



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**Diversidade de espécies de *Colletotrichum* causadoras de
antracnose em chuchuzeiro**

Christiane Almeida da Costa

**Recife – PE
2015**

CHRISTIANE ALMEIDA DA COSTA

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *COLLETOTRICHUM*
CAUSADORAS DE ANTRACNOSE EM CHUCHUZEIRO**

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. Ailton Reis (EMBRAPA Hortaliças) – Orientador

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

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (UFRPE) – Coorientador

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2015**

Ficha Catalográfica

C837d Costa, Christiane Almeida da
Diversidade de espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose no chuchuzeiro / Christiane Almeida da Costa. – Recife, 2015.
47 f.: il.

Orientador(a): Ailton Reis.
Dissertação (Programa de Pós-graduação em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2015.
Inclui apêndice(s) e referências.

1. *Sechium edule* 2. Antracnose 3. *Colletotrichum*
4. Filogenia multilocus 5. Morfologia I. Reis, Ailton, orientador
II. Título


CDD 632

DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *COLLETOTRICHUM* CAUSADORAS DE ANTRACNOSE EM CHUCHUZEIRO

CHRISTIANE ALMEIDA DA COSTA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 25/02/2015.

ORIENTADOR:

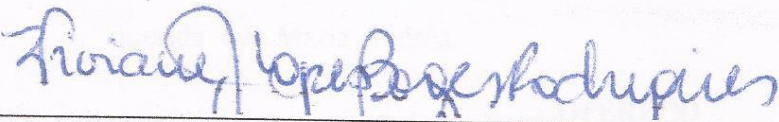


Prof^o. Dr. Ailton Reis (EMBRAPA Hortaliças)

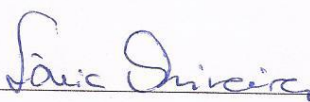
EXAMINADORES:



Prof^o. Dr^o. Marco Aurélio Siqueira da Gama (UFRPE)



Dr^a. Viviane Jurema Lopes Borges Rodrigues (MAPA)



Prof^a. Dra. Sônia Maria Alves de Oliveira (UFRPE)

RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2015

DEDICÓ

*"Todas as coisas na Terra passam.
Os dias de dificuldade passarão...
Passarão, também, os dias de ... solidão.
As dores e as lágrimas passarão.
As frustrações que nos fazem chorar... Um dia
passarão.
A saudade do ser querido que está longe, passará.
Os dias de tristeza...
Dias de felicidade...
São lições necessárias que, na Terra, passam,
deixando no espírito imortal
as experiências acumuladas.
...
Tudo passa...
exceto Deus."*

(Chico Xavier)

À família Almeida, por todo apoio e incentivo
nesta caminhada. Em especial à minha
querida avó Maria Andréa.

OFEREÇO

Aos meus queridos pais, Raimundo Lopes e Elineide Almeida pelo amor incondicional, apoio, ensinamentos e renúncias. Ao meu irmão Christian por toda amizade e apoio. Ao meu pai de coração Antônio Dalmácio, pelo exemplo de vida e por se fazer presente.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida que me concedeu e por mais essa conquista . Por se fazer presente em todos os momentos de fragilidade, pelo amparo nas horas de dificuldades e por me permitir seguir adiante.

Aos professores Ailton Reis, Marcos Câmara e Sami Michereff, pela atenção, orientação, paciência e por todos os preciosos ensinamentos repassados.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela concessão de bolsa de estudos.

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pelos bons exemplos de dedicação, profissionalismo, de amor a pesquisa e ensino. Em especial às professoras, Elineide Barbosa e Rosa de Lima Mariano, pela simplicidade e humanidade.

Aos integrantes do laboratório de Micologia, Willie Anderson, Mariote Netto, Eduardo Souza, Wilson Júnior, Jerusa Santos e Francisco Mendez (Kiko) pela cooperação e conhecimentos compartilhados e por todos os momentos de alegria, descontração e risos tornando o ambiente de trabalho muito mais harmônico e produtivo.

Ao querido amigo Cainã Mello, pelo companheirismo, compreensão e por ser o primeiro a incentivar essa jornada.

As queridas companheiras de casa Geane Miquele, Lizz Campos e Denyse Alexandre por toda amizade, por compartilharem suas rotinas, suas vidas e seus sonhos.

Meus agradecimentos em especial à Waléria Guerreiro Lima, por toda atenção e ajuda indispensáveis à realização deste trabalho, pela amizade, carinho e por acreditar em mim.

À minha querida amiga-irmã Monique Bezerra, que me acompanhou desde o início dessa jornada, pela amizade, companheirismo e lealdade em todos os momentos.

Às queridas Meridiana Araújo e Josiene Veloso, pela amizade, carinho e pelo exemplo de companheirismo e generosidade.

Sinceros agradecimentos à Tamiris Joana, Paulo Roberto, Nívia Teixeira, Luana Maria, Edilaine Melo, Elias Silva, Luiz Gustavo e Daniela Dambrós, por cada momento compartilhado.

Aos funcionários Darcy e Romildo por toda disponibilidade quando necessária.

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

Muito Obrigada!!!!

