
<i>Colletotrichum sp.</i>	GJS08_144	gi 312264650	<i>Mangifera indica</i>	Panamá
<i>Colletotrichum sp.</i>	4801	gi 312264680	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>Colletotrichum sp.</i>	LCM243	gi 312264679	<i>Quercus</i>	Panamá
<i>Colletotrichum sp.</i>	E681	gi 312264678	<i>Tetragastris panamensis</i>	Panamá
<i>Colletotrichum sp.</i>	E1249	gi 312264677	<i>Trichilia tuberculata</i>	Panamá
<i>Colletotrichum sp.</i>	1093	gi 312264676	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá

Dados das sequências buscadas no NCBI que neste trabalho foram alinhadas para a construção das árvores filogenéticas.

<sup>1</sup> Número de identificação da sequência dentro do banco de dados, GI.

#### 5.4. Teste de patogenicidade

Neste estudo foram usados isolados de seringueira selecionados para a identificação morfológica. Os testes de patogenicidade foram realizados por meio de inoculações em folíolos destacados coletados na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Para os testes em folíolos destacados, folíolos sadios de seringueira foram colocados em placas de Petri contendo algodão umedecido com água destilada e esterilizada. A inoculação foi feita tanto na porção adaxial quanto na abaxial dos folíolos, de duas formas distintas: sem fermento e com fermento causado por perfurador flambado. Um disco de micélio foi colocado em contato com a superfície da folha. No tratamento controle, nenhum isolado foi inoculado nos folíolos. A

patogenicidade avaliada em 24, 48 e 72 horas após a inoculação dos isolados nos folíolos destacados.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Caracterização morfológica

Os isolados apresentaram-se pouco heterogêneos quanto a coloração das colônias exibindo variações de branco a cinza em meio BDA 1/5 (Figura 3). Não foi constatada a presença de setas em nenhum dos isolado examinados em meio BDA e Sabourad. Os apressórios produzidos tanto em meio BDA 1/5 quanto em meio Sabourad apresentaram coloração marrom escuro e formato variando de circular, ovalado a ligeiramente irregular. Os conídios apresentaram-se retos e cilíndricos com extremidades arredondadas em alguns, mas a maior parte deles mostraram ápices abruptamente afilados (Figura 4 C e D). O tamanho dos conídios variou de 2,5-4 $\mu$  X 8,5-12 $\mu$ . Somente 7 isolados apresentaram escleródios em meio BDA 1/5 (Tabela 2).

O isolado HB048 foi o único a produzir peritécios em meio Saboraud. Esses peritécios apresentaram ascósporos típicos de *Glomerella*, o estágio sexual de *Colletotrichum*.

As sequências da região 5' do gene *tef1* (5'-*tef1*) dos isolados de seringueira foram comparadas com a do holótipo de *Colletotrichum gloesporioides* (ROJAS *et al.*, 2010) e 14 isolados mostraram identidade entre 96 a 100%, enquanto que os outros 9 isolados mostraram identidade de 81 a 82% (Tabela 2).



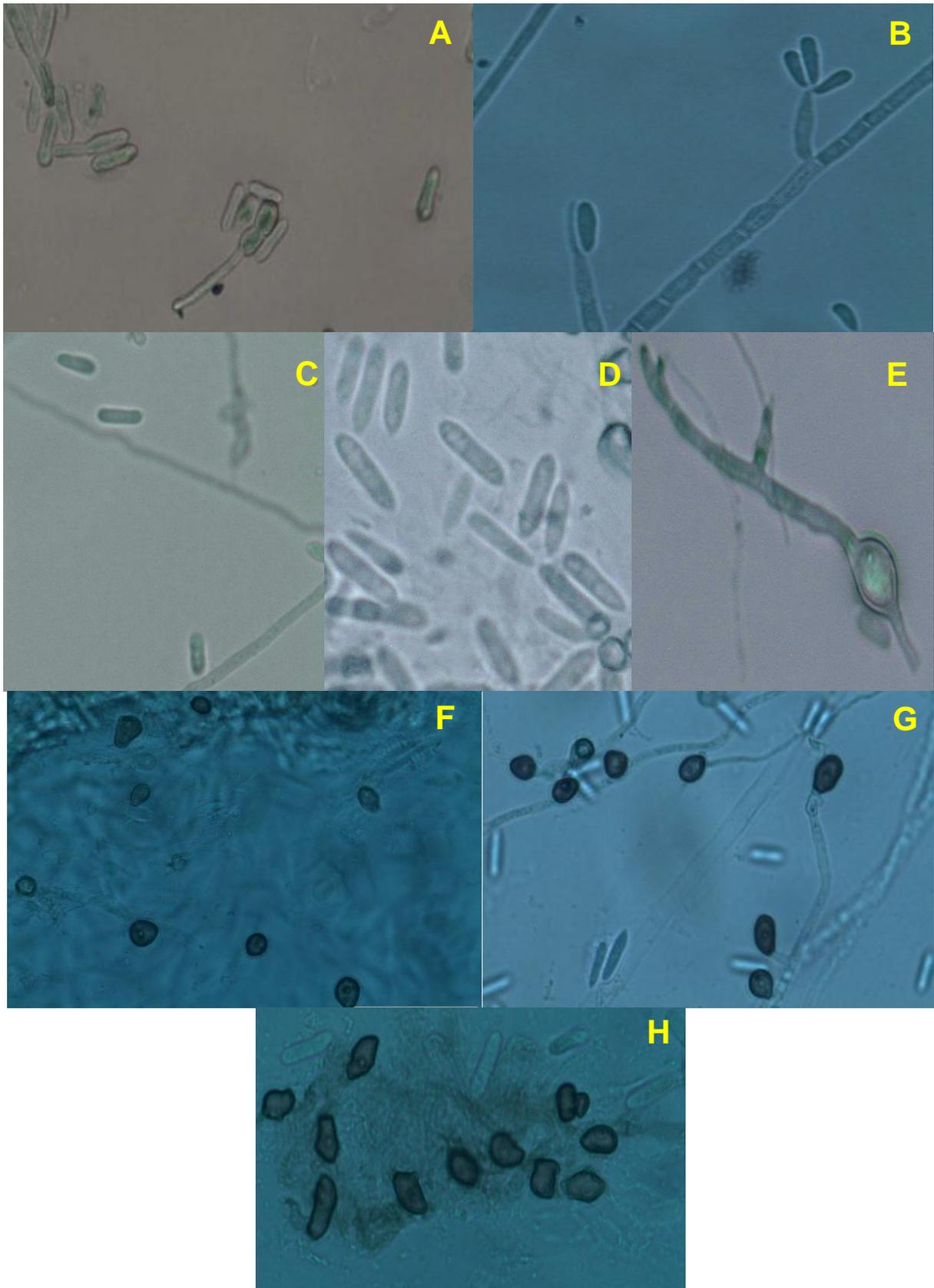
**Figura 3.** Isolados de *Colletotrichum* de *Hevea brasiliensis* em placas de Petri meio BDA 1/5.

