

WILLIE ANDERSON DOS SANTOS VIEIRA

**PREVALÊNCIA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp.
ENDOFÍTICOS EM MANGUEIRA**

**RECIFE-PE
FEVEREIRO – 2012**

WILLIE ANDERSON DOS SANTOS VIEIRA

**PREVALÊNCIA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp.
ENDOFÍTICOS EM MANGUEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE) – Orientador

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (UFRPE) – Co-orientador

Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima (UFAL) – Co-orientador

**RECIFE-PE
FEVEREIRO – 2012**

Ficha Catalográfica

V657p Vieira, Willie Anderson Dos Santos
Prevalência de isolados de *Colletotrichum* spp. endofíticos em
mangueira / Willie Anderson Dos Santos Vieira. -- Recife, 2012.
68 f. : il.

Orientador (a): Marcos Paz Saraiva Câmara.
Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,
Recife, 2012.

Referências.

1. Micologia 2. Caracterização 3. *Colletotrichum*
4. Endofíticos 5. GPDH 6. *Mangifera indica* 7. Prevalência
I. Câmara, Marcos Paz Saraiva, Orientador II. Título

CDD 616.015

**PREVALÊNCIA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp.
ENDOFÍTICOS EM MANGUEIRA**

WILLIE ANDERSON DOS SANTOS VIEIRA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 28/02/2012

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE)

EXAMINADORES:

Dr^a. Viviane Jurema Lopes Borges Rodrigues

Prof. Dr. Péricles Albuquerque Melo Filho

Dr^a Waléria Guerreiro Lima

“Vai passar, tu sabes que vai passar. Talvez não amanhã, mas dentro de uma semana, um mês ou dois, quem sabe? O verão está aí, haverá sol quase todos os dias, e sempre resta essa coisa chamada ‘impulso vital’.”

“Eu sei que todos os dias quando eu acordo, Deus dá um sorriso e me diz: estou te dando a chance de tentar de novo.”

Caio Fernando Abreu

À minha mãe Marilene Vieira e ao meu pai Nivaldo Vieira, pelos ensinamentos, educação, apoio e paciência, pela compreensão dos momentos mais complicados e pelo incentivo em prosseguir.

À minha irmã Lunna Vieira, pela companhia virtual.

Aos grandes amigos Jôsiane Dias, Edna Carvalho e Helder Francisco, que mesmo distantes, se fizeram presentes.

DEDICO

“Com a sabedoria se edifica a casa, e com o entendimento ela se estabelece; e pelo conhecimento se encherão as câmaras com todos os bens preciosos e agradáveis. O homem sábio é forte, e o homem de conhecimento consolida a força.” (Pv. 24:3-5)

“Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam.” (Sl. 23:4)

Ao grande DEUS,

AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por seu amor eterno e incondicional, e por possibilitar todas as minhas conquistas;

Aos professores Marcos Câmara, Sami Michereff e Gaus Silvestre pela orientação e confiança;

Aos professores Armínio Santos e Antonio Carlos de Oliveira pelo treinamento científico durante a graduação;

Ao Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pelo apoio institucional e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UFRPE pelos ensinamentos transmitidos, em especial às professoras Elineide Barbosa da Silveira e Sônia Maria Alves de Oliveira;

Sinceros agradecimentos a Nelson Bernardi Lima, Marília Wortman Marques e Marcelo Bezerra, membros do Laboratório de Micologia da UFRPE, pela disposição durante a realização deste trabalho;

A todos os amigos de turma pelos momentos compartilhados, em especial para Arinaldo Silva, Cléia Cabral, Diene Miranda e Susan Tsuji;

Aos amigos Eliane Inokuti, Luiz Gustavo, Mariote Netto, Rômulo Diniz e Waléria Guerreiro pela amizade compartilhada;

Aos amigos Breno Oliveira e Daíse Bernardino pela atenção em momentos especiais deste trabalho;

Aos funcionários Darcy Martins e Romildo Angeiras pela amizade e atenção;

Por fim, a todos que de alguma forma fizeram parte desta conquista.

SUMÁRIO

	página
AGRADECIMENTOS	iii
SUMÁRIO.....	iv
RESUMO GERAL	v
GENERAL ABSTRACT	vi
CAPÍTULO I – Introdução geral	viii
1. A cultura da mangueira	9
2. Antracnose da mangueira	10
3. O gênero <i>Colletotrichum</i>	12
4. Estilos de vida de <i>Colletotrichum</i> spp.	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO II – Prevalência de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. endofíticos em mangueira	27
RESUMO.....	28
ABSTRACT	29
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
RESULTADOS	36
DISCUSSÃO	39
AGRADECIMENTOS	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
CONCLUSÕES GERAIS	68

RESUMO GERAL

No presente estudo são relatadas as espécies de isolados de *Colletotrichum* endofíticos associados a mangueiras no Estado de Pernambuco/Brasil, e sua distribuição nos diferentes tecidos da planta em cinco diferentes áreas. Isolados foram caracterizados cultural e morfológicamente, quanto à patogenicidade e virulência, e através de inferências filogenéticas baseadas na sequência parcial do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPDH). Houve diferença significativa na frequência de isolamento de *Colletotrichum* em função da área de coleta e do tecido da planta. Na localidade de Aldeia (área III) foi observada a maior frequência de isolamento de *Colletotrichum*. O limbo maduro foi a parte da planta mais colonizada por *Colletotrichum* em um maior número de áreas. *Colletotrichum asianum*, *C. fructicola*, *C. cliviae*, *C. boninense* e duas espécies não identificadas ocorrem como endófitas em mangueira, e *C. asianum* foi prevalente sobre as demais. Todos os isolados foram patogênicos em frutos de manga. A análise filogenética revelou agrupamentos que foram congruentes com os caracteres morfológicos analisados, porém não agrupou isolados conforme características fenotípicas. Também não foi observado padrão de distribuição das espécies nas diferentes áreas, nem nos tecidos vegetais.

Palavras-chave: abordagem polifásica, antracnose, distribuição, filogenia, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPDH), *Mangifera indica*

GENERAL ABSTRACT

In the current study the *Colletotrichum* species isolated from mango in Pernambuco state in Brazil are described, as well as their distribution in different plant tissues. The *Colletotrichum* isolates are characterized through cultural, morphological, pathogenicity and virulence data, and from phylogenetic analyses based on a partial sequence of the gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPDH). There was significant difference in isolament frequency among sites and plant tissues. In the locality of Aldeia (site III) it was observed the highest isolation frequency. The old limb was the part of plant most colonized in a higher number of sites. *Colletotrichum asianum*, *C. fructicola*, *C. cliviae*, *C. boninense* and two unidentified species were found as endophyte in mango, and *C. asianum* was prevalent over the other. All isolates were pathogenic in mango fruits. The phylogenetic analysis revealed groupings that were congruent with morphological characters, but did not group isolates according to phenotypic characters. There was no distribution pattern of species in different areas, neither in plant tissues.

Keywords: anthracnose, distribution, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPDH), *Mangifera indica*, phylogeny, polyphasic approach

Capítulo I

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

1. A cultura da mangueira

A mangueira (*Mangifera indica* L.) é uma frutífera que pertence à família Anacardiaceae e à classe Dicotiledônea. É originária do sul da Ásia, do centro Indiano e do subcentro Indo-Malaio (PINTO, 2004). A cultura é bem adaptada a regiões com estações secas e chuvas bem definidas. A planta vegeta e frutifica numa faixa de 0 a 48°C. No entanto, a temperatura ótima para o crescimento e desenvolvimento situa-se entre os níveis de 24 a 26°C, uma vez que temperaturas elevadas ou muito baixas prejudicam o crescimento, desenvolvimento e produção, afetando a qualidade dos frutos. Temperaturas muito baixas podem causar a morte de plantas jovens, folhas e frutos pequenos. A exigência mínima da mangueira em termos de precipitação é de 1.000 mm/ano, no entanto é cultivada em regiões que apresentam de 500 a 2.500 mm/ano. Regiões com umidade relativa do ar abaixo dos 60% são ideais para o cultivo da mangueira (CUNHA et al., 2000).

Do conjunto de frutas atualmente comercializadas, a manga é uma das mais populares do mundo em virtude do seu amplo consumo nos países asiáticos e na América Latina (NETO; REINHARDT, 2003). É uma das mais importantes frutas produzidas no Brasil quanto ao aspecto socioeconômico, pois contribui significativamente para a pauta de exportações brasileiras de frutas frescas, fortalecendo a balança comercial (MELO et al., 2009).

O Brasil apresentou, no ano de 2010, uma área plantada de 76.568 hectares com rendimento médio de 15,83 t/ha, o que correspondeu a uma produção de 1.188.911 t com valor estimado de 600 milhões de reais (IBGE, 2010).

No ano de 2009, o Brasil exportou 110.202 t de manga, o equivalente a 97.388 milhões de reais. Até o mês de julho de 2010, as exportações chegavam a 45.207 t, sendo a maior parte (26.742 t) destinada aos Países Baixos (AGRA FNP, 2011). Ao final de 2010, o volume final exportado foi de 124.694 t, montante que proporcionou receitas de aproximadamente 120 milhões de dólares (IBRAF, 2011).

O Nordeste é maior região produtora de manga do Brasil, com destaque para o Submédio do Vale do São Francisco (Bahia e Pernambuco) e, em menor escala, a mesorregião do Centro-Sul Baiano (CORREIA; ARAUJO, 2010). No Nordeste, a manga é

cultivada em todos os estados, em particular nas áreas irrigadas da região semi-árida, que apresentam excelentes condições para o desenvolvimento da cultura e obtenção de elevada produtividade e qualidade de frutos. No ano de 2009, o Vale do São Francisco contava com aproximadamente 23.000 hectares de mangueiras em produção, com perspectivas de aumento de área, principalmente em função das condições climáticas favoráveis e da implantação de novos perímetros irrigados (MELO et al., 2009).

As variedades cultivadas com maior frequência na região do Vale do São Francisco são "Tommy Atkins", "Haden", "Keitt", "Kent", "Palmer", "Rosa" e "Espada". Enquanto as cinco primeiras visam principalmente o mercado consumidor internacional, as duas últimas são direcionadas, sobretudo, aos diversos mercados consumidores nacionais (CORREIA; ARAUJO, 2010).

Muitos problemas são encontrados na cadeia produtiva da mangueira e, em muitos casos, limitantes à sua exploração comercial. As doenças de plantas são responsáveis por grandes perdas em culturas de importância econômica, principalmente aquelas que ocorrem em frutíferas no período pós-colheita, frequentemente de etiologia fúngica. A intensificação do cultivo e algumas práticas não adequadas de manejo têm gerado problemas fitossanitários e conseqüentemente perdas na produção, que podem ser quantitativas (redução na produção) e qualitativas (afeta a aparência dos frutos) (BATISTA; BARBOSA, 2008).

Dentre as doenças que ocorrem na mangueira, destacam-se a malformação floral e vegetativa ou embonecamento (*Fusarium subglutinans* Wollenweb et. Reinking), o oídio (*Oidium mangiferae* Bert.), a morte-descendente [*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon et. Maubl], podridões pedunculares em frutos [*L. theobromae*, *Pestalotiopsis mangiferae* (Henn.) Steyaert, *Alternaria alternata* (Fr.) Kiessler, e *Fusicoccum* spp.] e a antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. et Sacc., uma das doenças mais frequentes e que, em geral, causa as maiores perdas econômicas em áreas produtoras de manga no mundo (BATISTA; BARBOSA, 2010).

No Nordeste brasileiro, a antracnose é a principal doença de frutos em pós-colheita em diversas culturas de elevada importância econômica (SILVA, 2007).

2. Antracnose da mangueira

A antracnose é causada por espécies de *Colletotrichum* Corda, gênero de grande importância nas regiões tropicais. No Brasil, a antracnose encontra-se amplamente

disseminada em todas as regiões produtoras de manga, e varia quanto à incidência e severidade conforme os níveis de umidade do ambiente (CUNHA et al., 2000).

No Brasil, estudos envolvendo caracterização morfológica, patogênica e molecular sugerem que *C. gloeosporioides* é o único agente etiológico da antracnose da mangueira (PERES et al., 2002). Em contrapartida, na Austrália, além dessa espécie há também comprovação da participação de sua variante, *C. gloeosporioides* var. *minor* J. H. *C. acutatum* Simmonds, com uma participação menos significativa, também ocorre na Austrália e na Índia (FITZELL, 1979; PLOETZ, 1994). Na Colômbia, identificou-se apenas a espécie *C. gloeosporioides* causando antracnose em manga (AFANADOR-KAFURI et al., 2003; MARTÍNEZ et al., 2009). Avaliando a ocorrência e distribuição de *Colletotrichum* spp. em manga nos Estados Unidos e Porto Rico, através de características morfológicas, sorológicas e moleculares, em um total de 183 isolados, 93% foram identificados como *C. gloeosporioides*, 5% como *C. acutatum*, e 3% não se enquadraram em nenhuma destas espécies (VARGAS et al., 2006). Jayasinghe e Fernando (2009) relataram pela primeira a ocorrência de *C. acutatum* causando antracnose em manga no Sri Lanka.

O fungo denominado *C. gloeosporioides* é o estágio anamórfico do ascomiceto *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld et. Schrenk, sendo a fase do ciclo de vida do patógeno responsável pelos processos infecciosos e consequente desenvolvimento dos sintomas da antracnose em mangueira (PLOETZ, 1994) e em outras culturas hospedeiras.

