

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PATOGÊNICA DE
ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. ASSOCIADOS A
SINTOMAS DE ANTRACNOSE EM MANGUEIRAS**

**Andressa de Souza
Engenheira Agrônoma**

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2011

**D
I
S
S.
/
S
O
U
Z
A

A.**

**2
0
1
1**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PATOGÊNICA DE
ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. ASSOCIADOS A
SINTOMAS DE ANTRACNOSE EM MANGUEIRAS**

Andressa de Souza

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Goes

Co-orientadoras: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Dra. Ester Wickert

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2011

S729c Souza, Andressa de
Caracterização molecular e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados a sintomas de antracnose em mangueiras / Andressa de Souza. -- Jaboticabal, 2011
ix, 91 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientador: Antonio de Goes

Banca examinadora: Nelson Sidnei Massola Junior, Janete Aparecida Desiderio

Bibliografia

1. *Colletotrichum* spp.. 2. Caracterização molecular. 3. *Mangifera indica*. 4. AFLP. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.4:634.441

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. ASSOCIADOS A SINTOMAS DE ANTRACNOSE EM MANGUEIRAS

AUTORA: ANDRESSA DE SOUZA

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANTONIO DE GOES

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ESTER WICKERT

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ANTONIO DE GOES

Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. NELSON SIDNEI MASSOLA JUNIOR

Departamento de Fitopatologia / Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - USP / Piracicaba/SP

Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO

Departamento de Biol Aplicada A Agrop / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 28 de fevereiro de 2011.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANDRESSA DE SOUZA – nascida em 10 de agosto de 1985, em São Bernardo do Campo, SP, é Engenheira Agrônoma formada pela Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’ (UNESP), Jaboticabal, SP, em fevereiro de 2009. Na graduação estagiou, no período de abril de 2004 a agosto de 2008, junto ao Departamento de Fitossanidade, no Laboratório de Fitopatologia, e no Departamento de Tecnologia, no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, na área de fitopatologia e genética de populações de fitopatógenos, como bolsista do CNPq, sob orientação do Prof. Dr. Antonio de Goes e co-orientação da Dra. Ester Wickert. O Estágio de Conclusão de Curso foi realizado na filial da Monsanto do Brasil Ltda. em Uberlândia, MG, com bolsa de complementação educacional. Concluiu a graduação com o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “Diversidade genética e caracterização de isolados de *Guignardia* spp. de diferentes hospedeiros através de marcadores moleculares e testes de patogenicidade”. Em 2009, ingressou no curso de Pós-Graduação, Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, pela UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como bolsista CNPq e, posteriormente, FAPESP, sob orientação do Prof. Dr. Antonio de Goes e co-orientação da Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos e da Dra. Ester Wickert.

“Feliz o homem que achou sabedoria e o homem que obtém discernimento, porque tê-la por ganho é melhor do que ter por ganho a prata, e tê-la como produto é melhor do que o próprio ouro. Ela é mais preciosa do que os corais, e todos os outros agrados teus não se podem igualar a ela. Ela é árvore de vida para os que a agarram, e os que a seguram bem devem ser chamados de felizes” - Provérbios 3:13-15, 18

“Quem se isola procurará o seu próprio desejo egoísta; estourará contra toda a sabedoria prática” - Provérbios 18:1

“Os ousados começam, mas só os determinados terminam”

George Bernard Shaw

“Pedras no caminho?

Guardo todas...

Um dia construirei um castelo”

Fernando Pessoa

Dedico

A Deus por ter guiado meus passos...

Ofereço

*À minha mãe Rose, ao meu irmão Alessandro...
e ao meu namorado Gustavo pelo apoio e carinho.*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho, Câmpus de Jaboticabal e ao curso de Produção Vegetal pela oportunidade e ensino.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos nos primeiros meses do curso de Mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa e auxílio financeiro que possibilitaram o desenvolvimento do projeto de pesquisa que originou essa dissertação.

Ao Laboratório de Fitopatologia e ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) que disponibilizaram toda estrutura necessária para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu orientador Antonio de Goes, pelo qual tenho profundo respeito e admiração, que mesmo estando fisicamente distante, não deixou de aconselhar e orientar. Obrigada mais uma vez por ter acreditado e apoiado o desenvolvimento do projeto mesmo sob condições adversas. Obrigada pela amizade que continuará nessa nova etapa da minha vida acadêmica.

À minha co-orientadora Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, pela qual adquiri profunda admiração, que ofereceu toda a estrutura do seu laboratório para o desenvolvimento do projeto, além de ter me dado a oportunidade de aprender inúmeras coisas que acrescentaram significativamente na minha formação. Obrigada pela confiança, amizade e apoio, sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

À Ester Wickert, meu exemplo, para a qual me faltam palavras para agradecer todo o treinamento que foi me dado. Muito obrigada por ter compartilhado comigo momentos valiosos e ter me dado toda a base de um conhecimento que não tem preço e nem está escrito em livros. Sinto-me honrada

por ter sido treinada por você. Mais uma vez, muito obrigada por ter me orientado, me apoiado e acalmado, mesmo estando distante.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade e do Departamento de Tecnologia, em especial à Profa. Lúcia Maria Carareto Alves e ao João Carlos Campanharo pelo convívio e bela amizade.

Aos membros da banca examinadora pelas correções e sugestões que muito contribuíram para a conclusão dessa dissertação. Obrigada por ter feito do dia da minha defesa, um dia de gratificação e reconhecimento pelo meu trabalho.

A todos os amigos do LBMP que me apoiaram, me ajudaram e me escutaram quando mais precisei, em especial Silvana, Eliamar, Viviane Schuch, Elisângela, Gisele, Érika, Thaís, Mariana, Milena, Gabriela e Malú. Um obrigado especial à Michele que deu apoio, atenção e amizade incondicionais e, à Viviane Vieira pelo carinho e amizade.

A todos os amigos do Laboratório de Fitopatologia pela amizade, em especial Gabriela Cintra, Ronilda, Eliana, Elton e Adriano. Obrigada Gabriela e Adriano por ter fornecido materiais para com a realização desse trabalho. Um obrigado mais do que especial à minha co-orientada Roberta pelo apoio, compreensão, ajuda e companheirismo, espero podermos continuar juntas.

Às minhas amigas de sempre e inesquecíveis Juliane Mattos e Vanessa (Rapidex). Obrigada pela amizade sempre presente entre nós.

À minha família, em especial, Rose (mãe), Alessandro (irmão), Rosentina e Reinaldo (avós), Vagner e Walter (tios), Glaucon, Anderson e Adrian (primos) e Elza (tia), pelo amor e apoio em todos os anos da minha vida.

Ao meu namorado Gustavo pelo apoio, companheirismo, amor, carinho e convivência por mais dois anos da minha vida que só contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal. Obrigada por fazer parte da minha vida.

À todos que porventura não foram mencionados, mas que contribuíram de uma forma ou de outra para a conclusão de mais uma etapa...

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. A cultura da manga	4
2.1.1. Origem e distribuição	4
2.1.2. Importância econômica	5
2.1.3. Problemas fitossanitários	6
2.2. Antracnose	6
2.2.1. Considerações gerais	6
2.2.2. Etiologia	7
2.2.3. Sintomas	10
2.2.4. Controle da doença	11
2.3. Caracterização molecular de espécies de <i>Colletotrichum</i>	12
2.4. Patogenicidade de isolados de <i>Colletotrichum</i>	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Obtenção dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.	18
3.2. Extração de DNA	19
3.3. Sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2	21
3.3.1. Amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2	21
3.3.2. Análise das sequências	22
3.4. Desenvolvimento dos marcadores fAFLP	23
3.4.1. Restrição do DNA	24
3.4.2. Ligação dos adaptadores	24
3.4.3. Pré-amplificação	25
3.4.4. Amplificação seletiva	26
3.4.5. Análise dos dados de fAFLP	28

3.5. Testes de patogenicidade	29
3.5.1. Inoculação	29
3.5.2. Avaliação e análises	31
4. RESULTADOS	32
4.1. Obtenção dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.	32
4.2. Extração de DNA	42
4.3. Sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2	42
4.4. Desenvolvimento dos marcadores fAFLP	51
4.5. Testes de patogenicidade	59
5. DISCUSSÃO	70
6. CONCLUSÕES	78
7. REFERÊNCIAS	80

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Programa do termociclador para amplificação seletiva	27
Tabela 2. Procedência dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp., nomenclatura, tecido vegetal e respectivo hospedeiro	33
Tabela 3. Isolados com haplótipos distintos e o respectivo número de indivíduos que cada um representa, dentro de cada população	46
Tabela 4. Número de isolados entre as populações que compartilharam haplótipos	47
Tabela 5. Análise de variância molecular (AMOVA) em 16 populações de <i>Colletotrichum</i> spp. GL = graus de liberdade e SQ = soma do quadrado dos desvios	50
Tabela 6. Índice de fixação específico para cada população	50
Tabela 7. Média da distância genética intra-grupos e intra-subgrupos, e distância genética (d_A) entre grupos e subgrupos	58
Tabela 8. Análise de variância molecular (AMOVA) em 16 populações de <i>Colletotrichum</i> spp. GL = graus de liberdade e SQ = soma do quadrado dos desvios	59
Tabela 9. Dados correspondentes à análise estatística dos valores das áreas médias das lesões (cm ²) nas variedades 'Palmer' e 'Tommy Atkins', segundo os isolados testados, e o agrupamento da análise filogenética obtido pelo emprego de marcadores fAFLP	65
Tabela 10. Dados correspondentes à análise estatística dos valores das áreas médias das lesões (cm ²), nas variedades 'Palmer' e 'Tommy Atkins', separadamente, segundo os isolados testados, e grupo da análise filogenética mediante o emprego de marcadores fAFLP	67

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo da antracnose em manga. As linhas sólidas e as linhas pontilhadas representam o ciclo da doença e a fenologia da planta, respectivamente (ARAUZ, 2000)	9
Figura 2. Ação das enzimas de restrição <i>EcoRI</i> e <i>MseI</i>	24
Figura 3. Ligação dos adaptadores, uma sequência conhecida de 20 nucleotídeos que será utilizada posteriormente como primer	25
Figura 4. Pré-amplificação usando 'G' como nucleotídeo seletivo no iniciador <i>EcoRI</i> e 'T' no <i>MseI</i>	26
Figura 5. Amplificação seletiva, na qual pode ser acrescentado nucleotídeos às extremidades 3' dos primers de acordo com o polimorfismo esperado. Os primers <i>EcoRI</i> são marcados com fluorescência	26
Figura 6. Padrão de tamanho molecular GeneScan ROX 500 – 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 245, 300, 340, 350, 400, 450, 490 e 500 pb	28
Figura 7. (A) Folhas de mangueira 'Palmer' dispostas em uma bandeja após a sua inoculação com uma suspensão de conídios calibrada para 1×10^5 conídios/mL; (B) As bandejas seladas com plásticos transparente ficaram dispostas em bancadas sob luz constante por cinco dias após a inoculação	30
Figura 8. Medição da área das lesões nas folhas por meio do software Image ProPlus® 4.1	31
Figura 9. Colônias típicas de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. obtidos de tecidos de mangueiras e citros, exibindo diferenças na morfologia das colônias	41
Figura 10. DNA genômico de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp., apresentando um padrão de boa qualidade. PM: padrão de tamanho molecular 100pb DNA Ladder Plus (Fermentas)	42

- Figura 11. Produto de PCR com os primers ITS1/ITS4 para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2. PM: padrão de tamanho molecular 100pb DNA Ladder Plus (Fermentas). CN: controle negativo (mix de reação sem DNA) 43
- Figura 12. Sequência consenso do isolado BR.F.P23 obtida por meio do software Phred/Phrap/Consed e eletroferograma de sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2, representando as demais sequências obtidas 43
- Figura 13. Agrupamento neighbor-joining dos isolados de *Colletotrichum* spp. obtido pela análise da região ITS1-5,8S-ITS2. O subgrupo G1.1 foi formado pelos demais isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* do estudo que não se agruparam no G1.2, enquanto o subgrupo G2.1 foi constituído por isolados da espécie *Colletotrichum acutatum* 45
- Figura 14. Agrupamento neighbor-joining dos isolados de *Colletotrichum* spp. representantes de toda a população em função de seus haplótipos 49
- Figura 15. (A) DNA genômico previamente à restrição pelas enzimas *MseI* e *EcoRI* e DNA genômico completamente restringido pelas enzimas. PM: padrão de tamanho molecular 100pb DNA Ladder Plus (Fermentas); G: DNA genômico; R: DNA restringido pelas enzimas; (B) Produto de PCR da reação pré-seletiva com *smear* visível de 100 a 1000 pb. PM: padrão de tamanho molecular 100pb DNA Ladder (Fermentas) 51
- Figura 16. Leitura dos picos polimórficos dos isolados JA.F.B104 e JA.F.B105, utilizando-se os primers NED*EcoRI-AT/MseI-C, FAM*EcoRI-AC/MseI-CA e JOE*EcoRI-AG/MseI-G por meio do software Genotyper 3.7 52
- Figura 17. Filograma formado pelos 189 isolados do estudo, subdividido em dois grupos, sendo o G1 formado por isolados da espécie

- Colletotrichum gloeosporioides* e o G2 constituído por isolados da espécie *Colletotrichum acutatum* 54
- Figura 18. Filograma formado por isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* do subgrupo G1.1 que subdividiu-se em outros dois subgrupos, G1.1.1 e G1.1.2, cuja distância genética entre eles é de 0,075 55
- Figura 19. Filograma formado por isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* do subgrupo G1.2 que subdividiu-se em outros dois subgrupos, G1.2.1 e G1.2.2, cuja distância genética entre subgrupos é de 0,160 56
- Figura 20. Filograma formado por isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* do subgrupo G1.3, oriundos de citros e por um isolado de mangueira cuja média da distância genética entre eles é de 0,081 ..56
- Figura 21. Filograma formado por isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* do subgrupo G1.4. Os isolados marcados com um símbolo pertencem ao subgrupo G2.1 do dendrograma constituído por toda a população de isolados das análises da região ITS1-5,8S-ITS2 57
- Figura 22. Filograma formado por isolados de *Colletotrichum acutatum* do grupo 2, oriundos de citros e por um isolado de mangueira cuja média da distância genética entre eles é de 0,204 58
- Figura 23. As lesões ocasionadas pelo isolado VA.I.TA211 foram caracterizadas por extensas manchas pretas arredondadas. Por outro lado, os sintomas ocasionados pelo isolado JA.F.B105 caracterizaram-se por lesões necróticas, circundadas por manchas pretas, indicando a região de desenvolvimento do fungo. Vista parcial da presença de acérvulos e conídios sobre os tecidos necróticos, resultantes da inoculação, obtida por microscopia. Folhas de mangueira 'Palmer' à esquerda e folhas de mangueira 'Tommy Atkins' à direita 61
- Figura 24. Padrão de sintomas ocasionados por isolados de *Colletotrichum acutatum* de citros e pelo isolado VA.L.H189 de mangueira. Nota-

se a presença de um padrão semelhante de sintomas entre os isolados IT.CF.VC13 e o VA.L.H189, ao passo que o isolado IT.CF.VC10 foi levemente severo às folhas de mangueiras. Folhas de mangueira 'Palmer' à esquerda e folhas de mangueira 'Tommy Atkins' à direita 62

Figura 25. Padrão de sintomas ocasionados por isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de citros e pelo isolado JA.F.B104 de mangueira, geneticamente semelhante aos isolados de citros. Nota-se diferentes graus de severidade de sintomas em ambas as variedades de mangueiras. Folhas de mangueira 'Palmer' à esquerda e folhas de mangueira 'Tommy Atkins' à direita 63

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. ASSOCIADOS A SINTOMAS DE ANTRACNOSE EM MANGUEIRAS

RESUMO – A mangueira (*Mangifera indica* L.) conta com diversos problemas de ordem fitossanitária, destacando-se como um dos mais importantes, a antracnose, causada na maioria das vezes pelo fungo *C. gloeosporioides*. Dada a importância comercial dessa doença, esse trabalho teve por objetivo realizar a caracterização genética e patogênica de uma população de isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de tecidos com sintomas de antracnose de diferentes variedades e órgãos das plantas de manga, dos principais municípios produtores do Estado de São Paulo, além de compará-los geneticamente com isolados obtidos de citros. O sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 possibilitou a identificação de 183 isolados de uma população obtida de mangueiras como *C. gloeosporioides*, com exceção de apenas um deles, o qual foi identificado como *C. acutatum*. Já os isolados de citros, sendo três obtidos de folhas assintomáticas e dois de flores com sintomas de podridão, foram classificados em *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, respectivamente. Os resultados obtidos mediante o emprego de marcadores fAFLP indicaram uma alta variabilidade genética entre isolados de uma mesma população e a ocorrência de fluxo gênico. Além disso, tais resultados corroboraram aqueles obtidos pelo sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2, por agruparem os isolados do estudo segundo a sua espécie. Os isolados representativos da população, inclusive aqueles obtidos de citros, de ambas as espécies de *Colletotrichum*, causaram sintomas típicos de antracnose quando inoculados em folhas de mangueiras ‘Palmer’ e ‘Tommy Atkins’, indicando que, provavelmente, não há especificidade de hospedeiros para essas espécies.

Palavras-chave: *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, diversidade genética, *Mangifera indica*, marcadores AFLP.

**GENETIC AND PATHOGENIC CHARACTERIZATION OF *Colletotrichum* spp.
ISOLATES ASSOCIATED WITH ANTHRACNOSE DISEASE OF MANGO**

Summary - The mango crop (*Mangifera indica* L.) is attacked by several diseases and in this context, the anthracnose is one of the most important. This disease is caused by the fungus *C. gloeosporioides* in most situations. Due to economic importance of the anthracnose on mango, the aim of this study was to analyze the genetic and pathogenic variability of *Colletotrichum* spp. isolates obtained from different organs and varieties of mango plants with anthracnose symptoms, and from different municipalities of São Paulo State that are among the major producers of mango. The isolates from mango were also compared with isolates obtained from citrus. Sequencing of ITS1-5.8S-ITS2 region from 183 isolates obtained from mango allowed the identification of them as *C. gloeosporioides*, however, one of them, was identified as *C. acutatum*. The isolates from citrus, obtained from symptomless leaves and flowers with rot symptoms, were identified as *C. gloeosporioides* and *C. acutatum*, respectively. The results obtained by applying AFLP markers indicated high level of genetic variability among isolates within population and the occurrence of gene flow. Moreover, these results corroborated those achieved by sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 region, because the isolates were grouped according to its species. Representative isolates of the population, including those obtained from citrus, belonging to both species of *Colletotrichum*, caused typical symptoms of anthracnose disease on mango leaves of Palmer and Tommy Atkins varieties, indicating the lack of host specificity for these species.

Keywords: AFLP markers, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, genetic diversity, *Mangifera indica*.

1. INTRODUÇÃO

A cultura da manga (*Mangifera indica* L.) tem apresentado elevados progressos comerciais, a qual, apenas em 2008 contribuiu com cerca de 40% da produção mundial de frutas (FAO, 2009). O Brasil, em particular, nesse ano, produziu 1.154.649 toneladas de manga, das quais 11% foram destinadas à exportação, ocupando o segundo lugar dentre as frutas mais exportadas pelo país (IBRAF, 2009; AGRIANUAL, 2011).

Não obstante a importância da cultura, as pesquisas com a mesma são escassas, principalmente em relação aos problemas fitossanitários que prejudicam a produção da fruta e a depreciam, inviabilizando a exportação.

A cultura da manga conta com diversos problemas de ordem fitossanitária, destacando-se como um dos mais importantes a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., na maior parte das vezes, e por *C. acutatum* J.H. Simmonds, em menores proporções, em alguns países (FREEMAN et al., 1998; RIVERA-VARGAS et al., 2006). Tal doença prejudica a produção e deprecia os frutos de forma qualitativa, representando um grande entrave à melhoria da produtividade, comércio interno e exportações.

O gênero *Colletotrichum* é o agente causal da antracnose e de outras doenças em inúmeras espécies de plantas, ocupando posição de destaque como sendo um dos grupos de fungos fitopatogênicos mais estudados (HYDE et al., 2009a). A antracnose ocorre em frutos nas fases de pós-colheita, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, sendo responsável por perdas de muitos milhões de dólares em culturas como banana (*Musa* spp.), caju (*Anacardium occidentale* L.), mamão (*Carica papaya* L.), maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.), manga (*Mangifera indica* L.), café (*Coffea arabica* L.), dentre outras (PERES et al., 2002; LOPEZ & LUCAS, 2010; NGUYEN et al., 2010).

Em manga, os sintomas de antracnose ocorrem em todos os órgãos da planta. Nas folhas, as lesões mostram-se salientes, necróticas e pretas. Na panícula, os sintomas podem ocorrer tanto no ramo da inflorescência quanto nas flores individuais.

Os frutos, quando infectados no estágio inicial de desenvolvimento, geralmente são abortados. Já em pós-colheita, os sintomas da doença são caracterizados por lesões de coloração marrom a preta e deprimidas, podendo ocupar alguns milímetros a vários centímetros (ARAUZ, 2000).

No Brasil, o controle do patógeno baseia-se essencialmente no uso de fungicidas de contato ou sistêmicos. Segundo produtores das várias regiões do Estado de São Paulo, em determinados anos, especialmente com primavera e verão muito chuvosos, são empregadas mais de vinte pulverizações por ciclo. Além dos elevados custos de controle, tem se observado que os resultados muitas vezes mostram-se aquém dos níveis desejados.

Assim, considerando que nos últimos dez anos o controle do patógeno vinha sendo alcançado com sucesso, suspeita-se que, dada à pressão de seleção exercida pelo intenso uso de fungicidas, especialmente os sistêmicos, possa ter havido seleção de linhagens do patógeno resistentes aos principais ingredientes ativos. Tal fato, por exemplo, já foi relatado em muitos casos, dado ao intenso uso de fungicidas do grupo dos benzimidazóis (AKEM, 2006). Também, além da dificuldade no controle do patógeno, outro aspecto relevante trata-se dos diferentes níveis de patogenicidade observados em condições controladas. Tal aspecto induz a se pressupor a possível existência de grupos de especialização patogênica.

Embora a literatura internacional tenha contribuído muito com informações relativas ao estudo de populações de *Colletotrichum* associados a sintomas de antracnose em mangueiras (MARTÍNEZ et al., 2009; GUPTA et al., 2010), no Brasil, os trabalhos ainda são escassos.

Normalmente as espécies de *Colletotrichum* têm sido identificadas com base em caracteres morfológicos (SUTTON, 1992; PHOTITA et al., 2005). Porém, esses critérios por si só têm se mostrado inadequados devido à grande variação morfológica e fenotípica do patógeno resultantes de influências ambientais. A taxonomia incerta dos fungos, incluindo-se os do gênero *Colletotrichum*, tem dificultado os esforços para entender melhor as suas relações com o hospedeiro, realizar a correta diagnose das

doenças, desenvolver estratégias de controle e estabelecer programas eficazes de quarentena (TEBEEST et al., 1997)

Em vista disso, técnicas moleculares, como o sequenciamento das regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e β -tubulina e o uso de marcadores moleculares têm sido utilizadas com sucesso para caracterização e identificação de espécies do gênero *Colletotrichum* (HYDE et al., 2009b). O sequenciamento dos espaços intergênicos de unidades repetidas do rDNA nuclear, como a região ITS constitui em excelente alternativa para discriminação de espécies de fungos (WHITE et al., 1990). Por outro lado, para análise da diversidade genética intra e entre populações, a técnica AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) tem se destacado em relação a outras técnicas, dado à possibilidade de identificar alto nível de polimorfismo, à sua reprodutibilidade e confiabilidade (LOPES et al., 2002). Além disso, estudos de diversidade genética entre populações associados a testes de patogenicidade têm auxiliado na discriminação de espécies patogênicas e não patogênicas, assim como quanto ao estudo da abrangência fisiológica das espécies (CAI et al., 2009).

Devido à importância da antracnose em manga no Brasil, denota-se a necessidade de estudos acerca da estrutura genética das populações de *Colletotrichum*, que podem oferecer informações úteis quanto ao potencial evolutivo dos isolados, assim como auxiliar na reavaliação, desenvolvimento e adoção de estratégias para o controle do patógeno.

Diante do exposto, os objetivos do presente estudo foram: (i) identificar por meio do sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2, isolados de *Colletotrichum* associados a sintomas de antracnose em mangueiras de diferentes municípios do Estado de São Paulo; (ii) determinar por meio de marcadores moleculares fAFLP (*fluorescent amplified fragment length polymorphism*), as relações filogenéticas entre esses isolados; (iii) estabelecer relações quanto a características genéticas e o potencial patogênico dos indivíduos representativos da população e; (iv) comparar genotipicamente grupos de isolados de *Colletotrichum* responsáveis por sintomas de antracnose em mangueiras, e isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* responsáveis, respectivamente, pela antracnose e podridão floral em laranjas doces (*Citrus sinensis*).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura da manga

2.1.1. Origem e distribuição

A manga é originária da Índia e presumi-se que tem sido cultivada pelos homens por mais de 4.000 anos, sendo inclusive, retratada em esculturas que datam de 100 A.C. (MUKHERJEE, 1953). Em meados do ano 1.500, os indianos já dominavam as técnicas de plantio de mangueiras e possuíam as melhores variedades viáveis para constituírem grandes pomares. A dispersão da manga em todo o mundo deu-se juntamente com as negociações entre a Ásia e a Europa de frutas tropicais e especiarias. Os portugueses, no início do século XVI, coletaram mudas de mangueiras e sementes na Índia, e as levaram para a África e suas ilhas adjacentes, e, subsequentemente para o Brasil (MUKHERJEE, 1953).

As primeiras plantas de manga introduzidas no Brasil, no Rio de Janeiro, eram poliembrionicas, da raça Filipina, com limitada variação genética e produziam frutos muito fibrosos (MUKHERJEE, 1953; DONADIO et al., 2010). A partir de 1930, no entanto, com a introdução de cultivares da raça Indiana, plantas monoembrionicas, caracterizadas por produzirem frutos com pouca fibra e por apresentarem maior resistência a doenças, a cultura da manga no Brasil tomou um grande impulso do ponto de vista comercial (DONADIO et al., 2010).

No Estado de São Paulo, as primeiras plantas de manga foram introduzidas em 1899, em Jardinópolis (DONADIO et al., 2010). Dado ao apelo comercial no Estado de São Paulo, de 1990 a 2000, o crescimento no número de pés novos de mangueiras foi de 98% (PEROSA et al., 2002). Entretanto, o maior sucesso no cultivo de mangueiras foi registrado na região Nordeste do Brasil, que contribui atualmente com até 70% da produção brasileira (AGRIANUAL, 2011).

Atualmente, 24 Estados brasileiros e o Distrito Federal contribuem para a produção brasileira de manga (AGRIANUAL, 2011). As principais variedades plantadas no Brasil são: (i) para consumo *in natura*: Haden, Tommy Atkins, Keity, Palmer, Ruby, Zill e Van Dick; (ii) para composição de compota em calda: Imperial, Carlota, São Quirino, Nom Plus Ultra, Haden, Palmer, Kent e Zill; e (iii) próprias para fabricar néctar: Carlota, Palmer, Manga D'água e Sensation (iv) outras variedades: Bourbon, Keitt, Coquinho, Espada Extrema, Ouro e Rosa (CAMARGO FILHO et al., 2004).