As dificuldades na identificação das espécies de *Colletotrichum* decorrem da grande diversidade fenotípica, influência de fatores ambientais, estabilidade dos caracteres morfológicos, existência de formas intermediárias e falta de padronização de condições culturais empregadas nos diferentes estudos (SUTTON, 1992; FREEMAN *et al.*, 1998; LOPEZ, 2001). Segundo Vinnere (2004), a caracterização baseada somente em critérios morfológicos pode não ser suficiente em decorrência a grande variabilidade de características para algumas espécies do gênero *Colletotrichum*, acentuada quando os isolados em estudo são cultivados em meios artificiais. A maioria dos fungos incluindo *Colletotrichum acutatum* foram anteriormente classificados como *C. gloeosporioides* (BAXTER, 1983; SUTTON, 1992; VAN DER AA, 1990).

Segundo Sutton (1992), *C. acutatum* apresenta conídios retos, fusiformes e abruptamente afilados nas extremidades, com comprimento variando entre 8,5- 16,5  $\mu\text{m}$  e largura entre 2,5 e 4,0  $\mu\text{m}$ , enquanto *C. gloeosporioides* possui conídios retos,

cilíndricos, de ápices arredondados, com comprimento entre 9  $\mu\text{m}$  e 24  $\mu\text{m}$  e largura entre 3,5 e 6  $\mu\text{m}$ . As medidas observadas no presente estudo se sobrepõe e, apesar de alguns isolados apresentarem extremidades afiladas, não foi possível enquadrar nenhum dos isolados em uma espécie determinada.

Espécies tradicionais deste gênero formam complexos de espécies filogenéticas morfologicamente indistinguíveis umas das outras (DU *et al.*, 2005; CROUCH *et al.*, 2009) e formas intermediárias são comuns. Além disso, sabe-se que existe variação na morfologia dos conídios em função do local onde são produzidos. Conídios produzidos em acérvulos são mais uniformes que aqueles produzidos em conidióforos fialídicos (MENEZES, 2006), frequentemente produzidos em meio de cultura. Assim, cada isolado de *Colletotrichum* é composto por uma população de biótipos, tornando muito difícil a definição do conceito morfológico de espécie (MENEZES, 2006).



**Figura 4.** Estruturas dos isolados de *Colletotrichum* em meio Saboraud. A) Conídios germinando (40X). B) Conidiogênese filídica (40X). C) Conídios retos, cilíndricos, de ápices arredondados (40X). D) Conídios retos, fusiformes e abruptamente afilados nas extremidades (40x). E) Clamidósporo F) e G) Apressórios do tipo circular e ovalado. H) Apressório ligeiramente irregular.

**Tabela 2.** Características dos isolados de *Colletotrichum* obtidos de seringueira utilizados nesse estudo.

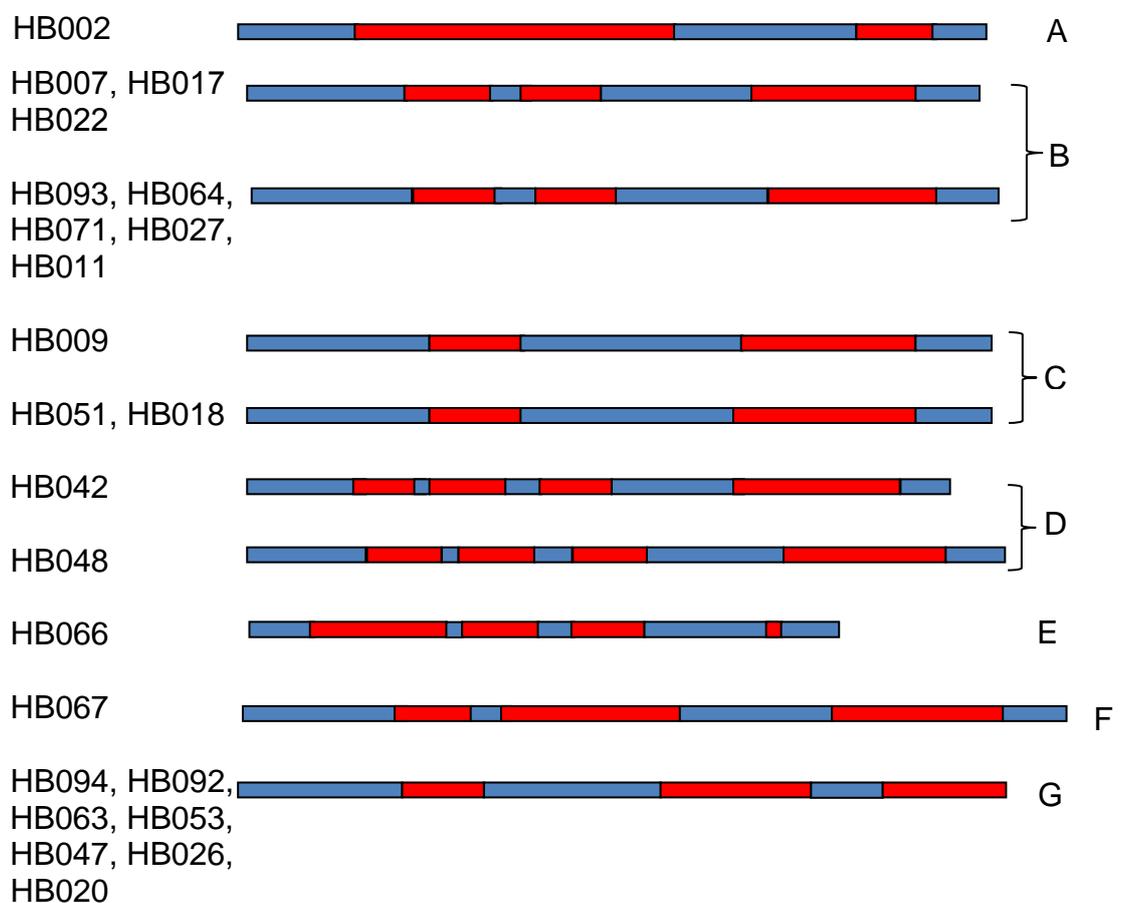
Isolado	Identidade em relação à <i>C. gloeosporioides</i> <sup>1</sup>	Esporos Comprimento x largura <sup>2</sup> (em µm)	Cor da colônia (meio BDA)	Escleródios (Meio BDA)
HB 002	100%	3x 9- 10	Branca Alaranjada	-
HB 007	82%	3 x 9 -12	Branca acinzentada	-
HB 009	96%	2,5-3x 8-10	Esverdeada	-
HB 011	81%	3,0- 3,5 x 9-9,5	Cinza ao centro com bordas brancas	-
HB 017	82%	2,5 x 8,5	Branca acinzentada	+
HB 018	97%	2,5- 3,5 x 8,5 -9	Branca	+
HB0 20	98%	2,5-3 x -9-12	Branca esverdeada	-
HB 022	82%	2,5-3 x 9-12	Branca alaranjada	-
HB 026	98%	3-4 x 8,5-10	Branca alaranjada	-
HB 027	81%	3-4 x9-9,5	Branca acinzentada	+
HB 042	100%	3,5-4 x 9-10	Branca acinzentada	-
HB 047	98%	3-4 x 9-10	Branca acinzentada	+
HB 048	100%	3-4 x 9-10	Verde escura	-
HB 051	97%	2,5-3 x 8,5-9	Branca acinzentada	+
HB 053	98%	2,5-4 x 8,5 - 9	Branca	-
HB 063	98%	2,5- 4x 8,5-9	Branca alaranjada	+
HB 064	81%	3-4 x 9-9,5	Branca acinzentada	-
HB 066	100%	2,5-4 x 10-12	Cinza	+
HB 067	82%	2,5-3 x 9-12	Acinzentada	-
HB071	81%	3-4 x 9-9,5	Branca Alaranjada	-
HB 092	98%	3-3,5x 9-12	Branca alaranjada	-
HB 093	81%	3-4 x 9-10	Cinza alaranjada	-
HB 094	98%	3-3,5 x 9-12	Branca alaranjada	-