Em mangueira, os sintomas da antracnose podem ocorrer em folhas, ramos, pecíolos, inflorescências (panículas) e frutos (NELSON, 2008). Nas folhas, a doença se inicia como manchas circulares pequenas, de coloração marrom e com a borda mais escura e irregular, com halo clorótico, geralmente próximas aos bordos foliares, e não são limitadas pelas nervuras. Em folhas jovens (com coloração bronze ou verde pálido) a doença pode ocorrer quando estas são emitidas no período chuvoso. Estas lesões geralmente permanecem pequenas, porém, em condições de umidade e temperatura elevadas, elas aumentam suas dimensões e coalescem, formando áreas lesionadas com mais de 1 cm de diâmetro. O centro de lesões mais velhas se deteriora e se desprende da folha causando perfurações (PLOETZ, 1994; PITKETHLEY; CONDE, 2007).

Nas inflorescências, os primeiros sintomas são pontuações de coloração marrom-escura ou preta, as quais aumentam em tamanho, coalescem, e matam as flores antes da formação dos frutos, reduzindo significativamente a produção (NELSON, 2008).

Em ramos, a antracnose pode causar morte dos ponteiros, embora não ocorra comumente. Em casos graves, ocorrem lesões enegrecidas e alongadas, que secam os galhos a partir das pontas (PLOETZ, 1994).

Frutos pequenos podem ser infectados, apresentando várias manchas pequenas de coloração marrom, sendo abortados no início do seu desenvolvimento. Quando os frutos ultrapassam 5 cm de diâmetro o aborto é menos frequente, e o desenvolvimento da infecção tende a parar logo que o apressório é formado (PLOETZ, 1994). Neste momento a infecção torna-se quiescente, e algumas vezes pode ser detectada pela presença de áreas acinzentadas levemente deprimidas na casca de frutos em amadurecimento (PITKETHLEY; CONDE, 2007). Na casca de frutos maduros, antes ou após a colheita, surgem pequenas manchas arredondadas, deprimidas de coloração marrom escura ou preta. Essas lesões comumente coalescem e atingem o interior dos frutos, causando uma extensa decomposição da polpa. Um segundo tipo de sintoma é a “mancha em lágrima”, que são regiões lineares necrosadas nos frutos, que podem ou não estarem associadas a rachaduras superficiais na epiderme que dão ao fruto o aspecto de “pele de crocodilo”, ou podem se desenvolver em largura, causando fendas profundas que se estendem da epiderme à polpa (NELSON, 2008).

O patógeno produz uma grande quantidade de conídios em massas mucilaginosas de coloração variando do rosa ao laranja (acérvulos), principalmente em condições de elevada umidade, sobre folhas e inflorescências infectadas e frutos abortados mumificados. Os conídios são disseminados por respingos de chuva e causam novas infecções em qualquer órgão da planta. No entanto, durante o armazenamento, não é comum o fungo ser disseminado de um fruto para outro. Os conídios de *Colletotrichum* spp. produzidos em outros hospedeiros, como abacate, mamão, banana e citros, também podem infectar e causar doenças em frutos de manga (AGRIOS, 2005; PITKETHLEY; CONDE, 2007).

3. O gênero *Colletotrichum*

Os fungos do gênero *Colletotrichum* e seu teleomorfo *Glomerella* encontram-se distribuídos por todo o mundo, especialmente como causadores de problemas na pré e na pós-colheita nas regiões tropicais (SUTTON, 1992).

O gênero *Colletotrichum*, descrito por Corda em 1837, é um Ascomiceto (ordem Sordariales, família *Glomerellaceae*) que compreende várias espécies, incluindo saprófitas e

fitopatogênicas, tendo *C. dematium* (Pers. & Fr.) Grove como a espécie-tipo (SUTTON, 1980).

Colletotrichum spp. têm como características: micélio imerso, ramificado, septado, hialino, marrom pálido ou marrom escuro. Conidiomata do tipo acervular, subcuticular, epidermal, subepidermal ou peridermal, separada ou confluenta, com parede hialina ou marrom, fina ou espessa, com textura angular e deiscência irregular. Esclerócios às vezes presentes em culturas, coloração variando do marrom escuro ao preto, frequentemente confluentes, ocasionalmente setosos. Setas em conidiomatas ou esclerócios, marrons, lisas, septadas e de ápice cônico. Conidióforos hialinos a marrons, septados, ramificados apenas na base, lisos, formados nas células superiores do acérvulo. Células conidiogênicas enteroblásticas, fialídicas, hialinas, lisas, determinadas, cilíndricas, integradas ou discretas, com canal diminuto, mas ocasionalmente com colarete e espaçamento periclinal bastante proeminente. Conídios hialinos, não septados (exceto no início da germinação), retos ou falcados, lisos, com parede fina, às vezes gutulados, não aristados ou com o ápice prolongado em um simples apêndice celular. Apressórios marrons, com margens contínuas ou irregulares, simples ou germinando repetidamente para formar colunas complexas de vários apressórios conectados (SUTTON, 1980).

Cerca de 900 espécies já foram descritas ou transferidas para o gênero *Colletotrichum* (BAILEY; JEGER, 1992). A circunscrição de espécies para o gênero *Colletotrichum* foi por longa data realizada com base em critérios descritivos clássicos, como dimensões dos conídios, presença, ausência e morfologia das setas. Outros critérios complementares foram incluídos posteriormente, como a gama de hospedeiros e os tipo de dano causado (SUTTON, 1980).

Segundo Von Arx. (1957), Stoneman, em 1898, encontrou a forma ascógena em antracnose provocada por espécies de *Gloeosporium*, e as colocou em um novo gênero então denominado *Gnomoniopsis*. No entanto, esse nome já havia sido ocupado com outro fungo por Berlese em 1892. Em 1903, Von Schrenk e Spaulding mudaram a classificação para *Glomerella*, contendo cinco espécies. Em 1957, Von Arx identifica que o conídio da espécie tipo do gênero tem duas células, o que foi aceito posteriormente, sendo transferido para o gênero *Marsonina*. Ainda neste mesmo ano, Von Arx concluiu que vários anamorfos dos gêneros *Colletotrichum*, *Vermicularia* e *Gloeosporium* pertenciam ao mesmo grupo, e aceitou o nome *Colletotrichum* proposto por Corda, e o número de espécies foi drasticamente reduzido de várias centenas para 11. Posteriormente, Sutton critica a classificação de Von

Arx, afirmando que esta foi baseada em informações experimentais insuficientes, além de uma inadequada examinação ou citação do material original, e em 1980 publica uma compilação de opiniões contemporâneas relacionadas à taxonomia de Coelomycetes, onde o gênero *Colletotrichum* foi dividido em 22 espécies, e espécies como *C. gloeosporioides*, *C. dematium*, *C. capsisi* (Sydow) E. Butler & Bisby e *C. sublineolum* P. Henn. Kabat & Bubák foram designados como grupos de espécies. Esse número de espécies continuou variável com o passar dos anos, variando de 40 em Sutton (1992) a 60 no Dicionário de Fungos (KIRK et al., 2008)

A identificação de espécies de *Colletotrichum* baseada na morfologia tem sido sempre problemática, pois são poucas as características confiáveis, e muitas dessas características são plásticas, variando conforme os métodos e condições experimentais (CAI et al., 2009). A diferenciação baseada no hospedeiro ou gama de hospedeiros não é consistente, pois taxa como *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *C. graminicola* (Ces.) Wils, dentre outros, infectam uma ampla gama de hospedeiros. Outro aspecto é que pelo conceito de espécie biológica, grupos de isolados patogênicos e não patogênicos, podem ambos ser incluídos em uma única espécie (SUTTON, 1980, 1992).

Quando se trata do conceito de espécie biológica, baseado em testes de compatibilidade, o seu uso torna-se impraticável devido à baixa frequência e imprevisibilidade quanto à ocorrência do teleomorfo *Glomerella*, tanto em condições naturais como em meios de cultura (ROJAS et al., 2010).

Devido à taxonomia convencional do gênero *Colletotrichum* não ser satisfatória, há a tendência de se utilizar um estudo polifásico para a identificação, o que reflete na classificação de espécies e taxa sub-específicos dentro do gênero (SUTTON, 1992; CANNON et al., 2000).

A utilização de caracteres moleculares como dados de sequências de DNA apresenta-se como uma ferramenta vantajosa para a taxonomia de fungos, uma vez que podem ser analisadas estatisticamente para inferir relações filogenéticas. A combinação dos conceitos de espécie filogenética com caracteres moleculares pode superar a maioria das limitações associadas ao conceito biológico e outros conceitos de espécie (SHENOY; JEEWON; HYDE, 2007). Com o rápido progresso dos métodos de filogenia molecular, atualmente é possível reconhecer clados estáveis e bem resolvidos dentro do gênero *Colletotrichum* (CAI et al, 2009).

A região ITS (Internal Transcribed Spacer) do 5.8S rDNA é a mais amplamente sequenciada em estudos filogenéticos do gênero *Colletotrichum*, e conseqüentemente, primers baseados nessa região (MILLS et al., 1992) foram utilizados nos últimos 10-15 anos como um primer espécie-específico para *C. gloeosporioides*. No entanto, atualmente já são conhecidas as limitações do ITS e outros marcadores, e o desenvolvimento e uso de *loci* mais informativos tornou-se cada vez mais necessário (SILVA et al., 2011).

Análises filogenéticas, principalmente baseadas em seqüências de regiões do rDNA, têm indicado que os complexos de espécies de *Colletotrichum* compreendem um número variável de clados monofiléticos. No entanto, essas seqüências não são o suficientemente variáveis para diferenciar linhagens intimamente relacionadas. Por outro lado, informações de seqüências como a região HMG (High Mobility Group) do gene MAT1-2 apresentam um maior grau de divergência que as da região ITS do rDNA, sendo possível diferenciar grupos de isolados dos complexos de espécies *C. graminicola* Ces., *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* (DU et al., 2005).

Cai et al. (2009) sequenciaram os genes ITS, GPDH (glicerol-3-fosfato desidrogenase) CAL (calmodulina), ACT (actina), CHS (quitina sintase), e EF1 α (fator de alongação 1 α) de 64 isolados de *C. gloeosporioides sensu lato*, distribuídos em 5 grupos através de filogenia multigênica e os avaliaram quanto à separabilidade e heterogeneidade. Quanto à separabilidade, que é a capacidade do gene em separar os grupos (variabilidade inter-específica), os genes GPDH, CAL e ACT apresentaram os maiores valores, sendo considerados bons candidatos para identificação de espécies. Quanto à heterogeneidade (variação intra-específica), conforme esperado, os valores foram mais baixos que os de separabilidade, com exceção do gene EF1 α , que apresentou valores maiores devido à alta variabilidade de íntrons, sendo um gene bastante informativo para estudos em nível de população. Em trabalho similar com espécies de *Colletotrichum* de conídio falcado em hospedeiros herbáceos, dentre os genes ITS, ACT, CHS, GPDH, histona 3 e beta-tubulina, a separabilidade de espécies foi maior para os genes GPDH e histona 3 (DAMM et al., 2009).

Resultados interessantes baseados em análises filogenéticas podem ser observados em estudos de comparação entre isolados patogênicos e não patogênicos de *Colletotrichum* spp. obtidos de cacaueteiro e outras plantas no Panamá (ROJAS et al., 2010). Através do sequenciamento da região 5' *tef1* do fator de alongação-1 α , observou-se que as espécies *C. theobromicola* Delacr. e *Colletotrichum* sp. indet. 1 formam clados distintos, incluindo apenas isolados patogênicos à folhas e frutos do cacaueteiro. Em contraste, a maioria dos isolados

endofíticos assintomáticos foram agrupados em clados que não continham isolados fitopatogênicos.

O que se sugere é que, futuramente, uma abordagem polifásica deva ser adotada antes de novas espécies de *Colletotrichum* serem introduzidas ou epitipos serem designados, devendo-se incorporar dados moleculares, morfológicos, fisiológicos e relacionados à patogenicidade (CAI et al., 2009).

4. Formas de vida de *Colletotrichum* spp.

Como fitopatógeno, *Colletotrichum* spp. é o principal causador de antracnose e podridões de pré e pós colheita de frutos, além de causar tombamentos, e requeima de flores e plântulas (BAYLEY; JEGER, 1992).

Além da sua ocorrência como fitopatógeno, o mesmo pode crescer saprofiticamente. Um isolado não fitopatogênico de *C. gloeosporioides* pode facilmente crescer sobre o tecido necrosado por algum isolado fitopatogênico, ou mesmo por outra espécie do gênero (UCHIDA; KADOOKA, 1997). No patossistema *C. gloeosporioides* × mangueira, o fungo sobrevive na forma saprofítica até um período ambiental favorável à infecção em ramos mortos, lesões antigas, frutos e partes afetadas remanescentes no solo, sobre os quais esporula quando há calor e umidade (CUNHA et al., 2000).

Adicionalmente, isolados deste gênero e de outros gêneros causadores de antracnose, são comumente isolados como endofíticos de uma ampla gama de hospedeiros (STONE et al., 2004).

Em estudo de caracterização de isolados endofíticos e patogênicos de *Colletotrichum* de plantas herbáceas na Tailândia através da caracterização morfológica foram diferenciados três grupos morfológicos distintos dentro da espécie *C. gloeosporioides* incluindo isolados patogênicos e todos os endofíticos, além das espécies *C. musae* (Berk. & M.A. Curtis) Arx e *C. truncatum* (Schwein.) Andrus & W.D. Moore. Através da caracterização molecular baseada em sequências da região ITS, isolados patogênicos de banana e um isolado endofítico de gengibre foram identificados com *C. musae* com 97% de suporte pelo teste de bootstrap. Isolados patogênicos a soja agrupados com a espécie *C. truncatum*, e isolados endofíticos agrupados com as espécies *G. acutata* Guerber & Correll e *C. boninense* Moriwaki, Toy. Sato

& Tsukib apresentaram 100% de suporte. Apenas um isolado endofítico foi agrupado com *C. coccodes* (Wallr.) Hughes com 58% de suporte (PHOTITA et al., 2005).