2.1.2. Importância econômica

Em 2008, a produção mundial de frutas tropicais foi estimada em mais de 82,7 milhões de toneladas, com destaque para a manga, a qual dominou o mercado global, com aproximadamente 40% da produção mundial (FAO, 2009). Em 2008, a Ásia foi o principal produtor de mangas, contando com 74% da produção mundial. A América Latina e o Caribe contribuíram com 16% da produção, a África com 10% e a Oceania com uma pequena porcentagem (FAO, 2009).

No Brasil, a produção de manga está aumentando anualmente, a qual, em 2001 foi de 782.348 toneladas, passando em 2008 para 1.154.649 toneladas (AGRIANUAL, 2011). Esse incremento também ocorreu na quantidade de produto exportado, que passou de 115.512 toneladas em 2006, para 133.725 toneladas em 2008. Nesse ano, por exemplo, dentre as frutas frescas brasileiras mais exportadas, a manga ocupou o segundo lugar, perdendo apenas para o melão (IBRAF, 2009). Os principais países importadores da manga brasileira são os Países Baixos, Estados Unidos, Reino Unido, Espanha e Portugal (AGRIANUAL, 2011).

Além da região Nordeste, o Estado de São Paulo também tem contribuído muito para a produção de manga para exportação. Conforme dados publicados, o Estado conta e utiliza de uma boa infra-estrutura para produção de frutas de alta qualidade, obedecendo tanto à padronização das técnicas de pós-colheita, como às exigências fitossanitárias dos países importadores (PEROSA et al., 2002). Em 2008, em particular, o Estado de São Paulo produziu 207.930 toneladas em 12.308 hectares,

correspondendo a 66% da produção da região Sudeste e 18% da produção brasileira (AGRIANUAL, 2011), o que demonstra, portanto, a importância da cultura nesse Estado.

2.1.3. Problemas fitossanitários

Vários são os patógenos e pragas que afetam a cultura da manga em todo o mundo. No Brasil, em termos fitossanitários destacam-se: (i) seca-da-mangueira, resultante do complexo *Ceratocystis fimbriata* e o seu vetor *Hypocryphalus mangiferae*; (ii) malformação floral (*Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*) (iii) antracnose, atribuída ao fungo *Colletotrichum gloeosporioides*; (iv) oídio (*Oidium mangiferae*); (v) podridão-do-pedúnculo (*Diplodia natalensis* e *Diaphorte citri*); (vi) verrugose (*Sphaceloma mangiferae*); (vii) morte descendente (*Lasiodiplodia theobromae*); e (viii) mancha-angular (*Xanthomonas campestris* pv. *Mangiferae indica*) (RIBEIRO, 2005; DONADIO et al., 2010).

2.2. Antracnose

2.2.1. Considerações gerais

O gênero *Colletotrichum* é o agente causal da antracnose e outras doenças em folhas, ramos e frutos de inúmeras espécies de plantas, incluindo muitas culturas importantes (CAI et al., 2009, HYDE et al., 2009a; PHOULIVONG et al., 2010). Assim, fungos do gênero *Colletotrichum*, pertencentes à classe Coelomycetes (SUTTON, 1992; HYDE et al., 2009b), ocupam posição de destaque pela sua importância econômica, sendo, em vista disso, um dos grupos de fungos fitopatogênicos mais estudados (HYDE et al., 2009a). Esse gênero engloba espécies endofíticas, epifíticas, saprófitas, fitopatogênicas (HYDE et al., 2009b) e até aquelas capazes de causar doenças em humanos (CANO et al., 2004).

A espécie *C. gloeosporioides* é patogênica para abacate, banana, manga, maracujá, mamão (PERES et al., 2002; AFANADOR KAFURI et al., 2003; PHOULIVONG et al., 2010), maçã (CARVALHO et al., 2000; GONZÁLEZ & SUTTON, 2004), citros (TIMMER & BROWN, 2000; FEICHTENBERGER et al., 2005), café (NGUYE et al., 2010), morango (MERTELY & LEGARD, 2004), *stylosanthes* (CHAKRABORTY et al., 2002), cará (ABANG et al., 2006), oliveira (SERGEEVA et al., 2008), *Agavaceae* (FARR et al., 2006), caju (LOPEZ & LUCAS, 2010), caquizeiro (KIM et al., 2009), dentre outras plantas. Da mesma maneira, a espécie *C. acutatum* também infecta várias plantas como tomate (AFANADOR KAFURI et al., 2003), morango, samambaia-preta, citros, *blueberry* (MACKENZIE et al. 2009), café (NGUYE et al., 2010), oliveira (SERGEEVA et al., 2008), pimenta (KIM et al., 2009), goiaba (PERES et al., 2002), manga (RIVERA-VARGAS et al., 2006), uva (WHITELAW-WECKERT et al., 2007), dentre outras.

Nesse contexto, no mundo a antracnose é reconhecida como a mais importante doença da cultura da manga, em pré e pós-colheita. Trata-se de uma doença limitante à produção de frutos em todos os países produtores de manga, especialmente naqueles nos quais prevalecem alta umidade durante a época de colheita (ARAUZ, 2000; AKEM, 2006; PLOETZ & FREEMAN, 2009; PLOETZ, 2010).

2.2.2. Etiologia

No Brasil, e na maioria das regiões produtoras de manga no mundo, a antracnose é causada por *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (teleomorfo = *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk) (PIMENTA, 2009). Entretanto, em algumas regiões do globo foi relatada a presença de *C. acutatum* J.H. Simmonds (teleomorfo = *Glomerella acutata* Guerber & J.C. Correll) ocorrendo, comparativamente, em menores proporções (FREEMAN et al., 1998; ARAUZ, 2000; RIVERA-VARGAS et al. 2006; HYDE et al., 2009a; PHOULIVONG et al. 2010, PLOETZ, 2010).

O fungo *C. gloeosporioides*, pertencente à ordem Melanconiales, produz acérvulos subepidérmicos, dispostos em círculos, dos quais são liberados os conídios

através de uma mucilagem de coloração alaranjada (ARAUZ, 2000; RIBEIRO, 2005). Os conídios são hialinos e gutulados, uninucleados, com 12-19 μm de comprimento, por 1,0-6,0 μm de largura, arredondados nas extremidades e levemente curvos (RIBEIRO, 2005). Já o teleomorfo *G. cingulata*, possui peritécios rostrados, subesféricos e agrupados num estroma, ou bem separados. Os ascos são subclavados, medindo 42-60 x 10-12 μm . Os ascósporos são hialinos, unicelulares e curvados, medindo 12-24 x 4-6 μm (RIBEIRO, 2005).

A produção de ascósporos de *G. cingulata* foi detectada em folhas secas de mangueiras sobre o solo, em 1976 (GORDILLO, L. & HERNÁNDEZ, 1980). Entretanto, o papel do estágio sexual no ciclo da doença mostra-se ainda desconhecido (FITZELL & PEAK, 1984; ARAUZ, 2000). Os conídios, por outro lado, constituem-se na fonte primária de inóculo, e são formados abundantemente na copa das plantas (FITZELL & PEAK, 1984), tanto em lesões existentes em folhas, ramos, panículas, como em frutos mumificados (RIBEIRO, 2005; ARAUZ, 2000) (Figura 1).

O fungo *C. gloeosporioides* requer água livre ou umidade relativa acima de 95% para a germinação do conídio e formação do apressório (DODD et al., 1991). Entretanto, o conídio pode sobreviver por uma a duas semanas sob umidade baixa, de cerca de 62%, e então germinar a 100% de umidade relativa (ESTRADA et al., 1993). Em geral, a infecção é favorecida a temperaturas de 20°C a 30°C (ARAUZ, 2000).

Os conídios são normalmente dispersos pela água da chuva, podendo atingir folhas, flores ou outros tecidos jovens e causar infecções secundárias, adquirindo um caráter policíclico nesses órgãos (ARAUZ, 2000; RIBEIRO, 2005). Os frutos em desenvolvimento também podem ser infectados ocasionando perdas de produção.

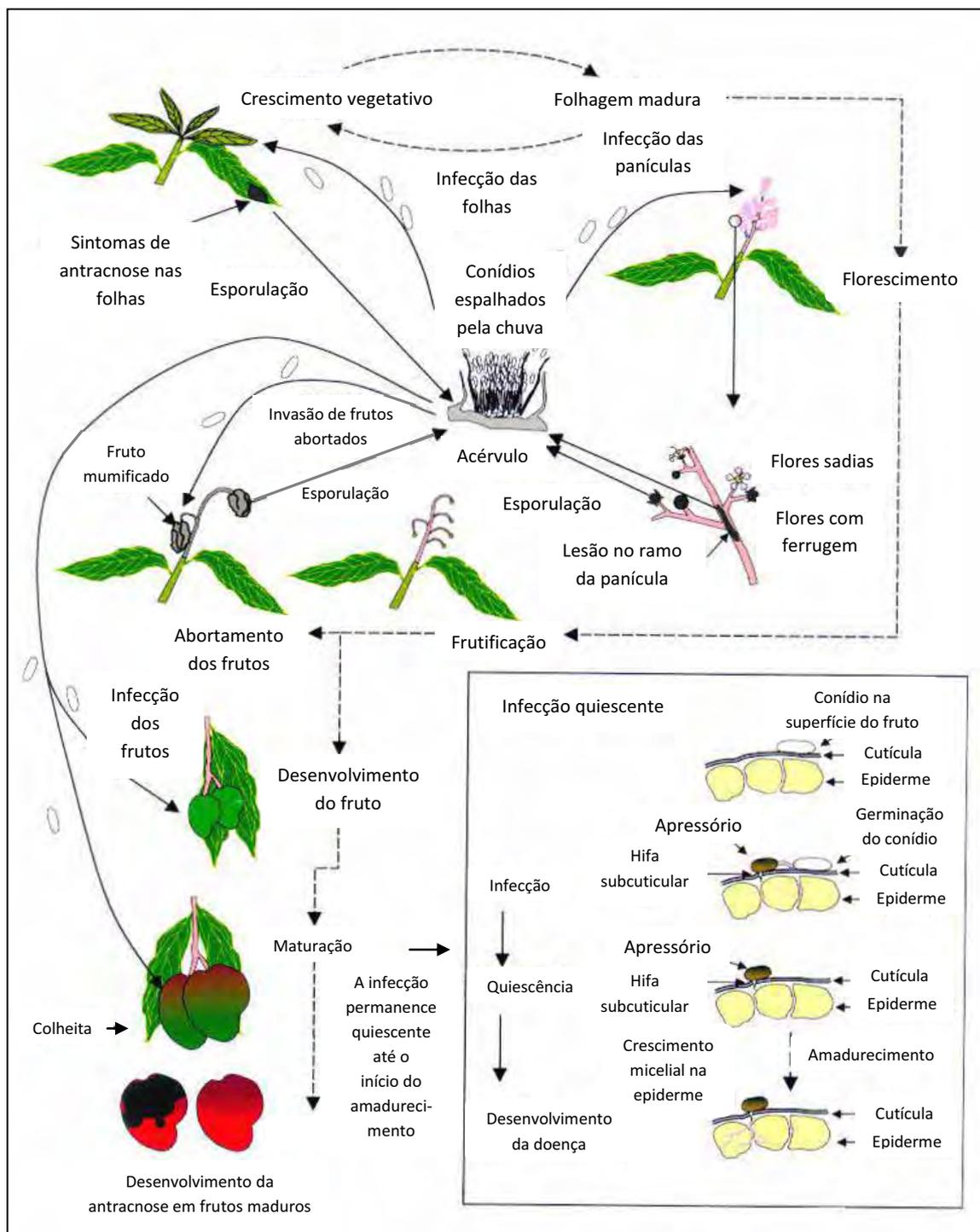


Figura 1. Ciclo da antracnose em manga. As linhas sólidas e as linhas pontilhadas representam o ciclo da doença e a fenologia da planta, respectivamente (ARAUZ, 2000).

Em pós-colheita, os sintomas de antracnose se originam de infecções quiescentes que ocorrem nos frutos em fase de desenvolvimento. Após a colheita, assim que o período climatérico dos frutos se inicia, as lesões começam a se desenvolver. Não há infecção de fruto para fruto, sendo a antracnose em pós-colheita uma doença tipicamente monocíclica (ARAUZ, 2000). Entretanto, os frutos de manga podem ser infectados por conídios oriundos de isolados de *Colletotrichum* spp. de outros hospedeiros como abacate, mamão, banana, café e citros (FREEMAN, S. & SHABI, 1996; FREEMAN et al., 1998), com indicação, portanto, de que não há uma aparente e estrita especificidade entre as espécies desse fungo associadas a esses hospedeiros.

2.2.3. Sintomas

Nas folhas, as lesões mostram-se salientes, necróticas, arredondadas ou irregulares, pretas e visíveis em ambas as faces da mesma. Ao evoluírem, as lesões coalescem e formam grandes áreas necróticas, geralmente nas margens das folhas (ARAUZ, 2000; RIBEIRO 2005). As lesões foliares se desenvolvem primeiramente em tecido jovem, porém, os conídios podem ser formados em lesões no estágio inicial até o mais avançado de desenvolvimento das folhas (ARAUZ, 2000). Sob condições favoráveis, o fungo pode invadir os ramos e causar manchas necróticas escuras seguidas de uma seca da ponta para a base e subsequente desfolha (RIBEIRO, 2005).

Na panícula, o fungo pode infectar tanto o ramo da inflorescência, quanto as flores individuais. Nos ramos, aparecem lesões alongadas de coloração cinza-escura a preta. Já as flores com sintomas ficam secas e sua cor varia de marrom a preta (ARAUZ, 2000). Frutos pequenos, do tamanho de uma ervilha, podem ser infectados e abortados. Os frutos abortados devido a causas fisiológicas normais, geralmente ficam mumificados. Estes são invadidos saprofiticamente pelo fungo *C. gloeosporioides*, onde ocorre uma abundante produção de conídios (ARAUZ, 2000; CUNHA et al., 2000).

Em pós-colheita, as lesões na superfície dos frutos são arredondadas, de coloração marrom a preta, com uma borda indefinida, deprimidas e às vezes com

pequenas rachaduras (ARAUZ, 2000; RIBEIRO, 2005). Nesse caso, podem ocorrer novas lesões, mais extensas, resultantes do escorrimento das gotas de água, da parte basal para a distal do fruto, e conseqüente dispersão do inóculo (ARAUZ, 2000). Geralmente, as lesões são restritas à casca, mas em casos severos o fungo pode invadir a polpa. Em estádios avançados da doença, o fungo produz acérvulo e abundante massa de conídios de coloração alaranjada a salmão sob as lesões (ARAUZ, 2000).

2.2.4. Controle da doença

Na fase de pré-colheita, o manejo da antracnose se baseia em: (i) sanidade das plantas; (ii) alteração do tempo de florescimento para assegurar que os frutos se desenvolvam durante condições de clima seco; e (iii) integração dessas medidas com o uso de fungicidas (JOHNSON & HOFMAN, 2009). No contexto da melhoria das condições de sanidade das plantas, dentre as medidas de caráter cultural incluem-se maior espaçamento entre plantas, favorecendo a ventilação e insolação, e podas de limpeza que reduzem as fontes de inóculo (RIBEIRO, 2005).

O uso de fungicidas é restrito pelo número de produtos que encontram-se registrados para a cultura, sua eficiência, ou até mesmo pela aceitabilidade do seu uso segundo os regulamentos dos países importadores. Em geral, dentre os fungicidas protetores, os cúpricos têm maior aceitabilidade, embora haja muita semelhança entre as formulações (JOHNSON & HOFMAN, 2009). Geralmente, os fungicidas cúpricos, por serem de contato e facilmente laváveis, não são muito eficazes, a menos que aplicados com outros fungicidas, como os ditiocarbamatos (RIBEIRO, 2005; PLOETZ, 2010). No entanto, o emprego do mancozeb, do grupo dos ditiocarbamatos, não é aceito em alguns países, como por exemplo, nos Estados Unidos (AKEM, 2006; PLOETZ, 2010).

Os fungicidas sistêmicos, por outro lado, possibilitam na maioria das vezes uma maior eficiência quando comparada aos fungicidas de contato. Nesse grupo destacam-se os benzimidazóis. Entretanto, ao longo dos anos, em diversos países tem-se verificado falhas na sua eficiência dada à seleção de estirpes de *C. gloeosporioides*

resistentes aos mesmos, comprometendo a sua viabilidade de uso (AKEM, 2006). Os imidazoles, procloraz e imazalil, são usados em alguns países para controle da antracnose em pré e pós-colheita, porém, o uso dos mesmos não é permitido para o tratamento de frutos destinados ao mercado da Europa (PLOETZ, 2010).

Ultimamente, fungicidas do grupo das estrobilurinas têm se mostrado eficientes no controle da antracnose e muitas outras doenças de pós-colheita de manga. No entanto, esses fungicidas mostram-se vulneráveis quanto à possibilidade de seleção de estirpes resistentes, devendo ser usados com moderação (PLOETZ, 2010). Johnson & Hofman (2009) sugerem que uma ou duas aplicações devem ser feitas durante a florada e antes do estabelecimento dos frutos, com duas aplicações adicionais a 21 e 7 dias antes da colheita. Na pós-colheita, é recomendado o tratamento dos frutos mediante emprego de fungicidas associados a tratamentos térmicos para prevenir o desenvolvimento de lesões resultantes de infecções quiescentes (RIBEIRO, 2005; PLOETZ, 2010).

Quanto ao comportamento varietal, em termos de resistência ao patógeno, consta na literatura como de maior resistência à antracnose em campo as variedades Keitt, Tommy Atkins e Van Dyke. E dentre as mais suscetíveis destacam-se Haden e Bourbon, enquanto dentre as moderadamente suscetíveis encontram-se a Palmer e Coração-de-boi (RIBEIRO, 2005; PLOETZ, 2010). Denota-se assim que, para as condições do Brasil, as variedades de maior importância econômica (CAMARGO FILHO et al., 2004) mostram-se muito vulneráveis, especialmente pelo fato de que em grande parte das regiões produtoras conta-se com chuvas frequentes e em alta intensidade quando das fases iniciais de desenvolvimento dos frutos e nas fases que antecedem a maturidade fisiológica dos mesmos.

2.3. Caracterização molecular de espécies de *Colletotrichum*

Devido à limitada presença de caracteres morfológicos distinguíveis entre as espécies, assim como a raridade da ocorrência da fase teleomórfica, a identificação de espécies do gênero *Colletotrichum* mostra-se difícil e laboriosa (HYDE et al., 2009b).

TeBeest et al. (1997) concluíram que a taxonomia incerta dos fungos, incluindo-se os do gênero *Colletotrichum*, tem dificultado os esforços para entender melhor as suas relações com o hospedeiro, realizar a correta diagnose das doenças, desenvolver estratégias de controle e estabelecer programas eficazes de quarentena.

Usualmente as espécies de *Colletotrichum* são identificadas com base em caracteres morfológicos, incluindo-se tamanho e forma dos conídios e apressórios, presença e ausência de setas, escleródios, acérvulos e estágio teleomorfo e, inclusive, caracteres culturais, como coloração da colônia, taxa de crescimento e textura (SUTTON, 1992; TEBEEST et al., 1997; PHOTITA et al., 2005; THAUNG, 2008). Entretanto, esses critérios por si só nem sempre oferecem a confiabilidade necessária, haja visto as grandes variações morfológicas e fenotípicas resultantes de influências ambientais (HYDE et al., 2009b). Em função dessa dificuldade apontada, outras técnicas têm sido utilizadas com vistas à caracterização e identificação das espécies de fungos do gênero *Colletotrichum*, com destaque ao emprego de técnicas moleculares (PERES et al., 2002; DU et al., 2005; PHOTITA et al., 2005; ABANG et al., 2006; WHITELAW-WECKERT et al., 2007; THAN et al., 2008; KIM et al., 2009; NGUYE et al., 2010). Cannon et al. (2000), por exemplo, relataram que o emprego de análises de ácidos nucléicos poderiam prover resultados na classificação de fungos do gênero *Colletotrichum* com maior confiabilidade, visto que as características do DNA não são diretamente influenciadas pelos fatores ambientais.

Em vários estudos relacionados à sistemática molecular e filogenia de fungos, o cístron que codifica o DNA ribossomal (rDNA) tem sido utilizado com sucesso. A região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e os espaços intergênicos de unidades repetidas do rDNA nuclear variam entre espécies do mesmo gênero, ou entre populações (WHITE et al., 1990). Além disso, as reações PCR (*Polimerase Chain Reaction*) e o sequenciamento direto dessas regiões ribossomais oferecem muitas vantagens como rapidez, sequências com baixo número de erros, requer pequenas quantidades de DNA e é um método compatível com sequenciadores automáticos (WHITE et al., 1990). Segundo esses autores os primers ITS1 e ITS4 possibilitam a amplificação de uma região que engloba o ITS 1, 5.8S rDNA e o ITS2 do rDNA nuclear.

A técnica de sequenciamento da região ITS foi empregada por Moriwaki et al. (2002), Peres et al. (2002), Afanador-Kafuri et al. (2003), Photita et al. (2005), Du et al., (2005), Chung et al. (2006), Cannon et al. (2008), Kim et al. (2009), Shivas & Tan (2009), Nguyen et al. (2010), Lopez & Lucas (2010), dentre outros, para identificação de diferentes espécies de *Colletotrichum* provenientes de diferentes hospedeiros, em todo o mundo.

No entanto, Cai et al. (2009) analisaram 343 sequências de ITS de *C. gloeosporioides* do *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov) e constataram que cerca de 86% das sequências mostraram considerável divergência evolutiva com isolados de *C. gloeosporioides*, e provavelmente, representavam outras espécies. Dados semelhantes foram obtidos por Crouch et al. (2009) ao analisar 53 sequências de ITS de *Colletotrichum* do *GenBank*. Porém, atualmente, a região ITS é a única disponível para todas as espécies de *Colletotrichum*. Assim, devido à facilidade de obtenção das sequências e à extensa biblioteca existente, a região ITS ainda é muito útil para construção das relações interespecíficas entre isolados, porém, não seria a metodologia mais adequada para classificar novas espécies de *Colletotrichum* (CAI et al., 2009).

Outras técnicas moleculares têm sido utilizadas para estabelecer relações genéticas entre isolados de *Colletotrichum* de uma mesma espécie ou de espécies diferentes. Dentre as técnicas empregadas incluem-se RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (FREEMAN et al., 2001; ANDRADE et al., 2007), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WHITELAW-WECKERT et al., 2007; ROJAS-MARTÍNEZ et al., 2008, NGUYEN et al., 2009); microssatélite (ABANG et al., 2006; NGUYEN et al., 2009), ap-PCR (FREEMAN & SHABI, 1996; AFANADOR-KAFURI et al., 2003) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (ANSARI et al., 2004; SILVA-MANN et al., 2005; HEILMANN et al., 2006; KIM et al., 2009).

De acordo com Stansfield (1991), o termo 'marcador' é utilizado para se referir a uma marca no *locus*. Cada gene está localizado em um lugar específico do cromossoma, chamado *locus*. Devido às mutações, os genes podem ser modificados em várias formas exclusivas chamadas alelos. Todas as formas alélicas de um gene ocorrem num mesmo *locus*, em cromossomos homólogos.

A técnica AFLP, comparativamente às demais técnicas, detecta um maior número de *loci* que revelam marcadores moleculares, além de possibilitar uma ampla cobertura do genoma. A utilização de enzimas de restrição combinada com condições adequadas à hibridização dos primers durante as reações de amplificação agrega a robustez da técnica de RFLP com a praticidade da PCR. Devido a essas características, gradativamente os marcadores RAPD vêm sendo substituídos pelo AFLP (LOPES et al., 2002).

Os marcadores AFLP foram desenvolvidos por Zabeau & Vos (1993). A técnica se baseia na propriedade de certas enzimas de restrição, como a *EcoRI* e a *MseI*, de deixar após a clivagem do DNA, extremidades coesivas de sequência conhecida. Assim, é possível construir sequências de nucleotídeos de fita dupla que se ligam às extremidades dos fragmentos de restrição, denominadas adaptadores. Uma vez que a sequência dos adaptadores e a do sítio de restrição são conhecidas, pode-se construir iniciadores específicos a essas sequências para a pré-amplificação dos fragmentos de restrição. Na pré-amplificação, os primers são constituídos por uma sequência complementar ao adaptador, seguida de outra específica do sítio de restrição da enzima e um nucleotídeo seletivo é usado no terminal 3' dos iniciadores (LOPES et al., 2002).

Na segunda fase, denominada de amplificação seletiva, são usados de um a dois nucleotídeos seletivos nos terminais 3' dos iniciadores para pequenos genomas. Assim, apenas os fragmentos que possuem nucleotídeos complementares aos nucleotídeos seletivos, utilizados nos terminais 3' dos iniciadores, serão amplificados. Dessa maneira, os alelos dos *loci* de AFLP, determinados pela presença ou ausência de um determinado fragmento ou banda, são oriundos da perda ou ganho de um sítio de restrição, ou da complementaridade ou não das bases seletivas usadas nos terminais 3' dos iniciadores aonde se inicia a PCR com a região que flanqueia o sítio de restrição. A amplificação seletiva visa diminuir o número de fragmentos gerados pela digestão, reduzindo artefatos da técnica. A leitura dos fragmentos pode ser realizada em gel de poliacrilamida ou ser automatizada, realizada por um analisador de DNA, o que requer marcação fluorescente dos primers. Nesse último caso a técnica passa a ser conhecida

como fAFLP (*fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism*) (LOPES et al., 2002).

A técnica AFLP tem sido utilizada com sucesso para analisar a diversidade genética de populações de fungos. Por exemplo, mediante a análise de diversidade genética de uma população de isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de caqui e de *C. acutatum* oriundos de pimenta, de uma mesma região geográfica, por meio de marcadores AFLP, foi realizada a separação dos isolados em dois grupos, segundo as suas espécies. Verificou-se, ainda, que cada grupo subdividiu-se em outros subgrupos, mostrando a diversidade genética existente entre essa população de isolados obtida de diferentes culturas e oriundas de um mesmo local (KIM et al., 2009).

Ao analisar a variabilidade genética de *C. coccodes* oriundos de batata, Heilmann et al. (2006) relataram que a técnica AFLP foi muito mais eficiente para caracterização subespecífica do que a análise de grupos com compatibilidade vegetativa. Marcadores AFLP também foram utilizados com sucesso para analisar a diversidade genética de isolados de *C. lindemuthianum* oriundos de uma mesma cultivar de feijão, de dez países, localizados em três continentes (ANSARI et al., 2004).

2.4. Patogenicidade de isolados de *Colletotrichum*

É importante estabelecer se uma espécie de *Colletotrichum* em particular é hospedeiro-específica, apresentando assim alta seletividade, ou possui uma grande gama de hospedeiros. Geralmente, fungos que são hospedeiro-específicos podem apresentar uma distribuição geográfica limitada, o que pode ter uma grande importância em relação à biossegurança. No entanto, se o patógeno tiver muitos hospedeiros, a espécie pode ser cosmopolita e possivelmente oportunista. Assim, testes de patogenicidade fornecem dados úteis na classificação e futura delimitação das espécies de *Colletotrichum*. Postulados de Koch tem sido utilizados por muitos pesquisadores para confirmar a patogenicidade de várias espécies de *Colletotrichum* (CAI et al., 2009).