<sup>1</sup>ID: Identidade dos isolados: Indica a quantidade de nucleotídeos das sequências inteiras dos isolados de seringueira alinhados com o holótipo: *Colletotrichum gloeosporioides*, IMI 356878, gi: 312264636 (em %) por meio do programa BLAST.

<sup>2</sup> Dimensão dos esporos comprimento x largura máximo e mínimo.

## 6.2. Caracterização molecular

O tamanho das sequências do fragmento correspondente a região 5' do gene *tef1* (5'-*tef1*) de 23 isolados de *Colletotrichum* de seringueira variou de 431-587pb. As sequências apresentaram de 2 a 4 íntrons. Foram observadas de 10 distintas configurações dos sítios de inserção de íntrons. Dessas 10 configurações, 7 puderam ser agrupadas (A - G) por apresentarem semelhanças (Figura 6).



**Figura 5.** Configuração da inserção de íntrons nos isolados de *Colletotrichum* em seringueira da região 5' *tef1*. Das 10 configurações dos isolados, 7 foram agrupadas em: A, B, C, D, E, F e G por semelhança no tamanho de íntrons (em vermelho) e de exons (em azul).

Essas 23 sequências foram combinadas com 167 outras obtidas de bancos de dados públicos e, 106 (Tabela 1) foram utilizadas no alinhamento para uma análise de diversidade. Nesse trabalho os exons foram utilizados por que não foi possível estabelecer nenhuma relação de homologia com base nos íntrons.

O alinhamento mostrou que nem sempre os isolados com configuração semelhante foram agrupados no mesmo clado. Por exemplo, os isolados HB009 e HB051, apesar de terem uma configuração de íntrons semelhante, foram agrupados separadamente na análise filogenética (Figuras 6 e 7). Esses resultados podem ser explicados pelo fato da análise ter sido conduzida com os exons.

Ao contrário dos resultados aqui apresentados, Rojas *et al.* (2011) usaram 7 genes para estudar a filogenia de *Colletotrichum* e concluíram que o uso desses 7 genes era equivalente ao uso apenas de 5'-*tef1*. Esses autores incluíram os íntrons na análise que conduziram e descreveram três novas espécies de dentro do clado que abriga *C. gloeosporioides*. No entanto, a análise dos dados sem a remoção dos íntrons também não forneceu um agrupamento coerente como relatado por Rojas *et al.* (2011) (Dados não apresentados).

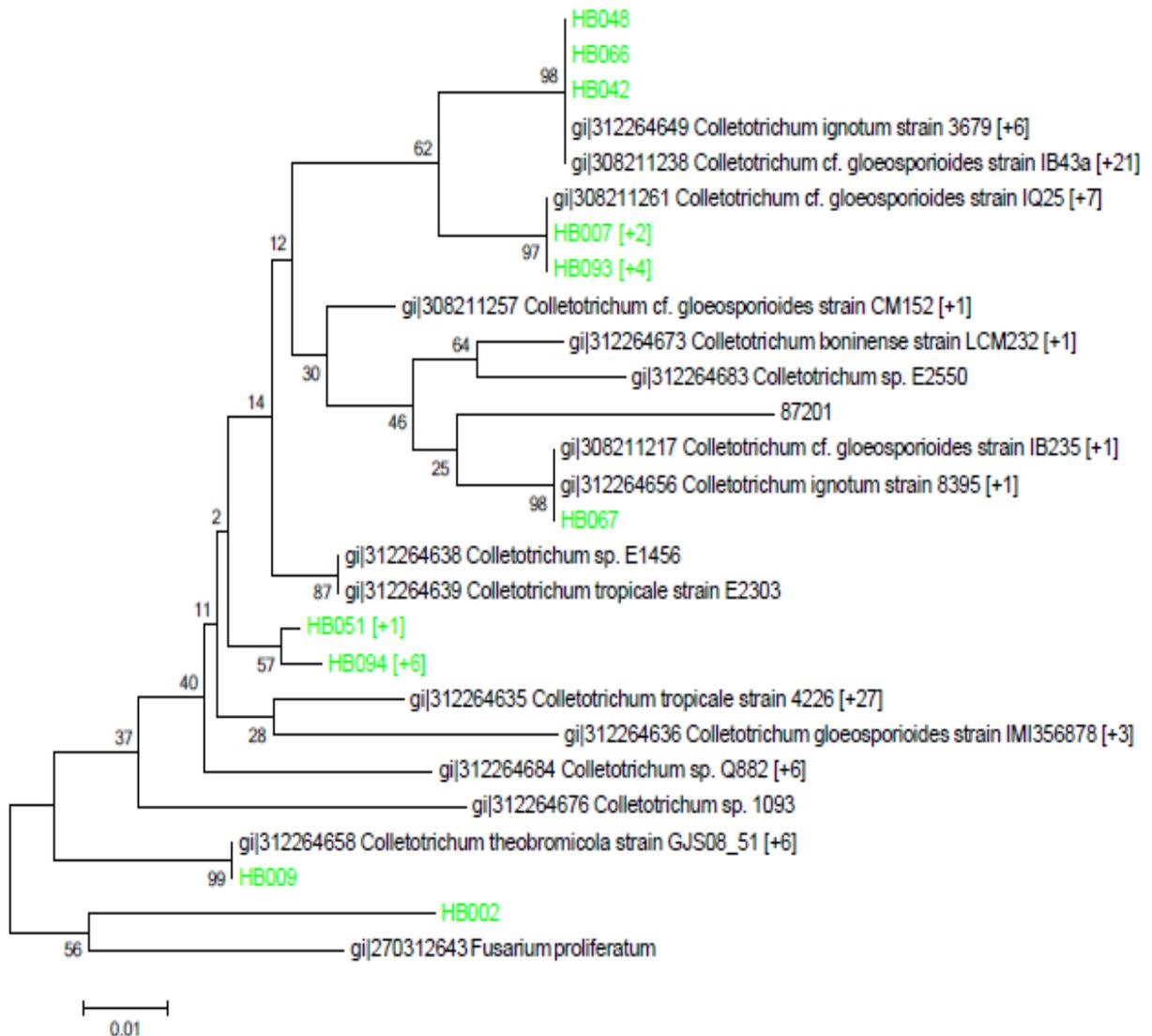
Os dados de cor da colônia, tamanho dos conídios e identidade das sequências de 5'-*tef1* não mostraram nenhum tipo de relação (Tabela 2; Figuras 6 e 7). Na presente análise as novas espécies descritas por Rojas *et al.* (2011) agruparam-se com *C. gloeosporioides* e misturaram-se no filograma, não permitindo um agrupamento consistente (Figuras 6 e 7). Além disso, os valores de bootstrap encontrados para os alinhamentos obtidos com os métodos Neighbor-Joining e Parcimônia (Figuras 6 e 7) foram baixos, na maioria das vezes menores que 70%.