Rojas et al. (2010) em estudo de filogenia baseada em sequências *multilocus* de *C. gloeosporioides sensu lato* em diversos hospedeiros no Panamá, observaram a formação de nove subgrupos dentro da espécie *C. gloeosporioides*. Isolados patogênicos ao cacau foram identificados como *C. theobromicola* Delacr.. A espécie *C. ignotum* Rojas, Rehner & Samuels compreendeu isolados endofíticos assintomáticos de cacau e outras plantas. Duas espécies não identificadas formaram clados com isolados endofíticos assintomáticos. Dois grupos externos (*outgroups*) não puderam ser identificados através das características morfológicas, nem a partir das sequências disponíveis.

Espécies ou isolados de *Colletotrichum* podem restritamente habitar o interior o interior de tecidos do hospedeiro sem causar doenças a este. No entanto, sabe-se que isolados fitopatogênicos podem apresentar o endofitismo como uma fase do processo infeccioso, no qual o patógeno penetra e mantém-se em estado de quiescência até que as condições ideais para o desenvolvimento da doença sejam estabelecidas (AGRIOS, 2005).

Dentre as diversas definições propostas para microrganismos endofíticos, a mais comumente utilizada engloba todos os microrganismos habitantes de órgãos vegetais que, em algum período do seu ciclo de vida podem colonizar tecidos vegetais internos sem causar danos aparentes ao hospedeiro (PETRINI, 1991).

Os fungos endofíticos podem infectar plantas através de transmissão horizontal ou vertical. Na transmissão horizontal, o inóculo é transportado de uma planta para outra e na vertical, eles infectam plantas novas a partir de uma semente já infectada. A transmissão horizontal aparenta ser o mecanismo de dispersão predominante de espécies endofíticas (ZABALGOGAEZCO, 2008).

Diferentes tipos de simbiose ocorrem entre os endófitas e as plantas. Dependendo da espécie envolvida, o resultado da interação planta-endófito pode variar do antagonismo ao mutualismo (ZABALGOGAEZCO, 2008). Endófitas têm despertado grande interesse dos pesquisadores nos últimos anos devido aos seus benefícios à planta hospedeira como a produção de metabólitos secundários envolvidos na defesa da planta contra herbívoros e patógenos (GIMENEZ et al., 2007). Por outro lado, relatos de infecções assintomáticas indicam que tanto um isolado avirulento ou hipovirulento de um conhecido fungo fitopatogênico pode estar latente no interior de tecidos do hospedeiro, bem como um fungo

patogênico pode ter uma fase latente antes de causar danos ao seu hospedeiro (FISHER; PETRINI, 1992).

Alguns fungos endofíticos são conhecidos por serem patógenos quiescentes (latentes) (HYDE; SOYTONG, 2008). Recentes observações e hipóteses sobre fungos endofíticos afirmam que a colonização assintomática é um equilíbrio de antagonismos entre o patógeno e o hospedeiro (DEVARAJU; SATISH, 2010). A infecção quiescente de plantas por patógenos é uma situação em que o patógeno infecta a planta, porém esta não exhibe sintomas da doença (PHOTITA et al., 2004). Posteriormente, em função de uma mudança ambiental, estresse nutricional da planta ou estágio de maturação da planta ou do patógeno, são então produzidos os sintomas da doença (AGRIOS, 2005). Além destas mudanças, uma predisposição genética do hospedeiro aparenta ser importante para o sucesso da infecção por um endófito (FISHER; PETRINI, 1992). Segundo Prusky (1996), os mecanismos envolvidos na inibição da colonização são: efeitos do hospedeiro e requerimentos nutricionais do patógeno; compostos antifúngicos pré formados; elicitação de fitoalexinas; e falha na produção de quantidades adequadas de fatores de patogenicidade.

A espécie *C. gloeosporioides* é conhecida por causar doenças quiescentes em pós-colheita (PRUSKY; PLUMBLEY, 1992), e isolados endofíticos são comumente encontrados em partes sadias de plantas (CANNON; SIMMONS, 2002; LUBBE et al., 2004; PHOTITA et al. 2004, 2005).

Rojas et al. (2010) sugerem que as espécies *C. ignotum* e *C. tropicale* podem infectar assintomaticamente folhas e frutos do cacaueteiro, e que após as mudanças a nível intra e intercelular que ocorrem durante a maturação dos frutos, estas espécies isoladas como endofíticos podem passar para uma colonização ativa resultando em podridão, e que por razões desconhecidas não causam sintomas em folhas.

Wei et al. (2002) observaram que a expressão do gene *pnl-2* que codifica a produção de pectina-liase extracelular foi baixa durante a infecção de *C. gloeosporioides* f. sp. *malvae* em *Malva pusila* Sm., possivelmente devido a uma maior sensibilidade à repressão catabólica. Também sugerem que essa repressão catabólica ocorre devido aos baixos níveis de açúcares nos tecidos do hospedeiro, e que em fungos hemibiotróficos como *Colletotrichum*, a mudança da fase biotrófica para a necrotrófica ocorre devido às enzimas que degradam a parede celular deixarem de ser afetadas pelos açúcares, através da produção de diferentes isoenzimas reguladas por diferentes vias aos diferentes estágios de desenvolvimento da doença.

Em outras instâncias, propágulos de fungos saprófitas são transportados na forma de aerossóis ou por respingos e então depositados na superfície de tecidos vegetais, onde iniciam seu desenvolvimento, penetram e permanecem dormentes. O crescimento ativo no interior dos tecidos vegetais é iniciado apenas após a senescência, quando então passam de endofíticos para colonizadores primários da matéria orgânica (CANNON; SIMMONS, 2002).

Devido a esses diferentes estilos de vida de *Colletotrichum* spp., é importante saber se os isolados endofíticos encontrados em diferentes tecidos da mangueira não são isolados fitopatogênicos em fase quiescente, e que exteriorizam-se na forma de doença quando em contato com frutos suscetíveis. Também é necessário elucidar quais as espécies que estão associadas aos modos de vida fitopatogênico e endofítico, pois é sabido que espécies diferentes dentro de um mesmo gênero costumam ser variáveis quanto à suscetibilidade à tratamentos preventivos e curativos com a utilização de produtos químicos.

Quando se trata do gênero *Colletotrichum*, a sua taxonomia clássica baseada em características morfológicas e culturais é complexa, pois estas características são comumente variáveis conforme as condições de cultivo. Neste âmbito, a biologia molecular torna-se de grande valia por disponibilizar métodos alternativos para estudos taxonômicos que são importantes ferramentas na resolução de problemas de delimitação de espécies (MACLEAN et al., 1993).

Técnicas moleculares para identificação de espécies que utilizam o sequenciamento de determinadas regiões do genoma do fungo podem ser utilizadas para elucidar as relações filogenéticas entre os diversos isolados, pois sabe-se que uma única espécie de *Colletotrichum* pode englobar tanto isolados fitopatogênicos, bem como saprófitas e endofíticos.

Baseado nesses pressupostos, a presente dissertação teve como objetivos avaliar a distribuição de *Colletotrichum* spp. endofíticos de diferentes partes da mangueira em cinco áreas no Estado de Pernambuco, caracterizar esses isolados a nível cultural, morfológico patogênico e molecular, identificar as espécies prevalentes e determinar as relações filogenéticas entre esses isolados endofíticos e isolados sintomáticos em frutos de manga.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

AGRA FNP. **Agrianual 2011**- anuário da agricultura brasileira. São Paulo: Agra FNP, 2011. 564 p.

AGRIOS, G. N. Plant disease caused by fungi. In: AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. p. 385-614.

BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. 338 p

BATISTA, D. C.; BARBOSA, M. A. G. Doenças da mangueira. In: FEIRA NACIONAL DA AGRICULTURA IRRIGADA, 1., Petrolina, PE, Brasil, 2008. **Minicursos** [CD-ROM]. Petrolina, 2008.

CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; WALLER, J. M.; 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**, Kunming, v. 39, p. 183-204, 2009.

CANNON, P. F.; SIMMONS, C. M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**, Laurence, v. 94, p. 210–220, 2002

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

CORREIA, R.C.; ARAUJO, J.L.P. **Cultivo da mangueira**. 2. ed. Petrolina: Embrapa Semi-Arido, 2010. Disponível em:

http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira_2ed/mercado.htm. Acesso em: 10 jan. 2012.

CUNHA, M. M.; SANTOS FILHO, H. P.; NASCIMENTO, A. S. **Manga**: fitossanidade. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, 2000, 104 p. (Embrapa. Frutas do Brasil, 6).

DAMM, U.; WOUDEBERG, J.H.C.; CANNON, P.F.; CROUS, P.W. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, p. 45-87, 2009.

DEVARAJU, R.; SATISH, S. Endophytic fungi: 'trapped' or 'hidden' store houses of bioactive compounds within plants: A Review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 12, p. 2986-2989, 2010.

DU, M.; SCHARDL, C. L.; VAILLANCOURT, L. J. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution on *Colletotrichum* species complexes. **Mycologia**, Lawrence, v. 97, n. 3, p.641- 658. 2005.

FISHER, P. J.; PETRINI, O. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). **New Phytologist**, Cambridge, v. 120, p. 137-143, 1992.

GIMÉNEZ, C.; CABRERA, R.; REINA, M.; COLOMA, A. Fungal endophytes and their role in plant protection. **Curr. Org. Chem.**, v. 11, p. 707-720, 2007

FITZELL, R. D. *Colletotrichum acutatum* as a cause of anthracnose of mango in New South Wales. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 63, p. 1067-1070, 1979

HYDE, K.D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 33, p. 163-173, 2008.

IBRAF. **Comparativo das exportações brasileiras de frutas frescas 2010-2009**. Disponível em:

<http://www.ibraf.org.br/estatisticas/Exportação/Comparativo_das_Exportações_Brasileiras_de_Frutas_frescas_2010-2009.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **SIDRA 97**: Sistema IBGE de recuperação automática. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010. Disponível em:
<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo/acervo2.asp?e=v&p=PA&z=t&o=10>>. Acesso em: 29 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.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; DAVID, J. C.; STALPERS, J. A. CABI. **Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi**. 9. ed. Wallingford: CAB International, 2001. 655 p.

LUBBE, C. M.; DENMAN, S.; CANNON, P. F.; GROENEWALD, J. Z.; LAMPRECHT, S. C.; CROUS, P. W. Characterization of *Colletotrichum* species associated with diseases of proteaceae. **Mycologia**, Laurence, v. 96, n. 6, p. 1268-1279, 2004.

MACLEAN, D. J.; BRAITHWAITE, K. S.; MANNERS, J. M.; IRWING, J. A. G. How do we identify and classify fungal pathogens in the era of DNA analysis? **Advances in Plant Pathology**, London, v. 10, p. 207-244, 1993.

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

MILLS, P. R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 98, p.137-143, 1992.

MELO,R.B ; SILVA, J. S.; CANDIDO, A. S.; FEITOSA, T. B. ; SOUZA, O. C. Análise da produção e da exportação de manga no Pólo Petrolina(PE)/Juazeiro(BA). In: ENCONTRO NORTE E NORDESTE DE CIÊNCIAS E ENGENHARIA DE MATERIAIS, 2., Teresina, PI, 2009. **Anais ...** Teresina: Editora Universitária da UFRN, 2009.

NELSON, S. C. Mango anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). **Plant Disease**, St. Paul, PD-48, 9 p., 2008.

NETO, M. T. C.; REINHARDT, D. H. Relações entre parâmetros de crescimento do fruto da manga cv. Haden. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 36-38, 2003.

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.

PETRINI, O. Fungal endophytes in tree leaves. In: ANDREWS, J. W.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer, 1992. p. 179-197.

PINTO, A. C. Q. Melhoramento genético da manga (*Mangifera indica* L.) no Brasil. In: ROZANE, D. E.; DAREZZO, R. J.; AGUIAR, R. L.; AGUILERA, G. H. A.; ZAMBOLIM, L. (Eds.). **Manga: produção integrada, industrialização e comercialização**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004. p. 17-78.

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D.; Are 33 some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? **Fungal Diversity**, Kunming, v. 16, p. 131-140, 2004.

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

PITKETHLEY, R.; CONDE, B. Mango anthracnose. **Plant Pathology**, Oxford, agnote n° 123, 2007.

PLOETZ, R. C. Mango diseases caused by fungi: antracnose. IN: PLOETZ, R. C., ZENTMEYER, G. A., NISHIJIMA, N. T., ROHRBASCH, K. G.; OHR, H.D. (Eds.). **Compendium of tropical fruit diseases**. St. Paul: APS Press, 1994. p. 35-36

PRUSKY, D. Pathogen quiescence in postharvest diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 413–434, 1996.

PRUSKY, D.; PLUMBLEY, R.A. **Quiescent infections of *Colletotrichum* in tropical and subtropical fruits**. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control* (eds. J.A. Bailey; M.J.Jeger). CAB International: Wallingford. p.289-307. 1992.

ROJAS, E. I.; REHNER, S. A.; SAMUELS, G. J.; VAN BAEL, S. A.; HERRE, E. A.; CANNON, A.; CHEN, R.; PANG, J.; WANG, R.; ZHANG, Y.; PENG, Y.; SHA, T. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. **Mycologia**, Lawrence, v. 102, n. 6, p. 1318–1338, 2010.