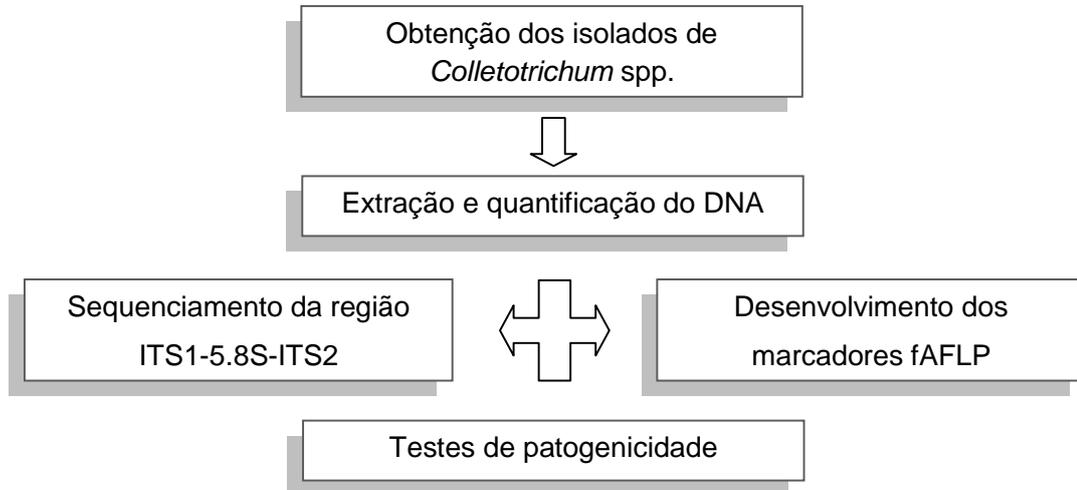
Estudos com testes de patogenicidade cruzados mostraram que um isolado de *C. acutatum* de morango mostrou-se patogênico quando inoculado em abacate, goiaba,

mamão, manga e maracujá, porém não o foi para frutos de banana. Foi verificado ainda que frutos de banana e de abacate expressaram sintomas típicos de antracnose apenas quando inoculados com um isolado de *C. musae* (PERES et al., 2002).

Em outro estudo, testes de patogenicidade mostraram que três espécies de *Colletotrichum*, *C. acutatum*, *C. capsici* e *C. gloeosporioides*, isoladas de pimentão (*Capsicum annuum*), são patogênicas para essa cultura, assim como isolados de *C. acutatum* obtidos de morango (THAN et al., 2008). Dessa forma, embora várias técnicas modernas contribuam na caracterização de vários fungos, incluindo-se *Colletotrichum* spp., os testes de patogenicidade são excelentes ferramentas para a comprovação da afinidade fisiológica dos isolados de *Colletotrichum* com possíveis hospedeiros. (CAI et al., 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O cultivo dos fungos e os testes de patogenicidade foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia e em casas de vegetação do Departamento de Fitossanidade. As atividades relacionadas à aplicação de técnicas moleculares foram desenvolvidas no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia, ambos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Campus de Jaboticabal, Estado de São Paulo. As etapas das atividades de trabalho encontram-se apresentadas conforme o seguinte organograma:



3.1. Obtenção dos isolados de *Colletotrichum* spp.

No estudo foram utilizados isolados de *Colletotrichum* spp. pertencentes à micoteca do Laboratório de Fitopatologia, FCAV/UNESP, formada nos anos de 2007/2008. Os isolados foram obtidos de tecidos de mangueiras com sintomas de antracnose, assim como de flores de citros com sintomas típicos de podridão floral. Tais isolados encontravam-se mantidos em tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), recobertos com óleo mineral esterilizado, sob condições ambiente. Além desses, foram obtidos isolados de folhas de mangueiras 'Haden', do banco de germoplasma, com sintomas de antracnose e de folhas assintomáticas de laranjeiras 'Valência' do Departamento de Fitossanidade, ambos localizados na FCAV/UNESP.

O isolamento dos fungos deu-se a partir de fragmentos de tecido vegetal, da região de transição doente/sadio, para o caso dos isolados obtidos de lesões, e de tecido sadio, para o caso daqueles obtidos de tecido assintomático. A seguir, os fragmentos, de cerca de 5mm², foram imersos em álcool 70% (v/v) por um minuto, posteriormente em solução de hipoclorito de sódio 0,5% (v/v), por três minutos, e enxaguados em água destilada esterilizada. Após secos em papel de filtro esterilizado, os fragmentos foram colocados equidistantemente entre si, em placas de Petri contendo

meio de cultura BDA. Posteriormente deu-se a incubação em B.O.D. a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por quatro dias. Quando do desenvolvimento das colônias, aquelas típicas de *Colletotrichum* foram repicadas para novas placas e, posteriormente, para tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA, onde após o seu desenvolvimento foram recobertas com óleo mineral esterilizado, visando a paralisação do metabolismo e preservação das culturas para estocagem. Posteriormente, quando do uso dos isolados, procedeu-se a sua recuperação a partir das culturas mantidas nos tubos de ensaio com conseqüente repicagem para placas de Petri contendo meio de cultura.

3.2. Extração de DNA

A fim de se obter quantidades suficientes de micélio para a extração de DNA, os isolados de *Colletotrichum* spp. foram repicados para frascos de vidro transparentes, de 110 mL, contendo meio de cultura líquido BD (batata-dextrose), nos quais os fungos se desenvolveram por cerca de 15 dias. Para a separação do micélio do meio de cultura, foram utilizadas peneiras de pequena trama que permitem filtragem, retendo o micélio e dispensando o meio restante. Ainda na peneira, o micélio foi lavado com água destilada, escorrido e colocado para secar em placas de Petri limpas, em temperatura ambiente, por cerca de 12 horas. Posteriormente, o micélio seco foi macerado com nitrogênio líquido até a formação de um pó, que foi transferido para tubos eppendorf de 2,0 mL.

O protocolo de Kuramae-Izioka (1997), com modificações, foi utilizado para as extrações de DNA, o que permitiu a obtenção de DNA em maior quantidade e qualidade. Assim, foram acrescentados 800 μL de tampão de extração [Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 100 mM pH 8.0 e SDS 0,5% (p/v)] a um tubo eppendorf de 2,0 mL contendo 0,1 g de micélio macerado. Após agitados, os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por 45 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos gentilmente. Posteriormente a esse período, foram acrescentados 400 μL de acetato de potássio 5 M. Misturou-se a solução por inversão e incubou-se no gelo por 30 minutos, invertendo-se os tubos a cada 10 minutos. Após as amostras terem sido centrifugadas a $15294 \times g$

por 10 minutos, a 15°C, o sobrenadante foi transferido para tubos novos, sendo acrescentado a este 700 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A solução foi misturada por inversão durante dois minutos e centrifugou-se novamente a 15294 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos novos e, novamente, tratado com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) sob as mesmas condições. Após a centrifugação, a fase superior foi transferida para tubos novos com cuidado para não tocar na interface inferior e acrescentou-se 15 µL de RNase (10 mg/mL). A fim de possibilitar a ação da RNase os tubos foram mantidos em banho-maria a 37°C por 60 minutos. Posteriormente, foram acrescentados 1000 µL de etanol absoluto gelado e a solução, após ser misturada gentilmente, foi levada ao freezer -20°C por aproximadamente 12 horas.

Após a precipitação do DNA em etanol, os tubos foram centrifugados a 15294 x g por 20 minutos. A fase líquida foi descartada e o *pellet* foi lavado com 1000 µL de etanol 70% (v/v). Após a centrifugação sob as mesmas condições anteriores, a fase líquida foi novamente descartada e o *pellet* foi colocado para secar em um concentrador à vácuo (Eppendorf) a 30°C por 5 minutos. Posteriormente, o *pellet* foi ressuscitado em 100 µL de tampão TE 10:1 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) por 24 horas à 4°C. A avaliação da quantidade do DNA e da sua qualidade foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro NanoDrop-100 (Uniscience), medindo-se a absorbância de cada amostra nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A relação da absorbância entre estes dois comprimentos de onda resulta no valor referente à qualidade do DNA, que se estiver no intervalo de 1,8 a 2,0 caracteriza um DNA de boa qualidade (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). As amostras também foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e padrão de concentração 100 pb DNA Ladder Plus (Fermentas) para verificação da qualidade do DNA. O gel foi visualizado sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC 1000 (BioRad).

3.3. Sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2

3.3.1. Amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2

A amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 foi realizada mediante o emprego do par de primers ITS1 (5' - ITS1 TCC GTA GG TGA ACC TGC GG - 3') e ITS4 (5' - TCC TCC GCT TAT TGA TA TGC - 3') (WHITE et al., 1990) para um fragmento esperado de cerca de 650 pb. Para a reação PCR de amplificação do fragmento, utilizou-se tampão 1X [100 mM Tris-HCl pH 8,8; 500 mM KCl; 0,8% (v/v) Nonidet P40]; MgCl₂ 2 mM; dNTP's 0,2 mM, 1,5 U de *Taq DNA polimerase*, 2,5 pmol de cada primer, ITS1 e ITS4, 60 ng de DNA genômico e água pura estéril para 20 µL. A amplificação foi realizada em um termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, inc.) programado para realizar 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1,5 minuto, e para finalizar um ciclo a 72°C por 10 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e padrão de concentração 100 pb DNA Ladder Plus (Fermentas). Assim, os fragmentos foram visualizados sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC 1000 (BioRad).

Como a reação PCR de amplificação do fragmento foi otimizada de forma a não deixar restos de reagentes após a reação, prosseguiu-se o sequenciamento direto do produto de PCR. Assim, o DNA do fragmento amplificado foi então submetido à PCR de sequenciamento utilizando-se os primers ITS1 (*Forward*) e ITS4 (*Reverse*) separadamente, e o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare) conforme instruções do fabricante. A amplificação de sequenciamento foi realizada sob as mesmas condições descritas para amplificação do fragmento. Após, o produto da PCR de sequenciamento foi precipitado em 80 µL de isopropanol 75% (v/v) e então submetido à centrifugação a 3220 x g por 45 minutos a 15°C. Posteriormente, a fase líquida foi descartada e o *pellet* foi lavado com 180 µL de etanol 70% (v/v). Após a lavagem, o *pellet* foi seco em um concentrador à vácuo a 45°C por 5 minutos. O produto da PCR de sequenciamento foi então submetido à desnaturação em formamida

(Applied Biosystems) na temperatura de 95°C por 5 minutos. Após a desnaturação, as amostras foram depositadas imediatamente no gelo a fim de se manter as fitas de DNA desnaturadas. A leitura das bases foi realizada por um sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems).

3.3.2. Análise das sequências

No sequenciador, os dados foram coletados pelo *software ABI Analysis Data Collection* (Applied Biosystems) após serem auto-analisados. Os eletroferogramas gerados pelo sequenciamento foram então submetidos ao pacote de programas Phred/Phrap/Consed (GORDON et al., 1998) para verificação da sua qualidade e obtenção das sequências consenso. Para o corte das extremidades e validação das sequências consenso, foram consideradas apenas as bases com qualidade Phred/Phrap igual ou superior a 20. As sequências de DNA qualificadas foram então comparadas a outras sequências depositadas no banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) através da ferramenta BLAST (ALTSCHULL et al., 1997).

Para a construção do dendrograma, as sequências de DNA obtidas no estudo e outras sequências do banco de dados foram alinhadas utilizando-se a ferramenta ClustalW (THOMPSON et al., 1994). Assim, as sequências de *Colletotrichum* do banco de dados (GenBank) incluídas nas análises foram: EU371022.1 *C. gloeosporioides* (espécie-tipo), AB219019.1 *G. cingulata*, AY177330.1 *C. gloeosporioides*, AF411700.1 *G. acutata* (espécie-tipo), GU183326.1 *G. acutata*, DQ003110.1 *G. graminicola* (espécie-tipo) e GU227819.1 *C. dematium* (espécie-tipo). Para constituir o grupo externo, foram acrescentadas duas sequências de fungos ascomicetos: FJ769706.1 *Guignardia citricarpa* e FSU38277 *Fusarium sambucinum*.

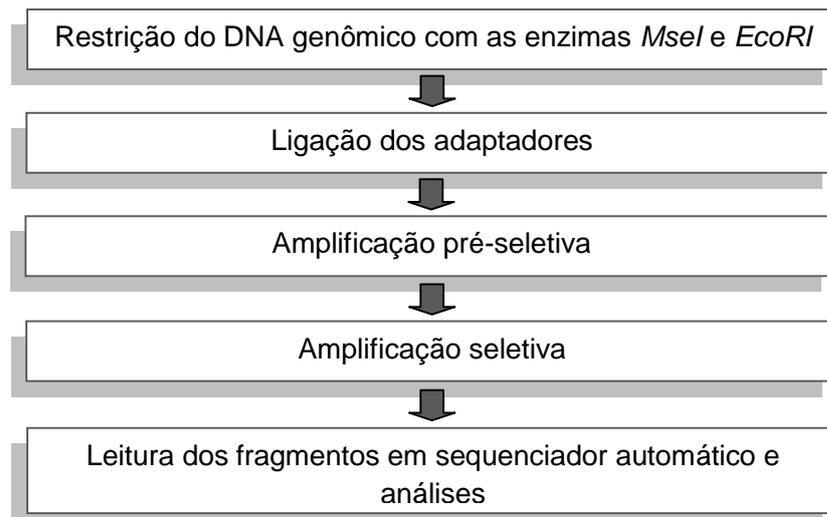
Após o alinhamento das sequências, os dendrogramas foram construídos pelo método da distância, com o algoritmo de agrupamento neighbor-joining (SAITOU & NEI, 1987) e modelo de substituição de nucleotídeos de Kimura-2-parameter (KIMURA, 1980), por meio do *software* MEGA 4.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*)

(TAMURA et al., 2007). Para assegurar a confiabilidade do agrupamento, a avaliação da significância por *bootstrap* foi realizada com 1000 repetições (FELSENSTEIN, 1985).

Valores de F_{ST} (índice de fixação) foram utilizados para estimar a diversidade genética intragrupos em relação à diversidade genética total de acordo com a equação $F_{ST} = (\theta_T - \theta_W) / \theta_T$, onde θ_T representa a diversidade genética total e θ_W representa a diversidade intragrupos (MARTIN, 2002). A análise de variância molecular (AMOVA) foi obtida utilizando-se o *software* Arlequin 3.5.1 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010). A estrutura genética das populações foi definida com base nos haplótipos de cada população, ou seja, alterações em pares de bases de uma dada sequência em relação às demais do grupo em análise. Os componentes da variância foram utilizados para calcular os índices de fixação e sua significância foi testada por 1000 permutações (EXCOFFIER et al., 1992).

3.4. Desenvolvimento dos marcadores fAFLP

Para o desenvolvimento da técnica fAFLP, utilizou-se o 'AFLP™ Microbial Fingerprinting Kit' (Applied Biosystems). O protocolo utilizado seguiu as recomendações do fabricante com modificações, conforme o organograma abaixo:



3.4.1. Restrição do DNA

Submeteu-se 500 ng de DNA à restrição com as enzimas *Msel*, de corte frequente, e *EcoRI*, de corte raro (Figura 2). A reação de restrição foi composta de Tampão React1 1,4X (Tris 330 mM, pH 7,9; MgAc 100 mM; KAc 660 mM; DTT 5 mM - Invitrogen), *Msel* 0,5 U (Invitrogen), *EcoRI* 2,5 U (Invitrogen) e água pura estéril para 9,1 μ L. A reação foi incubada a 37°C por 14 horas em termociclador. Após a restrição, as amostras foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose a fim de verificar a total digestão do DNA.

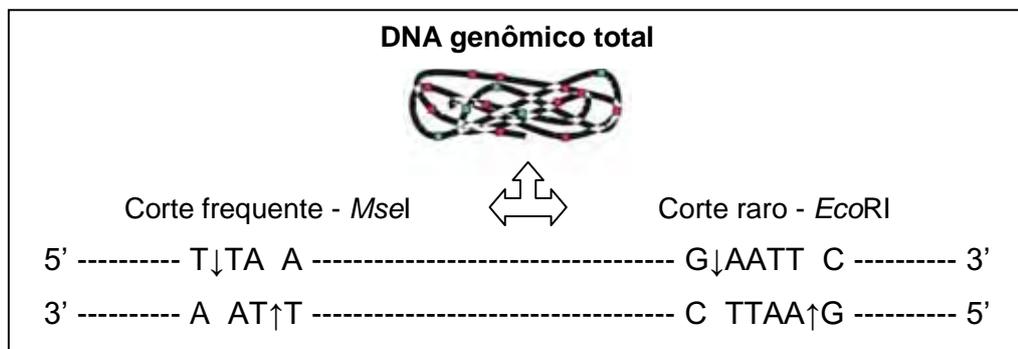


Figura 2. Ação das enzimas de restrição *EcoRI* e *Msel*.

3.4.2. Ligação dos adaptadores

Após a restrição, adaptadores específicos para as extremidades cortadas com as enzimas *EcoRI* e *Msel* foram ligados aos fragmentos com o auxílio da enzima T4 DNA ligase (Figura 3). Antes de preparar a reação, os adaptadores *Msel* e *EcoRI* foram desnaturados separadamente a 95°C por 5 minutos e, logo após, foram colocados no gelo. A reação para a ligação dos adaptadores foi composta por tampão da T4 DNA ligase 1X [250 mM Tris-HCl, pH 7,6; 50 mM MgCl₂; 5 mM ATP; 5 mM DTT; 25% (p/v) polietilenoglicol 8000 - Invitrogen], T4 DNA Ligase 0,5 U (Invitrogen), 0,33 μ L do adaptador *Msel* (1,1 μ M); 0,33 μ L do adaptador *EcoRI* (0,1 μ M) e 3,7 μ L do DNA restringido. A reação foi incubada a 20°C por 2 horas em termociclador. Após a ligação

dos adaptadores, o produto ligado foi diluído na proporção 1:8 (produto ligado : tampão TE 10:1).

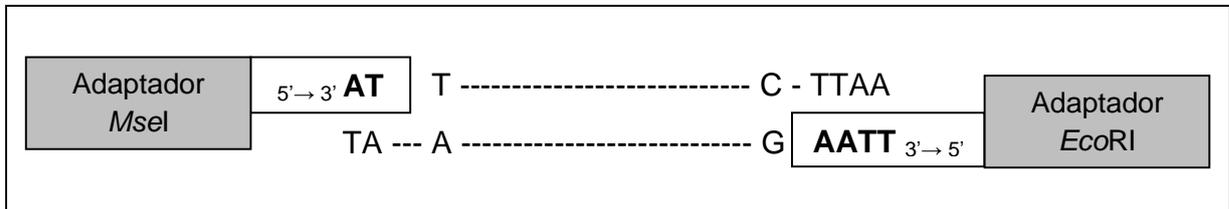


Figura 3. Ligação dos adaptadores, uma sequência conhecida de 20 nucleotídeos que será utilizada posteriormente como primer.

3.4.3. Pré-amplificação

A PCR de pré-amplificação permite a seleção de fragmentos por amplificar em maior quantidade aqueles de corte *EcoRI/Msel*. Assim, adicionalmente à sequência dos adaptadores, os primers usados para a amplificação pré-seletiva possuem um nucleotídeo complementar (Figura 4).

A reação pré-seletiva foi composta por 0,25 µL de *Core Sequence Msel* (0,25 µM), 0,25 µL de *Core Sequence EcoRI* (0,25 µM), 7,5 µL de *Core Mix* (tampão, nucleotídeos e *AmpliTaQ® DNA polimerase*) e 2,0 µL do DNA ligado e previamente diluído. A reação ocorreu em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf) programado para 72°C por 2 minutos, seguido de 20 ciclos a 94°C por 20 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos. Essa etapa também foi visualizada em gel de agarose 1,5% (p/v). O produto da reação pré-seletiva foi diluído na proporção 1:5 (produto pré-amplificado : tampão TE 10:1).

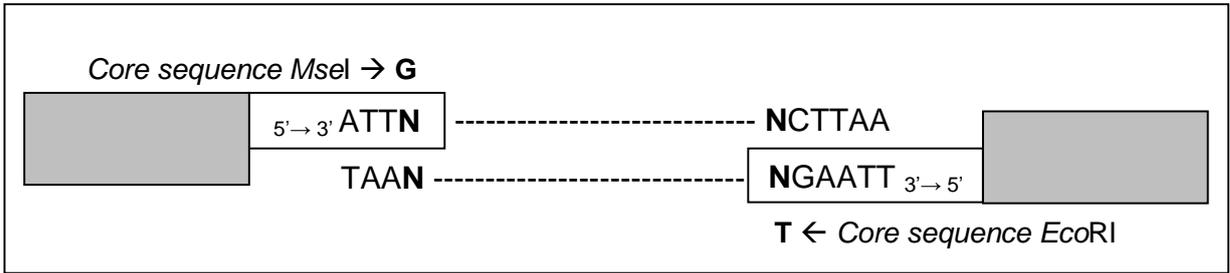


Figura 4. Pré-amplificação usando 'G' como nucleotídeo seletivo no iniciador *EcoRI* e 'T' no *Msel*.

3.4.4. Amplificação seletiva

Na etapa de amplificação seletiva podem ser adicionados de zero a dois nucleotídeos à extremidade 3' das sequências de primers. Assim, apenas fragmentos que possuam nucleotídeos complementares aos nucleotídeos seletivos serão amplificados. Nessa etapa os primers *EcoRI* podem ser marcados com fluorescências (NED, FAM e JOE) o que possibilita a análise dos fragmentos por meio de um analisador de DNA automático (Figura 5). A reação seletiva foi composta por 0,5 µL do primer *Msel* (0,22 µM), 0,5 µL do primer *EcoRI* (45 M), 7,5 µL de Core Mix (tampão, nucleotídeos e *AmpliTaq® DNA polimerase*) e 2,5 µL do produto da reação pré-seletiva diluída. A reação ocorreu em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf) programado conforme Tabela 1.

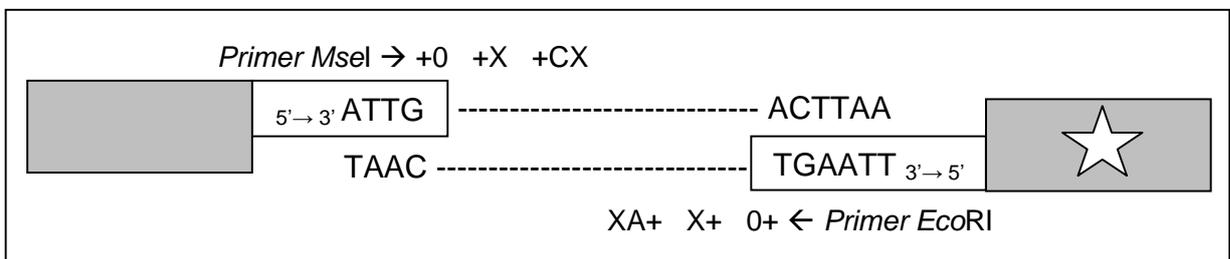


Figura 5. Amplificação seletiva, na qual pode ser acrescentado nucleotídeos às extremidades 3' dos primers de acordo com o polimorfismo esperado. Os primers *EcoRI* são marcados com fluorescência (☆).

A fim de possibilitar a visualização dos fragmentos, foram utilizados 1,55 μL do produto da amplificação seletiva de cada isolado, 0,37 μL do padrão de tamanho molecular GeneScan ROX 500 (Applied Biosystems) e 8 μL de formamida. Após desnaturadas a 95°C por 5 minutos, as amostras foram colocadas imediatamente no gelo. A separação dos fragmentos ocorreu em um sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems), utilizando-se polímero POP6 e um capilar de 50 cm. O sequenciador foi previamente calibrado para o reconhecimento das fluorescências com a matriz DS-32 (Applied Biosystems).

A seleção dos melhores primers capazes de evidenciar a possível diversidade genética entre os isolados foi realizada testando-se 33 conjuntos de primers, dos quais cinco foram selecionados para compor as análises de AFLP: NED*EcoRI-AT/MseI-C, FAM*EcoRI-AC/MseI-T, FAM*EcoRI-AC/MseI-CA, JOE*EcoRI-AG/MseI-G e JOE*EcoRI-AA/MseI-CC.

Tabela1. Programa do termociclador para amplificação seletiva.

Passo único	Ciclos			Nº de ciclo
94 °C por 2 min.	94°C - 20 sec.	66°C - 30 sec.	72°C - 2 min.	1
–	94°C - 20 sec.	65°C - 30 sec.	72°C - 2 min.	1
–	94°C - 20 sec.	64°C - 30 sec.	72°C - 2 min.	1
–	94°C - 20 sec.	63°C - 30 sec.	72°C - 2 min.	1
–	94°C - 20 sec.	62°C - 30 sec.	72°C - 2 min.	1
–	94°C - 20 sec.	61°C - 30 sec.	72°C - 2 min.	1
–	94°C - 20 sec.	60°C - 30 sec.	72°C - 2 min.	1
–	94°C - 20 sec.	59°C - 30 sec.	72°C - 2 min.	1
–	94°C - 20 sec.	58°C - 30 sec.	72°C - 2 min.	1
–	94°C - 20 sec.	57°C - 30 sec.	72°C - 2 min.	1
–	94°C - 20 sec.	56°C - 30 sec.	72°C - 2 min.	20
60 °C por 30 min.	–	–	–	1
4 °C	–	–	–	1

3.4.5. Análise dos dados de fAFLP

No sequenciador, os dados foram coletados e analisados previamente pelo *software Data Collection* (Applied Biosystems). Posteriormente, os dados foram escaneados pelo *software GeneScan* versão 3.7 (Applied Biosystems) tendo como padrão de tamanho molecular o GeneScan ROX 500 (Figura 6). Os projetos criados no *software GeneScan* possibilitaram a leitura minuciosa dos picos utilizando-se o *software Genotyper* versão 3.7 (Applied Biosystems), no qual foi possível marcar o tamanho molecular de cada pico. Assim, com o auxílio desse *software* os picos foram marcados criteriosamente a fim de se obter uma matriz binária, cujo princípio é o de ausência, representado pelo 0, e presença, representado pelo número 1, de um pico de mesmo tamanho molecular.

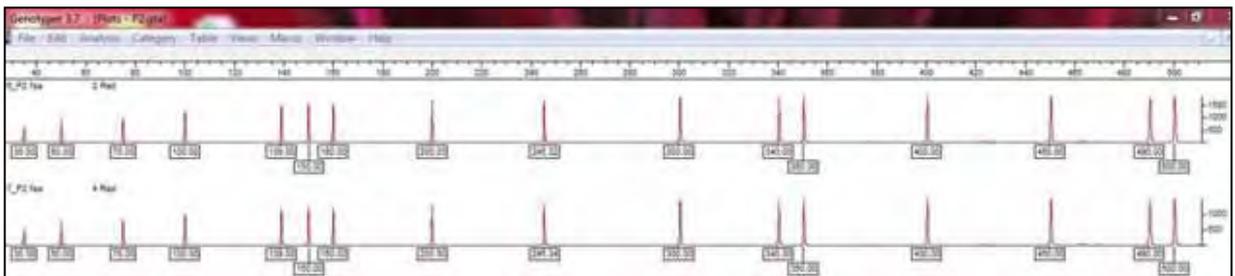


Figura 6. Padrão de tamanho molecular GeneScan ROX 500 – 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 245, 300, 340, 350, 400, 450, 490 e 500 pb.