Com base nos dados analisados, concluímos que não é possível diferenciar as espécies de *Colletotrichum* do complexo *C. gloeosporioides* com base apenas nas sequências de 5'-*tef1* e também com base em caracteres morfológicos. A taxonomia de *Colletotrichum* é complexa e, segundo parece que uma das causas dessa complexidade é a capacidade que esse gênero possui para realizar anastomose de esporos, mesmo entre espécies diferentes (ROCA *et al.*, 2004).

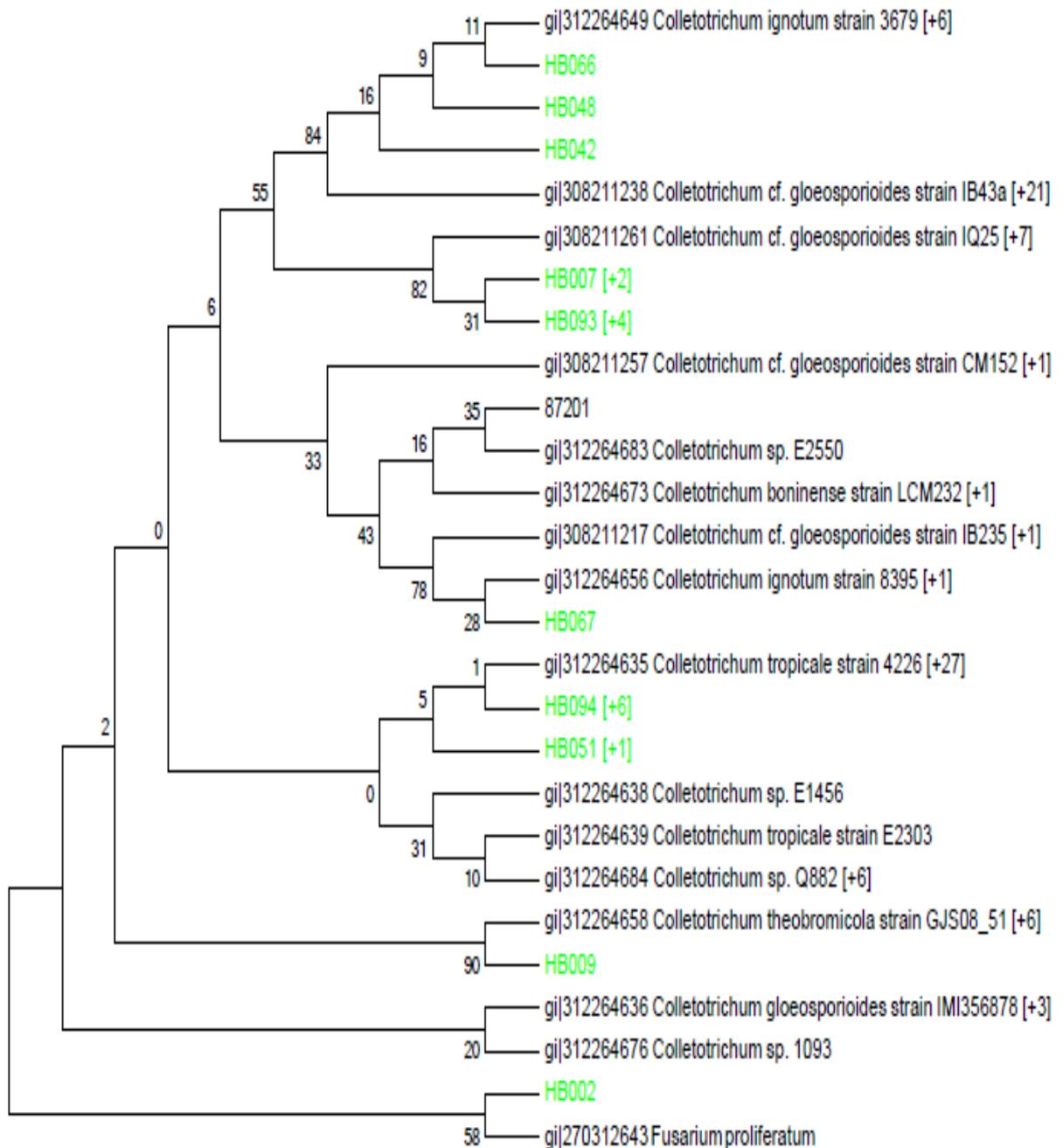
É possível que espécies já relatadas como causadoras de antracnose em seringueira além de *C. gloeosporioides*, reportada por Gasparotto *et al.*, 1997 e por Guyot, 2005, para o qual incluímos na análise a espécie tipo, estejam presentes entre os isolados estudados, mas outros estudos que incluam sequências de espécies tipo devem ser realizados no futuro.

Espécies novas podem estar presentes entre os isolados estudados, mas como discutido acima, sequências de espécies tipo devem ser incluídas nos estudos futuros, pois o gene *tef1* é pouco representado nos bancos de dados públicos para o gênero *Colletotrichum*, havendo um total de 167 sequências, sendo 55

correspondentes a *C. gloeosporioides*, 39 a *C. tropicale*, 9 a *C. ignotum*, 7 a *Colletotrichum horii*, 7 a *C. theobromicola* e 50 espécies de outros taxa, como *Colletotrichum sp.*



**Figura 6.** Árvore filogenética do gene 5'-*tef1* feita a partir do alinhamento de 106 isolados do banco de dados do NCBI construída pelo método Neighbor-Joining. A árvore foi enraizada com *Fusarium proliferatum*. As sequências com identificações iniciadas com as letras HB (de cor verde) foram obtidas de isolados de *Colletotrichum* de seringueira do presente estudo e as demais sequências foram obtidas dos bancos de dados públicos. Todos os valores de Bootstrap foram considerados. Os números entre colchetes indicam isolados adicionais de cada grupo, os isolados que possuem sequências idênticas são descritos a seguir: HB007- HB017, HB022; HB093 - HB064, HB071, HB027, HB011; HB051- HB018; HB094 - HB092, HB063, HB053, HB047, HB026, HB020.



**Figura 7.** Árvore filogenética do gene 5'-*tef1* feita a partir do alinhamento de 106 isolados do banco de dados do NCBI construída pelo método de Máxima Parcimônia. A árvore também foi enraizada com *Fusarium proliferatum*. As sequências com identificações iniciadas com as letras HB (de cor verde) foram obtidas de isolados de *Colletotrichum* de seringueira do presente estudo e as demais sequências foram obtidas dos bancos de dados públicos. Todos os valores de Bootstrap foram considerados. Os números entre colchetes indicam isolados adicionais, os isolados de cada grupo, os isolados que possuem sequências idênticas são descritos a seguir: HB007- HB017, HB022; HB093 - HB064, HB071, HB027, HB011; HB051- HB018; HB094 - HB092, HB063, HB053, HB047, HB026, HB020.