SHENOY, B. D., JEEWON, R.; HYDE, K. D. Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic Fungi. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 26, p. 1-54, 2007.

SILVA, G. F. **Eficiência de diferentes produtos fungicidas no controle da antracnose em manga**. 2007. 49 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró.

SILVA, D.N.; TALHINHAS, P.; VÁRZEA, V.; CAI, L.; PAULO, O.S.; BATISTA, D. Application of the Apn2/MAT locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: an example from coffee (*Coffea* spp.) hosts. **Mycologia**, Lawrence (DOI 10.3852/11-145), 2011.

STONE, J.K.; POLISHOOK, J.D.; WHITE, J.J.F. Endophytic Fungi. In: MUELLER, G.M.; BILLS, G.F.; FOSTER, M.S. (eds), **Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods**:. Academic Press, Burlington, pp. 241-270, 2004.

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

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes**. London: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.

UCHIDA, J. Y.; KADOOKA, C. Y. *Colletotrichum* leaf spot of red sealing wax palm. **Plant Disease**, St. Paul, PD-10, 1997.

VON ARX, J. A. Revision der zu *Gloeosporium* gestellten pilze. **Natuurkunde**, Amsterdam, v.51, p. 1-153, 1957

WEI, Y.; SHIH, J.; LI, J.; GOODWINA, P. H. Two pectin lyase genes, *pnl-1* and *pnl-2*, from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* differ in a cellulose-binding domain and in their expression during infection of *Malva pusilla*. **Microbiology**, New York, v. 148, p. 2149-2157, 2002

ZABALGOGEAZCOA, I. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 6, p. 138-146, 2008.

Capítulo II

Prevalência de isolados de *Colletotrichum* spp. endofíticos em mangueira

1 **Prevalência de isolados de *Colletotrichum* spp. endofíticos em mangueira**

2

3 Willie A. S. Vieira¹, Nelson B. Lima¹, Marília W. Marques¹, Sami J. Michereff¹, Marcos P. S.

4 Câmara¹

5

6 ¹Área de Fitossanidade, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de

7 Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brasil.

8

9 Autor para correspondência: Marcos P. S. Câmara, e-mail: mcamara@depa.ufrpe.br

10

11 **RESUMO**

12 A identidade das espécies de *Colletotrichum* endofíticas em mangueira é desconhecida. No
13 presente estudo são relatadas as espécies de *Colletotrichum* endofíticos associadas a
14 mangueira no Estado de Pernambuco (Brasil) e sua distribuição nos diferentes tecidos da
15 planta em cinco áreas de cultivo. Os isolados foram caracterizados por inferência filogenética
16 baseada na sequência parcial do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPDH), pelas
17 características culturais e morfológicas, bem como patogenicidade e virulência. Houve
18 diferença significativa na frequência de isolamento de *Colletotrichum* em função da área de
19 cultivo e do tecido da planta. Na localidade de Aldeia foi observada a maior frequência de
20 isolamento de *Colletotrichum*. O limbo velho foi a parte da planta mais colonizada na maioria
21 das áreas. *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. siamense*, *C. cliviae*, *C. boninense* e duas espécies não
22 identificadas de *Colletotrichum* foram detectados como endófitos em manga. A análise
23 filogenética revelou agrupamentos que foram congruentes com as características morfológicas
24 analisadas. Não houve padrão de prevalência das espécies em diferentes tecidos da planta e
25 áreas de cultivo. Todos os isolados de *Colletotrichum* foram patogênicos em frutos de manga.

26

27 **Palavras-chave:** abordagem polifásica, antracnose, distribuição, filogenia, gliceraldeído 3-
28 fosfato desidrogenase (GPDH)

29

30 **Prevalence of *Colletotrichum* spp. isolates endophytes in mango**

31

32 **ABSTRACT**

33 The identity of *Colletotrichum* species endophytes in mango is unknown. In the current study
34 the *Colletotrichum* species isolated from mango in Pernambuco state in Brazil are described,
35 as well as their distribution in different plant tissues. The *Colletotrichum* isolates were
36 characterized through phylogenetic inference based on glyceraldehyde-3-phosphate
37 dehydrogenase (GPDH), by cultural and morphological characters, as well as pathogenicity and
38 virulence. There was significant difference in isolament frequency among sites and different
39 plant tissues. In the locality of Aldeia it was observed the highest *Colletotrichum* isolation
40 frequency. The old limb was the part of plant most colonized in a higher number of sites. *C.*
41 *asianum*, *C. fructicola*, *C. siamense*, *C. cliviae*, *C. boninense* and 2 unidentified species were
42 found as endophyte in mango. The phylogenetic analysis revealed groupings that are
43 congruent with morphological characters analyzed. There was no prevalence pattern of
44 species in different plant tissues and cultivation areas. All *Colletotrichum* isolates were
45 pathogenic in mango fruits.

46

47 **Keywords:** anthracnose, distribution, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPDH),
48 phylogeny, polyphasic approach

49

50

51 INTRODUÇÃO

52

53 Dentre as frutas comercializadas, a manga é uma das mais populares do mundo, em
54 virtude do seu amplo consumo nos países asiáticos e na América Latina (Neto & Reinhardt,
55 2003). É também uma das mais importantes frutas produzidas no Brasil quanto ao aspecto
56 socioeconômico, pois contribui significativamente para a pauta de exportações brasileiras de
57 frutas frescas, fortalecendo a balança comercial (Melo et al., 2009).

58 Muitos problemas são encontrados na cadeia produtiva da mangueira e, em muitos
59 casos, limitantes a sua exploração comercial (Batista & Barbosa, 2008). No Nordeste
60 brasileiro, antracnose é a principal doença de frutos em pós-colheita em diversas culturas de
61 elevada importância econômica (Silva, 2007).

62 Como fitopatógeno, *Colletotrichum* spp. é o principal causador de antracnose e
63 podridões de pré e pós-colheita de frutos, além de causar tombamentos, e requeima de flores e
64 plântulas (Bailey & Jeger, 1992). Adicionalmente, isolados deste gênero são comumente
65 isolados como endofíticos em várias plantas tropicais (Cannon & Simmons, 2002; Rodrigues
66 & Petrini, 1997; Stone et al., 2004, Suryanarayanan et al., 2002). Estas espécies ou isolados
67 endofitos podem habitar restritamente o interior de tecidos do hospedeiro sem causar doenças.
68 No entanto, sabe-se que isolados patogênicos podem apresentar o endofitismo como uma fase
69 do processo infeccioso, no qual o patógeno penetra e mantém-se em estado de quiescência até
70 que as condições ideais para o desenvolvimento da doença sejam estabelecidas (Agrios,
71 2005).

72 Patógenos quiescentes parecem representar uma proporção relativamente pequena da
73 comunidade de endofíticos, que também é composta por espécies de saprófitas latentes e
74 mutualistas (Zabalgogazcoa, 2008). Recentes observações e hipóteses sobre fungos
75 endofíticos indicam que a colonização assintomática é um balanço de antagonismos entre o

76 patógeno e o hospedeiro (Devaraju & Satish, 2010). Este é um fator importante na interação
77 planta-patógeno, e de acordo com este ponto de vista, a caracterização das diferenças entre os
78 processos de infecção realizados por um endófito e por um fitopatógeno é um dos desafios da
79 atual fitopatologia (González & Tello, 2011).

80 Também é necessário elucidar quais as espécies estão associadas aos modos de vida
81 patogênico e endofítico, pois é sabido que espécies diferentes dentro de um mesmo gênero
82 costumam variar quanto à suscetibilidade a tratamentos químicos preventivos e curativos.

83 Circunscrição das espécies e identificação de *Colletotrichum* e seu teleomorfo
84 *Glomerella*, historicamente, têm sido baseados na gama de hospedeiros e em um conjunto de
85 caracteres morfológicos. No entanto, a taxonomia convencional não é suficiente para suportar
86 o desenvolvimento de conceitos robustos de espécie devido à plasticidade dos caracteres
87 morfológicos (Rojas et al., 2010). Devido a isto, é recomendável uma abordagem polifásica
88 para o reconhecimento e identificação de espécies do gênero *Colletotrichum*, combinando
89 dados moleculares com caracteres morfológicos e biológicos (Cai et al., 2009).

90 O objetivo do presente trabalho foi avaliar a prevalência de espécies de *Colletotrichum*
91 endofítico de diferentes partes da mangueira em cinco áreas no Estado de Pernambuco, e
92 caracterizá-las com base em dados moleculares, culturais, morfológicos e de virulência.

93 94 **MATERIAL E MÉTODOS**

95
96 Durante o período de janeiro a junho de 2011 foram efetuadas coletas de partes de
97 plantas de mangueira em cinco áreas de plantio não comerciais das variedades ‘Espada’ e
98 ‘Rosa’, localizados em Recife (área I e II), Itapirema (área III), Aldeia (área IV) e São João
99 (área V), no Estado de Pernambuco. Em cada área foram amostradas aleatoriamente 12
100 plantas. Em cada planta foram coletadas duas folhas novas, duas folhas velhas, um ramo e

101 uma inflorescência, todos visualmente sem sintomas de doenças. As amostras foram levadas
102 ao laboratório e processadas no mesmo dia.

103

104 **Amostragem e isolamento de *Colletotrichum* endofíticos**

105 As amostras foram inicialmente lavadas em água corrente. Para cada tipo de folha,
106 foram retirados cinco fragmentos circulares de 7 mm de diâmetro da região do limbo, e cinco
107 fragmentos das nervuras e pecíolo (dois para a nervura principal, dois para as nervuras
108 secundárias, e um do centro do pecíolo) através de cortes paralelos e rentes às nervuras e ao
109 pecíolo (Hata et al., 2002). Do interior de ramos, inflorescências e pedúnculos, foram
110 retirados cinco fragmentos de 6 mm ao longo dos seus comprimentos.

111 Os fragmentos oriundos das folhas foram desinfestados em etanol 75% por 1 min e em
112 solução de NaClO 1,5% por 2 min. Os fragmentos de ramo e inflorescência foram
113 desinfestados em etanol 75% por 10 s e NaClO 1,5% por 10 s, por terem sido retirados de
114 tecidos internos. Os fragmentos foram lavados em água destilada esterilizada e secos em
115 papel de filtro esterilizado. Os fragmentos desinfestados foram transferidos para placas de
116 Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) suplementado
117 com cloranfenicol (25 mg.L^{-1}) e incubados a temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h,
118 durante 15 dias. Os isolados apresentando colônias morfologicamente similares a
119 *Colletotrichum* foram transferidos para meio BDA e posteriormente analisados quanto à
120 morfologia de conídios para confirmação do gênero, conforme Sutton (1980).

121 Para fins comparativos, oito isolados sintomáticos foram obtidos a partir de frutos com
122 lesões típicas de antracnose.

123 Culturas monospóricas dos isolados esporulantes foram mantidas em meio BDA em
124 tubos e sob refrigeração. Os isolados foram posteriormente sequenciados e analisados

125 filogeneticamente para identificação das espécies. Os isolados obtidos encontram-se listados
126 na Tabela 1.

127

128 **Frequência geral de isolamento**

129 As frequências de isolamento (FI) de *Colletotrichum* para cada parte da planta foram
130 calculadas pela fórmula $FI\% = [(n^\circ \text{ de fragmentos colonizados por } Colletotrichum \text{ por parte}$
131 $\text{da planta} / n^\circ \text{ total de fragmentos em cada área}) \times 100]$ e comparadas pelo teste Z para
132 diferença entre proporções, ao nível de 5% de probabilidade.

133

134 **Caracterização molecular**

135 Os isolados foram cultivados em meio de cultura batata-dextrose (BD) por sete dias, e
136 o micélio foi separado do meio líquido através de filtração. O DNA genômico foi extraído
137 com o kit AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep (Axygen[®]), conforme protocolo
138 descrito pelo fabricante. A qualidade e a quantidade de DNA foram estimadas visualmente em
139 gel de agarose 1% (fragmento de 100 pb). Para amplificação do gene gliceraldeído-3 fosfato
140 desidrogenase (GPDH), foram utilizados os primers forward (5'-
141 GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA-3') e reverse (5'-
142 GGGTGGAGTCGTACTTGAGCATGT-3') (Peres et al ., 2008), gerando-se fragmentos de
143 aproximadamente 250 pb. As amplificações em PCR foram realizadas em um volume final
144 de 50 µL contendo 1 µL de DNA, 2,0 mL de água, 1,5 µM de cada primer , e 25 µL do PCR
145 Master Mix (2X) (0,05 u.mL⁻¹ de *Taq* DNA polimerase, tampão de reação com 4 mM
146 MgCl₂, e 0,4 mM de cada dNTP; Fermentas[®]). Para amplificação, as reações foram realizadas
147 em termociclador Biocycler MJ 96+ (Biosystems[®]), sendo utilizados: um ciclo a 94 °C por 2
148 min; 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 63 °C por 1 min e 20 s, e e 72 °C por 1 min e 30 s; e um
149 ciclo final à 72 °C por 6 min. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1 %.

150 Os produtos de PCR foram purificados com o kit AxyPrepTM PCR Cleanup (Axygen[®]), e
151 posteriormente sequenciados nos dois sentidos com os mesmos *primers* utilizados na
152 amplificação. Os sequenciamentos foram realizados pela empresa Macrogen Inc. (Seul,
153 Coreia do Sul).