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO GERAL	vii
GENERAL ABSTRACT	viii
CAPÍTULO I Introdução Geral	2
Referências Bibliográficas	10
CAPÍTULO II <i>Colletotrichum</i> species diversity causing anthracnose in chayote	18
Abstract	19
Introduction	19
Materials and Methods	21
Results	25
Discussion	26
References	30
CONCLUSÕES GERAIS	47

RESUMO GERAL

A antracnose causada por espécies de *Colletotrichum* é uma das doenças mais importantes da cultura do chuchu no Brasil. Neste estudo, espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose em frutos e folhas de chuchuzeiro, de algumas regiões produtoras no Brasil, foram coletados e caracterizados a partir de métodos moleculares, morfologia e características culturais. Análise de Neighbor-Joining baseadas em sequências da região genômica da β -tubulina (TUB2), de 75 isolados de *Colletotrichum*, foram analisadas como uma primeira medida de diversidade genética. Um subgrupo de 32 isolados foram sequenciados usando os genes parcial actina (ACT), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), parcial actina (ACT) calmodulina (CAL) e genes rDNA- região ITS (ITS). Máxima verossimilhança (ML) foi realizada utilizando as sequências concatenadas. A análise multilocus das sequências, juntamente com um exame dos caracteres fenotípicos, revelou quatro espécies descritas anteriormente (*Colletotrichum brevisporum*, *C. cliviae*, *C. fructicola* e *C. karstii*) e duas espécies desconhecidas em oito morfotipos. Todos os isolados selecionados para representar cada haplótipo, no teste de patogenicidade foram capazes de induzir sintomas típicos de antracnose em chuchuzeiro, entretanto com variação em sua virulência. Todas estas espécies são relatadas pela primeira vez em associação ao chuchuzeiro e no Brasil e no mundo. *C. orbiculare* não é o agente causal da antracnose em chuchuzeiro no Brasil.

Palavras-chave: *Sechium edule*, antracnose, *Colletotrichum*, filogenia multilocus, morfologia.

GENERAL ABSTRACT

Anthrachnose caused by *Colletotrichum* species is the most important disease of chayote in Brazil. In this study, *Colletotrichum* species associated with anthracnose on fruits and leaves of chayote, from various producing regions in Brazil, were collected and characterized by molecular, morphology and cultural methods. Neighbor-Joining analysis based on sequences of the β -tubulin genomic region (TUB2) of 75 *Colletotrichum* isolates were analyzed as a first measure of genetic diversity. A subset of 32 isolates were sequenced using the partial sequences of actin (ACT), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), calmodulin (CAL) genes and rDNA ITS (ITS) region. Maximum Likelihood (ML) was performed using the concatenated sequences. The multilocus sequence analysis, associated with phenotypic characteristics revealed four previously described species (*Colletotrichum brevisporum*, *C. cliviae*, *C. fructicola* and *C. karstii*) and two unidentified species, in eight morphotypes. All isolates selected to represent each haplotype, in pathogenicity test were able to induce typical symptoms of anthracnose in chayote but varied in their virulence. All these species are reported for the first time associated with chayote Brazil and worldwide. *C. orbiculare* is not the causal agent of anthracnose chayote in Brazil.

Keywords: *Sechium edule*, anthracnose, *Colletotrichum*, multilocus phylogeny, morphology

CAPÍTULO I

Introdução Geral

DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *COLLETOTRICHUM* CAUSADORAS DE ANTRACNOSE EM CHUCHUZEIRO

INTRODUÇÃO GERAL

1. O chuchuzeiro

O chuchuzeiro [*Sechium edule* (Jacq.) Swartz] é uma planta herbácea de ramos muito longas, perene e trepadeira, que pertence à família Cucurbitaceae (LOPES et al., 1994). Originário do México, onde era cultivado pelos astecas, o chuchuzeiro tinha grande destaque entre as hortaliças da época. Sua fama transpôs, em pouco tempo, as fronteiras mexicanas passando primeiramente pelas Antilhas, sendo gradativamente disseminado para todas as demais regiões do planeta, a partir do descobrimento do continente americano, sendo hoje cultivado em diversos países do mundo (DOMINGUES et al., 2011; LOPES et al., 1994).

A planta de chuchu é muito exigente em água (VIEIRA, 2010) e produz bem sob temperaturas de 18 °C a 27 °C. Temperaturas acima de 28 °C afetam a viabilidade do pólen e, conseqüentemente, a produtividade. Em locais onde a temperatura varia entre 10 °C e 18 °C, as plantas podem manter-se vegetando o ano todo. Entretanto, o florescimento e a frutificação são afetados. Sob temperaturas mais baixas, estas param de crescer e as folhas secam, sendo totalmente dizimadas em condições de geadas (LOPES et al., 1994).

A época de plantio do chuchuzeiro varia nas diferentes regiões do Brasil. Nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste o cultivo é propício entre os meses de setembro e outubro. Na região Norte entre abril e julho, enquanto na região Nordeste o cultivo pode ser realizado durante o ano todo. A colheita pode ser realizada cerca de 100 a 120 dias após o plantio (VIEIRA, 2010).

A cultura é mais conhecida devido ao fruto verde e carnoso, que contém uma única semente, e que é utilizado para consumo, embora, os ramos e folhas tenras também sejam comestíveis. No México, as raízes podem ser encontradas em mercados para serem consumidas (DOMINGUES et al., 2011). Fonte de vitaminas, sais minerais e aminoácidos livres, de bom valor energético e excelente qualidade em fibras, o chuchu é recomendado particularmente para pessoas que estão sob dieta e que precisam de um alimento de fácil digestão (LOPES et al., 1994). O fruto também é utilizado na indústria de compotas de frutas, forragem e medicamentos (FILGUEIRA, 2008).

O chuchuzeiro é produzido comercialmente no Brasil, Costa Rica, Itália, México, Porto Rico e Índia (MONTANO et al., 2000). Em geral, espécies da família Cucurbitaceae são produzidas em quantidades relativamente pequenas, para consumo local e, por isso, não costumam figurar nas estatísticas de produção de forma mais significativa, embora constituam itens importantes na dieta alimentar de muitos povos (SANTI et al., 2013).