### 6.3. Patogenicidade dos isolados

Dos 23 isolados testados, 15 apresentaram crescimento micelial após 24 horas em folhas com ferimentos. Os isolados HB009, HB042, HB048, HB067 apresentaram crescimento micelial e manchas nas folhas com abundante massa de esporos de coloração alaranjada (Figura 8). Nos isolados HB002, HB007, HB020, HB022, HB026 e HB064 não foram verificados crescimento micelial ou manchas foliares (Tabela 3), provavelmente por terem sido cultivados em laboratório ou serem espécies endofíticas com baixa patogenicidade, que colonizam folhas à espera de sua senescência para que as mesmas possam utilizar os nutrientes (MUNCH *et al.*, 2008).

**Tabela 3.** Teste de patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Identificação	Dia 23/09				Dia 24/09				Dia 25/09				Dia 26/09			
	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	d	d	b	b	d	d	b	b	d	d	b	b	d	d	b	b
HB 002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HB 007	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HB 009*	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	
HB 011	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	
HB 017	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	
HB 018	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	
HB0 20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HB 022	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HB 026	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HB 027	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	
HB 042*	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	
HB 047	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
HB 048*	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	
HB 051	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
HB 053	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	
HB 063	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
HB 064	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HB 066	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	
HB 067*	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	
HB 071	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	
HB 092	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
HB 093	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	
HB 094	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

\* Isolados que apresentaram manchas nas folhas após 24 horas.

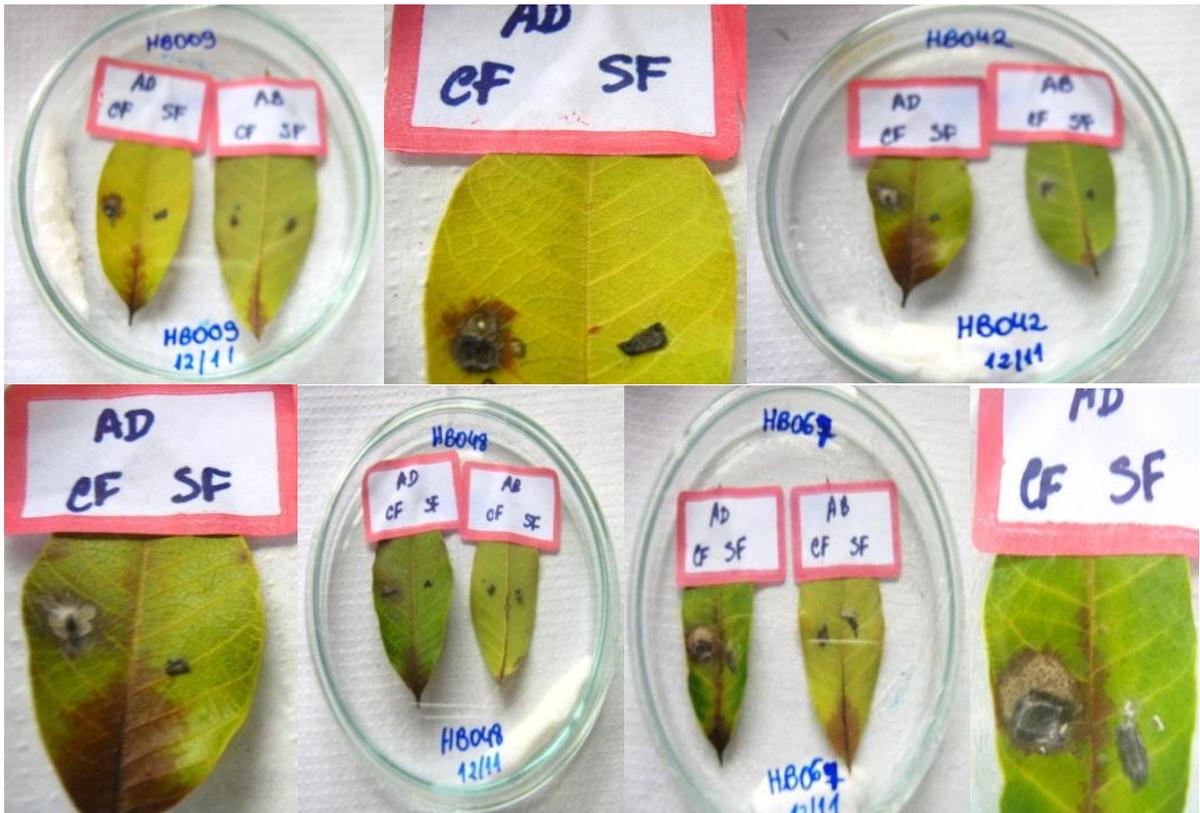
Significado das abreviações: CFad = com ferimento na região adaxial do folíolo, CFab = com ferimento na região abaxial do folíolo. SFad = sem ferimento na região adaxial do folíolo, SFab = sem ferimento na região abaxial do folíolo.

A reação dos isolados nas folhas de seringueira também não se relacionou com suas características morfológicas ou moleculares, sendo dessa maneira de pouca utilidade na identificação de espécies de *Colletotrichum*.

As espécies de *Colletotrichum* interagem com numerosas espécies de vegetais manifestando-se como patogênicas sintomáticas e cripticamente como endófitas assintomáticas. Não se sabe se esses modos contrastantes são estratégias ecológicas opcionais expressa por espécies individuais de *Colletotrichum* ou se a ecologia de uma espécie é explicitamente patogênica ou endofítica (ROJAS *et al.*, 2010).

Em muitos casos, uma mesma espécie tem sido caracterizada por apresentar diversos estilos de vida. Como e se os táxons mudam de estilos de vida de não patogênicos para patogênicos, são questões a serem respondidas sobre o gênero *Colletotrichum* (HYDE *et al.*, 2009).

Espécies de *Colletotrichum* que causam doenças em plantas comumente isolados como endófitas de plantas saudáveis, foram identificados como saprófitas (PHOTITA *et al.*, 2001a, 2003b; KUMAR & HYDE, 2004, Liu *et al.*, 2007; PROMPUTTHA *et al.*, 2007; DAMM *et al.*, 2009; PRIHASTUTI *et al.*, 2009). A espécie *C. ignotum* foi recentemente descrita como não patogênica e endofítica em diversas espécies de árvores tropicais (ROJAS *et al.*, 2010). No entanto, no estudo realizado pelo mesmo autor, a espécie *C. ignotum* foi isolada de folhas lesionadas e foi capaz de causar doença em testes de patogenicidade realizados em folíolos destacados. Apesar disso, os isolados de *C. ignotum* testados apresentaram uma baixa patogenicidade quando comparados aos demais isolados (ROJAS *et al.*, 2010).