154 Sequências de isolados ex-type foram utilizadas como referência e obtidas a partir do
155 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) (Tabela 2). Os alinhamentos múltiplos das sequências
156 foram realizados com o programa Clustal W. Alinhamentos foram ajustados manualmente
157 para permitir o alinhamento máximo e similaridade máxima entre as sequencias. Regiões
158 ambigualmente alinhadas foram excluídas das análises.

159 Análises filogenéticas foram realizadas utilizando o programa MEGA 5 (Tamura et
160 al., 2011). Foi realizada a análise de máxima parcimônia e as múltiplas árvores parcimoniosas
161 foram salvas. Estatísticas descritivas como comprimento, índice de consistência (IC) e índice
162 de retenção (IR) foram calculados para árvores geradas. A estabilidade dos clados resultantes
163 da análise de parcimônia foi avaliada pela análise de bootstrap com 1000 repetições.

164

165 **Caracterização cultural e morfológica**

166 Discos de micélio (6 mm de diâmetro) foram obtidos da borda de colônias com sete
167 dias de idade e transferidos para meio BDA (Himedia[®], 39 g.L⁻¹) e incubados a 25 °C sob
168 luminosidade contínua, conforme descrito por Cai et al. (2009). Os diâmetros ortogonais das
169 colônias de três replicatas foram mensurados após quatro dias de incubação, com auxílio de
170 paquímetro digital. A taxa de crescimento micelial foi calculada, sendo os valores expressos
171 em mm.dia⁻¹. Aos sete dias de incubação, as mesmas culturas foram caracterizadas em relação
172 a coloração e topografia das colônias, bem como formato e dimensões de 30 conídios por
173 isolado.

174 **Caracterização da patogenicidade e virulência**

175 Para os testes de patogenicidade e virulência, foram utilizados frutos de manga da
176 variedade Tommy Atkins, em estágio de maturação comercial. Os frutos foram lavados com
177 detergente neutro e água corrente, desinfestados em etanol 70% por 3 min e NaClO 1,5% por
178 3 min, lavados em água destilada esterilizada e submetidos a secagem ao ar sobre papel
179 toalha. Para inoculação dos frutos, foi utilizada a técnica da inoculação com disco de micélio,
180 de forma a se padronizar o método de inoculação, uma vez que parte dos isolados
181 apresentavam pouca ou nenhuma esporulação. Para isto, foram retirados discos de micélio de
182 6 mm de diâmetro da borda de colônias crescidas em meio BDA, com seis dias de cultivo. Os
183 frutos foram lesionados com auxílio de uma agulha esterilizada, sendo efetuados dois
184 ferimentos por fruto, e os discos de micélio depositados sobre os ferimentos. Frutos
185 inoculados com discos de BDA sem o crescimento fúngico constituíram a testemunha. Foram
186 utilizadas quatro repetições por isolado, sendo cada repetição constituída por dois frutos
187 inoculados. Os frutos foram submetidos à câmara úmida durante 48 horas (Montri et al.,
188 2009), e ao oitavo dia após a inoculação, foram inspecionados e a patogenicidade confirmada
189 pela presença de lesões típicas de antracnose.

190 Para comparação da virulência dos isolados, foram determinados os diâmetros
191 ortogonais das lesões com auxílio de paquímetro e estimada a área da lesão. Os valores das
192 áreas foram expressos em mm², submetidos à análise de variância e as médias comparadas
193 pelo teste LSD de Fischer, ao nível de 5% de probabilidade.

194

195 **Prevalência das espécies de *Colletotrichum***

196 Após a identificação das espécies, foi calculada a taxa de isolamento (TI) para cada
197 área e parte da planta amostrada [TI% = (n° de fragmentos colonizados por *Colletotrichum*
198 por parte da planta/ n° total de fragmentos por área ou parte da planta) x 100].

199 **RESULTADOS**

200

201 **Frequência geral de isolamento**

202 Em um total de 1715 amostras avaliadas (300 de ramo, nervuras e limbos jovens e
203 velhos, e 215 de inflorescência), 169 foram colonizados pelo gênero *Colletotrichum*.

204 Os valores das FI diferiram entre as cinco áreas. A área III apresentou o maior valor,
205 enquanto que a área I apresentou o menor (tabela 3).

206 A FI dentre as diferentes partes da planta também diferiram significativamente nas
207 cinco áreas. As mais altas FI foram observadas para limbo velho nas áreas I, II e V, para
208 limbo jovem na área IV, e nervura jovem na área III. Os menores valores foram observados
209 para inflorescência na área II, para ramo na área V, e para ambos na área III (Tabela 2).

210

211 **Caracterização molecular**

212 Após o alinhamento das sequências, foram identificados 10 haplótipos, e cinco
213 sequências de cada um destes haplótipos foram escolhidas ao acaso para construção da árvore.
214 As sequências do gene GPDH dos isolados endofíticos de *Colletotrichum* foram comparadas
215 com sequências homólogas disponíveis no GenBank de espécies de *Colletotrichum*
216 pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides* e que apresentaram maior índice de
217 similaridade com os isolados deste estudo (Tabela 2).

218 Uma das 246 árvores igualmente parcimoniosas geradas (comprimento = 124) é
219 mostrada na Figura 1. O índice de consistência foi 0,878094 e o índice de retenção 0,964200.
220 O conjunto de dados final apresentou 75 sítios variáveis, das quais 84,66% foram
221 informativos para as análises de parcimônia.

222 A análise de máxima parcimônia revelou cinco principais grupos dentro do complexo
223 de espécies *C. gloeosporioides*. O grupo I representou 72 endófitas e todos os isolados

224 sintomáticos. Este grupo obteve um suporte de bootstrap de 63% e foram identificados como
225 pertencentes à espécie *C. asianum* Prihast., L. Cai & K.D. Hyde. O grupo II representou oito
226 isolados agrupados com *C. fructicola* Prihast., L. Cai & K.D. Hyde., porém com suporte
227 inferior a 50%. No grupo III, seis isolados endofíticos agruparam-se com sequências de *C.*
228 *siamense* Prihast., L. Cai & K.D. Hyde com suporte de 64%. Os grupos IV (*Colletotrichum*
229 sp.) e V (*Colletotrichum* sp.) representam clados distintos com três isolados cada (suporte de
230 74% e 62% respectivamente), cuja identidade das espécies não pode ser determinada nem
231 com os dados morfológicos nem através das sequências de GPDH (Figura 1).

232 Dois clados fortemente suportados foram identificados fora do complexo *C.*
233 *gloeosporioides*. Quatro isolados foram identificados como *C. cliviae* Yan L. Yang, Zuo Y.
234 Liu, K.D. Hyde & L. Cai (grupo VI) e um isolado foi identificado como *C. boninense*
235 Moriwaki, Toy. Sato & Tsukib. (grupo VII), ambos com 99% de suporte.

236

237 **Caracterização cultural e morfológica**

238 Com base na morfologia das colônias, os isolados endofíticos de *Colletotrichum* foram
239 separados em nove diferentes morfogrupos. As características e imagens das colônias de cada
240 morfogrupo encontram-se sumarizadas na Figura 2.

241 *Colletotrichum asianum* apresentou 60 isolados no morfogrupo 1 e 12 isolados no
242 morfogrupo 2. *Colletotrichum siamense* apresentou quatro isolados no morfogrupo 1, um
243 isolado no morfogrupo 3 e um no 4. O morfogrupo 5 incluiu o isolado de *C. boninense*. O
244 morfogrupo 6 incluiu os isolados de *C. cliviae* e *Colletotrichum* sp. Grupo V. O morfogrupo 7
245 incluiu todos os isolados de *C. fructicola*. *Colletotrichum* sp. Grupo IV apresentou dois
246 isolados no morfogrupo 8 e um isolado no morfogrupo 9.

247 A morfologia dos conídios apenas foi distinta para a espécie *C. siamense* cujos
248 conídios foram do tipo fusiforme. Nas demais espécies todos os isolados apresentaram

249 conídios cilíndricos, com uma ou ambas as extremidades arredondadas. Foi observada uma
250 pequena proporção de conídios falcados em alguns isolados de *C. asianum*, e de conídios
251 fusiformes nos isolados de *C. cliviae*. No entanto, houve diferença entre as medias de
252 comprimento e largura dos conídios entre as espécies (Tabela 3).

253 Houve diferença estatística entre médias das taxas de crescimento das diferentes
254 espécies, sendo que *C. asinaum* ($6.60 \pm 1.03 \text{ mm.dia}^{-1}$) cresceu significativamente mais lento
255 que as outras espécies, as quais não diferiram entre si (Tabela 3).

256

257 **Caracterização da patogenicidade e virulência**

258 Com o método de inoculação utilizado, todos os isolados foram patogênicos,
259 resultando em infecção no fruto em até oito dias após a inoculação. Não foi observada
260 diferença entre as espécies quanto ao aspecto das lesões causadas.

261 Houve diferença significativa quanto à área das lesões. A espécie *Colletotrichum* sp.
262 Grupo V apresentou as maiores áreas de lesão, enquanto que *C. fructicola* apresentou as
263 menores. A espécie *C. boninense* não foi incluída nas análises estatísticas, porém apresentou a
264 menor área da lesão dentre todas as espécies.

265

266 **Prevalência das espécies de *Colletotrichum***

267 Com base nas comparações entre sequências do gene GPDH e entre as características
268 fenotípicas, 72 isolados endofíticos foram identificados como *C. asianum*, oito isolados como
269 *C. fructicola*, seis como *C. siamense*, quatro isolados como *C. cliviae*, um isolado como *C.*
270 *boninense* e seis isolados não tiveram a espécie definida (*Colletotrichum* sp. Grupo IV e
271 *Colletotrichum* sp. Grupo V, com três isolados cada).

272 Nas áreas II, III e V foram encontradas cinco diferentes espécies, e nas áreas I e II
273 foram encontradas duas espécies diferentes em cada. A espécie *C. asianum* prevaleceu em

274 todas as áreas, com o maior valor de TI na área III (84,62%) e o menor na área II (40,63%). A
275 espécie *Colletotrichum* sp. Grupo V foi restrita à área I (Figura 3a).

276 Em todas as partes da planta avaliadas, *C. asianum* foi a espécie prevalente com
277 valores de TI acima de 65%. Para ramo e inflorescência, a TI para *C. asianum* foi igual a
278 100%, mostrando a baixa diversidade de espécies nesses órgãos. Nervura jovem apresentou a
279 incidência de seis diferentes espécies. Nenhuma das espécies esteve restrita a uma parte
280 específica da planta (Figura 3b).

281 282 **DISCUSSÃO**

283
284 A colonização de plantas tropicais por fungos endofíticos é extremamente frequente
285 (Cannon & Simmons 2002). O isolamento de espécies endófitas de *Colletotrichum* tem sido
286 relatado com alta ocorrência em várias fruteiras e essências florestais tropicais, e também em
287 florestas temperadas e em plantas medicinais (Cannon & Simmons 2002; Guo et al., 2001;
288 Hanada et al., 2010; Hata et al., 2002; Huang et al., 2008; Kumar & Hide 2004; Lu et al.,
289 2004; Osono, 2008; Photita et al., 2001; Prihastuti et al., 2009; Rojas et al., 2010).

290 Observou-se que o gênero *Colletotrichum* apresentou altos valores de FI para os
291 tecidos foliares (limbo e nervura) em todas as áreas, enquanto que valores de FI foram
292 menores em ramo e inflorescência. Este dado pode ser um indicativo de especificidade pelos
293 tecidos foliares, ou inabilidade de penetrar tecidos mais internos como o sistema vascular dos
294 ramos e inflorescências. De acordo com Stone et al. (2004) espécies que colonizam tecidos
295 mais internos apresentam maior especificidade, em contraste com aquelas que colonizam
296 tecidos mais externos, as quais apresentam inespecificidade. A ausência de diferença nas FI
297 de *Colletotrichum* entre fragmentos foliares com e sem nervura, constatada nesse estudo, se
298 assemelha ao observado em folhas de *Pasania edulis* (Hata et al., 2002).

299 A maior prevalência de *Colletotrichum* em limbo velho que em limbo jovem
300 demonstra o efeito da idade do tecido sobre a colonização de *Colletotrichum*, em folhas. O
301 aumento da incidência de endófitas em folhas mais velhas é uma evidencia indireta de que
302 essas folhas tiveram mais tempo para acumular endófitas do ambiente (Photita et al., 2001). A
303 transmissão horizontal aparenta ser o mecanismo de dispersão predominante entre espécies
304 endófitas (Stone et al., 2004), no entanto, folhas mais velhas também tem mais tempo de
305 acumular verticalmente espécies colonizadoras que penetram através do pecíolo (Fröhlich et
306 al., 2000).

307 Quanto ao efeito da área, observou-se diferença significativa entre as áreas I e III. A FI
308 pode variar entre diferentes áreas em função de diferenças em fatores ambientais como
309 umidade, temperatura, precipitação e potencial de inóculo, além do efeito da atividade
310 humana (Photita et al., 2001). A área I localiza-se no perímetro urbano e está sujeita a ação
311 antrópica, e apresenta uma grande distância entre plantas, o que diminui a dispersão do
312 inóculo. Ambos os fatores podem ter contribuído para o menor valor de FI. Já na área III onde
313 foi observada a maior FI, apesar de também sofrer efeito da ação antrópica, as plantas
314 amostradas estavam inseridas em fragmentos conservados de mata onde a umidade é mais
315 elevada, o que provavelmente favoreceu um aumento do potencial do inóculo. Situação
316 semelhante ocorre ao comparar as FI das áreas I e II, que apesar de ambas estarem em Recife,
317 a área II localizava-se mais distante da zona urbana, e sob menor influência da ação antrópica.