A matriz binária foi convertida em uma matriz de distância com auxílio do *software PAUP* versão 4.0b10 (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) (SWOFFORD, 2002). Essa matriz foi utilizada na construção dos filogramas para a visualização das relações genéticas estabelecidas entre os isolados. Os filogramas foram gerados utilizando-se o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average*), pelo *software MEGA* 4.0 (TAMURA et al., 2007). O mesmo *software* foi utilizado para o cálculo das distâncias genéticas intra e entre grupos. A distância genética entre grupos foi calculada pela fórmula $d_A = d_{XY} - [(d_X + d_Y)/2]$, onde d_{XY} é a

média da distância genética entre os grupos X e Y, e d_X e d_Y são as distâncias médias intra-grupos. A análise da variância molecular (AMOVA) foi realizada pelo *software* Arlequin 3.5.1 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010) a partir da matriz binária. Mediante o valor de F_{ST} obtido, foi realizada uma estimativa do fluxo gênico (Nm) baseada no *Island Model* (WRIGHT, 1951), pela fórmula $Nm = (1 - F_{ST})/4F_{ST}$ (WHITLOCK & MCCAULEY, 1999). Se $Nm < 1$, a população local tende a uma diferenciação, porém, se $Nm \geq 1$, então há uma pequena diferenciação entre populações, e a migração nesse caso, é mais importante do que a deriva genética (WRIGHT, 1951).

3.5. Testes de patogenicidade

3.5.1. Inoculação

A metodologia empregada para a realização dos testes de patogenicidade baseou-se na metodologia utilizada por Rojas-Martínez et al. (2008) e sugerida por Cai et al. (2009). Os isolados se desenvolveram em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, sob temperatura ambiente de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob luz constante. Após aproximadamente oito dias de crescimento, 10 mL de água estéril contendo Tween 20 [0,1% (v/v)] foram adicionados a cada placa onde, mediante o uso de um pincel de cerdas macias foram removidos os conídios para a obtenção de uma suspensão. Posteriormente, mediante emprego de hemocítômetro, a suspensão foi calibrada para uma concentração contendo 1×10^5 conídios/mL (Figura 7). Os isolados que apresentaram maior dificuldade na formação dos conídios, mesmo após oito dias de crescimento, fato este diagnosticado em avaliações prévias, tiveram suas colônias umedecidas com água estéril aproximadamente 12 horas antes da inoculação. Esse procedimento facilitou a produção de conídios pelos fungos no tempo apropriado.

Nos testes, foram empregadas folhas jovens totalmente expandidas, com tecido foliar tenro, de aproximadamente 12 a 15 dias de desenvolvimento. Tais folhas foram previamente arranjadas no interior de bandejas forradas com papel de filtro umedecido

em água estéril. No pecíolo de cada folha foi colocado um chumaço de algodão umedecido a fim de se manter a turgidez da folha e a umidade elevada no ambiente.

A inoculação foi realizada em um dos lados do limbo foliar, dividido pela nervura central, enquanto a metade restante serviu como testemunha. Assim, foi depositada uma gota de 0,1 mL da suspensão em quatro pontos da folha, previamente marcados, seguido de envolvimento das bandejas com sacos plásticos transparentes a fim de se manter a umidade em torno de 95% (Figura 7). Para cada isolado foram empregadas cinco folhas de cada uma das variedades, Palmer e Tommy Atkins, oriundas de mudas de mangueiras mantidas em casa de vegetação do Departamento de Fitossanidade da FCAV/UNESP.

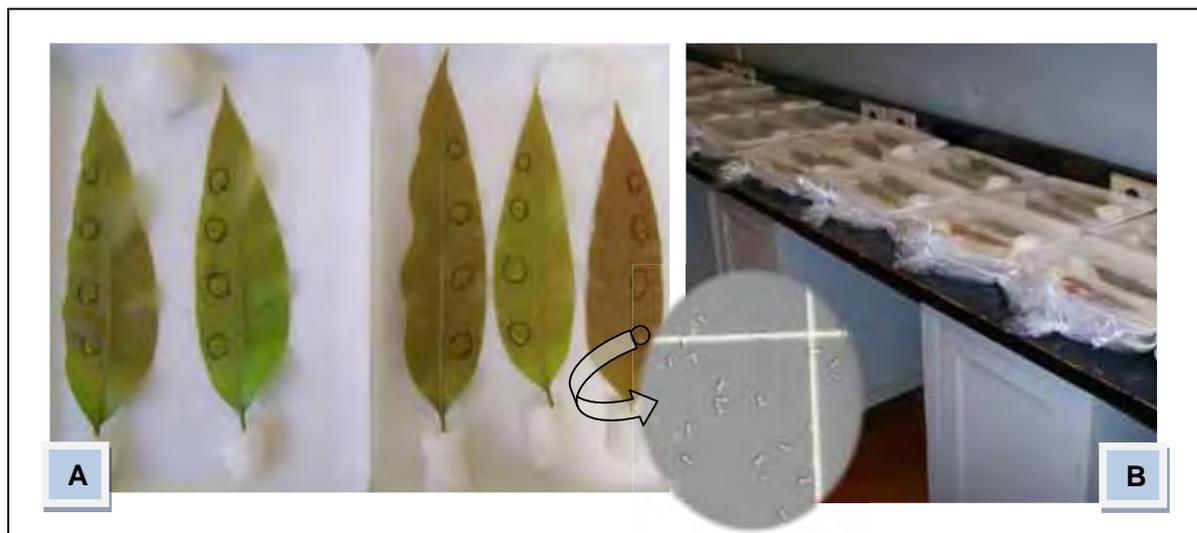


Figura 7. (A) Folhas de mangueira 'Palmer' dispostas em uma bandeja após a sua inoculação com uma suspensão de conídios calibrada para 1×10^5 conídios/mL; (B) As bandejas seladas com plásticos transparente ficaram dispostas em bancadas sob luz constante por cinco dias após a inoculação.

3.5.2. Avaliação e análises

Os resultados foram avaliados quanto à presença e ausência de sintomas típicos da doença após cinco dias da inoculação. Todas as folhas foram digitalizadas, juntamente com uma régua, de forma a possibilitar a obtenção dos valores referentes à área (cm^2) das lesões por meio do *software* Image-ProPlus® 4.1 (Figura 8).

Para a análise estatística foi utilizado o valor da média das áreas das quatro lesões obtidas em cada folha. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas através do teste de Scott & Knott (SCOTT & KNOTT, 1974), ao nível de 5% de probabilidade. Para a realização da análise estatística foi utilizado o programa computacional AgroEstat, versão 1.0 (BARBOSA & MALDONADO, 2010).

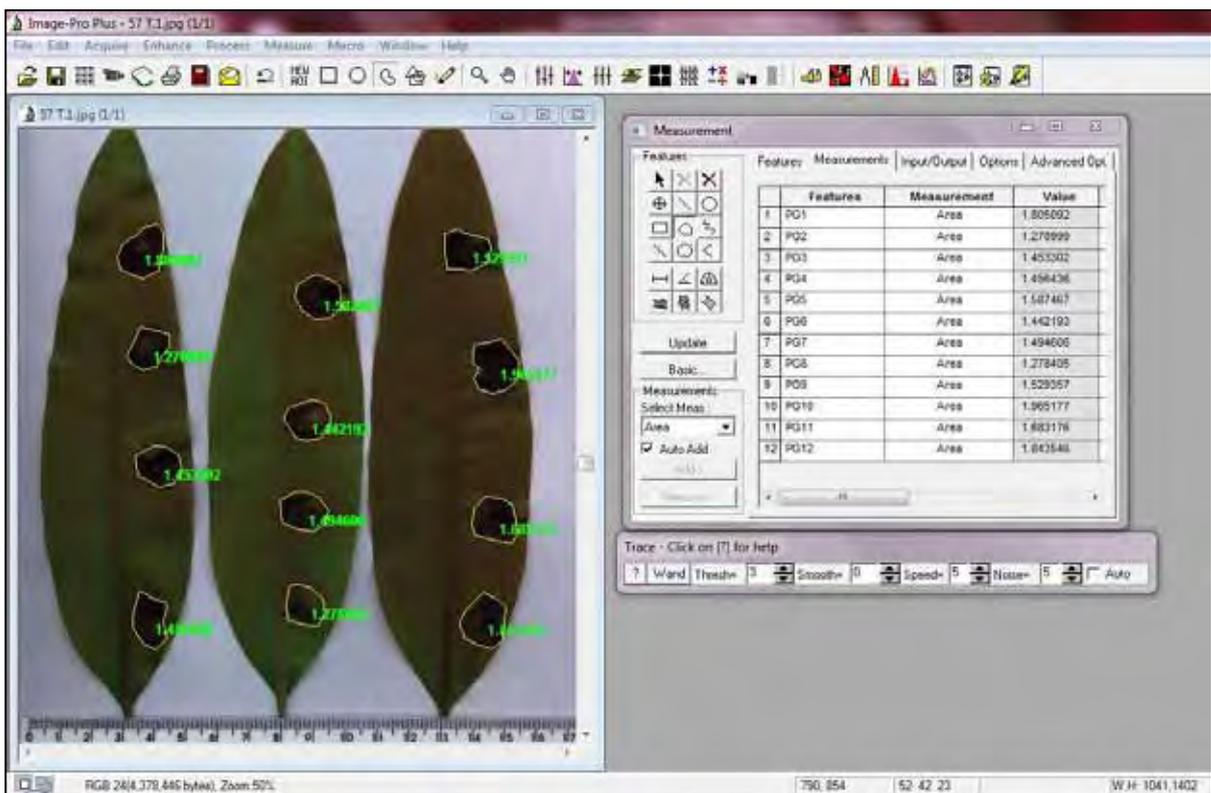


Figura 8. Medição da área das lesões nas folhas por meio do *software* Image ProPlus® 4.1.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção dos isolados de *Colletotrichum* spp.

No presente estudo contou-se com 182 isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de tecidos de mangueiras com sintomas de antracnose, e dois isolados oriundos de flores de citros com sintomas típicos de podridão floral dos citros, da micoteca do Laboratório de Fitopatologia. Também contou-se com dois isolados adicionais de *Colletotrichum* spp. obtidos de tecidos de mangueira 'Haden', do banco de germoplasma da FCAV/UNESP, com sintomas de antracnose, e de três isolados de folhas assintomáticas de plantas cítricas, da variedade Valência (Tabela 2).

Embora neste estudo não tenha sido realizado uma caracterização morfológica dos isolados, notou-se que as colônias dos mesmos apresentaram morfologia variada quando cultivadas em meio de cultura BDA. Algumas colônias apresentaram micélio aéreo de coloração cinza-escuro, outras, micélio de coloração cinza-claro a branco, com presença ou ausência de setores. Além disso, a maioria dos isolados, quando cultivados em diferentes placas de Petri contendo meio de cultura BDA, apresentou variação na morfologia da colônia, mesmo estando sob as mesmas circunstâncias de incubação (Figura 9).

Tabela 2. Procedência dos isolados de *Colletotrichum* spp., nomenclatura, tecido vegetal e respectivo hospedeiro.

Procedência^a	Nomenclatura^b	Tecido vegetal	Hospedeiro
<i>Colletotrichum</i> spp. de mangueira			
Araçatuba	AR.F.TA1	Fruto	Tommy Atkins
	AR.F.TA2	Fruto	Tommy Atkins
	AR.F.TA3	Fruto	Tommy Atkins
	AR.F.TA4	Fruto	Tommy Atkins
	AR.F.TA5	Fruto	Tommy Atkins
	AR.F.TA6	Fruto	Tommy Atkins
	AR.F.TA7	Fruto	Tommy Atkins
	AR.F.TA8	Fruto	Tommy Atkins
	AR.F.TA9	Fruto	Tommy Atkins
	AR.F.TA10	Fruto	Tommy Atkins
Barretos	BR.F.TA11	Fruto	Tommy Atkins
	BR.F.TA12	Fruto	Tommy Atkins
	BR.F.TA13	Fruto	Tommy Atkins
	BR.F.TA14	Fruto	Tommy Atkins
	BR.F.TA15	Fruto	Tommy Atkins
	BR.I.TA16	Inflorescência	Tommy Atkins
	BR.I.TA17	Inflorescência	Tommy Atkins
	BR.I.TA18	Inflorescência	Tommy Atkins
	BR.F.P19	Fruto	Palmer
	BR.F.P20	Fruto	Palmer
	BR.F.P21	Fruto	Palmer
	BR.F.P22	Fruto	Palmer
	BR.F.P23	Fruto	Palmer
	BR.F.H24	Fruto	Haden

Procedência^a	Nomenclatura^b	Tecido vegetal	Hospedeiro
<i>Colletotrichum</i> spp. de mangueira			
Barretos	BR.F.H25	Fruto	Haden
	BR.F.H26	Fruto	Haden
	BR.F.H27	Fruto	Haden
Bonfim Paulista	BP.I.VD28	Inflorescência	Van Dyke
	BP.I.VD29	Inflorescência	Van Dyke
	BP.I.VD30	Inflorescência	Van Dyke
	BP.I.VD31	Inflorescência	Van Dyke
	BP.I.VD32	Inflorescência	Van Dyke
	BP.I.R33	Inflorescência	Rosa
	BP.I.R34	Inflorescência	Rosa
	BP.I.R35	Inflorescência	Rosa
	BP.I.P37	Inflorescência	Palmer
	BP.I.P38	Inflorescência	Palmer
	BP.I.P39	Inflorescência	Palmer
	BP.F.P40	Fruto	Palmer
	BP.F.P41	Fruto	Palmer
Cândido Rodrigues	CR.F.TA43	Fruto	Tommy Atkins
	CR.F.TA44	Fruto	Tommy Atkins
	CR.L.P46	Folha	Palmer
	CR.L.P49	Folha	Palmer
	CR.I.P53	Inflorescência	Palmer
	CR.I.P55	Inflorescência	Palmer
	CR.L.H57	Folha	Haden
	CR.L.H58	Folha	Haden
	CR.L.H59	Folha	Haden
	CR.F.H60	Fruto	Haden
	CR.F.H61	Fruto	Haden

Procedência^a	Nomenclatura^b	Tecido vegetal	Hospedeiro
<i>Colletotrichum</i> spp. de mangueira			
Cândido Rodrigues	CR.F.H62	Fruto	Haden
	CR.I.H63	Inflorescência	Haden
	CR.I.H65	Inflorescência	Haden
General Salgado	GS.F.P66	Fruto	Palmer
	GS.F.P68	Fruto	Palmer
	GS.F.P69	Fruto	Palmer
	GS.F.P71	Fruto	Palmer
	GS.F.P72	Fruto	Palmer
	GS.F.P73	Fruto	Palmer
	GS.I.P74	Inflorescência	Palmer
	GS.I.P75	Inflorescência	Palmer
	GS.I.P76	Inflorescência	Palmer
	GS.I.P78	Inflorescência	Palmer
	GS.I.P79	Inflorescência	Palmer
	GS.I.P80	Inflorescência	Palmer
	GS.I.P81	Inflorescência	Palmer
	GS.I.P82	Inflorescência	Palmer
	GS.I.P83	Inflorescência	Palmer
	GS.L.P84	Folha	Palmer
	GS.L.P85	Folha	Palmer
Jaboticabal	JB.I.E87	Inflorescência	Espada vermelha
	JB.I.E88	Inflorescência	Espada vermelha
	JB.I.E89	Inflorescência	Espada vermelha
	JB.L.H1	Folha	Haden
	JB.L.H2	Folha	Haden
Jales	JL.F.P90	Fruto	Palmer
	JL.F.P91	Fruto	Palmer

Procedência^a	Nomenclatura^b	Tecido vegetal	Hospedeiro
<i>Colletotrichum</i> spp. de mangueira			
Jales	JL.F.P92	Fruto	Palmer
	JL.F.P93	Fruto	Palmer
	JL.F.TA96	Fruto	Tommy Atkins
	JL.F.TA97	Fruto	Tommy Atkins
	JL.F.TA98	Fruto	Tommy Atkins
Jardinópolis	JA.I.P101	Inflorescência	Palmer
	JA.L.P102	Folha	Palmer
	JA.F.B103	Fruto	Bourbom
	JA.F.B104	Fruto	Bourbom
	JA.F.B105	Fruto	Bourbom
	JA.F.B106	Fruto	Bourbom
	JA.L.P107	Folha	Palmer
	JA.L.P108	Folha	Palmer
	JA.F.TA110	Fruto	Tommy Atkins
	JA.I.TA112	Inflorescência	Tommy Atkins
	JA.I.TA113	Inflorescência	Tommy Atkins
	JA.I.TA114	Inflorescência	Tommy Atkins
	JA.F.P116	Fruto	Palmer
	JA.F.P117	Fruto	Palmer
	JA.F.P118	Fruto	Palmer
	JA.L.TA120	Folha	Tommy Atkins
JA.L.TA121	Folha	Tommy Atkins	
Mogi Mirim	MM.I.TA122	Inflorescência	Tommy Atkins
	MM.I.TA123	Inflorescência	Tommy Atkins
	MM.I.TA124	Inflorescência	Tommy Atkins
	MM.I.TA127	Inflorescência	Tommy Atkins
	MM.I.TA128	Inflorescência	Tommy Atkins

Procedência^a	Nomenclatura^b	Tecido vegetal	Hospedeiro
<i>Colletotrichum</i> spp. de mangueira			
Mogi Mirim	MM.I.TA129	Inflorescência	Tommy Atkins
	MM.I.TA130	Inflorescência	Tommy Atkins
	MM.I.TA131	Inflorescência	Tommy Atkins
Monte Alto	MA.L.P132	Folha	Palmer
	MA.L.P133	Folha	Palmer
	MA.L.P134	Folha	Palmer
	MA.L.P135	Folha	Palmer
	MA.I.P136	Inflorescência	Palmer
	MA.I.P137	Inflorescência	Palmer
	MA.I.P138	Inflorescência	Palmer
	MA.F.P139	Fruto	Palmer
	MA.F.P140	Fruto	Palmer
	MA.F.P141	Fruto	Palmer
	MA.F.P142	Fruto	Palmer
	MA.I.TA144	Inflorescência	Tommy Atkins
	MA.I.TA146	Inflorescência	Tommy Atkins
	MA.I.TA147	Inflorescência	Tommy Atkins
	MA.L.TA148	Folha	Tommy Atkins
	MA.L.TA151	Folha	Tommy Atkins
	MA.F.TA152	Fruto	Tommy Atkins
	MA.F.TA153	Fruto	Tommy Atkins
	MA.F.TA154	Fruto	Tommy Atkins
	MA.F.TA155	Fruto	Tommy Atkins
	MA.F.TA156	Fruto	Tommy Atkins
	MA.F.TA157	Fruto	Tommy Atkins
	MA.I.H158	Inflorescência	Haden
MA.I.H160	Inflorescência	Haden	

Procedência^a	Nomenclatura^b	Tecido vegetal	Hospedeiro
<i>Colletotrichum</i> spp. de mangueira			
Monte Alto	MA.L.H162	Folha	Haden
	MA.L.H163	Folha	Haden
	MA.L.H164	Folha	Haden
	MA.L.H165	Folha	Haden
	MA.F.H168	Fruto	Haden
	MA.F.H169	Fruto	Haden
	MA.F.H170	Fruto	Haden
São José do Rio Preto	SR.F.P171	Fruto	Palmer
	SR.F.P172	Fruto	Palmer
	SR.F.P173	Fruto	Palmer
	SR.F.P174	Fruto	Palmer
Taquaritinga	TA.F.P175	Fruto	Palmer
	TA.F.P177	Fruto	Palmer
	TA.F.P179	Fruto	Palmer
	TA.F.P180	Fruto	Palmer
	TA.F.P181	Fruto	Palmer
	TA.F.P183	Fruto	Palmer
	TA.F.P185	Fruto	Palmer
	TA.F.P186	Fruto	Palmer
Vista Alegre do Alto	VA.L.H188	Folha	Haden
	VA.L.H189	Folha	Haden
	VA.F.H190	Fruto	Haden
	VA.F.H191	Fruto	Haden
	VA.F.H192	Fruto	Haden
	VA.I.H193	Inflorescência	Haden
	VA.I.H194	Inflorescência	Haden
	VA.I.H195	Inflorescência	Haden

Procedência^a	Nomenclatura^b	Tecido vegetal	Hospedeiro
<i>Colletotrichum</i> spp. de mangueira			
Vista Alegre do Alto	VA.L.P196	Folha	Palmer
	VA.L.P197	Folha	Palmer
	VA.F.P199	Fruto	Palmer
	VA.F.P200	Fruto	Palmer
	VA.F.P201	Fruto	Palmer
	VA.I.P202	Inflorescência	Palmer
	VA.I.P203	Inflorescência	Palmer
	VA.I.P204	Inflorescência	Palmer
	VA.F.TA205	Fruto	Tommy Atkins
	VA.F.TA206	Fruto	Tommy Atkins
	VA.F.TA207	Fruto	Tommy Atkins
	VA.L.TA208	Folha	Tommy Atkins
	VA.L.TA209	Folha	Tommy Atkins
	VA.I.TA211	Inflorescência	Tommy Atkins
	VA.I.TA212	Inflorescência	Tommy Atkins
	VA.I.TA213	Inflorescência	Tommy Atkins
	Votuporanga	VT.F.P214	Fruto
VT.F.P215		Fruto	Palmer
VT.F.P217		Fruto	Palmer
VT.F.P218		Fruto	Palmer
VT.F.E219		Fruto	Espada vermelha
VT.F.E220		Fruto	Espada vermelha
VT.F.E221		Fruto	Espada vermelha
VT.F.E222		Fruto	Espada vermelha
VT.F.E223		Fruto	Espada Vermelha

Procedência^a	Nomenclatura^b	Tecido vegetal	Hospedeiro
<i>Colletotrichum</i> spp. de citros			
Jaboticabal	JB.L.VC2	Folha	Citros
	JB.L.VC5	Folha	Citros
	JB.L.VC6	Folha	Citros
Itapetininga	IT.CF.VC10	Flor	Citros
	IT.CF.VC13	Flor	Citros

^a Todos os municípios localizam-se no Estado de São Paulo;

^b Por questões práticas, a nomenclatura dos isolados encontra-se representada pelas siglas separadas por um ponto, do município, do tecido e do hospedeiro dos quais cada isolado foi obtido, respectivamente. O número adicional mencionado tem como objetivo facilitar a sua diferenciação.



Figura 9. Colônias típicas de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de tecidos de mangueiras e citros, exibindo diferenças na morfologia das colônias.

4.2. Extração de DNA

O DNA empregado nas análises mostrou-se de boa qualidade, apresentando a relação de absorvância entre os comprimentos de onda de 260 e 280 nm, de 1,75 a 2,0. Quando avaliado em gel de agarose a banda do DNA genômico mostrou-se íntegra, não apresentando sinais de sua degradação ou restos aparentes de RNA (Figura 10). Todas as amostras de DNA utilizadas nesse estudo apresentaram padrões semelhantes de qualidade.

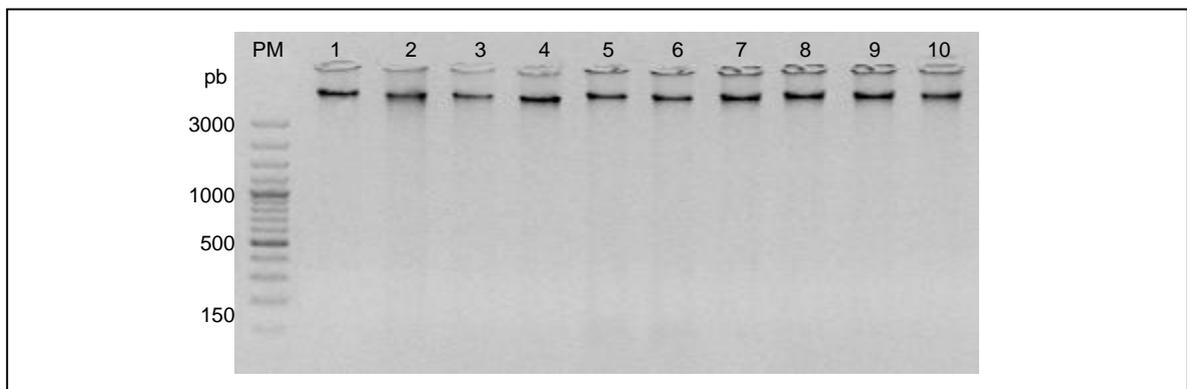


Figura 10. DNA genômico de isolados de *Colletotrichum* spp., apresentando um padrão de boa qualidade. PM: padrão de tamanho molecular 100pb DNA Ladder Plus (Fermentas).

4.3. Sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2

A reação de PCR para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 foi otimizada de forma a eliminar resíduos de reagentes que poderiam interferir na obtenção de uma sequência de DNA confiável e de boa qualidade (Figura 11). Dessa forma, os 189 isolados tiveram sua região ITS1-5.8S-ITS2 sequenciada, constituída por cerca de 313 a 535 pares de bases com qualidade Phred/Phrap maior do que 20 (Figura 12).

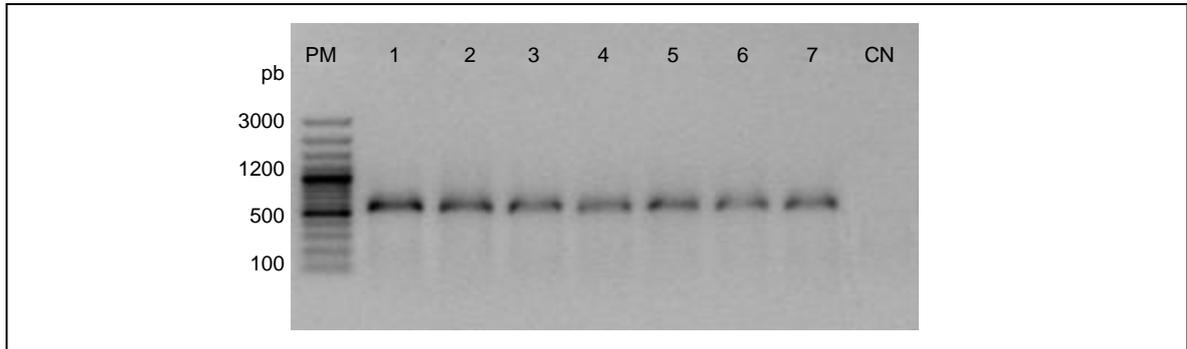


Figura 11. Produto de PCR com os primers ITS1/ITS4 para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2. PM: padrão de tamanho molecular 100pb DNA Ladder Plus (Fermentas). CN: controle negativo (mix de reação sem DNA).