**Figura 8.** Isolados que causaram a doença em folíolos destacados. Os isolados HB009, HB042, HB048, HB067 causaram danos típicos de antracnose nos folíolos.

## 7. Conclusão

Estudos morfológicos, análises moleculares e testes de patogenicidade foram realizados com 23 isolados obtidos de seringueira. Nenhuma das características analisadas isoladas ou em conjunto foi suficiente para classificar os isolados de seringueira ao nível de espécie. Portanto, estudos complementares serão necessários para entender a diversidade de *Colletotrichum* em seringueira, incluindo uma análise multilocus, que, em outros estudos, se mostrou como melhor método usado para delinear filogeneticamente as fronteiras entre os grupos deste fungo. Além disso, um maior número de isolados deve ser incluído, bem como sequências de isolados tipo de cada espécie de *Colletotrichum*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARENGA, A. de P.; CARMO, C. A. F. de S. do (Ed.). **Seringueira**. Viçosa, MG: **EPAMIG**, 2008. xvi, 894 p.
- ANDRADE, E.M., Uesugi, C.H., Ueno, B. e Ferreira, M.A.S.V. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira** 32:021-031, 2007.
- ARNOLD, A.E; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical trees biodiversity hot spots? **Ecology**, 88, 541–549, 2007.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 3, n. 1, 2000. **Disponível em:** <<http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/4>>. Acesso em: 22 set. 2011
- BAILEY, J.A. and Jeger, M.J. (1992). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control* CAB International, Wallingford: 1- 388. In: Hyde, K.D., Cai, L., McKenzie, E.H.C., Yang, Y.L., Zhang, J.Z. and Prihastuti, H. (2009). *Colletotrichum: a catalogue of fungus*. **Fungal Diversity** 39: 1-17.
- BARGUIL, B. M., Oliveira, S. M. A. de, Coelho, R. S. B. e Beserra Júnior, J. E. A. Identificação e variabilidade genética de isolados de *Colletotrichum* causando antracnose em inflorescências de plantas ornamentais tropicais. **Ciência Rural**, v.39, n.6, p. 1639-1646, set, 2009.
- BAXTER, A.P.; Van der WESTHUIZEN, G.C.A.; EICKER, A. Morphology and taxonomy of South African isolates of *Colletotrichum*. South African **Journal Botany**. v.259-289, 1983.
- BEGA, R. M. Heveicultura: alternativa para o pequeno proprietário rural no noroeste paulista. Viçosa: UFV, 2004 (Monografia). **Disponível em:** <[http://www.gestaodoagronegocio.com.br/mba/Download/MBA1 RODRIGO MERIGHI BEGA.pdf](http://www.gestaodoagronegocio.com.br/mba/Download/MBA1%20RODRIGO%20MERIGHI%20BEGA.pdf)> Acesso set.2011.
- BLAKEMAN, J.P. & HORNBY, D. The persistence of *Colletotrichum coccodes* and *Mycosphaerella ligulicola* in soil, with special reference to sclerotia and conidia. Trans. **British Mycol. Society**, 49:227–240, 1966.
- BURNETT, J. Fungal Populations and Species. **Oxford University Press**, Oxford, 2003.
- CAIXETA, G. Z. T.; CARMO, D. N. do.; CARMO, C. A. F. de S. do. Aspectos econômicos da heveicultura. **Informe agropecuário**. Belo Horizonte, 11 (121) janeiro de 1985.

CANO, J., Guarro, J. and Gene, J. (2004). Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, 42: 2450-2454.

Cannon, P.F.; Bridge, P.D.; Monte, E. Liking the past, present, and future of *Colletotrichum* systematics. In: Prusky, D.; Freeman, S.; Dickman, M.B. *Colletotrichum: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction*. St. Paul: **APS Press**, 2000. cap.5, p.1-20.

CARMO, C. A. F. de S. do. et al. Estimativa do estoque de carbono na biomassa do clone de seringueira RRIM 600 em solos da zona da mataminas gerais. **Disponível em:** <[http://www.cnps.embrapa.br/cohevea/BOLETIM%20DE%20PESQUISA % 20 RRIM % 20600. pdf](http://www.cnps.embrapa.br/cohevea/BOLETIM%20DE%20PESQUISA%20RRIM%20600.pdf)>. Acesso ago.2011

CECÍLIO, R. A.; Medeiros, S. de S.; Silva Junior, J. L. C. da.; Souza, J. A. Zoneamento agroclimático para a heveicultura na parte leste do Estado da Bahia. **Bahia Agríc.**, v.7, n.2, abr. 2006.

CHEE, K.H., HOLLIDAY, P. South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) of Hevea rubber. Kuala Lumpur. Malaysian Rubber Research and Development Board. Monograph 13, 1986. In: Intensidade do mal das folhas em plantas jovens e adultas de seis clones de seringueira na região do vale do Ribeira. Furtado *et al.* **Tropical plant pathology**. Botucatu- SP, 2008.

CORREL, J. C.; Liu, B. Molecular tools for taxonomy of *Colletotrichum* species. **Fitopatol. Bras.** 32 (Suplemento), agosto 2007.

CRACRAFT, J. Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. In: *Speciation and its Consequences* (eds Otte D, Endler J), pp. 28–59. **Sinauer Associates**, Sunderland, MA, 1983.

CRACRAFT, J. Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology*, 1, 159–187. 1989

CROUCH, J.A. et al. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored graminiicolous *Colletotrichum* group. **Mycologia**, v. 101, p.648-656, 2009. Disponível: <<http://www.mycologia.org/cgi/content/abstract/08-231v1?ck=nck>>. Acesso: jul/ 2011.

DAMM, U., WOUDEBERG, J.H.C., CANNON, P.F. and CROUS, P.W. (2009). *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity** 39: 45-87.

DAMM, U., Baroncelli, R., Cai, L., Kubo, Y., O'Connell, R., Weir, B., Yoshino, K. and Cannon, P. *Colletotrichum: species, ecology and interactions*. **International Mycological Association Fungus**, vol. 1, n. 2: 161–165, 2010

DETTMAN, J.; ANDERSON, J.; KOHN, L. Divergent adaptation promotes reproductive isolation among experimental populations of the filamentous fungus *Neurospora*. **BMC Evolutionary Biology**, 8, 35. 2008. In: GAZIS, R.; REHNER, S.; CAHAVERRI, P. Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. **Molecular Ecology**. 20, 3001–3013, 2011.

DU M, SCHARDL, C.L, NUCKLES E.M., Vaillancourt L.J. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. **Mycologia** 97:641–658, 2005.

FARR D.F, Aime M.C., ROSSMAN A.Y., Palm ME.. Species of *Colletotrichum* on Agavaceae. **Mycol, Res** 110:1395–1408, 2006.

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

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

GASPAROTTO, L.; SANTOS, A. F.; PEREIRA, J. C. R.; FERREIRA, F. A. Doenças da Seringueira no Brasil. Brasília: **Embrapa SPI**; Manaus: Embrapa CPAA, 1997. 168p.

GAZIS, R.; REHNER, S.; CAHAVERRI, P. Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. **Molecular Ecology**. 20, 3001–3013, 2011.