318 A comparação entre valores de FI entre diferentes estudos é problemática devido às
319 diferenças nos protocolos de isolamento, principalmente quanto ao tamanho dos fragmentos
320 empregado (Cannon & Simmons, 2002). Há também o efeito no processo de desinfestação
321 dos fragmentos, bem como do meio de cultura utilizado. Em um ensaio piloto foram testados
322 diferentes processos de desinfestação e meios de cultura para o isolamento de *Colletotrichum*
323 endofíticos em mangueira. Observou-se uma alta inibição de *Colletotrichum* pelo meio de

324 cultura LCA (Miura & Kudo 1970) e pelo meio BDA acrescido de rosa de bengala (30 mg.L⁻¹). Também foi observada uma inibição do isolamento de endofíticos em geral, quando o
325 tempo de desinfestação no hipoclorito de sódio foi superior a dois minutos.
326

327 As análises filogenéticas mostraram que a maioria dos isolados incluídos neste estudo
328 pertencem ao complexo de espécies *C. gloeosporioides*. Dentre os sete grupos representantes
329 dos principais grupos terminais, cinco foram incluídos no grande clado *C. gloeosporioides s.*
330 *l.*, com suporte de 99%. Atualmente, esse complexo compreende as espécies *C. asianum*, *C.*
331 *fructicola*, *C. horii*, *C. hymenocallidis*, *C. kahawae*, *C. gloeosporioides sensu stricto*, *C.*
332 *siamense* (Cai et al., 2009; Prihastuti et al., 2009; Yang et al., 2009), e espécies recentemente
333 descritas como *C. musae* (Su et al., 2011) e *C. jasmine-sambac* (Wikee et al., 2011). Quase
334 todos os isolados deste estudo foram associados a espécies deste complexo. Setenta e oito
335 isolados foram identificados como *C. asianum* e oito como *C. fructicola*.

336 Em trabalho com isolados endofíticos do cacauzeiro e de outras fruteiras tropicais do
337 Panamá, observou-se que a maioria das espécies de *Colletotrichum* identificadas estavam
338 inseridas no complexo de espécies *C. gloeosporioides* (Rojas et al., 2010).

339 Os agrupamentos gerados pelas análises filogenéticas foram congruentes com a
340 taxonomia baseada em características fenotípicas para as espécies identificadas.

341 No grupo II oito isolados foram agrupados com a espécie *C. fructicola* com um baixo
342 suporte. No entanto, o suporte deste clado aumentou quando estes isolados foram analisados
343 separadamente apenas com sequências de isolados de *C. fructicola* (FJ 972579, FJ 972577, FJ
344 972578; 100% de suporte) ou com sequências de *C. fructicola*, *C. asianum* (FJ 972571, FJ
345 972576, FJ 972573) e *C. siamense* (FJ 972575, FJ 972574; 54% de suporte) (dados não
346 apresentados).

347 Silva et al. (2011) analisando o locus *Apn2MAT*, e outros genes como ITS, β -tub2 e
348 GS, observaram que *C. siamense* foi reciprocamente monofilético com *C. asianum* ou *C.*

349 *fructicola*. Os autores supõem que essas espécies divergiram recentemente e,
350 conseqüentemente, a relação entre elas não pode ser facilmente resolvida, o que pode
351 justificar os baixos suportes frequentemente observados para estas espécies. A correta relação
352 filogenética entre estas três espécies permanece incerta.

353 Os grupos IV e V formaram clados dentro do complexo *C. gloeosporioides*, mas não
354 agruparam com nenhuma espécie conhecida com sequências do gene GPDH disponível.

355 Para efetivar o reconhecimento das espécies de *Colletotrichum* é recomendada a
356 utilização da filogenia multilocus, incluindo sequências dos genes ITS, TUB2, GPDH, ACT e
357 outros (Cai et al. 2009). Neste trabalho foi utilizada apenas as sequências do gene GPDH,
358 com base nos resultados obtidos por Damm et al. (2009) que estudou espécies de
359 *Colletotrichum* associados a hospedeiros herbáceos, concluindo que a separabilidade das
360 espécies foi superior com a utilização deste gene e do histona 3.

361 As características das colônias e os valores de taxa de crescimento foram importantes
362 características para diferenciar algumas espécies de *Colletotrichum*, sendo marcadores
363 fenotípicos consistentes para diferenciar isolados de *C. asianum* das demais espécies.
364 Resultados similares foram obtidos para espécies associadas ao gênero *Capsicum* (Than et al.,
365 2008b) e à doença ‘coffee berry disease’ (Prihastuti et al., 2009). Ambos marcadores,
366 associados ao formato e tamanho dos conídios foi útil para identificar os isolados do grupo III
367 *C. asianum* e não como *C. siamense*.

368 Os isolados de todas as espécies de *Colletotrichum* foram patogênicos em frutos de
369 manga e diferiram significativamente quanto à virulência. Apesar desta diferença, os
370 resultados podem não refletir com acurácia o verdadeiro potencial patogênico destes isolados.
371 Isolados endofíticos de *Colletotrichum* podem ser patógenos oportunistas, e mais estudos
372 devem ser realizados para determinar a patogenicidade e virulência de acordo com infecções
373 naturais, e não com inoculações artificiais (Prihastuti et al., 2009). São necessários mais

374 estudos com os isolados das espécies *C. asianum* e *Colletotrichum* sp. Grupo V, os quais
375 foram os mais virulentos.

376 Levando em consideração que o gênero *Colletotrichum* inclui espécies
377 hemibiotróficas, há a possibilidade que parte dos isolados não sejam verdadeiros endófitas.
378 Alguns isolados podem ter sido oriundos de apressórios que sobreviveram ao processo de
379 desinfestação (Lu et al., 2004). Para o gênero *Colletotrichum*, baseado nas várias definições
380 para o termo “endófito”, isolados podem ter o endofitismo como um estilo de vida (endófitas
381 verdadeiros, os quais colonizam sem nunca causar sintomas visíveis; Mostert et al., 2000), ou
382 como parte do ciclo de vida, uma vez que algumas espécies são denominadas patógenos
383 quiescentes (endofitismo como estratégia de sobrevivência; Wilson, 1995).

384 Uma vez identificadas as espécies, observou-se que não houve correlação com a
385 prevalência das espécies nas diferentes áreas e nas diferentes partes da planta. O dado mais
386 relevante foi que a espécie *C. asianum* foi prevalente sobre as demais, estando presente em
387 todas as áreas, sem mostrar especificidade a um determinado tecido vegetal. Segundo Cannon
388 & Simmons (2002), essa desuniformidade na distribuição das espécies sugere que a
389 colonização por endófitas assume um padrão caótico. Devido às outras espécies apresentarem
390 poucos isolados, não é possível inferir sobre a especificidade destas espécies por alguma parte
391 da planta.

392 Dentre as espécies identificadas, apenas *C. boninense* foi relatada no Brasil, a qual foi
393 associada com a antracnose do maracujá amarelo (Tozze Junior et al., 2010). *Colletotrichum*
394 *boninense* aparenta ser um patógeno e endófito comum em diversos hospedeiros (Hyde et al.,
395 2009). A espécie já foi relatada em diversas plantas na Guiana (Lu et al., 2004) e na Austrália
396 e sul da África (Lubbe et al., 2004).

397 *Colletotrichum asianum*, *C. fructicola* e *C. siamense* tiveram seu primeiro relato na
398 Tailândia. Epífitas e endófitas foram obtidos de frutos de café aparentemente sadios, e

399 também isolados como patogênicos (Prihastuti et al., 2009). *C. asianum* também está
400 associado à antracnose do gênero *Capsicum* (Than et al., 2008b) e da manga (Phoulivong et
401 al., 2010).

402 A mangueira é uma planta que tem seu centro de origem no continente asiático e foi
403 introduzida no Brasil no início da colonização portuguesa. Baseando na similaridade das
404 sequências brasileiras entre si e quando comparadas com as da mesma espécie encontradas na
405 Tailândia podemos levantar a hipótese de que as espécies *C. asianum*, *C. fructicola* e *C.*
406 *siamense* tenham sido introduzidas no Brasil através da colonização endofítica em órgãos de
407 propagação como sementes e mudas.

408 A espécie *C. cliviae* apenas foi relatada associada à antracnose de *Clivia miniata* na
409 China (Yang et al., 2009). Este é o primeiro relato desta espécie no Brasil, bem como sua
410 ocorrência em manga e seu isolamento como endófito.

411 O presente trabalho reportou a ocorrência de quatro espécies conhecidas de
412 *Colletotrichum*, como endófitas, em plantios não comerciais de manga. É necessário o estudo
413 das espécies ocorrentes em plantios comerciais, e comparar populações de endófitas com
414 populações de isolados sintomáticos, analisando aspectos ecológicos e epidemiológicos.

415

416 **AGRADECIMENTOS**

417

418 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo
419 suporte financeiro, e à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) pelo suporte
420 científico e tecnológico.

421

422

423

424 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

425

426 Agrios GN (2005) Plant Pathology. 5th Ed. Amsterdam. Elsevier Academic Press.

427

428 Batista DC, Barbosa MAG (2008) Doenças da mangueira. In: FEIRA NACIONAL DA
429 AGRICULTURA IRRIGADA, 1., Petrolina, PE, Brasil, 2008. Minicursos [CD-ROM].
430 Petrolina, 2008.

431

432 Bailey JA, Jeger MJ (1992) *Colletotrichum*: biology, pathology and control. CAB.
433 International. Wallingford, UK.

434

435 Cai L, Hyde KD, Taylor PWJ, Weir B, Waller J, Abang MM, Zhang JZ, Yang YL,
436 Phoulivong S, Liu ZY, Prihastuti H, Shivas RG, McKenzie EHC, Johnston PR (2009) A
437 polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. Fungal Diversity 39:183–124

438

439 Cannon PF, Simmons CM (2002) Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in
440 the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. Mycologia 94(2):210–220

441

442 Damm U, Woudenberg JHC, Cannon P, Crous PW (2009) *Colletotrichum* species with
443 curved conidia from herbaceous hosts. Fungal Diversity 39:45-87

444

445 Devaraju R., Satish S (2010) Endophytic fungi: ‘Trapped’ or ‘hidden’ store houses of
446 bioactive compounds within plants: A Review. Journal of Pharmacy Research 3(12):2986–
447 2989

448

449 Fröhlich J, Hyde KD, Petrini, O (2000). Endophytic fungi associated with palms.
450 Mycological Research 104: 1202-1212.
451
452
453 González V, Tello ML (2011) The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central
454 Spain. Fungal Diversity 47:29–42
455
456 Guo LD, Hyde KD, Liew ECY (2000) Identification of endophytic fungi from *Livistona*
457 *chinensis* based on morphology and rDNA sequences. New Phytologist 147:617-630
458
459 Hanada RE, Pomella AW, Costa HS, Bezerra JL, Loguercio LL, Pereira JO (2010)
460 Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees
461 and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. Fungal Biol
462 114: 01-910
463
464 Hata K, Atari R, Sone K (2002) Isolation of endophytic fungi from leaves of *Pasania edulis*
465 and their within-leaf distributions. Mycoscience 43:369–373
466
467 Huang WY, Cai YZ, Xing J, Corke H, Sun M (2007) A potential antioxidant resource:
468 endophytic fungi isolated from traditional Chinese medicinal plants. Economic Botany 61:14-
469 30
470
471 Hyde KD, Cai L, Cannon PF, Crouch JA, Crous PW, Damm U, Goodwin PH, Chen H,
472 Johnston PR, Jones EBG, Liu ZY, McKenzie EHC, Moriwaki J, Noireung P, Pennycook SR,

473 Pfenning LH, Prihastuti H, Sato T, Shivas RG, Tan YP, Taylor PWJ, Weir BS, Yang YL,
474 Zhang JZ (2009) *Colletotrichum* – names in current use. Fungal Diversity 39:147-183
475 Kumar DSS, Hide KD (2004) Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in
476 *Tripterygium wilfordii* . Fungal Diversity 17: 69-90
477
478 Lu G, Cannon PF, Reid A, Simmons CM (2004) Diversity and molecular relationships of
479 endophytic *Colletotrichum* isolates from the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. Mycol Res
480 108:53-63
481
482 Lubbe CM, Denman S, Cannon PF, Groenewald JZ, Lamprecht S, Crous PW (2004)
483 Characterization of *Colletotrichum* species associated with diseases of Proteaceae 96:1268-
484 1279.
485
486 Melo RB, Silva JS, Candido AS, Feitosa, TB, Souza OC (2009) Análise da produção e da
487 exportação de manga no Pólo Petrolina(PE)/Juazeiro(BA). In: Encontro Norte e Nordeste de
488 Ciências e Engenharia de Materiais, 2., Teresina, PI, 2009. Anais ... Teresina, Editora
489 Universitária da UFRN.
490
491 Montri P, Taylor PWJ, Mongkolporn O (2009) Pathotypes of *Colletotrichum capsici*, the
492 causal agent of chili anthracnose, in Thailand. Plant Disease 93:17–20.
493
494 Mostert L, Crous PW, Petrini O (2000) Endophytic fungi associated with shoots and leaves
495 of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. Sydowia 52:46-
496 58
497

498 Miura K, Kudo M (1970) An agar-medium for aquatic hyphomycetes. Trans Mycol Soc Japan
499 11:116–118
500

501 Nelson SC (2008) Mango anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). Plant Disease p. 48
502

503 Neto MTC, Reinhardt DH (2003). Relações entre parâmetros de crescimento do fruto da
504 manga cv. Haden. Revista Brasileira de Fruticultura 25 (1): 36-38
505

506 Osono T (2008) Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of *Camellia japonica*: seasonal
507 and leaf age-dependent variations. Mycologia 100(3):387–391
508

509 Peres NA, MacKenzie SJ, Peever TL, Timmer LW (2008) Postbloom fruit drop of citrus and
510 key lime anthracnose are caused by distinct phylogenetic lineages of *Colletotrichum*
511 *acutatum*. Phytopathology 98: 345-352
512

513 Photita W, Lumyong S, Hyde K (2001) Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at
514 Doi Suthep Pui National Park, Thailand. Mycol Res 105(12):1508-1513
515

516 Phoulivong S, Cai L, Chen H, McKenzie EH, Abdelsalam K, Chukeatirote E, Hyde KD
517 (2010) *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. Fungal
518 Diversity 44:33-43
519

520 Prihastuti H, Cai L, Chen H, Hyde KD (2009). Characterization of *Colletotrichum* species
521 associated with coffee berries in Chiang Mai, Thailand. Fungal Diversity 39: 89-109

522

523 Rodrigues KF, Petrini O (1997) Biodiversity of Endophytic Fungi in Tropical Regions. In:
524 Biodiversity of Tropical Micro Fungi, Hyde, K.D. (Ed.). Hong Kong University Press, Hong
525 Kong, PP. 57-69

526

527 Rojas EI., Rehner SA, Samuels G J, Van Bael SA, Herre E A, Cannon A, Chen R, Pang J,
528 Wang R, Zhang Y, Peng Y, Sha T (2010) *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with
529 *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host-
530 associated pathogens from asymptomatic endophytes. Mycologia 102(6):1318-1338

531

532 Silva GF (2007) Eficiência de diferentes produtos fungicidas no controle da antracnose em
533 manga. 49 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Semi-
534 Árido, Mossoró.