No Brasil encontra-se entre as 10 hortaliças mais consumidas, sendo os principais produtores os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Pernambuco, Minas Gerais e Paraná (DOMINGUES et al., 2011). Em 2012, o estado de São Paulo apresentou uma área cultivada de 2.067 hectares com produção de 101.503 toneladas (IEA, 2012). O estado de Minas Gerais teve 1.067 hectares cultivados e produção de 90.818,72 toneladas (EMATER-MG, 2012), enquanto o Paraná teve 1.589 hectares cultivados e produção de 61.890 toneladas (SEAB-PR, 2012).

Durante o cultivo de hortaliças podem ocorrer diversas doenças prejudiciais ao crescimento e desenvolvimento destas. Danos causados pelo ataque de patógenos podem levar, além da redução do desenvolvimento, à destruição dos tecidos ou até à morte da planta, o que reflete diretamente na baixa produtividade da cultura, ou mesmo danos diretos ao produto final colhido reduzindo, portanto, sua qualidade ou prejudicando sua aparência (PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013). Dentre as doenças que ocorrem no chuchuzeiro destacam-se o oídio [*Oidium* sp. = *Podosphaera xanthii* (Castagne) U. Braun & Shishkoff], a mancha zonada da folha (*Leandria momordica* Rangel), as galhas de nematoides [*Meloidogyne incognita* Kofoid & White e *M. javanica* (Treub) Chitwood] e a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum orbiculare* Damm, P.F. Cannon & Crous. Esta última é considerada a doença mais frequente e potencialmente mais destrutiva do chuchuzeiro, causando prejuízos elevados, especialmente em regiões de clima tropical e subtropical (DOMINGUES et al., 2011; LOPES et al., 1994; REIS; HENZ; BRUNE, 2008).

2. A antracnose do chuchuzeiro

No chuchuzeiro, a antracnose pode afetar toda parte aérea da planta, em qualquer fase do seu desenvolvimento. A doença ocorre com maior severidade em clima quente e em épocas chuvosas. Nessas condições, quando não é realizado o controle adequado, a doença pode provocar perdas de até 100% (DOMINGUES et al., 2011; KUROSZAWA; PAVAN, 1997; REIS; HENZ; BRUNE, 2008; SITTERLY; KEINATH, 1996).

A etiologia da antracnose do chuchuzeiro têm sido atribuída à espécie *C. orbiculare* que é um importante patógeno causador da antracnose também em outras cucurbitáceas, tais como o pepino (*Cucumis sativus* L.), o melão (*Cucumis melo* L.), a melancia [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai] e as abóboras (*Cucurbita pepo* L. e *Cucurbita máxima* Duchesne). Além destas, esta espécie fúngica é relatada em cerca de 40 espécies de plantas hospedeiras em todo o mundo (FARR; ROSSMAN, 2015). *C. orbiculare* apresenta colônia de formato irregular, com micélio acinzentado, marrom escuro a negro, com margens pálidas e rosadas. A massa conidial apresenta coloração que varia do rosa ao salmão, podendo apresentar esclerócios (SUTTON, 1992). Conídios hialinos, asseptados, de formato reto, cilíndrico ou clavado, com o ápice arredondado e base truncada variando de 10,5-12,5 µm por 4-4,5 µm e apressórios de coloração que variam do pálido ao marrom médio, com formato ovalado ou clavado, com comprimento variando entre 5,5-8,5 µm por 4,5-6,5 µm de largura (DAMM et al., 2013). *C. lagenarium* (Pass.) Ellis & Halsted é considerado sinonímia de *C. orbiculare* (VON ARX, 1957a) e as formas sexuais ligadas a cada um desses nomes foram descritas como *Glomerella lagenaria* (Pass.) F. Stevens nos Estados Unidos da América (EUA) (STEVENS, 1931) e no Japão (WATANABE; TAMURA, 1952), e *Glomerella cingulata* var. *orbiculare* S.F. Jenkins & Winstead nos EUA (JENKINS; WINSTEAD, 1962).

Os sintomas da antracnose ocorrem principalmente nas folhas e frutos do chuchuzeiro. Nas folhas, são formadas lesões circulares grandes, que podem coalescer e provocar queima das mesmas. No caule ou nos frutos, as lesões são elípticas e deprimidas, de coloração pálido-rósea. Infecções, quando severas, causam queda de folhas e apodrecimento dos frutos. No campo as lesões se expandem rapidamente e, em condições de armazenamento, as lesões podem coalescer formando lesões maiores, deprimidas, que com o tempo são preenchidas com massas de esporos do fungo, de coloração rosa. A doença também é muito comum na pós-colheita, pois frutos colhidos aparentemente sadios desenvolvem os sintomas após alguns dias (LOPES et al., 1994; SITTERLY; KEINATH, 1996; REIS; HENZ; BRUNE, 2008).

As principais fontes de inóculo inicial da antracnose do chuchuzeiro são outras cucurbitáceas, cultivadas ou selvagens. Os frutos-sementes são os principais responsáveis pela introdução do fungo em novas áreas de cultivo. Dentro da área de produção, a disseminação ocorre pelo impacto de gotas de água sobre as lesões esporulantes. Chuvas ou irrigações excessivas, condições de alta umidade e temperaturas entre 21 e 27°C são favoráveis ao desenvolvimento da doença (KUROZAWA; PAVAN; REZENDE, 2005; LOPES et al., 1994).