GONÇALVES, P. S et al. Desempenho de novos Clones de Seringueira III. Seleções Promissoras para a Região de Votuporanga, Estado de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.6, p.971-980, jun. 1999

GONÇALVES, P. de S.; BORTOLETTO, N.; FURTADO, E. L. Desempenho de clones de seringueira da série IAC 300 selecionados para a região noroeste do Estado de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 4, p. 589-599, abr. 2001.

GONÇALVES, P. de S. Uma história de sucesso: a seringueira no estado de São Paulo. *Jornal O Agrônomo*. **Programa seringueira**. Campinas, 54 (1), 2002., IAC

GONÇALVES, P. de S.; MARQUES, J.R.B. Melhoramento Genético da Seringueira: passado, presente e futuro. In: Alvarenga, A.P.; Carmo, C.A.F.S. (eds). **Seringueira**. Viçosa: Epamig. p.401-407, 2008.

GUNNELL, P.S. and GUBLER, W.D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic on strawberry. **Mycologia** 84: 157-165, 1992.

GUYOT, J.; Omandab, E. N.; Pinardc, F. Some epidemiological investigations on *Colletotrichum* leaf disease on rubber tree. *Crop Protection* 24 65-77. 2005.  
**Disponível em:** www.elsevier.com/locate/cropro. Acesso nov./ 2011.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp.** Ser. 41:95-98, 1999.

HARRINGTON, T.C. & RIZZO D.M. 1999. Defining Species in the Fungi. In: WORRALL, J.J. Structure and Dynamics of fungal Populations. Kluwer Press. Dordrecht, The Netherlands, P.P. 43-71

HIBBETT, D.S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL M.; CANNON, P.F.; ERIKSSON, E. O. *et al.* A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological research**, 2007.

HYDE, K.D., Cai, L., McKenzie, E.H.C., Yang, Y.L., Zhang, J.Z. and Prihastuti, H. (2009). ***Colletotrichum: a catalogue of confusion***. *Fungal Diversity* 39: 1-17.

HOLLIDAY P (1970) South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) of *Hevea brasiliensis*. CABI. Phytopatological papers, 12. In: Intensidade do mal das folhas em plantas jovens e adultas de seis clones de seringueira na região do vale do Ribeira. Furtado et al. **Tropical plant pathology**. Botucatu- SP, 2008.

ISHIKAWA, F. H. Variabilidade genética dentro da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de marcadores RAPD e grupos de anastomoses. **Lavras: UFLA**, 2005. 52 p.: il.

KIMATI, H., AMORIM, L., REZENDE, J.A.M; BERGAMIN FILHO; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia**: Doenças das plantas cultivadas. 4 ed. São Paulo: **Agronomica Ceres**, 2005. Vol2.

KUMAR, D.S.S. and Hyde. K.D. (2004). Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii*. **Fungal Diversity**, 17: 69-90.

LACAP, D.C.; HYDE, K.D.; LIEW ECY (2003) An evaluation of the fungal 'morphotype' concept based on ribosomal DNA sequences. **Fungal Diversity**, 12, 53–66. In: GAZIS, R.; REHNER, S.; CAHAVERRI, P. Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. **Molecular Ecology**. 20, 3001–3013, 2011.

LATUNDE-DADA, A.O., Bailey, J.A. and Lucas, J.A. (1997). Infection process of *Colletotrichum destructivum* O'Gara from lucerne (*Medicago sativa* L.) In: Hyde, K.D., Cai, L., McKenzie, E.H.C., Yang, Y.L., Zhang, J.Z. and Prihastuti, H. (2009). ***Colletotrichum: a catalogue of confusion***. *Fungal Diversity* 39: 1-17.

LEIGH, Jessica et al. Evolution Meets Fungal Genomics. **Handbook of Fungal Biotechnology**, second edition. New York, cap. 12, 2004.

LENNÉ, J. M., THOMAS, D., ANDRADE, R.P. & VARGAS, A. Anthracnose of *Stylosanthes capitata*: Implications for future disease evaluations of indigenous Tropical pasture legumes. **Phytopathology**, 74: 1070–1073. 1984.

LIU, X.Y., DUAN, J.X. and XIE, X.M. (2007). *Colletotrichum yunnanense* sp. nov., a new endophytic species from *Buxus* sp. **Mycotaxon**, 100: 137-144.

LOPEZ, A.M.Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas** 9:291-337. 2001.

LORENZI, H. - **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 5ª edição volume. 01. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum, 2008.

MAFACIOLI, R., TESSMANN, D.J., SANTOS, A.F. & VIDA J.B. Caracterização morfo-fisiológica e patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* da pupunheira. *Summa Phytopathologica* 32:113-117. 2006.

MAYR, E. Animal Species and Evolution. Harvard University Press, Cambridge, MA (1963). In: GAZIS, R.; REHNER, S.; CAHAVERRI, P. Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. **Molecular Ecology**. 20, 3001–3013, 2011.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica. **Fitopatologia Brasileira**, Recife, vol. 3, p.170-179, 2006.

MENEZES, M. & HANLIN, R.T. Apressoria of Brazilian isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of anthracnoses diseases. **Revista de Microbiologia** 27:247–251. 1996a.

MENEZES, M. & HANLIN, R.T. Morphological variability of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado trees from Northeastern Brazil. **Revista de Microbiologia**, 27:228–236, 1996b.

MICHEREFF, S.J. & BARROS, **Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável**. Recife, UFRPE. 2001, ISBN 85-87459-06-6.

MORAES VHF (1982) Sugestões para a uniformização da metodologia de estudo da fenologia foliar da seringueira. Manaus AM. Embrapa, Documentos, 1. In: Intensidade do mal das folhas em plantas jovens e adultas de seis clones de seringueira na região do vale do Ribeira. Furtado *et al.* **Tropical plant pathology** Botucatu- SP, 2008.

MOTA, A.M.; GASPAROTTO, L. Dinâmica da queda precoce de frutos de pupunheira. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, suplemento, p. 337, 1995.

National Center for Biotechnology Information, NCBI <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>> Acesso: jan. 2012.

Munch S, LINGNER U, FLOSS D.S., LUDWIG, N., SAUER, N., DEISING HB. 2008. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. **Plant Physiol.**, 165:4151.

OKANE, I.; NAKAGIRI, A. ITO, T. Endophytic fungi in leaves of ericaceous plants. **Canadian Journal of Botany, Ottawa**, v. 76, n. 4, p. 657-663, 1998.

O'DONNELL K, Cigelnik E, Nirenberg HI (Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia** 90, 465–493, 1998.

PERES, N.A.R.; KURAMAE, E.E.; DIAS, M.S.C.; SOUZA, N.L de; Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. Affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal Phytopatology**, v.150,n.3,p. 128-134, 2002.

PETTERSEN, R.H. & HUGHES, K.W. Species and speciation in mushrooms. *Bioscience* 49: 440-452, 1999.

Prihastuti, H., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E.H.C. and Hyde, K.D. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in Chiang Mai, Thailand. **Fungal Diversity**, 39: 89-109, 2009.