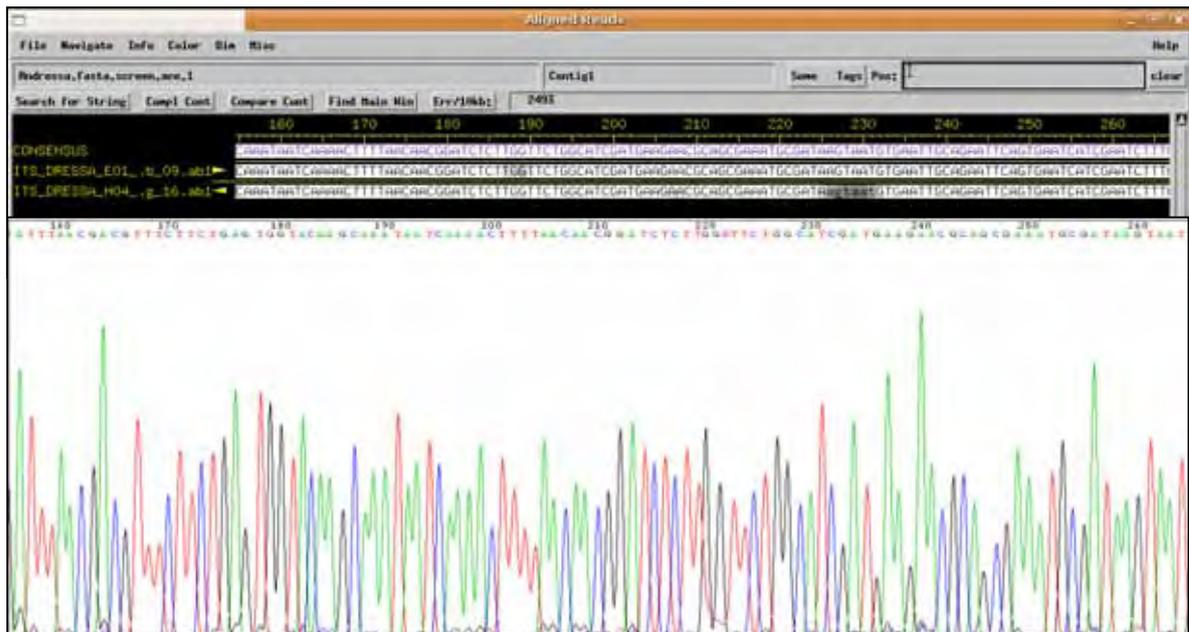


Figura 12. Sequência consenso do isolado BR.F.P23 obtida por meio do software Phred/Phrap/Consed e eletroferograma de sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2, representando as demais seqüências obtidas.

O BLAST das sequências de DNA no GenBank apresentou, em sua maioria, *E-value* zero, indicando que as mesmas alinharam-se corretamente com as sequências do banco de dados. Para confirmar os resultados obtidos nesse estudo, as sequências constituídas por bases de má qualidade ou que apresentaram muitos *gaps* foram excluídas e o sequenciamento foi repetido.

Com exceção dos isolados VA.L.H189, IT.CF.VC10 e IT.CF.VC13 que apresentaram de 99% a 100% de similaridade com a espécie *C. acutatum*, os demais isolados apresentaram de 99 a 100% de similaridade com a espécie *C. gloeosporioides*. No caso do isolado VA.L.H189, proveniente de folha de mangueira, a fim de confirmar o resultado obtido, o mesmo foi recuperado do estoque e todos os procedimentos envolvendo extração de DNA, PCR de sequenciamento e análises subsequentes foram repetidos três vezes, com a obtenção dos mesmos resultados.

Para a construção do dendrograma, todas as sequências dos 189 isolados foram alinhadas juntamente com sequências do banco de dados. Assim, o agrupamento obtido foi dividido em dois grupos, sendo o *G1* (*bootstrap* 96%) constituído pelos isolados da espécie *C. gloeosporioides* e o *G2* constituído pelas demais espécies de *Colletotrichum* do estudo e do banco de dados. O subgrupo *G1.1* (*bootstrap* 62%) foi constituído por todos os isolados pertencentes à espécie *C. gloeosporioides* da análise que não se agruparam no subgrupo *G1.2* (*bootstrap* 65%). Já o subgrupo *G2.1* foi formado pelos isolados pertencentes à espécie *C. acutatum* (*bootstrap* 99%) (Figura 13).

No estudo de estrutura genética de populações, foram selecionados isolados de cada população segundo seus haplótipos, ou seja, indivíduos cujas sequências de DNA possuem as mesmas variações (Tabela 3). Alguns isolados apresentaram sequências com haplótipos únicos, não encontrados em nenhum outro indivíduo da população. A partir dos isolados representativos de cada população foi possível conhecer aqueles que possuíam os mesmos haplótipos entre diferentes populações. Com exceção de apenas uma população, constituída pelos isolados de *C. acutatum* oriundos de plantas cítricas, de Itapetininga/SP, os indivíduos das demais populações compartilharam haplótipos entre si (Tabela 4). Mediante essa análise, foi possível notar que os isolados

que compuseram o subgrupo *G1.2* do agrupamento neighbor-joining compartilham haplótipos (Figura 13).

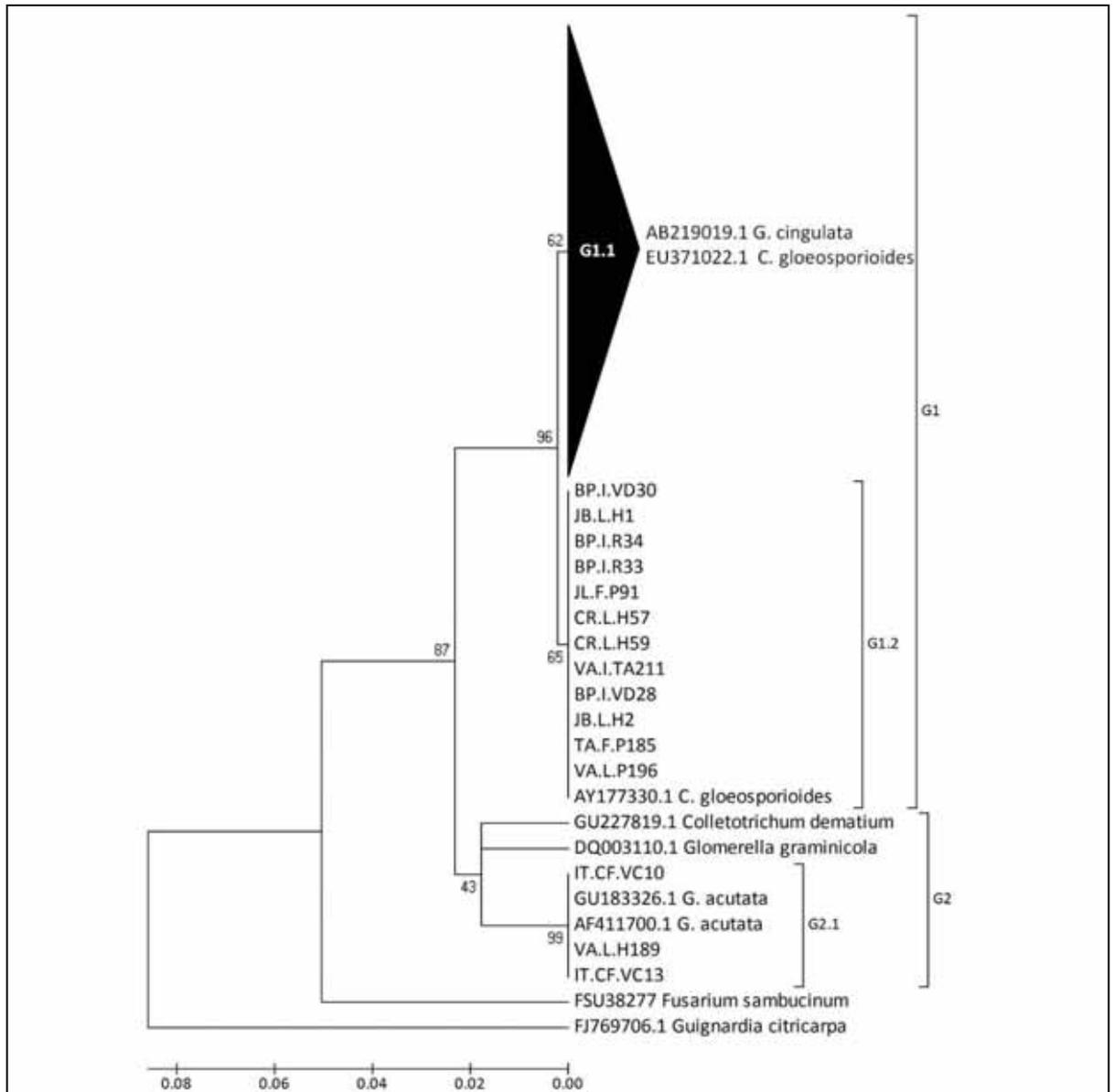


Figura 13. Agrupamento neighbor-joining dos isolados de *Colletotrichum* spp. obtido pela análise da região ITS1-5,8S-ITS2. O subgrupo *G1.1* foi formado pelos demais isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* do estudo que não se agruparam no *G1.2*, enquanto o subgrupo *G2.1* foi constituído por isolados da espécie *Colletotrichum acutatum*.

Tabela 3. Isolados com haplótipos distintos e o respectivo número de indivíduos que cada um representa, dentro de cada população.

Populações	Isolados ^a	Número de isolados ^b	Populações	Isolados ^a	Número de isolados ^b
Araçatuba	AR.F.TA2	9	Jardinópolis	JA.F.B104	1
	AR.F.TA7	1		JA.F.TA110	11
Barretos	BR.F.TA11	1	Mogi-Mirim	MM.I.TA122	8
	BR.F.TA13	1	Monte Alto	MA.F.P141	8
	BR.F.P21	13		MA.I.TA146	1
	BR.F.H25	2		MA.F.TA154	21
BP.I.VD29	1	MA.L.H163		1	
Bonfim	BP.I.VD30	1	São José do Rio Preto	SR.F.P171	4
Paulista	BP.I.R33	3	Taquaritinga	TA.F.P177	6
	BP.I.R35	8		TA.F.P179	1
Cândido Rodrigues	CR.F.TA44	9	TA.F.P185	1	
	CR.L.H59	2	Vista Alegre do Alto	VA.L.H189	1
	CR.I.H65	3		VA.F.H190	11
General	GS.F.P66	10	VA.I.H193	10	
Salgado	GS.I.P80	7	VA.L.P196	2	
	JB.I.E89	3	Votuporanga	VT.F.P215	1
Jaboticabal	JB.L.H1	2		VT.F.E221	8
	Jales	JL.F.P90	3	Jaboticabal	JB.L.VC5
JL.F.P91		1	citros	JB.L.VC6	2
JL.F.TA96		6	Itapetininga	IT.CF.VC13	2
Jardinópolis	JA.L.P102	6			

^a Isolados com haplótipos distintos representantes de cada população;

^b Número de isolados dentro de cada população que possuem o mesmo haplótipo do isolado representante.

Outro dendrograma foi construído apenas com os isolados que possuem diferentes haplótipos, dentre toda a população, a fim de se verificar a relação filogenética entre eles (Figura 14). Conforme o dendrograma, observou-se que tais isolados, embora apresentassem sequências de DNA diferentes, formaram pequenos grupos de acordo com sua similaridade genética. Por exemplo, o isolado JA.F.B104, obtido de fruto de mangueira, cujos haplótipos são equivalentes aos dos isolados JB.L.VC6 e JB.L.VC2, agrupou-se (*bootstrap* 70%) juntamente com o isolado JB.L.VC5, sendo estes últimos obtidos de folhas assintomáticas de citros. Dessa forma, conforme observado nas análises, apenas um isolado da espécie *C. gloeosporioides* obtido de mangueira compartilhou os mesmos haplótipos com os isolados dessa espécie obtidos de citros, mostrando que, embora indivíduos que habitam diferentes hospedeiros geralmente sejam geneticamente diferentes, não foi notada especificidade para esses isolados, pressupondo-se, a princípio, que não há especificidade patógeno/hospedeiro nessa citada interação.

Mediante análise da variância molecular (AMOVA) foi verificado um alto nível de variação genética entre indivíduos de uma mesma população (55%), assim como entre as diferentes populações (45%) (Tabela 5). Os resultados da análise revelaram um alto e significativo valor de F_{ST} (0,4491; $P < 0,0001$), mostrando que há um elevado nível de diferenciação genética entre os indivíduos em relação às sequências de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2. O índice de fixação (F_{ST}) calculado para cada população indicou uma alta variabilidade genética entre indivíduos de uma mesma população (Tabela 6).

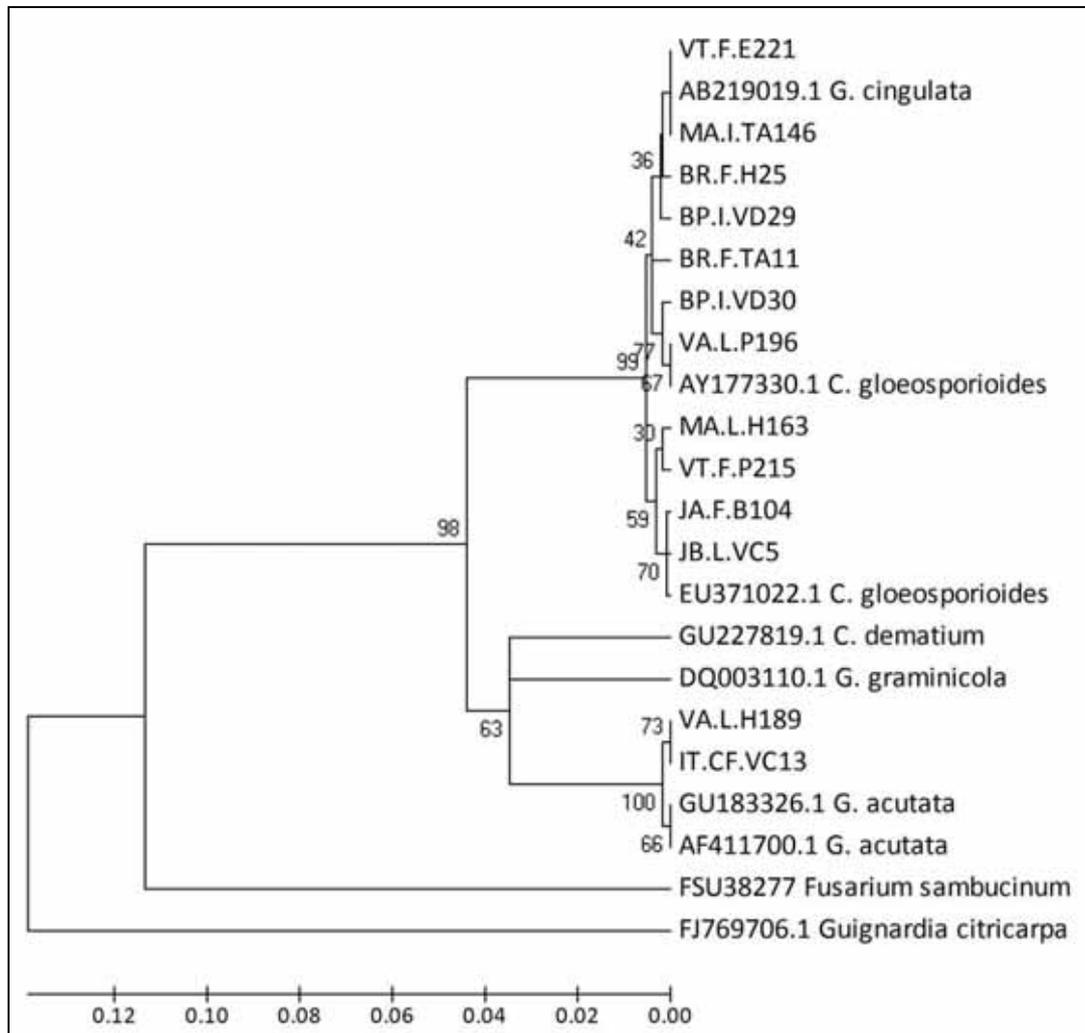


Figura 14. Agrupamento neighbor-joining dos isolados de *Colletotrichum* spp. representantes de toda a população em função de seus haplótipos.

Tabela 5. Análise de variância molecular (AMOVA) em 16 populações de *Colletotrichum* spp. GL = graus de liberdade e SQ = soma do quadrado dos desvios.

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes de variância	Varição (%)	P
Entre populações	15	75,409	0,3938	44,91	<0,0001
Dentro das populações	174	84,054	0,4831	55,09	<0,0001
Total	189	159,463	0,8769		

O índice de fixação (F_{ST}) = 0,4491

Tabela 6. Índice de fixação específico para cada população.

Populações	F_{ST}	Populações	F_{ST}
1. Araçatuba	0,4871	9. Mogi-Mirim	0,4969
2. Barretos	0,4737	10. Monte Alto	0,4679
3. Bonfim Paulista	0,4279	11. São José do Rio Preto	0,4969
4. Cândido Rodrigues	0,4523	12. Taquaritinga	0,4530
5. General Salgado	0,4707	13. Vista Alegre do Alto	0,3354
6. Jaboticabal	0,4192	14. Votuporanga	0,4862
7. Jales	0,4440	15. Jaboticabal citros	0,4729
8. Jardinópolis	0,4656	16. Itapetininga	0,4969

4.4. Desenvolvimento dos marcadores fAFLP

As reações foram realizadas de forma a se obter padrões semelhantes do produto do DNA restringido e do produto da PCR pré-seletiva a fim de garantir que os resultados de polimorfismo dos isolados representassem o real perfil genético das populações (Figura 15). Os primers da reação PCR seletiva selecionados proporcionaram a obtenção de 920 picos polimórficos, denotando um alto polimorfismo entre os isolados (Figura 16).

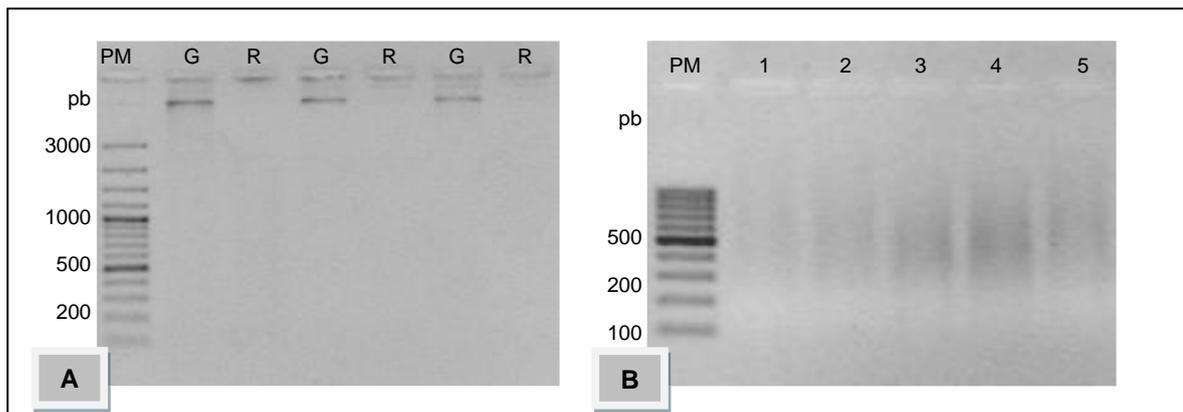


Figura 15. (A) DNA genômico previamente à restrição pelas enzimas *MseI* e *EcoRI* e DNA genômico completamente restringido pelas enzimas. PM: padrão de tamanho molecular 100pb DNA Ladder Plus (Fermentas); G: DNA genômico; R: DNA restringido pelas enzimas; (B) Produto de PCR da reação pré-seletiva com *smear* visível de 100 a 1000 pb. PM: padrão de tamanho molecular 100pb DNA Ladder (Fermentas).

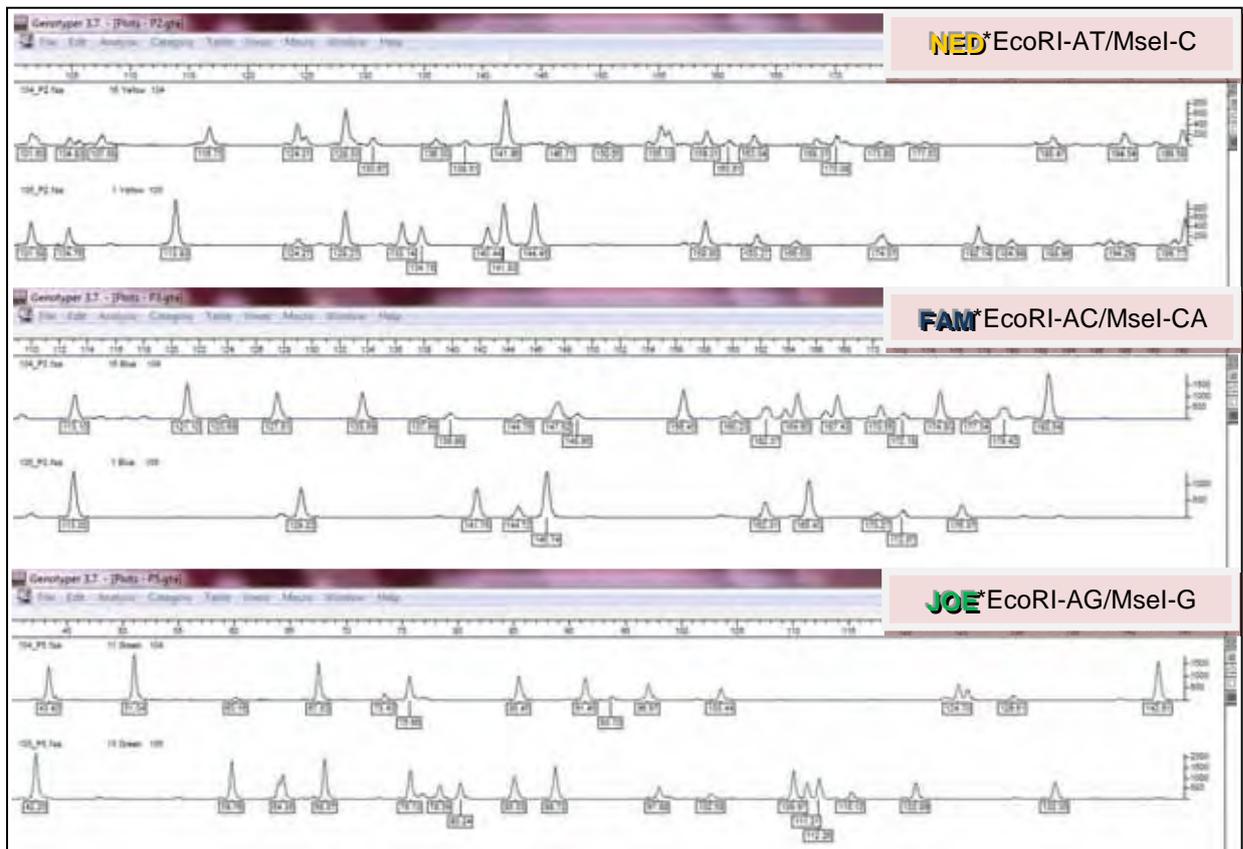


Figura 16. Leitura dos picos polimórficos dos isolados JA.F.B104 e JA.F.B105, utilizando-se os primers NED*EcoRI-AT/MseI-C, FAM*EcoRI-AC/MseI-CA e JOE*EcoRI-AG/MseI-G por meio do software Genotyper 3.7.

O filograma constituído pelos 189 isolados, construído a partir da matriz de distância, foi subdividido em dois grupos, sendo o *G1* constituído por isolados da espécie *C. gloeosporioides*, subdividido em quatro subgrupos principais, e o *G2* formado por indivíduos da espécie *C. acutatum*, sendo a distância genética entre esses dois grupos de 0,117(Figura 17).

O subgrupo *G1.1* foi subdividido em outros dois subgrupos, *G1.1.1* e *G1.1.2*, formados por isolados da espécie *C. gloeosporioides* de mangueiras (Figura 18). A média da distância genética entre os indivíduos do subgrupo *G1.1.1* (0,098) foi maior do

que aquela encontrada entre os isolados do subgrupo *G1.1.2* (0,021), enquanto que a distância genética entre esses dois subgrupos foi de 0,075 (Tabela 7).

O subgrupo *G1.2*, também foi subdividido em outros dois subgrupos formados por isolados de *C. gloeosporioides* de mangueiras (Figura 19). A média da distância genética entre isolados de um mesmo subgrupo foi de 0,056 para o subgrupo *G1.2.1* e de 0,069 para o subgrupo *G1.2.2*, ao passo que a distância genética entre esses dois subgrupos foi de 0,160 (Tabela 7), distância maior do que aquela apresentada entre os grupos *G1* e *G2*, constituídos por diferentes espécies de *Colletotrichum*.

Já o subgrupo *G1.3* foi formado pelos três isolados de *C. gloeosporioides* oriundos de folhas assintomáticas de citros e por um isolado de fruto de mangueira, JA.F.B104, cuja média da distância genética entre os isolados foi de 0,081 (Figura 20). Esses resultados corroboraram aqueles encontrados na análise da região ITS1-5.8S-ITS2. Porém, ao analisar todo o genoma mediante o emprego de marcadores fAFLP foi possível observar que há uma distância genética entre o isolado JA.F.B104 e aqueles obtidos de citros.

Por sua vez, o subgrupo *G1.4* foi formado por 85 isolados de *C. gloeosporioides* de mangueiras, cuja média da distância genética entre os mesmos foi de 0,026 (Figura 21). Nesse subgrupo encontram-se aqueles isolados que agruparam-se separadamente dos demais no subgrupo *G1.2* do dendrograma formado pela análise da região ITS1-5.8S-ITS2 (Figura 13).

Os indivíduos da espécie *C. acutatum*, sendo dois isolados oriundos de tecidos florais de citros com sintomas de podridão e um isolado proveniente de folhas de mangueiras com sintomas de antracnose, agruparam-se separadamente dos isolados da espécie *C. gloeosporioides*, formando o grupo *G2*, cuja média da distância genética entre os isolados foi de 0,204 (Figura 22). Notou-se que há uma considerável distância genética entre o isolado VA.L.H189 dos demais isolados obtidos de citros.

Desta forma, foi possível observar nos filogramas que os isolados não se agruparam segundo a sua origem, tais como, hospedeiro, variedade de mangueiras, órgãos das plantas e município dos quais os mesmos foram obtidos. Além disso, a distância genética entre grupos e subgrupos variou de 0,075 a 0,295, sendo que a

maior distância genética foi observada entre isolados da espécie *C. gloeosporioides* (Tabela 7). Dos 189 isolados analisados apenas dois apresentaram o mesmo padrão polimórfico, JA.F.TA110 e TA.F.P179, obtidos de diferentes municípios.

Os resultados da análise de variância molecular mostraram uma variação genética entre indivíduos de mesmo município, de 88%, ao passo que entre municípios a variação genética foi de 12% (Tabela 8). Ao analisar o genoma dos isolados por meio dos marcadores fAFLP, constatou-se uma significativa diferenciação genética entre populações ($F_{ST} = 0,1172$; $P > 0,0001$) e a ocorrência de fluxo gênico ($Nm = 1,8829$). Dessa forma, pressupõe-se que a alta diversidade genética entre indivíduos de uma mesma população e a baixa diferenciação genética entre populações, pode estar relacionada à migração de indivíduos de uma população para outra.