Algumas espécies de *Colletotrichum* formam microesclerócios, que atuam como estruturas de sobrevivência, permitindo que o fungo permaneça em estado dormente no solo, durante o inverno ou em condições de estresse. Os microesclerócios podem sobreviver por muitos anos, mesmo com a rotação de culturas, embora reduções significativas no inóculo sejam prováveis (PHOULIVONG, 2011). Os apressórios também podem servir como estruturas de sobrevivência, até que um *peg* de infecção se forme e penetre na superfície do hospedeiro (RATANACHERDCHAI et al., 2010).

O manejo da antracnose das cucurbitáceas consiste na utilização de sementes sadias, emprego de cultivares resistentes, destruição de restos culturais e de outras cucurbitáceas, rotação de culturas por dois a três anos, manejo adequado da irrigação com preferência à irrigação localizada (KUROZAWA; PAVAN; REZENDE, 2005; SITTERLY; KEINATH, 1996). Até o momento não há registro de fungicidas para o controle de *C. orbiculare* em chuchuzeiro no Brasil (MAPA, 2015).

3. O gênero *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* foi introduzido inicialmente por Tode, em 1790, com a denominação de *Vermicularia* Tode. Em 1831, Corda o reclassificou com a denominação de *Colletotrichum* (teleomorfo *Glomerella* Spauld. & H. Schrenk). Em 1837, Corda caracterizou o gênero *Colletotrichum*, de maneira geral, como fungos que apresentam conídios hialinos, retos, fusiformes ou curvados e acérvulos com setas (HYDE et al., 2009; SUTTON, 1980, 1992).

As espécies de *Colletotrichum* apresentam colônias de coloração variada em meio de cultura, com tonalidades que vão do branco-gelo ao cinza-escuro, com quantidade variável de micélio aéreo. Além disso, a presença de esclerócios e/ou de microesclerócios ocorre em algumas espécies do gênero (SUTTON, 1992).

O gênero *Colletotrichum* ocupa a oitava posição entre os fungos fitopatogênicos mais importantes em todo o mundo, em função da importância econômica do ponto de vista fitopatológico. O gênero causa a antracnose, uma doença que afeta uma ampla gama de hospedeiros, incluindo cereais, gramíneas, leguminosas, hortaliças, culturas perenes e árvores frutíferas (DEAN et al., 2012). Este gênero possui espécies com vários estilos de vida, como endofitas, epífitas, saprófitas, fitopatogênicas e até patogênicas ao homem (SUTTON, 1992; PHOULIVONG, 2011).

No processo de infecção, o conídio de *Colletotrichum* se adere e germina na superfície da planta hospedeira, emite o tubo germinativo e forma, em sua extremidade, o apressório, que por sua vez, germina e dá início ao *peg* (hifa) de penetração, que entra diretamente na superfície do tecido hospedeiro. Abaixo da cutícula e da epiderme, o fungo cresce e penetra, em seguida, nas células epidérmicas (BAILEY et al., 1992; LIAO et al., 2012; PERFECT et al., 1999). O estabelecimento dentro dos tecidos vegetais é auxiliado via produção pelo fungo de efetores de virulência induzida na hospedeira (KLEEMAN et al., 2012; O'CONNELL et al., 2012). As colônias, na maioria dos casos, entram em seguida numa fase biotrófica com tecidos infectados permanecendo externamente assintomáticos por um a três dias (O'CONNELL et al., 2000) ou estendendo-se e, presumivelmente, envolvendo dormência (PRUSKY; PLUMBLEY, 1992). Em seguida, o fungo entra em uma fase necrotrófica que resulta em morte significativa de células vegetais e o aparecimento de lesões patogênicas. Esse atraso no aparecimento dos sintomas da doença pode levar a perdas significativas na pós-colheita, com frutos aparentemente saudáveis apodrecendo no armazenamento (PRUSKY; PLUMBLEY, 1992). As estratégias de vida biotrófica adotadas por espécies de *Colletotrichum* também podem contribuir para a sua presença constante como endófitos assintomáticos em tecidos de plantas vivas (DELAYE; GARCÍA-GUZMÁN; HEIL, 2013; LU et al., 2004; ROJAS et al., 2010).

A delimitação de espécies para o gênero *Colletotrichum* foi por longa data realizada com base em critérios descritivos clássicos, como dimensões dos conídios, presença ou ausência e morfologia das setas. Outros critérios complementares foram incluídos posteriormente, como gama de hospedeiros (SUTTON, 1980) e taxa de crescimento micelial (TALHINHAS et al., 2002).

Durante muitos anos, as espécies de *Colletotrichum* foram consideradas como específicas para as plantas que infectavam, levando a um grande número de taxa descritos a partir da associação com plantas hospedeiras, e com poucas características distintivas. Atualmente, a compreensão da extensão da especificidade hospedeira das espécies de *Colletotrichum* é imperfeita. Isto acontece, devido a uma série de fatores, incluindo a amostragem incompleta, restrição de dados em grande parte para as populações que afetam plantas cultivadas ou ornamentais, e pouco conhecimento dos efeitos patogênicos. Informações sobre a maioria dos isolados em coleções de culturas indicam associação com uma determinada espécie de planta, mas raramente fornecem detalhes dessa interação (CANNON et al., 2012). A capacidade de muitas espécies de *Colletotrichum* existirem como endófitos acrescenta complicação extra para a compreensão da especificidade do hospedeiro

(LIU; XIE; DUAN, 2007; LU et al., 2004; ROJAS et al., 2010). O isolamento do tecido da planta viva não implica, necessariamente, que a espécie é um patógeno latente com uma fase hemibiotrófica (LATUNDÊ-DADA, 2001; PERES et al., 2005; MÜNCH et al., 2008; DELAYE; GARCÍA-GUZMÁN; HEIL, 2013), e distinguir entre as duas estratégias de vida é problemático. A investigação sobre a base molecular das interações parasita-hospedeiro em *Colletotrichum* é atualmente altamente ativa (O'CONNELL et al., 2012), e tais abordagens vão dominar a investigação no futuro sobre a extensão da especificidade do hospedeiro exibido por espécies de *Colletotrichum* (CANNON et al., 2012).