PRIYADARSHAN, P.M.; CLEMENT-DEMANGE, A. Breeding *Hevea* Rubber: Formal and Molecular Genetics. **Advances in Genetics**, v.52, p.51-105, 2004.

PROMPUTTHA, I., Lumyong, S., Dhanasekaren, V., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D. and Jeewon, R.(2007). A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. **Microbial Ecology**: 53: 579-590.

PHOTITA, W., LUMYONG, S., LUMYONG, P., Ho, W.H., MCKENZIE, E.H.C. and Hyde, K.D. Fungi on *Musa acuminata* in Hong Kong. **Fungal Diversity** 6: 99-106, 2001a.

PHOTITA, W., LUMYONG, S., LUMYONG, P., MCKENZIE, E.H.C. and HYDE, K.D. Saprobic fungi on dead wild banana. **Mycotaxon** 85: 345-356, 2003b.

PHOTITA, W., LUMYONG, S., LUMYONG, P., MCKENZIE, E.H.C. and HYDE, K.D. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? **Fungal Diversity** 16: 131-140, 2004.

PHOTITA, W., Taylor, P.W.J., FORD, R., LUMYONG, P., MCKENZIE, H.C. and HYDE, K.D. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. **Fungal Diversity**.18: 117-133, 2005.

REYNOLDS, D.R. The fungal holomorph: an overview, 1993. In: **The Fungal Holomorph: A Consideration of Mitotic and Pleomorphic Speciation** (eds Reynolds DR, Taylor JW). CAB International, Wallingford, UK. pp. 15–26.

Ribeiro, D. C., Bogo, A., Dantas, A. C. de M., Gomes, E. A, Coelho, C. M. M. e Guidolin, A. F. Comparação das técnicas de PCR-RFLP e sequenciamento de região ITS-rDNA para análise filogenética de isolados de *Colletotrichum* spp. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. Lages, v.8, n.1, p. 43-52, 2009.

ROCA, M.G.; DAVIDE L.C; DAVIDE,L.C.M; MENDES, MENDES-COSTA, M.C; SCHWAN, R.F.;WHEALS, A.E. Conidial anastomosis fusion between *Colletotrichum* species. **Mycol. Res.** 108 (11): 1320–1326, 2004.

ROJAS, E. I., REHNER, S. A., SAMUELS, G. J., VAN BAELE, S. A., HERRE, E. A., CANNON, P., CHEN, R., PANG, J., WANG, R., ZHANG, Y., PENG, Y., SHA, T. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. **Mycologia**, 102(6). pp. 1318-1338. 2010,

SAHA, T.; KUMAR, A.; RAVINDRAN, M.; JACOB, C. K.; ROY, B. E NAZEER, M. A. Identification of *colletotrichum acutatum* from rubber using random amplified polymorphic dnas and ribossomal dna polymorphisms. **Mycol. Res.** 106 (2) : 215-221. 2002.

SCHULTES, E.E. The odyssey of the cultivated rubber tree. **Endeavour**, v.1, p.133-138, 1977.

SEGUIN, M.; FLORI, A.; LEGNATÉ, H.; CLÉMENT-DEMANGE, A. Rubber tree. In: Hamon, P.; Seguin, M.; Perrier, X.; Glazmann, V. (eds). Genetic Diversity of Tropical Crops. Montpellier: **Cirad and Science Publishers Inc.**, p. 277-306, 2003.

SHERRIFF, C., WHELAN, M.J., ARNOLD, G.M., LAFAY, J.F., BRYGOO, Y., and BAILEY, J.A.. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. **Exp Mycol**,18: 121-138,1994.

SHERRIFF, C; WHELAN, M.J; ARNOLD, G.M, and BAILEY, J.A.. rDNA sequence analysis confirms the distinction between *Colletotrichum graminicola* and *C. sublineolum*. **Mycol Res**, 99:475-478, 1995.

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

SILVA, K. J. D. Distribuição e caracterização de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* no Brasil. **Lavras: UFLA**, 2004. 88p.: il.

SIMMONDS, J.H. A study of species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. **Queensland Journal of Agriculture and Animal Science** 22: 437-459, 1965.

SOUZA, B. O. de, SOUZA, E. A. de, MENDES-COSTA, M. C. Determinação da variabilidade em isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de marcadores morfológicos e culturais. **Ciênc. Agrotec.** Lavras, v. 31, n. 4, p. 1000-1006, jul/ago, 2007.

SREENIVASAPRASAD, S, Mills, PR, Meehan, BM, and Brown, AE.. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. **Genome**, 39:499-512, 1996

SUSSEL, A.A.B., FENILLE, R.C., KURAMAE, E.E., SOUZA, N.L. Caracterização de *Rhizoctonia solani*, agente etiológico do tombamento de mudas de café. *Summa Phytopathol.*, v. 27, n. 4, p. 348-352, 2005.

SUTTON, B.C. 1980. Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute.1980, 696p.

SUTTON, B.C.The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAYLEY, J.A.; JERGER, M.J (Ed.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford, U.K: CAB International, p.1-26, 1992.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, and KUMAR S **MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods**. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739, 2011.

TAYLOR JW, Jacobson D, Fisher MC The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. *Annual Review of Phytopathology*, 37, 197–246, 1999

TEBEEEST, D.O., Correll, J.C. and Weidemann, G.J. Specification and population biology in *Colletotrichum*. In: *The Mycota V, part B* (eds. K,Esser and P.A. Lemke). Springer-Verlag Berlin Heidelberg ,1997,157-168.

THAUNG, M.M., Coelomycetes systematics with special reference *Colletotrichum*. **Mycoscience**, 49: 345-350, 2008. **Disponível em:** <http://www.mendeley.com/research/coelomycete-systematics-special-reference-colletotrichum/#page-1> Acesso, nov. 2011.

THOMAS SE, Crozier J, Aime MC, Evans HC, Holmes KA Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies associated with indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador. *Mycological Research*, 2008, 112, 852–860.

TOZZE Junior, H. J. **Caracterização e identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do pimentão (*Capsicum annum*) no Brasil**. Piracicaba, 2007. 81p : il.

VAN DER AA, H. A., Noordeloos, M. E., and De Gruyter, J. 1990. Species concepts in some larger genera of the Coelomycetes. **Stud. Mycol.** 32:3-19.

VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: A study on two extreme cases. **Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Science ad Technology**, Uppsala, v.917, 72p., 2004. **Disponível em:** <[http://publications.uu.se/uu/fulltext/nbn\\_se\\_uu\\_diva-3902.pdf](http://publications.uu.se/uu/fulltext/nbn_se_uu_diva-3902.pdf)>. Acesso em: 21 out. 2011.

WANG, Y. e GUO L.D. A comparative study of endophytic fungi in needles, bark, and xylem of *Pinus tabulaeformis*. **Canadian Journal of Botany**, 2007, 85, 911–917.

ZERVAKIS, G.I.; MONCALVO J.M.; VILGALYS, R. Molecular phylogeny, biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. **Microbiology**, 150, 715–726.2004. In: GAZIS, R.; REHNER, S.; CAHAVERRI, P. Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. **Molecular Ecology**. 20, 3001–3013, 2011.