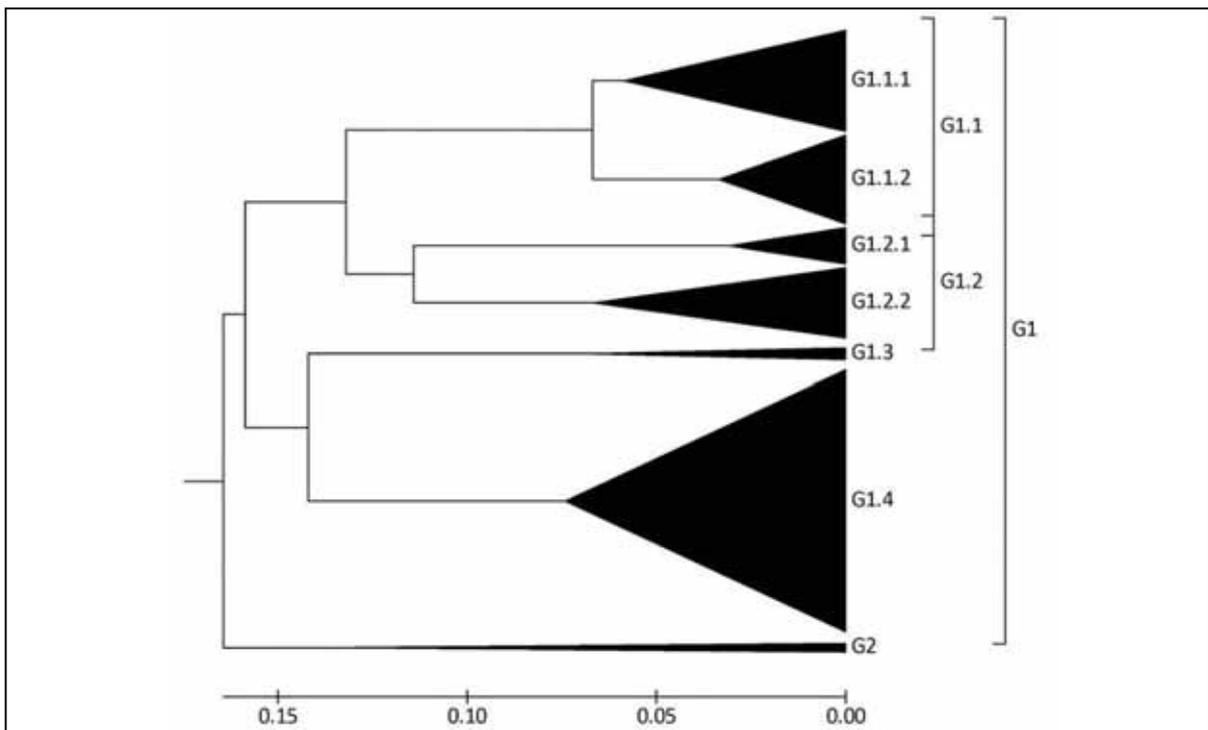


Figura 17. Filograma formado pelos 189 isolados do estudo, subdividido em dois grupos, sendo o *G1* formado por isolados da espécie *Colletotrichum gloeosporioides* e o *G2* constituído por isolados da espécie *Colletotrichum acutatum*.

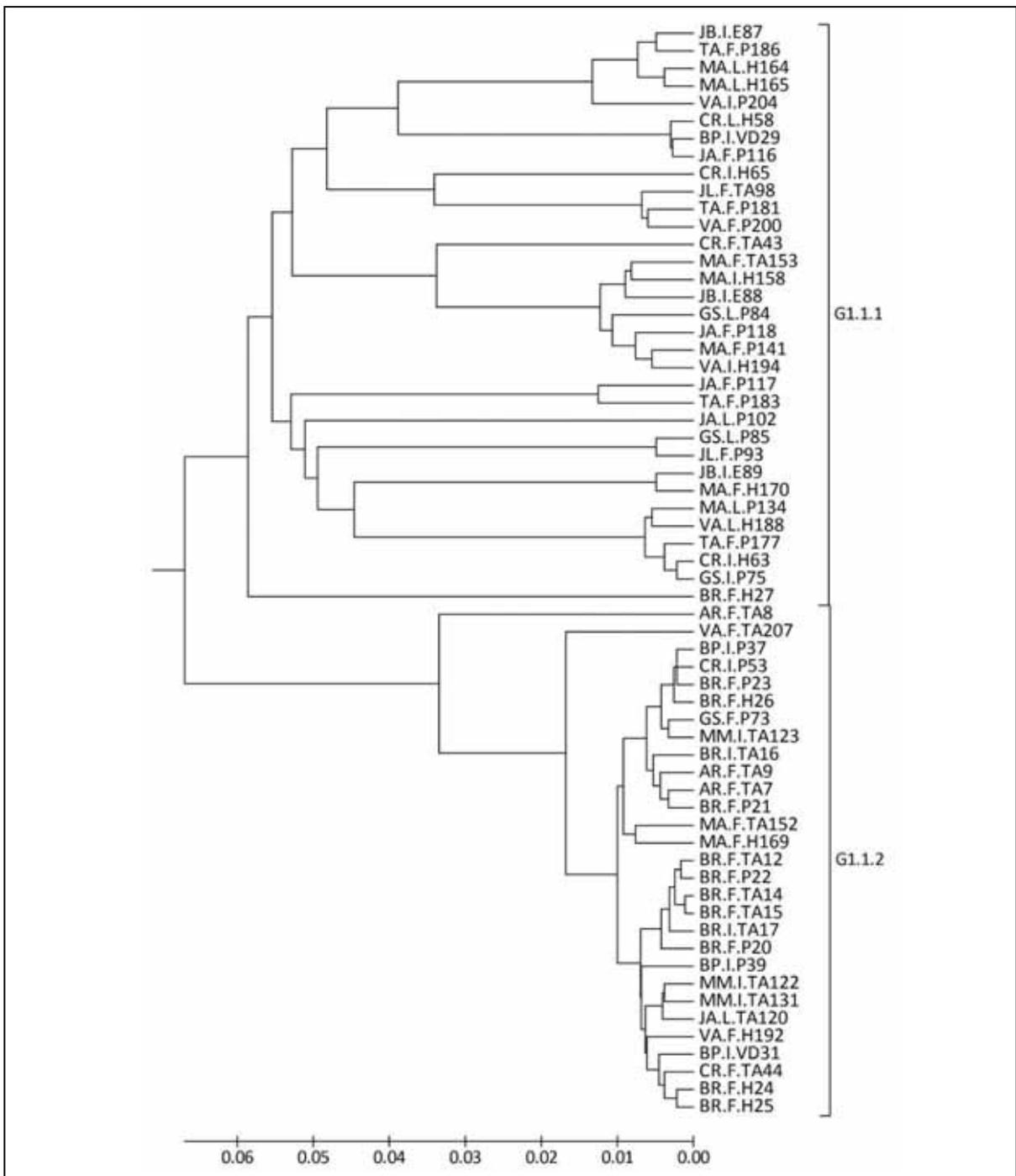


Figura 18. Filograma formado por isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* do subgrupo *G1.1* que subdividiu-se em outros dois subgrupos, *G1.1.1* e *G1.1.2*, cuja distância genética entre eles é de 0,075.

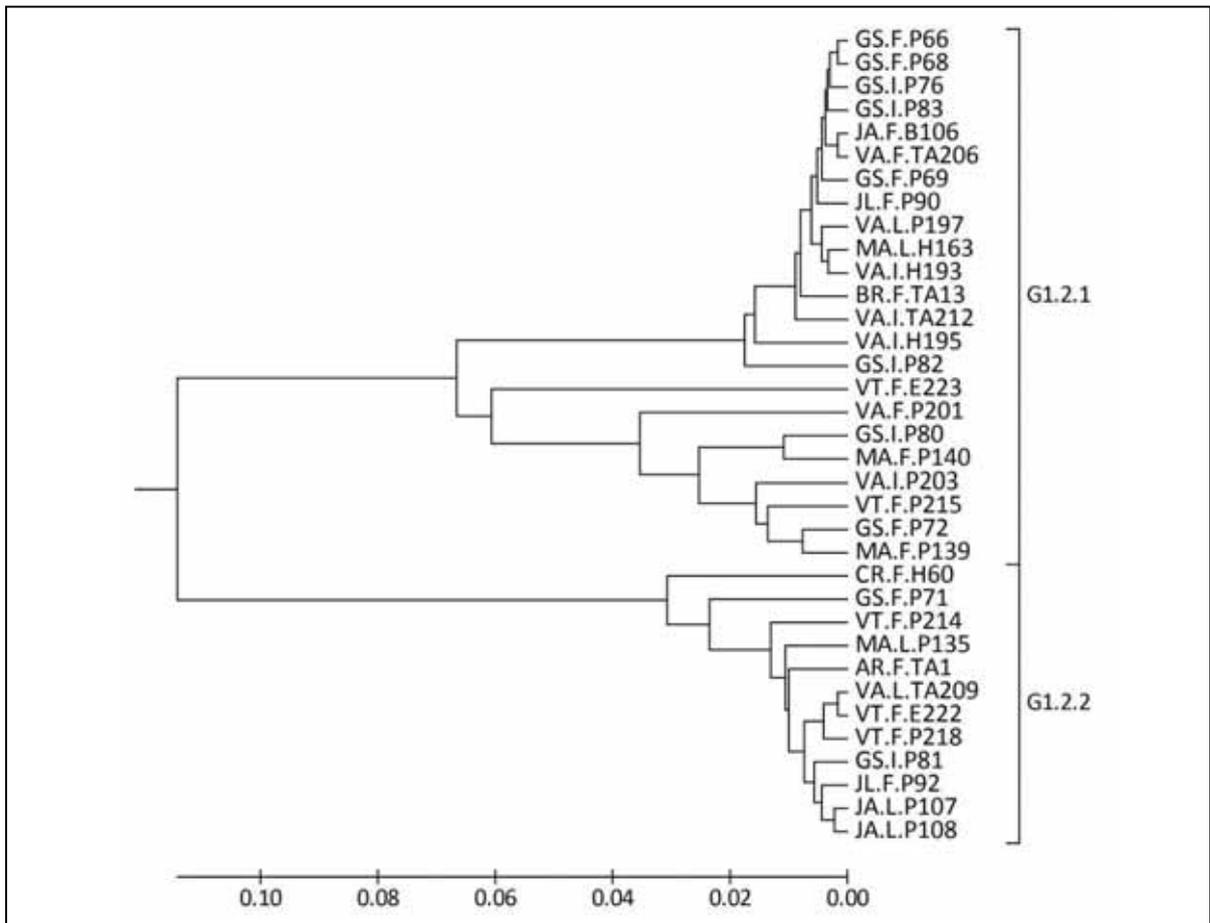


Figura 19. Filograma formado por isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* do subgrupo G1.2 que subdividiu-se em outros dois subgrupos, G1.2.1 e G1.2.2, cuja distância genética entre subgrupos é de 0,160.

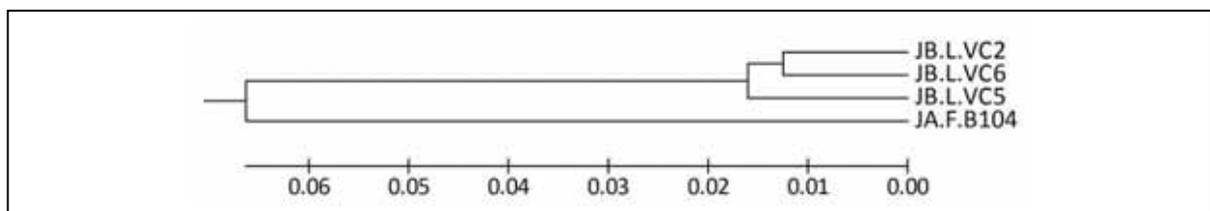


Figura 20. Filograma formado por isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* do subgrupo G1.3, oriundos de citros e por um isolado de manga cuja média da distância genética entre eles é de 0,081.

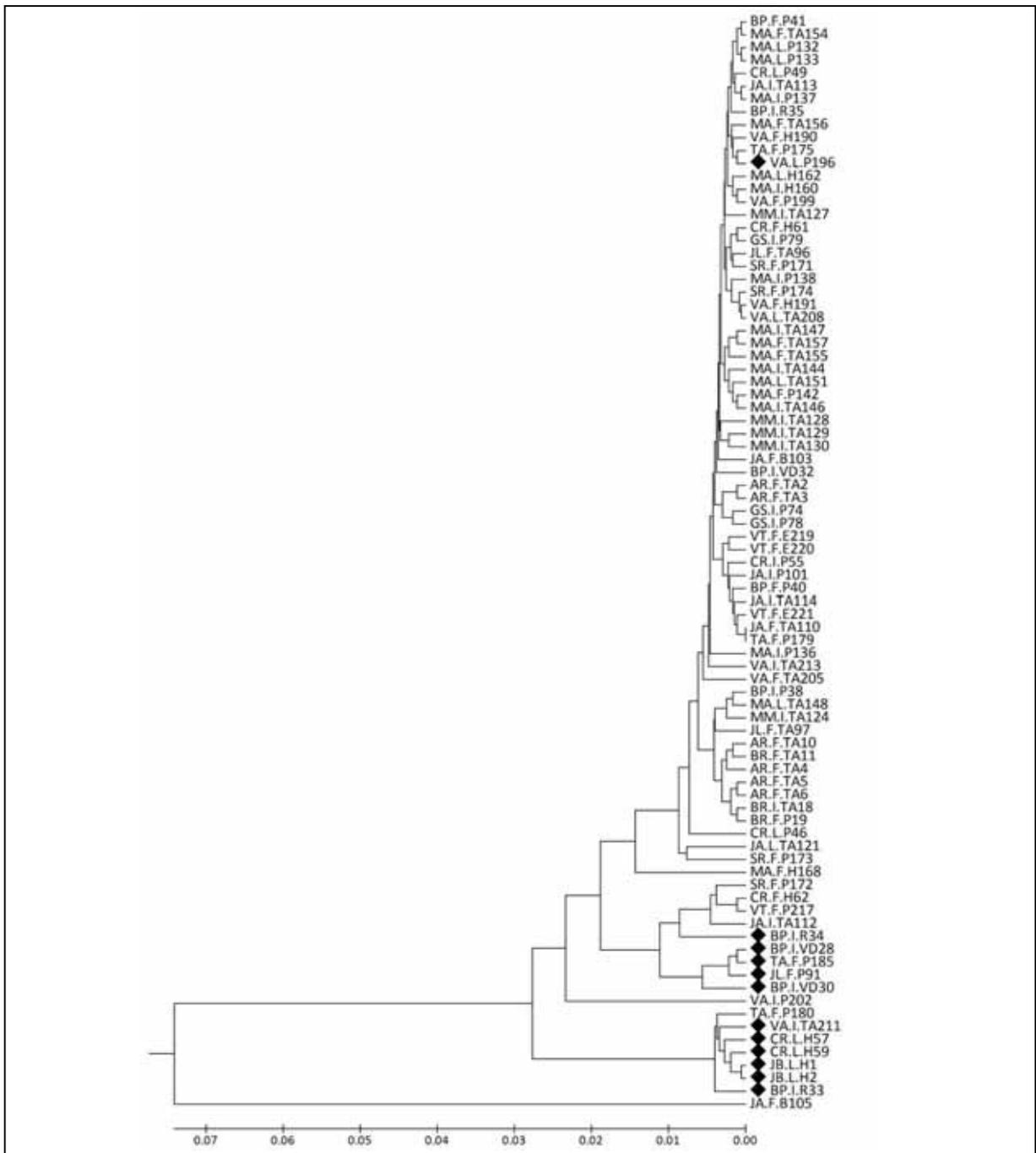


Figura 21. Filograma formado por isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* do subgrupo G1.4. Os isolados marcados com um símbolo (◆) pertencem ao subgrupo G2.1 do dendrograma constituído por toda a população de isolados das análises da região ITS1-5,8S-ITS2.

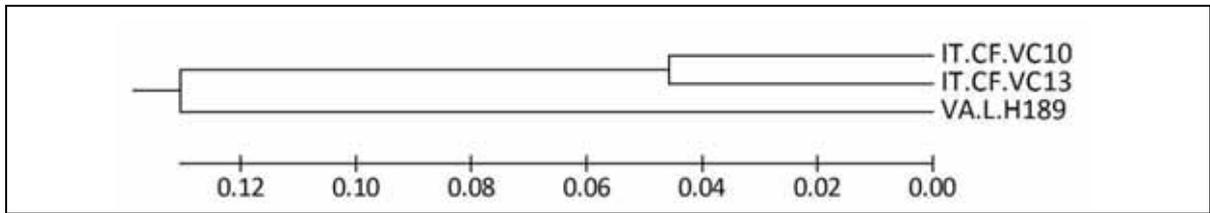


Figura 22. Filograma formado por isolados de *Colletotrichum acutatum* do grupo 2, oriundos de citros e por um isolado de mangueira cuja média da distância genética entre eles é de 0,204.

Tabela 7. Média da distância genética intra-grupos e intra-subgrupos, e distância genética (d_A) entre grupos e subgrupos.

Grupos	Intra grupos	Subgrupos	Intra subgrupos	Subgrupos						Grupo	
				1.1.1	1.1.2	1.2.1	1.2.2	1.3	1.4		2
1	0,219	1.1.1	0,098	-							
		1.1.2	0,021	0,075	-						
		1.2.1	0,056	0,172	0,213	-					
		1.2.2	0,069	0,190	0,247	0,160	-				
		1.3	0,081	0,224	0,273	0,255	0,242	-			
		1.4	0,026	0,250	0,295	0,280	0,276	0,231	-		
2	0,204	-	-	0,175	0,219	0,219	0,194	0,150	0,211	-	

Tabela 8. Análise de variância molecular (AMOVA) em 16 populações de *Colletotrichum* spp. GL = graus de liberdade e SQ = soma do quadrado dos desvios.

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes de variância	Varição (%)	P
Entre populações	15	3458,709	12,1297	11,72	<0,0001
Dentro das populações	173	15804,571	91,3556	88,28	<0,0001
Total	188	19263,280	103,4856		
Índice de fixação (F_{ST}) = 0,1172					

4.5. Testes de patogenicidade

Dentre os 189 isolados de *Colletotrichum* avaliados, 75 deles foram selecionados segundo os resultados obtidos com os marcadores fAFLP para serem submetidos ao teste de patogenicidade. Todos os isolados avaliados mostraram-se patogênicos, induzindo à expressão de sintomas típicos de antracnose em folhas de mangueiras ‘Palmer’ e/ou ‘Tommy Atkins’. Junto à face do limbo correspondente à testemunha os tecidos mostraram-se intactos, e sem sintomas aparentes.

Embora todas as folhas selecionadas para o teste de patogenicidade estivessem no mesmo estágio fenológico e apresentassem as mesmas condições de integridade, nem todas as cinco repetições utilizadas para cada isolado manteve o mesmo padrão de sintomas. Alguns isolados foram capazes de causar infecções extensivas, com 100% de expressão de sintomas em todas as repetições, enquanto outros causaram sintomas em apenas 5% dos pontos inoculados.

Na sua maioria, os isolados induziram à expressão de sintomas nas folhas constituídos por extensas lesões de coloração preta, arredondadas e visíveis em ambas as faces da folha (Figura 23). Porém, alguns isolados induziram a produção de lesões necróticas, irregulares, circundadas por manchas pretas, indicando a região de

desenvolvimento do fungo, visíveis em ambas as faces da folha. Nas áreas necrosadas foi observada a presença frequente de acérvulos e conídios (Figura 23).

Os isolados de *C. acutatum*, oriundos tanto de citros como de mangueiras, mostraram-se patogênicos em ambas as variedades de manga testadas. Comparativamente não houve uma diferença expressiva quanto à severidade dos sintomas ocasionados pelo isolado IT.CF.VC13 de citros e pelo isolado VA.L.H189, obtido de mangueira, indicando que esses isolados, embora tão díspares entre si quanto à sua origem, não exibiram especificidade fisiológica. Já o isolado IT.CF.VC10, ocasionou sintomas em cerca de 5% da área foliar de apenas uma das repetições, em ambas as variedades de manga, exibindo baixo nível de severidade (Figura 24). Visto que não houve ferimento prévio à inoculação, os isolados da espécie *C. acutatum* não foram oportunistas e sim, apresentaram mecanismos de invasão do tecido foliar de mangueiras.

Por sua vez, os isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de folhas assintomáticas de citros também foram capazes de ocasionar sintomas típicos de antracnose em folhas de ambas as variedades de mangueiras testadas, reforçando a suposição de que tais isolados não apresentaram especificidade fisiológica. Entretanto, a extensão de tal comportamento para a espécie depende de estudos complementares, mais representativos e de uma abordagem mais completa. O isolado JA.F.B104 de mangueira, que é geneticamente semelhante aos isolados de citros, induziu sintomas de antracnose nas duas variedades de mangueiras, com nível moderado de severidade, em comparação com os sintomas ocasionados pelos isolados de *C. gloeosporioides* de citros (Figura 25).

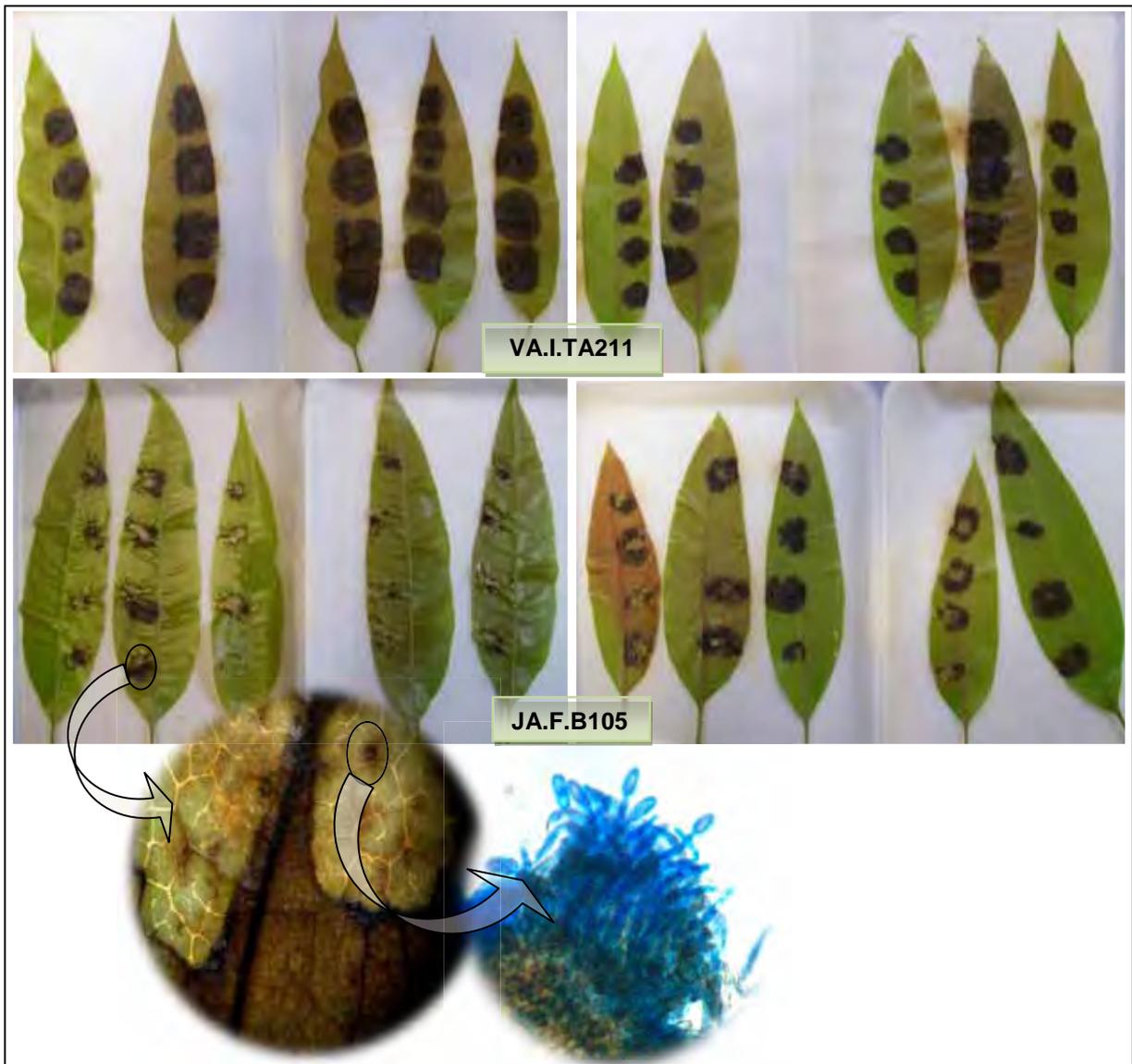


Figura 23. As lesões ocasionadas pelo isolado VA.I.TA211 foram caracterizadas por extensas manchas pretas arredondadas. Por outro lado, os sintomas ocasionados pelo isolado JA.F.B105 caracterizaram-se por lesões necróticas, circundadas por manchas pretas, indicando a região de desenvolvimento do fungo. Vista parcial da presença de acérvulos e conídios sobre os tecidos necróticos, resultantes da inoculação, obtida por microscopia. Folhas de mangueira ‘Palmer’ à esquerda e folhas de mangueira ‘Tommy Atkins’ à direita.

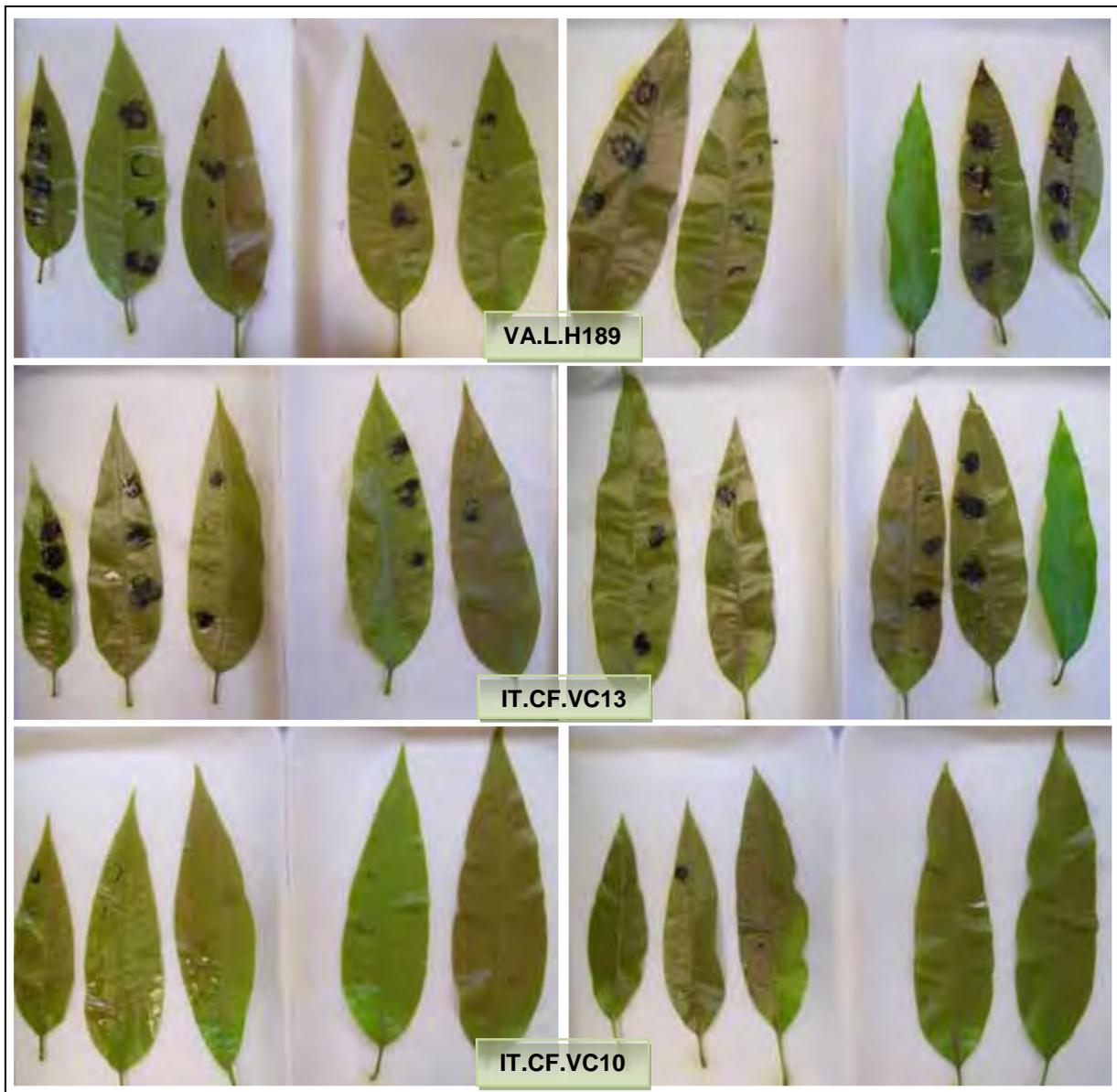


Figura 24. Padrão de sintomas ocasionados por isolados de *Colletotrichum acutatum* de citros e pelo isolado VA.L.H189 de mangueira. Nota-se a presença de um padrão semelhante de sintomas entre os isolados IT.CF.VC13 e o VA.L.H189, ao passo que o isolado IT.CF.VC10 foi levemente severo às folhas de mangueiras. Folhas de mangueira ‘Palmer’ à esquerda e folhas de mangueira ‘Tommy Atkins’ à direita.