Cerca de 900 espécies já foram descritas ou transferidas para o gênero *Colletotrichum* (BAILEY et al., 1992). Von Arx (1957a, b) reduziu o número de espécies relacionadas à *Colletotrichum*, de várias centenas (mais de 800) a 11 espécies com 12 *formae speciales*, baseando-se em caracteres morfológicos (morfologia dos conídios), relação com o estágio perfeito e patogenicidade. Sutton (1980) considerou válidas 22 espécies de *Colletotrichum*, com a distinção destas com base na morfologia de conídios e apressórios, além de características culturais das colônias. Mais tarde, Sutton (1992) aumentou esse número para 39 espécies “aceitas”, incluindo uma variedade e oito *formae speciales*, com base nos padrões utilizados no trabalho anterior e na especificidade do hospedeiro. Na 10ª edição do Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi, foi estimada a existência de 60 espécies de *Colletotrichum* (KIRK et al., 2008). Hyde et al. (2009) forneceram uma visão geral de 66 espécies de *Colletotrichum*, descrevendo-as com base na morfologia e na abordagem filogenética multilocus. Com a publicação do trabalho de Cannon et al. (2012), mais 41 espécies foram introduzidas no gênero *Colletotrichum*, elevando o número para mais de 100 espécies.

As identificações das espécies de *Colletotrichum* foram previamente baseadas na morfologia e em menor extensão na associação com o hospedeiro. Atualmente, a identificação de espécies de *Colletotrichum* baseada apenas na morfologia é problemática, pois existem poucas características confiáveis. Muitas dessas características são plásticas, variando conforme os métodos e condições experimentais, o que pode influenciar na caracterização morfológica e gerar sobreposições entre as espécies (CAI et al., 2009; CANNON et al., 2012; DAMM et al., 2009; HYDE et al., 2009). Por isso, 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 (SHENOY; JEEWON; HYDE, 2007).

As primeiras aplicações de dados de sequências de DNA para distinguir espécies de *Colletotrichum* foram publicadas por Mills; Hodson; Brown (1992) e Sreenivasaprasad; Brown; Mills (1992), que identificaram variação na sequência da região do ITS1 do nrDNA entre seis espécies de *Colletotrichum*, bem como detectaram polimorfismos na mesma região entre isolados de *C. gloeosporioides* de diferentes hospedeiros. A região ITS é a que possui maior número de sequências de *Colletotrichum* depositadas no GenBank. A análise filogenética utilizando dados desta região é uma ferramenta útil para uma identificação preliminar da espécie de *Colletotrichum* ou para colocá-lo em um complexo de espécie (CAI et al., 2009). No entanto, atualmente já são conhecidas as limitações da região ITS e outros marcadores para identificação de espécies deste gênero fúngico, assim a descoberta e uso de *loci* mais informativos tornou-se cada vez mais necessário (SILVA et al., 2012).

Como os genes utilizados na identificação não são eficientes individualmente para diferenciar as espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum* (HYDE et al., 2014), foi sugerido o uso de múltiplos marcadores (CAI et al., 2009). Diante disso, várias regiões do genoma do gênero *Colletotrichum* vêm sendo analisadas em conjunto com a região ITS, entre as quais a β -tubulina (TUB2), Fator de alongação 1- α (EF1- α), Actina (ACT), Calmodulina (CAL), Glutamina sintetase (GS), Quitina sintetase (CHS), Histona (HIS), Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e Apn2 e Mat1-2 (ApMat) (PRIHASTUTI et al., 2009; CANNON et al., 2012; DAMM et al., 2013; SHARMA et al., 2013). Em estudo recente constatou-se que, os marcadores mais eficientes para a identificação do gênero *Colletotrichum* foram β -tubulina e GAPDH. Entretanto, β -tubulina apresentou-se melhor do que GAPDH devido ao maior número total de diferenças de pares de bases, embora alguns clados tenham apresentado diferença em apenas um par de bases no alinhamento para β -tubulina (DAMM et al., 2012a).

A análise filogenética baseada em sequências nucleotídicas concatenadas, ou seja, que inclui duas ou mais regiões genômicas no estudo, aumenta o grau de certeza das inferências filogenéticas, devido ao maior número de nucleotídeos analisados, diminuindo o risco de recriar árvores de genes ao invés de árvores de espécies. Entretanto, apesar da vantagem da utilização de sequências concatenadas, é necessário que existam disponíveis em banco de dados reconhecidos internacionalmente, sequências de genoma completo ou de regiões subgenômicas para a análise das espécies do gênero *Colletotrichum* (CANNON; BRIDGE; MONTE, 2000; CROUCH et al., 2009; DAMM et al., 2009; PRIHASTUTI et al., 2009).