535

536 Silva DN, Talhinha P, Várzea V, Cai L, Paulo OS, Batista D (2011). Application of the
537 Apn2/MAT locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex:
538 an example from coffee (*Coffea* spp.) hosts. Mycologia (DOI 10.3852/11-145)

539

540 Stone JK, Polishook JD, White JJF, 2004. Endophytic Fungi. In: Mueller GM, Bills
541 GF, Foster MS (eds), Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods.:
542 Academic Press, Burlington, pp. 241-270

543

544 Su YY, Noireung P, Liu F, Hyde KD, Moslem MA, Bahkali AH, Abd-Elsalam KA, Cai L
545 (2011) Epitypification of *Colletotrichum musae*, the causative agent of banana anthracnose.
546 Mycoscience 52:376–382
547

548 Suryanarayanan TS, Murali TS, Venkatesan G (2002) Occurrence and distribution of fungal
549 endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. Canadian Journal of Botany 80:818-
550 826
551

552 Sutton BC (1980) The Coelomycetes. London: Commonwealth Mycological Institute. 696 p.
553

554 Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular
555 Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and
556 Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution (In Press).
557

558 Than PP, Jeewon R, Hyde KD, Pongsupasamit S, Mongkolporn O, Taylor PWJ (2008).
559 Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on
560 chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. Plant Pathology 57:562-572.
561

562 Tozze Júnior HJ, Fischer IH, Câmara MPS, Massola Júnior NS (2010) First report of
563 *Colletotrichum boninense* infecting yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) in
564 Brazil. Australasian Plant Disease Notes 5:70-72
565

566 Wikee S, Cai L, Pairin N, McKenzie EHC, Su YY, Chukeatirote E, Thi HN, Bahkali AH,
567 Moslem MA, Abdelsalam K (2011) *Colletotrichum* species from jasmine (*Jasminum*
568 *sambac*). *Fungal Divers* 46:171–182
569
570 Wilson D (1995) Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and
571 definition. *Oikos* 73:274-276
572
573 Yang YL, Liu ZY, Cai L, Hyde KD, Yu ZN, McKenzie EHC (2009) *Colletotrichum*
574 anthracnose of Amaryllidaceae. *Fungal Divers* 39:123–149
575
576 ZABALGOGEAZCOA I (2008) Fungal endophytes and their interaction with plant
577 pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6:138-146
578
579

Tabela 1 Relação de isolados endofíticos e sintomáticos de mangueira utilizados no presente trabalho.

ISOLADO	ÁREA	PARTE DA PLANTA	ESPÉCIE	HAPLÓTIPO
C1-NN	Recife (Pq. de Exposições do Cordeiro)	Nervura jovem	<i>Colletotrichum sp.</i> Grupo V	1
C4-LV	Recife (Pq. de Exposições do Cordeiro)	Limbo velho	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
C4-H	Recife (Pq. de Exposições do Cordeiro)	Ramo	<i>Colletotrichum asianum</i>	9
C4-LN	Recife (Pq. de Exposições do Cordeiro)	Limbo jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
C5-LN	Recife (Pq. de Exposições do Cordeiro)	Limbo jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
C6-NV	Recife (Pq. de Exposições do Cordeiro)	Nervura velha	<i>Colletotrichum sp.</i> Grupo V	1
C8-LV	Recife (Pq. de Exposições do Cordeiro)	Limbo velho	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
C10-LV	Recife (Pq. de Exposições do Cordeiro)	Limbo velho	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
C12-LV	Recife (Pq. de Exposições do Cordeiro)	Limbo velho	<i>Colletotrichum asianum</i>	9
R1-LN	Recife (Campus UFRPE)	Limbo jovem	<i>Colletotrichum fructicola</i>	7
R2-LV	Recife (Campus UFRPE)	Limbo velho	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
R3-NV	Recife (Campus UFRPE)	Nervura velha	<i>Colletotrichum asianum</i>	9
R4-H	Recife (Campus UFRPE)	Ramo	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
R4-LV	Recife (Campus UFRPE)	Limbo velho	<i>Colletotrichum sp.</i> Grupo IV	2

Tabela 1 Continuação.

ISOLADO	ÁREA	PARTE DA PLANTA	ESPÉCIE	HAPLÓTIPO
R5-NV	Recife (Campus UFRPE)	Nervura velha	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
R5-H	Recife (Campus UFRPE)	Ramo	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
R6-LV	Recife (Campus UFRPE)	Limbo velho	<i>Colletotrichum siamense</i>	5
R7-NN	Recife (Campus UFRPE)	Nervura jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
R8-LV	Recife (Campus UFRPE)	Limbo velho	<i>Colletotrichum siamense</i>	5
R9-LV	Recife (Campus UFRPE)	Limbo velho	<i>Colletotrichum sp.</i> Grupo IV	2
R9-NV	Recife (Campus UFRPE)	Nervura velha	<i>Colletotrichum siamense</i>	5
R9-LN	Recife (Campus UFRPE)	Limbo jovem	<i>Colletotrichum cliviae</i>	3
R9-NN	Recife (Campus UFRPE)	Nervura jovem	<i>Colletotrichum sp.</i> Grupo IV	2
R11-NV	Recife (Campus UFRPE)	Nervura velha	<i>Colletotrichum siamense</i>	6
R12-NV	Recife (Campus UFRPE)	Nervura velha	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
R12-LV	Recife (Campus UFRPE)	Limbo velho	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
A1-NN	Aldeia	Nervura jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	10

Tabela 1 Continuação.

ISOLADO	ÁREA	PARTE DA PLANTA	ESPÉCIE	HAPLÓTIPO
A1-NV	Aldeia	Nervura velha	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
A2-LN	Aldeia	Limbo jovem	<i>Colletotrichum siamense</i>	6
A2-NN	Aldeia	Nervura jovem	<i>Colletotrichum fructicola</i>	7
A2-NV (G)	Aldeia	Nervura velha	<i>Colletotrichum cliviae</i>	3
A3-LN	Aldeia	Limbo jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
A3-LV	Aldeia	Limbo velho	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
A3-NV	Aldeia	Nervura velha	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
A4-LN	Aldeia	Limbo jovem	<i>Colletotrichum cliviae</i>	3
A4-NN (C)	Aldeia	Nervura jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	8
A4-NN (G)	Aldeia	Nervura jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
A4-LV	Aldeia	Limbo velho	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
A4-NV	Aldeia	Nervura velha	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
A5-LN (G)	Aldeia	Limbo jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	10

Tabela 1 Continuação.

ISOLADO	ÁREA	PARTE DA PLANTA	ESPÉCIE	HAPLÓTIPO
A5-NN	Aldeia	Nervura jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
A5-LV	Aldeia	Limbo velho	<i>Colletotrichum asianum</i>	9
A5-NV	Aldeia	Nervura velha	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
A6-LN	Aldeia	Limbo jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	9
A6-LV	Aldeia	Limbo velho	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
A8-NN	Aldeia	Nervura jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
A8-LV	Aldeia	Limbo velho	<i>Colletotrichum asianum</i>	9
A9-NN	Aldeia	Nervura jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
A9-LV	Aldeia	Limbo velho	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
A9-NV	Aldeia	Nervura velha	<i>Colletotrichum asianum</i>	9
A10-NN	Aldeia	Nervura jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
A10-LV	Aldeia	Limbo velho	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
A10-NV	Aldeia	Nervura velha	<i>Colletotrichum asianum</i>	10

Tabela 1 Continuação.

ISOLADO	ÁREA	PARTE DA PLANTA	ESPÉCIE	HAPLÓTIPO
A11-NN	Aldeia	Nervura jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
A11-LV	Aldeia	Limbo velho	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
A11-NV	Aldeia	Nervura velha	<i>Colletotrichum sp.</i> Grupo V	1
A12-LN	Aldeia	Limbo jovem	<i>Colletotrichum fructicola</i>	7
A12-LV	Aldeia	Limbo velho	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
I 1-NN	IPA - Itapirema	Nervura jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
I 2-LN	IPA - Itapirema	Limbo jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
I 3-LN	IPA - Itapirema	Limbo jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
I 4-LN	IPA - Itapirema	Limbo jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
I 4-P	IPA - Itapirema	Inflorescência	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
I 4-NV	IPA - Itapirema	Nervura velha	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
I 5-NV	IPA - Itapirema	Nervura velha	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
I 8-P	IPA - Itapirema	Inflorescência	<i>Colletotrichum asianum</i>	10

Tabela 1 Continuação

ISOLADO	ÁREA	PARTE DA PLANTA	ESPÉCIE	HAPLÓTIPO
I 8-LN	IPA - Itapirema	Limbo jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
I 9-P	IPA - Itapirema	Inflorescência	<i>Colletotrichum asianum</i>	9
I 9-LN	IPA - Itapirema	Limbo jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
I 9-NV	IPA - Itapirema	Nervura velha	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
I 10-P	IPA - Itapirema	Inflorescência	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
I 10-H	IPA - Itapirema	Ramo	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
I 10-LV	IPA - Itapirema	Limbo velho	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
I 11-LV	IPA - Itapirema	Limbo velho	<i>Colletotrichum fructicola</i>	7
I 11-NV	IPA - Itapirema	Nervura velha	<i>Colletotrichum asianum</i>	9
I 12-LN	IPA - Itapirema	Limbo jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
S1-LN	São João	Limbo jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
S1-LV	São João	Limbo velho	<i>Colletotrichum boninense</i>	4
S2-P	São João	Inflorescência	<i>Colletotrichum asianum</i>	9

Tabela 1 Continuação.

ISOLADO	ÁREA	PARTE DA PLANTA	ESPÉCIE	HAPLÓTIPO
S2-LV	São João	Limbo velho	<i>Colletotrichum asianum</i>	9
S2-NV	São João	Nervura velha	<i>Colletotrichum asianum</i>	9
S3-LN	São João	Limbo jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	9
S3-LV	São João	Limbo velho	<i>Colletotrichum asianum</i>	9
S3-NV	São João	Nervura velha	<i>Colletotrichum asianum</i>	9
S4-NN	São João	Nervura jovem	<i>Colletotrichum fructicola</i>	7
S4-LV	São João	Limbo velho	<i>Colletotrichum asianum</i>	9
S5-LV	São João	Limbo velho	<i>Colletotrichum fructicola</i>	7
S6-LN	São João	Limbo jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	9
S6-NN	São João	Nervura jovem	<i>Colletotrichum cliviae</i>	3
S6-LV	São João	Limbo velho	<i>Colletotrichum asianum</i>	9
S9-NV	São João	Nervura velha	<i>Colletotrichum asianum</i>	9
S9-LV	São João	Limbo velho	<i>Colletotrichum fructicola</i>	7

Tabela 1 Continuação.

ISOLADO	ÁREA	PARTE DA PLANTA	ESPÉCIE	HAPLÓTIPO
S9-NN	São João	Nervura jovem	<i>Colletotrichum fructicola</i>	7
S10-P	São João	Inflorescência	<i>Colletotrichum asianum</i>	9
S10-LN	São João	Limbo jovem	<i>Colletotrichum siamense</i>	6
S10-NN	São João	Nervura jovem	<i>Colletotrichum asianum</i>	9
S11-NV	São João	Nervura velha	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
130	Recife (Pq. de Exposições do Cordeiro)	Fruto (sintomático)	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
P49	Recife (Pq. de Exposições do Cordeiro)	Fruto (sintomático)	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
P46	Recife (Pq. de Exposições do Cordeiro)	Fruto (sintomático)	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
P50	Recife (Pq. de Exposições do Cordeiro)	Fruto (sintomático)	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
P45	Recife (Pq. de Exposições do Cordeiro)	Fruto (sintomático)	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
P43	Recife (Pq. de Exposições do Cordeiro)	Fruto (sintomático)	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
P47	Recife (Pq. de Exposições do Cordeiro)	Fruto (sintomático)	<i>Colletotrichum asianum</i>	10
P53	Recife (Pq. de Exposições do Cordeiro)	Fruto (sintomático)	<i>Colletotrichum asianum</i>	10

Tabela 2 Relação dos isolados e número de acesso do GenBank das sequências do gene GPDH utilizadas como referência.