Figura 25. Padrão de sintomas ocasionados por isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de citros e pelo isolado JA.F.B104 de mangueira, geneticamente semelhante aos isolados de citros. Nota-se diferentes graus de severidade de sintomas em ambas as variedades de mangueiras. Folhas de mangueira 'Palmer' à esquerda e folhas de mangueira 'Tommy Atkins' à direita.

De acordo com os dados da análise estatística dos valores das áreas médias das lesões, em cm^2 , constatou-se uma diferença significativa (99% de probabilidade) nos níveis de severidade de sintomas ocasionados pelos indivíduos testados. As duas variedades de mangueiras testadas, 'Palmer' e 'Tommy Atkins', não apresentaram diferenças significativas quanto à expressão de sintomas.

Embora os valores das áreas médias das lesões, ocasionadas pelos isolados, nas duas variedades sejam semelhantes ('Palmer': $1,6950 \text{ cm}^2$; 'Tommy Atkins': $1,7702 \text{ cm}^2$), observou-se que a variedade Tommy Atkins, considerada moderadamente resistente à antracnose (RIBEIRO, 2005; PLOETZ, 2010), foi tão suscetível ao patógeno quanto a variedade 'Palmer', apresentando maior área de lesões, na maioria dos casos. Esse comportamento semelhante possivelmente deveu-se às condições nas quais o estudo foi conduzido, onde as diferenças nos níveis de inóculo eram inexistentes. A variedade 'Palmer', por ser de ciclo produtivo tardio em relação à variedade Tommy Atkins, normalmente se encontra em condições predisponentes mais favoráveis ao desenvolvimento da doença, já que o ambiente natural de verão, com temperatura e umidade mais elevadas, favorecem o desenvolvimento e incremento dos níveis de inóculo do patógeno, fato esse que foi mascarado no presente estudo.

As análises estatísticas possibilitaram a separação dos indivíduos em quatro grupos, *a*, *b*, *c* e *d*, do mais virulento ao menos virulento. Os resultados das análises que englobam as duas variedades de mangueiras indicaram que a maioria dos isolados pertencentes ao subgrupo *G1.4* do filograma obtido com marcadores fAFLP, constituem em sua maioria o grupo *a* e *b* do teste de patogenicidade, ou seja, em geral, são muito virulentos, ainda que haja exceções para alguns isolados. Já os isolados que constituem os subgrupos *G1.1*, *G1.2*, *G1.3* e *G2* do filograma encontram-se distribuídos nos grupos *c* e *d*, variando de virulentos a levemente virulentos (Tabela 9). O mesmo foi observado quando as análises estatísticas das áreas das lesões nas folhas de mangueiras 'Palmer' e 'Tommy Atkins' foram realizadas separadamente (Tabela 10). Notou-se um número maior de isolados no grupo *a*, referente aos isolados mais virulentos para a variedade Tommy Atkins, em relação ao grupo *a*, das análises referentes à variedade Palmer.

De modo geral, devido às grandes variações do teste de patogenicidade, os grupos formados pela análise estatística das áreas médias das lesões não estão diretamente relacionados ao agrupamento construído com os marcadores fAFLP. Porém, com base nos resultados, supõe-se que o subgrupo *G1.4* do filograma seja considerado o mais virulento.

Tabela 9. Dados correspondentes à análise estatística dos valores das áreas médias das lesões (cm²) nas variedades ‘Palmer’ e ‘Tommy Atkins’, segundo os isolados testados, e o agrupamento da análise filogenética obtido pelo emprego de marcadores fAFLP.

Grupo fAFLP	Isolado	Área média das lesões (cm ²)	Grupo fAFLP	Isolado	Área média das lesões (cm ²)
G1.4	VA.I.TA211	4,4345800 a	G1.4	JA.I.TA112	2,6989300 b
G1.1.1	JB.I.E87	4,2002100 a	G1.4	SR.F.P171	2,6962500 b
G1.4	CR.L.P49	4,1061300 a	G1.4	CR.L.H57	2,6575600 b
G1.4	CR.F.H61	3,7048500 a	G1.4	JA.F.B103	2,5887500 b
G1.4	VA.L.TA208	3,7005400 a	G1.1.1	JA.L.P102	2,3447800 b
G1.4	GS.I.P74	3,6650800 a	G1.2.2	VA.L.TA209	2,3428100 b
G1.4	MM.I.TA130	3,6525300 a	G1.4	JB.L.H1	2,3105300 b
G1.4	VA.L.P196	3,6124500 a	G1.1.1	JL.F.P93	2,0768000 c
G1.2.1	VA.I.TA212	3,5529800 a	G1.1.2	AR.F.TA7	2,0705600 c
G1.4	BP.I.R35	3,4973800 a	G1.2.1	MA.L.H163	1,9831700 c
G1.4	AR.F.TA2	3,4686000 a	G1.1.2	BR.F.H25	1,7914200 c
G1.4	JA.F.TA110	3,4382700 a	G1.4	BP.F.P40	1,7671800 c
G1.4	SR.F.P172	3,4193700 a	G1.4	TA.F.P185	1,7219700 c
G1.4	VA.I.P202	3,1922400 b	G1.1.1	VA.L.H188	1,6901800 c
G1.1.2	BR.F.P20	3,1184000 b	G1.4	MA.L.TA148	1,6454500 c
G1.4	CR.L.P46	3,0781700 b	G1.4	VA.F.TA205	1,6081200 c
G1.2.2	JL.F.P92	2,8759200 b	G1.1.2	MA.F.H169	1,4628600 c
G1.4	JA.F.B105	2,7110500 b	G1.2.2	MA.L.P135	1,4622200 c

Grupo fAFLP	Isolado	Área média das lesões (cm²)	
G1.4	JL.F.P91	1,4501300	c
G2	VA.L.H189	1,4319600	c
G1.1.1	CR.I.H65	1,4018100	c
G1.1.2	VA.F.H192	1,3979300	c
G1.2.1	GS.I.P80	1,2731900	c
G1.3	JB.L.VC5	1,1953000	c
G1.4	MM.I.TA128	1,1748100	c
G1.1.2	BP.I.P37	1,1684500	c
G1.1.2	BR.I.TA16	1,1599400	c
G1.3	JB.L.VC6	1,1400100	c
G1.4	MA.L.TA151	1,1136100	c
G1.1.2	CR.I.P53	1,1041000	c
G1.2.1	BR.F.TA13	1,0798200	c
G2	IT.CF.VC13	1,0395100	c
G1.1.2	MM.I.TA122	1,0147600	c
G1.4	VA.I.TA213	0,9459800	d
G1.2.1	GS.I.P76	0,8879500	d
G1.3	JB.L.VC2	0,8779600	d
G1.2.1	VA.I.H195	0,8720200	d
G1.1.2	CR.F.TA44	0,8252300	d

Grupo fAFLP	Isolado	Área média das lesões (cm²)	
G1.4	JA.L.TA121	0,7276100	d
G1.1.2	GS.F.P73	0,6668600	d
G1.1.1	GS.L.P84	0,6480800	d
G1.1.1	BR.F.H27	0,6354800	d
G1.3	JA.F.B104	0,6119100	d
G1.1.1	VA.F.P200	0,6114000	d
G1.2.2	JA.L.P107	0,5916500	d
G1.2.2	JA.L.P108	0,4773500	d
G1.1.1	JA.F.P118	0,4246000	d
G1.1.1	BP.I.VD29	0,3631700	d
G1.4	MA.I.H160	0,3493800	d
G1.1.2	MA.F.TA152	0,3095900	d
G1.1.2	BR.F.P23	0,2540100	d
G1.2.2	VT.F.P218	0,1671500	d
G1.2.2	MA.F.P140	0,0911100	d
G2	IT.CF.VC10	0,0625500	d
G1.2.2	VT.F.E222	0,0408700	d
G1.2.2	GS.F.P71	0,0070600	d
G1.1.1	JL.F.TA98	0,0067800	d

Tabela 10. Dados correspondentes à análise estatística dos valores das áreas médias das lesões (cm²), nas variedades ‘Palmer’ e ‘Tommy Atkins’, separadamente, segundo os isolados testados, e grupo da análise filogenética mediante o emprego de marcadores fAFLP.

Variedade ‘Palmer’			Variedade ‘Tommy Atkins’		
Grupo fAFLP	Isolado	Área média das lesões (cm ²)	Grupo fAFLP	Isolado	Área média da lesões (cm ²)
G1.4	VA.I.TA211	5,7368800 a	G1.4	SR.F.P172	5,2878200 a
G1.4	VA.L.TA208	5,1119200 a	G1.4	MM.I.TA130	4,3681200 a
G1.2.1	VA.I.TA212	4,5079400 a	G1.4	CR.L.P49	4,3211800 a
G1.4	AR.F.TA2	4,3051800 a	G1.4	CR.F.H61	4,2177400 a
G1.1.1	JB.I.E87	4,2226400 a	G1.1.1	JB.I.E87	4,1777800 a
G1.4	VA.I.P202	3,9597000 b	G1.4	JA.F.TA110	4,0802600 a
G1.4	CR.L.P49	3,8910800 b	G1.4	GS.I.P74	4,0028600 a
G1.4	CR.L.H57	3,5789000 b	G1.4	VA.L.P196	3,8653800 a
G1.4	BP.I.R35	3,5076000 b	G1.4	BP.I.R35	3,4871600 a
G1.4	SR.F.P171	3,4870800 b	G1.1.2	BR.F.P20	3,4695400 a
G1.4	CR.L.P46	3,4656600 b	G1.2.2	VA.L.TA209	3,2485600 b
G1.4	VA.L.P196	3,3595200 b	G1.4	JA.F.B105	3,2313400 b
G1.1.1	JA.L.P102	3,3566000 b	G1.1.2	BR.F.H25	3,2248400 b
G1.4	GS.I.P74	3,3273000 b	G1.4	VA.I.TA211	3,1322800 b
G1.2.1	MA.L.H163	3,2224600 b	G1.4	MA.L.TA148	3,1029800 b
G1.4	CR.F.H61	3,1919600 b	G1.4	JA.I.TA112	3,0438800 b
G1.2.2	JL.F.P92	2,9412600 c	G1.2.2	JL.F.P92	2,8105800 b
G1.4	MM.I.TA130	2,9369400 c	G1.4	CR.L.P46	2,6906800 b
G1.4	JA.F.B103	2,9175200 c	G1.1.2	VA.F.H192	2,6489200 b
G1.4	JA.F.TA110	2,7962800 c	G1.4	AR.F.TA2	2,6320200 b
G1.1.2	BR.F.P20	2,7672600 c	G1.2.1	VA.I.TA212	2,5980200 b
G1.4	JB.L.H1	2,6307800 c	G1.4	VA.I.P202	2,4247800 b
G1.4	BP.F.P40	2,6072200 c	G1.4	VA.L.TA208	2,2891600 b

Variedade 'Palmer'			
Grupo fAFLP	Isolado	Área média das lesões (cm ²)	
G1.1.1	JL.F.P93	2,5201000	c
G1.4	JA.I.TA112	2,3539800	c
G1.4	JL.F.P91	2,2378200	c
G1.4	TA.F.P185	2,1950800	c
G1.4	JA.F.B105	2,1907600	c
G1.1.2	AR.F.TA7	2,1200400	c
G1.3	JB.L.VC6	1,9863000	c
G1.1.2	BR.I.TA16	1,9850200	c
G1.1.2	BP.I.P37	1,9537000	c
G1.4	VA.F.TA205	1,9270000	c
G1.4	SR.F.P172	1,5509200	d
G1.2.2	MA.L.P135	1,4622200	d
G1.2.2	VA.L.TA209	1,4370600	d
G1.1.2	MA.F.H169	1,3946600	d
G1.1.2	GS.F.P73	1,3207800	d
G2	VA.L.H189	1,2545200	d
G1.3	JB.L.VC5	1,1953000	d
2	IT.CF.VC13	1,1663200	d
G1.1.2	CR.F.TA44	1,1411000	d
G1.1.1	VA.L.H188	1,1161200	d
G1.1.2	MM.I.TA122	1,0788000	d
G1.2.1	GS.I.P80	0,9795000	d
G1.2.2	JA.L.P107	0,9202600	d
G1.4	VA.I.TA213	0,8758400	d
G1.4	MM.I.TA128	0,8049000	d
G1.1.1	BP.I.VD29	0,7263400	d
G1.1.1	CR.I.H65	0,7172600	d
G1.4	MA.L.TA151	0,5934600	d
G1.3	JA.F.B104	0,5912800	d

Variedade 'Tommy Atkins'			
Grupo fAFLP	Isolado	Área média da lesões (cm ²)	
G1.1.1	VA.L.H188	2,2642400	b
G1.4	JA.F.B103	2,2599800	b
G1.1.2	CR.I.P53	2,2051200	b
G1.2.1	BR.F.TA13	2,1040200	b
G1.1.1	CR.I.H65	2,0863600	b
G1.1.2	AR.F.TA7	2,0210800	c
G1.4	JB.L.H1	1,9902800	c
G1.4	SR.F.P171	1,9054200	c
G1.2.1	GS.I.P76	1,7556400	c
G1.4	CR.L.H57	1,7362200	c
G1.2.1	VA.I.H195	1,7319600	c
G1.4	MA.L.TA151	1,6337600	c
G1.1.1	JL.F.P93	1,6335000	c
G2	VA.L.H189	1,6094000	c
G1.2.1	GS.I.P80	1,5668800	c
G1.4	MM.I.TA128	1,5447200	c
G1.1.2	MA.F.H169	1,5310600	c
G1.2.2	MA.L.P135	1,4622200	c
G1.1.1	JA.L.P102	1,3329600	c
G1.4	VA.F.TA205	1,2892400	c
G1.4	TA.F.P185	1,2488600	c
G1.4	JA.L.TA121	1,2303600	c
G1.3	JB.L.VC2	1,2189600	c
G1.1.1	VA.F.P200	1,2172400	c
G1.3	JB.L.VC5	1,1953000	c
G1.4	VA.I.TA213	1,0161200	c
G1.2.2	JA.L.P108	0,9512200	d
G1.1.2	MM.I.TA122	0,9507200	d
G1.2.2	BP.F.P40	0,9271400	d

Variedade 'Palmer'		
Grupo fAFLP	Isolado	Área média das lesões (cm ²)
G1.1.1	GS.L.P84	0,5870600 d
G1.3	JB.L.VC2	0,5369600 d
G1.1.1	JA.F.P118	0,4740800 d
G1.1.1	BR.F.H27	0,3918400 d
G1.1.2	BR.F.P23	0,3638600 d
G1.1.2	BR.F.H25	0,3580000 d
G1.4	JA.L.TA121	0,2248600 d
G1.4	MA.L.TA148	0,1879200 d
G1.1.2	VA.F.H192	0,1469400 d
G2	IT.CF.VC10	0,0558600 d
G1.2.1	BR.F.TA13	0,0556200 d
G1.2.2	MA.F.P140	0,0252000 d
G1.2.1	GS.I.P76	0,0202600 d
G1.2.2	VT.F.P218	0,0201000 d
G1.2.1	VA.I.H195	0,0120800 d
G1.1.2	MA.F.TA152	0,0113200 d
G1.2.2	GS.F.P71	0,0096800 d
G1.2.2	VT.F.E222	0,0063400 d
G1.1.1	VA.F.P200	0,0055600 d
G1.2.2	JA.L.P108	0,0034800 d
G1.1.2	CR.I.P53	0,0030800 d
G1.1.1	JL.F.TA98	0,0013200 d
G1.4	MA.I.H160	0,0009200 d

Variedade 'Tommy Atkins'		
Grupo fAFLP	Isolado	Área média da lesões (cm ²)
G2	IT.CF.VC13	0,9127000 d
G1.1.1	BR.F.H27	0,8791200 d
G1.2.1	MA.L.H163	0,7438800 d
G1.1.1	GS.L.P84	0,7091000 d
G1.4	MA.I.H160	0,6978400 d
G1.4	JL.F.P91	0,6624400 d
G1.3	JA.F.B104	0,6325400 d
G1.1.2	MA.F.TA152	0,6078600 d
G1.1.2	CR.F.TA44	0,5093600 d
G1.1.2	BP.I.P37	0,3832000 d
G1.1.1	JA.F.P118	0,3751200 d
G1.1.2	BR.I.TA16	0,3348600 d
G1.2.2	VT.F.P218	0,3142000 d
G1.3	JB.L.VC6	0,2937200 d
G1.2.2	JA.L.P107	0,2630400 d
G1.2.2	MA.F.P140	0,1570200 d
G1.1.2	BR.F.P23	0,1441600 d
G1.2.2	VT.F.E222	0,0754000 d
G2	IT.CF.VC10	0,0692400 d
G1.1.2	GS.F.P73	0,0129400 d
G1.1.1	JL.F.TA98	0,0122400 d
G1.2.2	GS.F.P71	0,0044400 d
G1.1.1	BP.I.VD29	0,0000000 d

5. DISCUSSÃO

O sequenciamento da região ITS foi eficiente na discriminação dos isolados do estudo nas espécies *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. No entanto, no transcorrer do desenvolvimento dessa etapa do trabalho comprovou-se o fato levantado por Cai et al. (2009) e Hyde et al. (2009b) quanto à dificuldade na identificação de espécies de fungos pertencentes ao complexo *Colletotrichum*, visto que mais de 86% das sequências ITS designadas como *C. gloeosporioides* depositadas no GenBank não são conspecíficas com essa espécie. Na tentativa de minorar essa dificuldade, nesse trabalho foram utilizadas sequências ITS de espécies-tipo de *Colletotrichum* para a obtenção dos dendrogramas (CANNON et al., 2008; HYDE et al., 2009a).

Mesmo diante as dificuldades encontradas na caracterização molecular de espécies de *Colletotrichum*, as técnicas moleculares têm sido utilizadas com frequência para essa finalidade (HYDE et al. 2009b). O sequenciamento da região ITS também foi empregado com sucesso para a identificação de diferentes espécies de *Colletotrichum* provenientes de diferentes hospedeiros em todo o mundo (MORIWAKI et al., 2002; PERES et al., 2002; AFANADOR-KAFURI et al., 2003; PHOTITA et al., 2005; DU et al., 2005; CHUNG et al., 2006; KIM et al., 2009; SHIVAS & TAN, 2009; NGUYEN et al., 2010; LOPEZ & LUCAS, 2010).

Resultados de estudos relativos à caracterização de isolados das espécies *C. acutatum*, *C. capsici* e *C. gloeosporioides* demonstraram que os diferentes grupos formados pelas análises das sequências da região ITS e β -tubulina foram equivalentes aos grupos formados pela análise dos caracteres morfológicos dos isolados (THAN et al., 2008). Outro estudo similar com isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de várias plantas herbáceas, também revelou que as sequências da região ITS foram potencialmente úteis na determinação taxonômica das espécies (PHOTITA et al., 2005).

No Brasil, de acordo com a literatura, somente a espécie *C. gloeosporioides* encontra-se associada aos sintomas de antracnose em mangueiras, embora testes de patogenicidade conduzidos com um isolado de *C. acutatum* obtido de morango

demonstraram que o mesmo produziu sintomas em frutos de mangueira 'Haden' (PERES et al., 2002). Também, há relatos da ocorrência da espécie *C. acutatum* causando sintomas de antracnose em manga no Sri Lanka, fato este comprovado por testes de patogenicidade (JAYASINGHE & FERNANDO, 2009). Em outro trabalho relativo à caracterização molecular e morfológica de isolados de *Colletotrichum* spp. de mangueiras, conduzido em Porto Rico e na Flórida, Estados Unidos da América, foi verificado que 93% dos isolados encontrados pertenciam à espécie *C. gloeosporioides*, enquanto apenas 5% à espécie *C. acutatum*. Ambas as espécies, no entanto, induziram a expressão de sintomas em folhas de mangueiras inoculadas (RIVERA-VARGAS et al., 2006).

As espécies, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, que são, na maioria das vezes, os agentes causais de podridão em frutas tropicais (PHOULIVONG et al., 2010) podem ocasionar os mesmos sintomas em um mesmo hospedeiro. Por exemplo, no caso da oliveira, um trabalho revelou que 97% dos isolados associados a sintomas de antracnose pertenciam à espécie *C. acutatum*, enquanto que apenas 3% pertenciam à *C. gloeosporioides*, e que ambos mostraram-se patogênicos para essa planta (TALHINHAS et al., 2005). Os mesmos investigadores, mediante emprego de testes de patogenicidade cruzados, revelaram que isolados de ambas as espécies, obtidos de oliveiras, foram capazes de ocasionar sintomas em morango e tremoço. Em morango, as espécies *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* também são responsáveis pela causa de sintomas de antracnose (DENOYES-ROTHAN et al., 2003; MERTELY & LEGARD, 2004).

Neste estudo, dentre uma coleção de 184 isolados de *Colletotrichum* oriundos de mangueiras, foi encontrado apenas um isolado, VA.L.H189, pertencente à espécie *C. acutatum*, sendo os demais pertencentes à *C. gloeosporioides*. Assim, pressupõe-se que essa espécie não é um agente causal comum de sintomas de antracnose em mangueiras no Brasil, embora o mesmo tenha potencial de causar sintomas. Esse isolado, quando comparado por meio dos marcadores fAFLP com os isolados de *C. acutatum* obtidos de sintomas de podridão floral dos citros, mostrou-se geneticamente distante dos mesmos, não apresentando o mesmo padrão de polimorfismo. Da mesma

maneira, embora o isolado JA.F.B104, obtido de mangueira, possua um perfil genético muito semelhante aos isolados de *C. gloeosporioides* de citros, tanto na análise das sequências da região ITS quanto com marcadores fAFLP, o mesmo mostrou-se distante geneticamente dos isolados de citros.

Os estudos com marcadores moleculares fAFLP apontaram uma alta diversidade genética entre os isolados desse estudo, com alto índice de variação entre isolados de uma mesma população. O filograma dos 189 isolados foi dividido em dois grupos, sendo o G1 subdividido em quatro subgrupos principais e formado por isolados da espécie *C. gloeosporioides* e, um pequeno grupo constituído por isolados da espécie *C. acutatum*. No geral, não foi constatada qualquer relação entre os agrupamentos e a procedência dos isolados, como município, órgãos das plantas ou variedade de mangueiras das quais os mesmos foram obtidos, embora alguns isolados oriundos de um mesmo município encontrem-se unidos em um mesmo *cluster*, próximos uns dos outros.

Isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* obtidos de morango, quando analisados por meio de marcadores RAPD e microssatélites separaram-se em grupos diferentes daqueles formados por isolados oriundos de citros (UREÑA-PADILLA et al., 2002), assim como ocorreu neste trabalho. Além disso, os pesquisadores indicaram uma significativa diferenciação entre as subpopulações de isolados de *C. gloeosporioides*. Um alto nível de diferenciação genética e ocorrência de fluxo gênico também foram constatados entre populações de *C. sublineolum* de sorgo na Etiópia (CHALA et al., 2010).

Ao analisar isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* provenientes de sintomas de antracnose em morango, Denoyes-Rothan et al. (2003) relataram a ausência de correlação entre o polimorfismo genético e a origem geográfica dos isolados, sugerindo que houve uma disseminação mundial dos mesmos, provavelmente por meio de trocas internacionais de órgãos de propagação vegetativa. Da mesma maneira, um estudo envolvendo caracterização molecular de isolados de *C. gloeosporioides* oriundos de grãos de café com sintomas de antracnose, de diferentes locais do Vietnã, revelou uma alta diversidade genética entre os isolados segundo

análises com marcadores RAPD e microssatélites, e relatou que os mesmos foram, em sua maioria, agrupados de acordo com sua origem geográfica, regiões Norte e Sul do país (NGUYEN et al., 2009). Porém, segundo esses investigadores, não foi possível a diferenciação entre isolados provenientes de localidades dentro das regiões Norte e Sul, e não houve uma correlação entre os agrupamentos obtidos e o potencial patogênico dos isolados (NGUYEN et al., 2009). Por sua vez, marcadores AFLP indicaram uma alta diversidade genética entre isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* obtidos de caqui e pimenta, porém, não foi possível agrupar-los segundo a sua procedência (KIM et al., 2009).

Vários trabalhos relatam a alta variabilidade genética entre populações de *Colletotrichum* e pressupõem motivos pelos quais esse fungo possui tal capacidade. Por exemplo, uma alta variabilidade genética e heterogeneidade entre populações de isolados de *C. gloeosporioides* de manga e maracujá na Colômbia, foram encontradas por meio de análises morfológicas e moleculares com marcadores Ap-PCR e RAPD (AFANADOR-KAFURI et al., 2003). Os autores sugeriram que se essa população de isolados pertence a uma única espécie, a complexidade genética e heterogeneidade podem ser explicadas pela presença de um estágio perfeito do fungo (FREEMAN et al., 1998).

Na Nigéria, em alguns casos, isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de uma mesma lesão em cará (*Dioscorea alata*), foram considerados como pertencentes a diferentes grupos de compatibilidade vegetativa, e até mesmo um isolado de planta daninha mostrou-se compatível com isolados obtidos de cará. Assim, os autores sugeriram que, devido à diversidade dos grupos de compatibilidade vegetativa, adicionalmente à reprodução assexuada, a reprodução sexual poderia estar exercendo importante papel na epidemiologia da antracnose em cará (ABANG et al., 2004). Pouco tempo depois, os mesmos investigadores relataram a presença de estruturas reprodutivas como peritécio, ascos e ascósporos do teleomorfo de *C. gloeosporioides*, *G. cingulata*, em associação com conídios de *C. gloeosporioides* em cará na Nigéria (ABANG et al., 2006). Da mesma maneira, o teleomorfo *G. cingulata* também foi detectado ocorrendo naturalmente em morangueiros na Flórida (MERTELY & LEGARD,

2004). McDonald & Linde (2002) propuseram que fitopatógenos sob contínua recombinação sexual atingem altos níveis de diversidade genética, atuando na formação de novas raças e/ou genótipos capazes de se adaptar a diferentes hospedeiros.