A abordagem polifásica, baseada na análise da sequência de um conjunto de múltiplos *loci*, ou seja, análise filogenética baseada em diversos genes, juntamente com dados morfológicos, fisiológicos e de patogenicidade, deve ser recomendada para identificação

precisa das espécies de *Colletotrichum*, por possibilitarem o reconhecimento de clados estáveis e bem desenvolvidos do gênero (CAI et al., 2009). A abordagem polifásica permitiu agrupar 119 espécies de *Colletotrichum* em nove clados (acutatum, boninense, dematium, destructivum, gloeosporioides, graminicola, orbiculare, spaethianum e truncatum), com as espécies, contidas em cada clado, filogeneticamente muito próximas, além de se verificar a presença de espécies isoladas, ou seja, espécies não pertencentes a algum dos complexos já descritos (CANNON et al., 2012). Baseado no reconhecimento de que existem complexos de espécies dentro das espécies anteriormente determinadas, estudos baseados no sequenciamento em multilocus usando as regiões dos genes ITS, GAPDH, CHS-1, HIS3, ACT, TUB2 e GS permitiram a separação em complexos de espécies de *Colletotrichum*. Como o complexo acutatum ficou constituído por 31 espécies de *Colletotrichum* (DAMM et al., 2012b), o complexo boninense por 18 espécies (DAMM et al., 2012a), dematium e destructivum por 6 espécies, o complexo gloeosporioides por 22 espécies, graminicola com 13 espécies, spaethianum e truncatum por 5 e 3 espécies respectivamente e o complexo orbiculare por oito espécies (DAMM et al., 2013WEIR; DAMM.; JOHNSTON, 2012).

Inexistem, em nível mundial, estudos sobre a caracterização molecular de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do chuchuzeiro utilizando uma ampla coleção de isolados, representativa de diferentes regiões de produção. No único estudo realizado no Brasil, foram utilizados três isolados de *Colletotrichum* obtidos de chuchu e o sequenciamento da região ITS, sendo possível a identificação de somente um isolado, como *C. orbiculare* (SUSSEL, 2005). E mais recentemente em um estudo, que promoveu a epitificação do complexo orbiculare, nenhum isolado de chuchu foi utilizado (DAMM et al., 2013). A correta identificação e caracterização da diversidade das espécies de *Colletotrichum*, patogênicas a uma determinada planta hospedeira, é fundamental para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de controle, além de propiciar um melhor entendimento da epidemiologia da doença (PHOULIVONG, 2011). Portanto, o objetivo dessa dissertação foi caracterizar as espécies de *Colletotrichum* associadas com a antracnose do chuchuzeiro em vários polos produtores do Brasil, baseada na análise de genes em multilocus, características morfológicas e culturais e testes de patogenicidade e virulência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, J. A.; O'CONNELL, R. J.; PRING, R. J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford: Centre for Agriculture and Biosciences International, 1992. p. 88-120.
- CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; WALLER, J.; ABANG, M. M.; ZHANG, J. Z.; YANG, Y. L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z. Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R. G.; MCKENZIE, E. H. C.; JOHNSTON, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, n. 1, p. 183-204, 2009.
- 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. (Eds.). *Colletotrichum: host specificity, pathology, and host pathogen interaction*. St. Paul: APS Press, 2000. p. 1-20.
- CANNON, P. F., DAMM, U., JOHNSTON, P. R., WEIR, B. S. *Colletotrichum* - current status and future directions. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, n. 1, p. 181-213, 2012.
- CROUCH, J. A.; CLARKE, B. B.; WHITE, J. F.; HILLMAN, B. I. Systematic analysis of the falcate-spored gramminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species of the fungus from warm season grasses. **Mycologia**, Bronx, v. 101, n. 5, p. 717-732, 2009.
- 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, n. 1, p. 45-87, 2009.
- DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, n. 1, p. 37-113, 2012a.
- DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, n. 1, p. 1-36, 2012b.
- DAMM, U.; CANNON, P. F.; LIU, F.; BARRETO, R. W.; GUATIMOSIM, E.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum orbiculare* species complex: important pathogens of field crops and weeds. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 61, n.1, p. 29-59, 2013.

DEAN, R.; KAN, J. A. L. V.; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P. D.; RUDD, J. J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, E.; FOSTER, G. D. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 13, n. 4, p. 414-430, 2012.

DELAYE, L.; GARCÍA-GUZMÁN, G.; HEIL, M. Endophytes versus biotrophic and necrotrophic pathogens - are fungal lifestyles evolutionarily stable traits? **Fungal Diversity**, Kunming, v. 60, n. 1, p.125-135, 2013.

DOMINGUES, R. J.; TÖFOLI, J. G.; FERRARI, J. T.; AZEVEDO FILHO, J. A. Principais doenças fúngicas do chuchuzeiro (*sechium edule*) no estado de São Paulo. **Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 5-9, 2011.

EMATER-MG (EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS). **Acompanhamento de safra agrícola** [on line]. Belo Horizonte: Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais, 2012. Disponível em: <<http://www.emater.mg.gov.br/>>. Acesso em: 15 dez. 2014.

FARR, D. F.; Rossman, A. Y. **Fungal databases: fungus-host distributions** [on line]. Beltsville: Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS-USDA, 2015. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm>>. Acesso em: 02 jan. 2015.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa: Editora UFV, 2008. 421 p.

HYDE, K. D.; CAI, L.; CANNON, P. F.; CROUCH, J. A.; CROUS, P. W.; DAMM, U.; GOODWIN, P. H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P. R.; JONES, E. B. G.; LIU, Z. Y.; MCKENZIE, E. H. C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S. R.; PFENNING, L. H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R. G.; TAN, Y. P.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z. *Colletotrichum* - names in current use. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, n. 1, p. 147-183, 2009.