Espécie	Isolado	Número de acesso no GenBank
		GPDH
<i>C. asianum</i>	MFU 090232 ^a	FJ 972571
<i>C. asianum</i>	MFU 090233	FJ 972576
<i>C. asianum</i>	MFU 090234	FJ 972573
<i>C. boninense</i>	MAFF 305972 ^a	GQ221769
<i>C. cliviae</i>	CSSK4 ^a	GQ856756
<i>C. cliviae</i>	CSSS1	GU085867
<i>C. cliviae</i>	CSSS2	GU085868
<i>C. fructicola</i>	MFU 090226 ^a	FJ 972579
<i>C. fructicola</i>	MFU 090227	FJ 972577
<i>C. fructicola</i>	MFU 090228	FJ 972578
<i>C. gloeosporioides</i>	CBS 953.97	FJ 972582
<i>C. gloeosporioides</i>	CORCG4 ^a	HM034806
<i>C. gloeosporioides</i>	CORCG5 ^a	HM034807
<i>C. siamense</i>	MFU 090230 ^a	FJ 972575
<i>C. siamense</i>	MFU 090231	FJ 972574
<i>C. simmondsii</i>	BRIP 28519	FJ 972580
<i>C. simmondsii</i>	CBS 294.67	FJ 972581

GDPH- gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

^a Ex-types.

Tabela 3 Frequência de isolamento (%) de *Colletotrichum* endófitas em mangueira.

Parte da planta	Área				
	Recife (Área I)	Recife (Área II)	Aldeia (Área III)	Itapirema (Área IV)	São João (Área V)
Ramo	0,28 b	1,14 bcd	0 d	0,29 bcde	0 e
Inflorescência	0,00 b	0 e	0 d	1,14 abcd	0,57 bcde
Limbo jovem	0,56 ab	1,43 bc	4,19 abc	2,57 a	1,71 bc
Nervura jovem	0,28 b	0,57 bcde	7,42 a	0,57 abcde	2 ab
Limbo velho	1,97 a	4,29 a	5,16 ab	1,43 ab	4,29 a
Nervura velha	0,28 b	1,71 bcd	4,19 abc	1,14 abc	1,43 bcd
Total	3,38 E	9,14 BC	20,97 A	7,14 BCD	10,00 B

Valores coma mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Z (P=0,05).

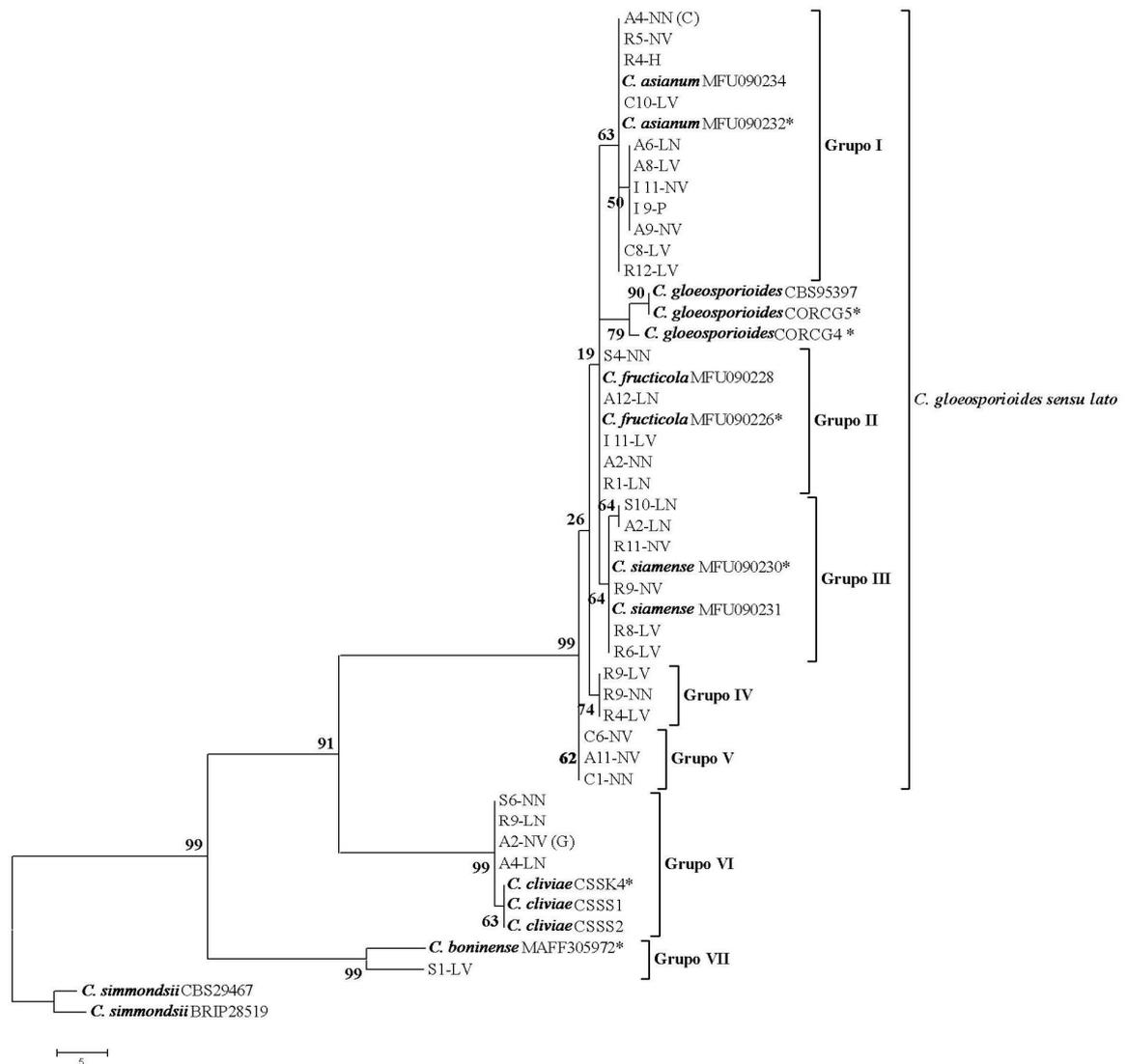
597 **Tabela 4** Relação dos dados culturais, morfológicos e de virulência das espécies de *Colletotrichum*.

Espécies	Formato do conídio	n*	Comprimento dos conídios (µm)	Largura dos conídios (µm)	Taxa de crescimento (mm.dia ⁻¹)	Área da lesão (mm ²)
<i>C. asianum</i>	Cilíndrico-clavado	72	14.84 ± 1.79 (12.31 – 18.56)	5.06 ± 0.43 (4.33 – 6.33)	6.60 ± 1.03 b (4.24 – 10.92)	334.01 ± 115.50 ab (8.09 – 767.01)
<i>C. cliviae</i>	Cilíndrico-fusiforme	4	17.01 ± 1.12 (15.94 – 18.18)	5.19 ± 0.18 (5.06 – 5.40)	9.22 ± 3.54 a (5.64 – 12.82)	164.81 ± 210.94 abc (5.59 – 468.66)
<i>C. fructicola</i>	Cilíndrico	8	13.84 ± 1.84 (9.97 – 15.08)	5.17 ± 0.44 (4.52 – 5.69)	10.63 ± 2.48 a (6.95 – 13.14)	103.50 ± 66.77 c (22.89 – 205.09)
<i>C. siamense</i>	Fusiforme	6	14.46 ± 1.30 (13.12 – 16.44)	4.73 ± 0.32 (4.43 – 5.17)	9.30 ± 3.68 a (4.63 – 15.50)	362.29 ± 220.37 ab (39.22 – 643.43)
Colletotrichum sp. Grupo IV	Cilíndrico	3	13.00 ± 0.39 (12.77 – 13.45)	4.45 ± 0.27 (4.14 – 4.67)	9.94 ± 0.75 a (9.10 – 10.55)	141.30 ± 66.83 bc (86.64 – 215.80)
Colletotrichum sp. Grupo V	Cilíndrico	3	12.67 ± 0.23 (12.41 – 12.86)	4.73 ± 0.61 (4.35 – 5.43)	9.93 ± 1.22 a (8.71 – 11.15)	402.70 ± 243.41 a (258.37 – 683.74)

598 Médias ± desvio padrão, seguidas com a mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste LSD de Fischer (P = 0,05).

599 * Número de isolados

600



601

602 **Figura 1** A história evolutiva foi inferida usando o método de Máxima Parcimônia (MP).

603 Uma das 246 árvores igualmente parcimoniosas (comprimento = 124) é mostrada. O índice de

604 consistência (CI) é (0,878094) e o índice de retenção (RI) é (0,964200), e, o índice composto

605 é 0,848496 (0,846615) para os todos os sítios e para todos os sítios informativos (em

606 parênteses). A percentagem de árvores na qual os táxons associados foram agrupados pelo

607 teste de bootstrap (1000 repetições) é mostrada próximo aos ramos.. A análise envolveu 48

608 sequências de nucleotídeos. Todas as posições que contêm gaps e dados inexistentes foram

609 eliminados. Houve um total de 75 posições no conjunto final de dados. Análises evolutivas

610 foram conduzidas no MEGA5 (Tamura et al., 2011). *C. simmondsii* foi utilizado como grupo
611 externo (outgroup). Os asteriscos indicam os epitipos.

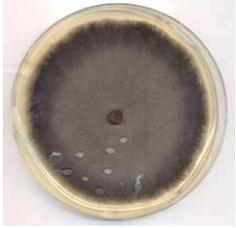
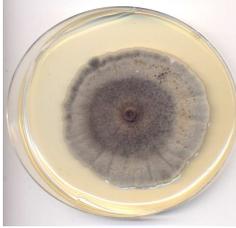
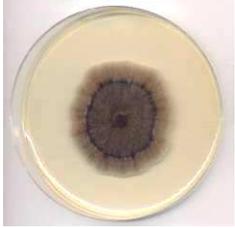
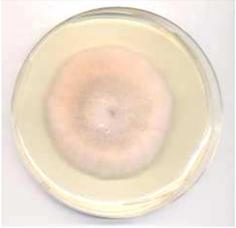
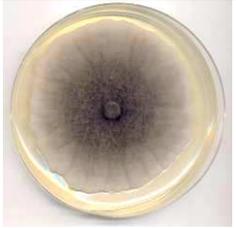
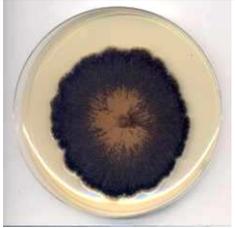
	<p>Morfogrupo 1: colônia cinza-esverdeado a cinza escuro, em tufo, reverso cinza escuro. Espécie: <i>C. asianum</i>; <i>C. siamense</i> Nº isolados: 60; 4</p>		<p>Morfogrupo 4: colônia cinza esverdeado escuro, felposa, reverso cinza escuro. Espécie: <i>C. siamense</i> Nº isolados: 1</p>		<p>Morfogrupo 7: colônia cinza a cinza pálido, felposa, reverso laranja, massas de esporulação abundantes e esparsas. Espécie: <i>C. fructicola</i> Nº isolados: 8</p>
	<p>Morfogrupo 2: colônia branca, cotonosa, micélio tipicamente estéril, reverso verde oliváceo. Espécie: <i>C. asianum</i> Nº isolados: 12</p>		<p>Morfogrupo 5: colônia cinza, cotonosa, reverso cinza escuro, massas de esporulação esparsas. Espécie: <i>C. boninense</i> Nº isolados: 1</p>		<p>Morfogrupo 8: colônia sépia, felposa, reverso cinza escuro ao centro. Espécie: <i>Colletotrichum</i> sp. Grupo IV Nº isolados: 2</p>
	<p>Morfogrupo 3: colônia laranja pálido, cotonosa, micélio tipicamente estéril, reverso creme. Espécie: <i>C. siamense</i> Nº isolados: 1</p>		<p>Morfogrupo 6: colônia cinza, cotonosa, reverso cinza pálido a cinza escuro ao centro Espécies: <i>C. clivae</i>; <i>Colletotrichum</i> sp. Grupo V Nº isolados: 4; 3</p>		<p>Morfogrupo 9: colônia preta, felposa, reverso cinza escuro, massas de esporulação abundantes. Espécie: <i>Colletotrichum</i> sp. Grupo IV Nº isolados: 1</p>

Figura 2 Quadro das imagens e descrição dos morfogrupos descritos para as espécies de *Colletotrichum* endófitas. Colônias com 4 dias de idade, cultivadas sob luz fluorescente contínua e temperatura de 25 °C.

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

- A área de coleta e a parte da planta interferem na frequência de isolamento de *Colletotrichum* endófitas em mangueiras no Estado de Pernambuco;
- O gene GPDH foi eficiente para a identificação das espécies *C. asianum*, *C. boninense*, *C. cliviae*, *C. siamense* e *C. fructicola* como endófitas em mangueira;
- Taxa de crescimento e aspecto da colônia são marcadores fenotípicos consistentes na identificação de isolados de *C. asianum*;
- O teste de patogenicidade elucidou que isolados de *Colletotrichum* endofíticos de mangueira comportam-se como patogênicos em frutos de manga;
- Os valores de taxa de isolamento evidenciaram *C. asianum* como a espécie prevalente.