Gordillo & Hernández (1980) relataram a presença do teleomorfo, *G. cingulata*, ocorrendo em folhas de mangueiras em decomposição no solo, em Cuba, no ano de 1976. Após esse relato, não houve outros com relação à presença de *G. cingulata*, ocorrendo em pomares de manga. Porém, como foram verificados diferentes haplótipos dentro de uma mesma população, em relação ao resultado do sequenciamento da região ITS, que é altamente conservada entre indivíduos de uma mesma espécie, e um baixo fluxo gênico quando da avaliação do genoma por meio de marcadores fAFLP, sugere-se que a grande variabilidade genética encontrada entre isolados de uma mesma população deste estudo, pode ser explicada pela recombinação sexual entre indivíduos ou pela presença de grupos com compatibilidade vegetativa, o que certamente se constitui em alicerce para a hipótese apresentada.

Os testes de patogenicidade revelaram que tanto isolados da espécie *C. acutatum*, quanto da espécie *C. gloeosporioides*, oriundos de mangueira e de citros, foram capazes de ocasionar sintomas de antracnose em folhas de mangueiras 'Palmer' e 'Tommy Atkins'. Como os isolados que colonizam citros são capazes de causar sintomas em mangueiras, nota-se que, embora em vários municípios do Estado de São Paulo haja a coexistência de pomares de citros e mangueiras nas mesmas propriedades, ou em áreas limítrofes, aparentemente não houve migração dos isolados de citros para mangueiras.

Um estudo envolvendo testes de patogenicidade cruzado de isolados de *C. acutatum* de lima ácida, laranja doce, mirtilo, samambaia preta e morango relatou que seria improvável que um genótipo patogênico para um dos hospedeiros avaliados pudesse migrar para outro desses hospedeiros e causar uma epidemia. O estudo revelou que apenas um grupo de isolados mostrou-se capaz de infectar frutos de diferentes hospedeiros (MACKENZIE et al., 2009). No presente estudo, a raridade da presença de *C. acutatum* e do genótipo de *C. gloeosporioides* encontrado em citros,

associados a sintomas de antracnose em mangueiras, também se constitui em indicação quanto à ausência de migração desses fungos entre os hospedeiros.

Na literatura, encontra-se relatada a flexibilidade das espécies de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* em causar sintomas, de maneira equânime, em vários hospedeiros. Testes de patogenicidade *in vitro* mostraram que isolados de *C. acutatum* da Austrália, de pessegueiro, *blueberry*, pimentão, uva, manga, azeitona, morango e tomate foram capazes de ocasionar sintomas em uva, *blueberry* e morango, indicando a ausência de especificidade fisiológica (WHITELAW-WECKERT et al., 2007). Da mesma forma, isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de pessegueiro, maçã, abacate, manga e noz-pecã e isolados de *C. acutatum* obtidos de maçã, pêssigo e noz-pecã ocasionaram sintomas em todas as frutas com níveis variáveis de infecção (FREEMAN & SHABI, 1996), reforçando a inespecificidade apontada. Em outro estudo, isolados de *C. acutatum* mostraram-se patogênicos para abacate, goiaba, mamão, manga e maracujá (PERES et al., 2002). Por sua vez, isolados de *C. gloeosporioides* de manga não foram capazes de ocasionar sintomas típicos de antracnose em pimentão (THAN et al., 2008).

Já isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de sintomas de antracnose em cará, foram capazes de ocasionar níveis moderados de sintomas em mamão, abacate e manga, assim como isolados de manga também o ocasionaram quando inoculados em cará e abacate (ABANG et al., 2006). Porém, os mesmos pesquisadores relataram que isolados de citros não causaram sintomas em cará. Da mesma maneira, Martínez et al. (2009) relataram que isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* de lima ácida 'Tahiti' não ocasionaram sintomas de antracnose em mangueiras. Em vista desses resultados, sugere-se que embora *C. gloeosporioides* tenha uma alta flexibilidade em causar sintomas em diferentes hospedeiros, o fato dos isolados de citros desse estudo terem causado sintomas de antracnose em mangueiras denota que há afinidade desses genótipos com plantas de mangueira.

Mesmo que *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* aparentemente não sejam hospedeiro-específicos, isolados de um determinado hospedeiro, quando inoculados em outro, podem apresentar poucos sintomas ou menos sintomas em relação aos isolados do seu hospedeiro de origem. Por exemplo, em um estudo com isolados de *C.*

gloeosporioides oriundos de caqui, apenas 11% causaram sintomas em frutos de pimenta. Por outro lado, todos os isolados de *C. acutatum* oriundos de pimenta, foram capazes de ocasionar sintomas no seu hospedeiro de origem e em ramos de caqui, embora com menos intensidade em relação aos isolados oriundos desse hospedeiro (KIM et al., 2009). Tais resultados corroboram aqueles obtidos neste estudo em relação à pequena quantidade de sintomas ocasionados pelo isolado *C. acutatum* de citros, IT.CF.VC10, em folhas de mangueiras.

Os isolados de *C. gloeosporioides* de mangueiras, deste estudo, ocasionaram sintomas de antracnose em folhas das variedades Palmer e Tommy Atkins de maneira diferenciada, até mesmo entre as repetições de um mesmo experimento. Rojas-Martínez et al. (2008), em seus estudos, também encontraram diferenças quanto à virulência de seus isolados e à falta de uniformidade dos sintomas ocasionados pelos mesmos, fato este que levou os pesquisadores a sugerir que pode haver mais de uma raça ou forma especial de *C. gloeosporioides*.

Os grupos formados pela análise estatística do teste de patogenicidade não estão diretamente relacionados ao agrupamento construído com os marcadores fAFLP, não obstante, de acordo com os resultados, pressupõe-se que o subgrupo *G1.4* seja o mais patogênico em relação aos demais, ainda que tenha se observado algumas exceções. Um estudo semelhante relatou que a fraca correlação entre a patogenicidade dos isolados de *C. gloeosporioides* e os agrupamentos baseados em análises com marcadores moleculares indicou ausência de associação entre o polimorfismo genético e a virulência dos isolados (ABANG et al., 2006). Than et al. (2008), ao estudar três espécies de *Colletotrichum* de diferentes hospedeiros, também não encontraram correlação entre os resultados das análises filogenéticas e os resultados dos testes de patogenicidade cruzados.

Conforme dados obtidos no presente estudo, pressupõe-se que a existência de populações de *C. gloeosporioides*, geneticamente diferentes e, até mesmo de outra espécie, *C. acutatum*, em um mesmo local, afetando diferentes variedades de mangueiras e diferentes partes das plantas, pode estar contribuindo para uma resposta diferenciada do fungo à severidade dos sintomas ocasionados nas diferentes

variedades de manga. Além disso, a grande variabilidade genética entre isolados de *C. gloeosporioides* pode justificar o desenvolvimento da resistência dos mesmos ao grupo dos benzimidazóis, usados constantemente no controle do patógeno, assim como ressaltar a potencialidade de seleção de estirpes resistentes, pelo uso contínuo de fungicidas do grupo das estrobilurinas (AKEM, 2006; JOHNSON & HOFMAN, 2009; PLOETZ, 2010).

É possível que propágulos desses patógenos possam sobreviver entre os ciclos de cultivos, na forma quiescente, em diferentes tecidos da planta e, dessa forma, contribuir para a formação de grande quantidade de inóculo quando sob condições ambientais favoráveis. Tal comportamento, pode contribuir ao incremento na quantidade de doença nas variedades de mangueiras que encontram-se em ciclo produtivo nesse período, como é o caso da mangueira 'Palmer', cujo ciclo produtivo é tardio em relação à mangueira 'Tommy Atkins', e que, portanto, comportou-se como suscetível no presente estudo.

Em vista dos resultados ora apresentados, estudos complementares relacionados ao complexo *M. indica-Colletotrichum* e *Citrus-Colletotrichum* fazem-se necessários com vistas ao melhor entendimento desses patossistemas e eventualmente da contribuição relativa da reprodução sexual entre indivíduos de uma mesma ou de diferentes populações de fitopatógenos, e da migração de espécies de *Colletotrichum* associadas a outros hospedeiros cultivados em áreas afins.

6. CONCLUSÕES

- Os sintomas de antracnose em plantas de mangueiras no Estado de São Paulo resultam de infecções, quase que na totalidade, causadas por *C. gloeosporioides* já que dos 184 isolados provenientes de diferentes órgãos e variedades de mangueiras, e de diferentes municípios do Estado, 183 foram classificados como pertencentes a essa espécie. Apenas um isolado, obtido de folhas de mangueira 'Haden', de Vista Alegre do Alto, foi identificado como *C. acutatum*, sendo este o primeiro relato dessa espécie ocorrendo naturalmente em plantas de manga no Brasil;
- Marcadores fAFLP foram eficientes na caracterização molecular de isolados de diferentes populações, cujos resultados corroboram aqueles obtidos mediante análise das sequências da região ITS1-5.8S-ITS2;
- Há indicação de uma alta variabilidade genética entre isolados de *C. gloeosporioides* de uma mesma população e a ocorrência de fluxo gênico, conforme resultados obtidos mediante emprego de marcadores moleculares fAFLP;
- Não há, entre um conjunto de isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de mangueiras, relação entre a procedência dos mesmos, formação dos grupos e subgrupos da análise filogenética e à totalidade do seu potencial patogênico, embora isolados de um subgrupo tenham se destacado como sendo mais virulentos em relação aos demais;

- Tanto os isolados da espécie *C. acutatum*, quanto da espécie *C. gloeosporioides*, oriundos de mangueiras e de citros, são capazes de ocasionar sintomas de antracnose em folhas de mangueiras 'Palmer' e 'Tommy Atkins'.
- Em termos de níveis de patogenicidade, há um comportamento diferenciado entre isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de mangueiras, independente dos órgãos e locais dos quais provieram, assim como em relação às respectivas variedades;
- Não há resposta diferenciada das mangueiras 'Palmer' e 'Tommy Atkins' à inoculação com isolados de *Colletotrichum* spp.;
- Não há especificidade fisiológica entre isolados de *C. acutatum* e de *C. gloeosporioides*, obtidos respectivamente de flores de citros com sintomas de Podridão Floral, e de tecidos foliares assintomáticos, com indicação, portanto, da existência de uma maior amplitude biológica, em termos de hospedeiros.

7. REFERÊNCIAS

- ABANG, M. M.; HOFFMANN, P.; WINTER, S.; GREEN, K. R.; WOLF, G. A. Vegetative compatibility among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.152, p.21-27, 2004.
- ABANG, M. M.; ASIEDU, R.; HOFFMANN, P.; WOLF, G. A.; MIGNOUNA, H. D.; WINTER, S. Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from different yam hosts in the agroecological zones in Nigeria. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.154, p.51-61, 2006.
- AFANADOR-KAFURI, L.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology**, New York, v.93, n.5, p.579-587, 2003.
- AGRIANUAL: **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: AgraFNP, 2011. p.338-344.
- AKEM, C. N. Mango anthracnose disease: present status and future research priorities. **Plant Pathology Journal**, Faisalabad, v.5, n.3, p.266-273, 2006.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p.3389-3402, 1997.
- ANDRADE, E. M.; UESUGI, C. H.; UENO, B.; FERREIRA, M. A. S. V. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, p.021-031, 2007.

ANJOS, J. R. N.; CHARCHAR, M. J. A.; AKIMOTO, A. K. Ocorrência de antracnose causada por *Colletotrichum acutatum* em pequiheiro no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, p.96-98, 2002.

ANSARI, K. I.; PALACIOS, N.; ARAYA, C.; LANGIN, T.; EGAN, D.; DOOHAN, F. M. Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum lindemuthianum* isolates of different geographic origins. **Plant Pathology**, Oxford, v.53, p.635-642, 2004.

ARAUZ, L. F. Mango anthracnose: economic impact and current options for integrated and management. **Plant Disease**, St. Paul, v.84, n.6, p.600-611, 2000.

BARBOSA, J. C. & MALDONADO, J. R. W. **AgroEstat: Sistema para Análises Estatísticas de Ensaio Agrônomicos versão 1.0**. Jaboticabal: FCAV/UNESP, 2010.

BOMPARD, J. M. Taxonomy and Systematics. In: LITZ, R.E. **The Mango: Botany, Production and Uses**. 2ed. Wallingford: CAB International, 2009. cap.2, p.19-36.

CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; WALLER, J.; ABANG, M. M.; ZHANG, J. Z.; YANG, Y. L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z. Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R. G.; MCKENZIE, E. H. C.; JOHNSTON, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v.39, p.183-204, 2009.

CAMARGO FILHO, W. P. de; ALVES, H. S.; MAZZEI, A. R. Mercado de Manga no Brasil: contexto mundial, variedades e estacionalidade. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.34, n.5, p.60-68, 2004.

CANNON, P. F.; BRIDGE, P. D.; MONTE, E. Linking the past, present and future of *Colletotrichum* systematics. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. **Colletotrichum Host Specificity, Pathology and Host-pathogen Interaction**. St. Paul: APS Press, 2000, p.1-20.

CANNON, P. F.; BUDDIE, A. G.; BRIDGE, P. D. The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mycotaxon**, New York, v. 104, p. 189–204, 2008.

CANO, J.; GUARRO, J.; GENE, J. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.42, p. 2450-2454, 2004.

CARVALHO, F.M.S.; LEITE JUNIOR, R.P.; UENO, B. Pathogenic characterization of *Colletotrichum* spp. associated with apple diseases in southern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.72-78, 2000.

CHAKRABORTY, S.; FERNANDES, C. D.; CHARCHAR, M. J. D'A.; THOMAS, M. R. Pathogenic variation in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting *Stylosanthes* spp. in a center of diversity in Brazil. **Phytopathology**, New York, v.92, n.5, p.553-562, 2002.

CHALA, A.; TRONSMO, A. M.; BRURBERG, M. B. Genetic differentiation and gene flow in *Colletotrichum sublineolum* in Ethiopia, the centre of origin and diversity of sorghum, as revealed by AFLP analysis. **Plant Pathology**, Oxford, DOI: 10.1111/j.1365-3059.2010.02389.x, 2010.

CHUNG, W.; ISHII, H.; NISHIMURA, K.; FUKAYA, M.; YANO, K.; KAJITANI, Y. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crops in Japan. **Plant Disease**, St. Paul, v.90, p.506-512, 2006.

CROUCH, J. A.; CLARKE, B.; HILLMAN, BRADLEY. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored gramini-colous *Colletotrichum* group. **Mycologia**, New York, v. 101, p. 648-656, 2009.

CUNHA, M. M.; SANTOS FILHO, H. P.; NASCIMENTO, A. S. **Manga: fitossanidade**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. cap. 3, p.25-47.

DENOYES-ROTHAN, B.; GUÉRIN, G.; DÉLYE, C.; SMITH, B.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. Genetic diversity and pathogenic variability among isolates of

Colletotrichum species from strawberry. **Phytopathology**, New York, v.93, p.219-228, 2003.

DODD, J. C.; ESTRADA, A. B.; MATCHAM, J.; JEFFRIES, P.; JEGER, M. J. The effect of climatic factors on *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of mango anthracnose, in the Philippines. **Plant Pathology**, Oxford, v.40, p.568-575, 1991.

DONADIO, L. C.; ZACCARO, R. P.; RIBEIRO, I. J. A. Manga. In: DONADIO, L. C. **História da fruticultura paulista**. Jaboticabal: Maria de Lourdes Brandel, 2010. cap.13, p.236-254.

DU, M.; SCHARDL, C. L.; VAILLANCOURT, L. J. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. **Mycologia**, New York, v.97, p.641-658, 2005.

ESTRADA, A. B.; DODD, J. C.; JEFFRIES, P. 1993. Effect of environment on the *in vitro* growth and development of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from the Philippines. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.341, p.360-370, 1993.

EXCOFFIER, L. & LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v.10, p.564-567, 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variant inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Austin, v.131, p.479-491, 1992.

FAO. **Food and Agricultural Organization**. Review of recent world market situation for bananas and tropical fruits. 2009. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/012/ak341e/ak341e14.htm>. Acesso em: 13 jan. 2011.

FARR, D. F.; AIME, M. C.; ROSSMAN, A. Y.; PALM, M. E. Species of *Colletotrichum* on *Agavaceae*. **Mycological Research**, Cambridge, v.110, p.1395-1408, 2006.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JR., J. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 4ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. cap.28, p.239-269.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, Lancaster, v.39, p.783-391, 1985.

FITZELL, R. D. & PEAK, C. M. The epidemiology of anthracnose disease of mango: inoculum sources, spore production and dispersal. **Annals of Applied Biology**, London, v.104, p.53-59, 1984.

FREEMAN, S. & SHABI, E. Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.49, p.395-404, 1996.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, St. Paul, v.82, n.6, p.596-605, 1998.

FREEMAN, S.; MINZ, D.; MAYMON, M.; ZVEIBIL, A. Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum sensu* Simmonds. **Phytopathology**, New York, v.91, p.586–592, 2001.

GONZÁLEZ, E. & SUTTON, T. B. Population diversity within isolates of *Colletotrichum* spp. causing *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apples in three orchards in North Carolina. **Plant Disease**, St. Paul, v.88, p.1335-1340, 2004.

GORDILLO, L. & HERNÁNDEZ, E. Forma sexual y medios de cultivo para *Colletotrichum gloeosporioides*, patógeno del mango en Cuba. **Ciencias de la Agricultura**, La Habana, v.7, p.11-17, 1980.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Toronto, v.8, n.3, p.195-202, 1998.

GUPTA, V. K.; PANDEY, A.; KUMAR, P.; PANDEY, B. K.; GAUR, R. K.; BAJPAI, V.; SHARMA, N.; SHARMA, S. Genetic characterization of mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. by random amplified polymorphic DNA analysis. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.9, n.26, p.4009-4013, 2010.

HEILMANN, L. J.; NITZAN, N.; JOHNSON, D. A.; PASCHE, J. S.; DOETKOTT, C.; GUDMESTAD, N. C. Genetic variability in the potato pathogen *Colletotrichum coccodes* as determined by amplified fragment length polymorphism and vegetative compatibility group analyses. **Phytopathology**, New York, v.96, p.1097-1107, 2006.

HYDE, K. D.; CAI, L.; CANNON, P. F.; CROUCH, J. A.; CROUS, P. W.; DAMM, U.; GOODWIN, P. H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P. R.; JONES, E. B. G.; LIU, Z. Y.; MCKENZIE, E. H. C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S. R.; PFENNING, L. H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R. G.; TAN, Y. P.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v.39, p.147-183, 2009a.

HYDE, K. D.; CAI, L.; MCKENZIE, E. H. C.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z.; PRIHASTUTI, H. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v.39, p.1-17, 2009b.

IBRAF. **Instituto Brasileiro de Fruticultura**. 2009. Disponível em: http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp .Acesso em: 13 jan. 2011.

JAYASINGHE, C. K. & FERNANDO, T. H. P. S. First report of *Colletotrichum acutatum* on *Mangifera indica* in Sri Lanka. **Ceylon Journal of Science**, Peradeniya, v.38, p.31-34, 2009.

JOHNSON, G. I. & HOFMAN, P. J. Postharvest Technology and Quarantine Treatments. In: LITZ, R.E. **The Mango: Botany, Production and Uses**. 2ed. Wallingford: CAB International, 2009. cap.15, p.529-605.

KIM, H.; LIM, T. H.; KIM, J.; KIM, Y. H.; KIM, H. T. Potential of crossinfection of *Colletotrichum* species causing anthracnose in persimmon and pepper. **The Plant Pathology Journal**, Suwon, v.25, n.1, p.13-20, 2009.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.16, p.111-120, 1980.

KURAMAE-IZIOKA, E. E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloesporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Revista Unimar**, Marília, v.19, p.683-689, 1997.

LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A. V. O.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores moleculares dominantes RADP e AFLP. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n.29, p.56-60, 2002.

LOPEZ, A. M. Q. & LUCAS, J. A. *Colletotrichum* isolates related to anthracnose of cashew trees in Brazil: morphological and molecular description using LSU rDNA sequences. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.53, n.4, p.741-752, 2010.

MACKENZIE, S. J.; PERES, N. A.; BARQUERO, M. P.; ARAUZ, L. F.; TIMMER, L. W. Host range and genetic relatedness of *Colletotrichum acutatum* isolates from fruit crops and leatherleaf fern in Florida. **Phytopathology**, New York, v.99, n.5, p.620-631, 2009.

MARTIN, A. P. Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.8, p.3673-3682, 2002.

MARTÍNEZ, E. P., HÍO, J. C.; OSORIO, J. A.; TORRES, M. F. Identification of *Colletotrichum* species causing anthracnose on Tahiti lime, tree tomato and mango. **Agronomía Colombiana**, Bogotá, v.27, p.211-218, 2009.

McDONALD, B. A. & LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, New York, v.40, p.349-79, 2002.

MERTELY, J. C. & LEGARD, D. E. Detection, isolation, and pathogenicity of *Colletotrichum* spp. from strawberry petioles. **Plant Disease**, St. Paul, v.88, p.407-412, 2004.

MORIWAKI, J.; TSUKIBOSHI, T; SATO, T. Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v.68, p.307-320, 2002.

MUKHERJEE, S.K. The mango - its botany, cultivation, uses and future improvement especially as observed in India. **Economic Botany**, New York, v.7, n.2, p.130-162, 1953.

NGUYEN, P. T. H.; PETTERSSON, O. V.; OLSSON, P.; LILJEROTH, E. Identification of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of coffee in Vietnam. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.127, p.73-87, 2010.

NGUYEN, P. T. H.; SÄLL, T.; BRYNGELSSON, T.; LILJEROTH, E. Variation among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from infected coffee berries at different locations in Vietnam. **Plant Pathology**, Oxford, v.58, p.898-909, 2009.

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

PEROSA, J. M. Y. & PIERRE, F. C. Técnicas de pós-colheita e expansão da cultura da manga no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.2, p.381-384, 2002.

PIMENTA, A. A. **Caracterização morfométrica, patogênica e genética de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em manga (*Mangifera indica* L.)**. 2009. 79f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho', Jaboticabal, 2009.

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

PHOULIVONG, S.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E. H. C.; ABDELSALAM, K. E. C.; HYDE, K. D. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v.44, p.33-43, 2010.

PLOETZ, R. C. **Anthracnose of mango: Management of the most important pre- and post-harvest disease**. 2010. Disponível em: http://www.mango.org/media/55703/anthracnose_of_mango.pdf. Acesso em: 17 jan. 2011.

PLOETZ, R.C. & FREEMAN, S. Foliar, floral and soilborne diseases. In: LITZ, R.E. **The Mango: Botany, Production and Uses**. 2ed. Wallingford: CAB International, 2009. cap.8, p.231-302.

RIBEIRO, I. J. A. Doenças da mangueira (*Mangifera indica*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 4ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. cap.52, p.457-465.

RIVERA-VARGAS, L. I.; LUGO-NOEL, Y.; MCGOVERN, R. J.; SEIJO, T.; DAVIS, M. J. Occurrence and distribution of *Colletotrichum* spp. on mango (*Mangifera indica* L.) in Puerto Rico and Florida, USA. **Plant Pathology Journal**, Faisalabad, v.5, n.2, p.191-198, 2006.

ROJAS-MARTÍNEZ, R. I.; ZAVALA-MEJÍA, E.; NIETO-ÁNGEL, D. Virulence and genetic variation of isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. on mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden. **Revista Mexicana de Fitopatología**, Obregón, v.26, p.21-26, 2008.

SAITOU, N. & NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.4, p.406-425, 1987.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3ed. Londres: CSHL Press, 2001. p.1448.

SERGEEVA, V.; SPOONER-HART, R.; NAIR, N. G. First report of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* causing leaf spots of olives (*Olea europaea*) in Australia. **Australasian Plant Disease Notes**, Victoria, v.3, p.143-144, 2008.

SCOTT, A. J. & KNOTT, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Arlington, v. 30, p. 507-12, 1974.

SHIVAS, R. G. & TAN, Y. P. A taxonomic re-assessment of *Colletotrichum acutatum*, introducing *C. fiorinae* comb. et stat. nov. and *C. simmondsii* sp. nov. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v.39, p.111-122, 2009.

SILVA-MANN, R.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C.; BERNARDINO FILHO, J. R.; SALGADO, K. C. C.; STEVENS, M. R. AFLP markers differentiate *Colletotrichum gossypii* from *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, p.169-172, 2005.

STANSFIELD, W. D. **Theory and Problems of Genetics**. 3ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 1991. p.452.

SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A. & JEGER, M. J. ***Colletotrichum: biology, pathology and control***. Wallingford: CAB International, 1992. cap.1, p.1-26.

SWOFFORD, D. L. **PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 4.0b10**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2002.

TALHINHAS, P.; SREENIVASAPRASAD, S.; NEVES-MARTINS, J.; OLIVEIRA, H. Molecular and Phenotypic Analyses Reveal Association of Diverse *Colletotrichum acutatum* Groups and a Low Level of *C. gloeosporioides* with Olive Anthracnose. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n.6, p.2987-2998, 2005.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.24, p.1596-1599, 2007.

TEBEEST, D. O.; CORRELL, J. C.; WEIDEMANN, G. J. Specification and population biology in *Colletotrichum*. In: ESSER, K.; LEMKE, P. A. **The Mycota V, part B**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1997. p.157-168.

THAN, P. P.; JEEWON, R.; HYDE, K. D.; PONGSUPASAMIT, S.; MONGKOLPORN, O.; TAYLOR, P. W. J. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. **Plant Pathology**, Oxford, v.57, p.562-572, 2008.

THAUNG, M. M. Coelomycete systematics with special reference to *Colletotrichum*. **Mycoscience**, Tokyo, v.49, p.345-350, 2008.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-

specific gag penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.22, p.4673-4680, 1994.

TIMMER, L. W. & BROWN, G. E. Biology and control of anthracnose diseases of citrus. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. ***Colletotrichum. Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction***. St. Paul: APS Press, 2000, p.300-316.

UREÑA-PADILLA, A. R.; MACKENZIE, S. J.; BOWEN, B. W.; LEGARD, D. E. Etiology and population genetics of *Colletotrichum* spp. causing crown and fruit rot of strawberry. **Phytopathology**, Berlin, v.92, p.1245-1252, 2002.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELGARD, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. cap.38, p. 315-322.

WHITELAW-WECKERT, M. A.; CURTIN S. J.; HUANG, R.; STEEL, C. C.; BLANCHARD, C. L.; ROFFEY, P. E. Phylogenetic relationships and pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* isolates from grape in subtropical Australia. **Plant Pathology**, Oxford, v.56, p.448-463, 2007.

WHITLOCK, M. C. & MCCAULEY, D. E. Indirect measure of gene flow and migration. **Heredity**, Edinburgh, v.82, p.117-125, 1999.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, London, v.15, p.323-354, 1951.

ZABEAU, M. Gent, Belgium; VOS, P. Renkum, The Netherlands. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. Int Cl.⁷: C12Q 1/68. FR 92402629.7. 24 set. 1991, 31 mar. 1993. **European Patent**, Paris, Bulletin 1993/13, n.0534858B2, p.47.