HYDE, K. D.; NILSSON, R.H.; ALIAS, S. A.; ARIYAWANSA, H. A.; BLAIR, J. E.; CAI, L.; COCK, A. W. A. M.; DISSANAYAKE, A. J.; GLOCKLING, S. L.; GOONASEKARA, I. D.; GORCZAK, M.; HAHN, M.; JAYAWARDENA, R. S.; VAN KAN, J. A. L.; LAURENCE, M. H.; LÉVESQUE, C. A.; LI, X.; LIU, J. K.; MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; MANAMGODA, D. S.; MARTIN, F. N.; MCKENZIE, E. H. C.; MCTAGGART, A. R.; MORTIMER, P. E.; NAIR, P. V. R.; PAWŁOWSKA, J.; RINTOUL, T. L.; SHIVAS,

R. G.; SPIES, C. F. J.; SUMMERELL, B. A.; TAYLOR, P. W. J.; TERHEM, R. B.; UDAYANGA, D.; VAGHEFI, N.; WALTHER, G.; WILK, M.; WRZOSEK, M.; XU, J. C.; YAN, J.; ZHOU, N. One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera: I (2014). **Fungal Diversity**, Kunming, DOI 10.1007/s13225-014-0298-1, 2014.

IEA (INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA). **CATI Anuários**: banco de dados [online]. São Paulo: Instituto de Economia Agrícola, 2012. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br>>. Acesso em: 15 dez. 2014.

JENKINS, S. F.; WINSTEAD, N. N. Morphology, taxonomy and sexuality of the ascogenous stages of two *Colletotrichum* spp. that attack cucurbits. *Phytopathology*, Lancaster, v. 52, n. 1, p.15, 1962.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. **Ainsworth and Bisby's Dictionary of Fungi**. 10. ed. Wallingford: Centre for Agriculture and Biosciences International, 2008. 771 p

KLEEMANN, J.; RINCON-RIVERA, L. J.; TAKAHARA, H.; NEUMANN, U.; VAN THEMAAT, E. V. L.. van der Does, H. C.; Hacquard, S.; Stüber, K.; Will, I.; Schmalenbach, W.; Schmelzer, E.; O'Connell, R.J. Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002643, 2012. DOI:10.1371/journal.ppat.1002643.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças das cucurbitáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.). **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 325-337.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A.; REZENDE, J. A. M. Doenças das cucurbitáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 292-302.

LATUNDE-DADA, A. O. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 2, n. 4, p. 187-198, 2001.

LIAO, C.-Y.; CHEN, M.-Y.; CHEN, Y.-K.; KUO, K.-C.; CHUNG K.-R. LE, M.-H. Formation of highly branched hyphae by *Colletotrichum acutatum* within the fruit cuticles of *Capsicum* spp. **Plant Pathology**, London, v. 61, n. 2, p. 262-270, 2012.

- LIU, X.; XIE, X.; DUAN, J. *Colletotrichum yunnanense* sp. nov., a new endophytic species from *Buxus* sp. **Mycotaxon**, New York, v. 100, n. 1, p. 137-144, 2007.
- LOPES, J. F.; OLIVEIRA, C. A. S.; FRANÇA, F. H.; CHARCHAR, J. M.; MARISHIMA, N.; FONTES, R.R. **A cultura do chuchu**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 1994. 53 p. (Coleção Plantar, 14).
- LU, G.; CANNON, P. F.; REID, A.; SIMMONS, C.M. Diversity and molecular relationships of endophytic *Colletotrichum* isolates from the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycological Research**, London, v. 108, n. 1, p. 53-63, 2004.
- MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **Agrofit** - sistemas de agrotóxicos fitossanitários [on line]. Brasília: Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2015. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 02 jan. 2015.
- MILLS, P. R.; HODSON, A.; BROWN, A. E. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruits. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: Centre for Agriculture and Biosciences International, 1992. p. 269-288.
- MONTANO, H. G., DAVIS, R. E., DALLY, E. L., PIMENTEL, J. P., BRIOSO, P. S. T. 2000. Identification and phylogenetic analysis of a new phytoplasma from diseased chayote in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, n. 4, p.429-436.
- MÜNCH, S.; LINGNER, U.; FLOSS, D. S.; LUDWIG, N.; SAUER, N.; DEISING, H. B. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. **Journal of Plant Physiology**, Berlin, v. 165, n. 1, p. 41-51, 2008.
- O'CONNELL, R. J.; PERFECT, S.; HUGHES, B.; CARZANIGA, R.; BAILEY, J. A.; GREEN, J. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Eds.). **Colletotrichum: host specificity, pathology, and host pathogen interaction**. St. Paul: APS Press, 2000. p. 57-77.
- O'CONNELL, R. J.; THON, M. R.; HACQUARD, S.; AMYOTTE, S. G.; KLEEMANN, J. Life-style transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**, New York, v. 44, n. 9. p. 1060-1067, 2012.

- PEREIRA, R. B.; CARVALHO, A. D. F.; PINHEIRO, J. B. **Diagnose e controle alternativo de doenças em tomate, pimentão, cucurbitáceas e cenoura**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2013. 16 p. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 121).
- PERES, N. A.; TIMMER, L. W.; ADASKAVEG, J. E.; CORRELL, J. C. Life styles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, n. 8, p. 784-796, 2005.
- PERFECT, S. E.; HUGHES, H. B.; O'CONNELL, R. J.; GREEN, J. R. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 27, n. 2-3, p. 186-198, 1999.
- PHOULIVONG, S. *Colletotrichum*, naming, control, resistance, biocontrol of weeds and current challenges. **Current Research in Environmental and Applied Mycology**, Chiang Rai, v. 1, n. 1, p. 53-73, 2011.
- PRIHASTUTI, H.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, n.1, p. 89-109, 2009.
- PRUSKY, D.; PLUMBLEY, R. A. Quiescent infections of *Colletotrichum* in tropical and subtropical fruit. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.). **Colletotrichum**: biology, pathology and control. Wallingford: Centre for Agriculture and Biosciences International, 1992. p. 289-307.
- RATANACHERDCHAI, K.; WANG, H.; LIN, F.; SOYTONG, K. ISSR for comparison of cross-inoculation potential of *Colletotrichum capsici* causing chili anthracnose. **Microbiology Research**, Berlin, v. 4, n. 1, p. 76-83, 2010.
- REIS, A.; HENZ, G. P.; BRUNE, S. **Principais doenças do chuchu no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. 5 p. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 60).
- ROJAS, E. I.; REHNER, S. A.; SAMUELS, G. J.; VAN BAEL, S. A.; HERRE, E. A. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish pathogen and endophyte clades. **Mycologia**, Bronx, v. 102, n. 6, p. 1318-1338, 2010.
- SANTI, A.; SCARAMUZZA, W. L. M. P.; SOARES, D. M. J.; SCARAMUZZA, J. F.; DALLACORT, R.; KRAUSE, W.; TIEPPO, R. C. Desempenho e orientação do crescimento do pepino japonês em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 649-653, 2013.

SEAB-PR (SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO DO PARANÁ). **Área, produção e valor das principais hortaliças cultivadas no Paraná - safra 2011/2012**. Curitiba: Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, 2012. Disponível em: < <http://www.agricultura.pr.gov.br/>>. Acesso em: 15 dez. 2014.

SHARMA, G.; KUMAR, N.; WEIR, B. S.; HYDE, K. D.; SHENOY, B. D. The ApMat marker can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 61, n. 1, p. 117-138, 2013.

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

SILVA, D. N.; TALINHAS, P.; VÁRZEA, V.; CAI, L.; PAULO, O. S.; BATISTA, D. Application of the Apn2/ MAT locus to improvise the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: an example from coffee (*Coffea* spp.) hosts. **Mycologia**, Bronx, v. 104, n. 2, p. 396-409, 2012.

SITTERLY, R. W.; KEINATH, A.P. Anthracnose. In: ZITTER, T. A.; HOPKINS, D. L.; THOMAS, C. E. (Eds.). **Compendium of cucurbit diseases**. St. Paul: APS Press, 1996. p. 24-25.

SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E.; MILLS, P. R. DNA sequence variation and interrelationship among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, n. 4, p. 265-281, 1992.

STEVENS, F. L. The ascigerous stage of *Colletotrichum lagenarium* induced by ultra-violet irradiation. **Mycologia**, Brox, v. 23, n. 2, p. 134-139, 1931.

SUSSEL, A. A. B. **Caracterização de isolados de *Colletotrichum lagenarium*, agente causal da antracnose das cucurbitáceas**. 2005. 68 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

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

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

- TALHINHAS, P.; SREENIVASAPRASAD, S.; NEVES-MARTINS, J.; OLIVEIRA, H. Genetic and morphological characterisation of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 9, p. 986-996, 2002.
- VIEIRA, D. F. A. (Coord.). **Catálogo brasileiro de hortaliças**: saiba como plantar e aproveitar 50 das espécies mais comercializadas no País. Brasília: SEBRAE - Embrapa Hortaliças, 2010. 60 p.
- VON ARX, J. A. Revision der zu *Gloeosporium* gestellten pilze. **Natuurkunde**, Amsterdam, v. 51, n. 3, p. 1-153, 1957a.
- VON ARX, J. A. Die arten der gattung *Colletotrichum* Cda. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, n. 29, n. 5, p. 413-468, 1957b.
- WATANABE, T.; TAMURA, M. Studies on the perfect stage of the causal fungus of the anthracnose of cucumber. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 16, n. 1, p. 137-140, 1952.
- WEIR, B.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, n. 1, p. 115-180, 2012.

CAPÍTULO II

Diversity of *Colletotrichum* species causing anthracnose in chayote in Brazil

Diversity of *Colletotrichum* species causing anthracnose in chayote in Brazil

**Christiane A. Costa¹ · Waléria G. Lima¹ · Willie A. S. Vieira¹ · Sami J. Michereff¹ ·
Marcos P. S. Câmara¹ · Ailton Reis²**

¹ Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, Brazil

² Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária –EMBRAPA, Embrapa Hortaliças (Embrapa Vegetables) – CNPH, Caixa Postal 218, 70351-970, Brasília-DF, Brasil.

Corresponding author: Ailton Reis- e-mail: ailton.reis@embrapa.br

Telephone number: +55 61 33859058

Abstract

Anthrachnose caused by *Colletotrichum* species is the most important disease of chayote in Brazil. In this study, *Colletotrichum* species associated with anthracnose on fruits and leaves of chayote, from various producing regions in Brazil, were collected and characterized by molecular, morphology and cultural methods. Neighbor-Joining analysis based on sequences of the β -tubulin genomic region (TUB2) of 75 *Colletotrichum* isolates were analyzed as a first measure of genetic diversity. A subset of 32 isolates were sequenced using the partial sequences of actin (ACT), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), calmodulin (CAL) genes and rDNA ITS (ITS) region. Maximum Likelihood (ML) was performed using the concatenated sequences. The multilocus sequence analysis, associated with phenotypic characteristics revealed four previously described species (*Colletotrichum brevisporum*, *C. cliviae*, *C. fructicola* and *C. karstii*) and two unidentified species, in eight morphotypes. All isolates selected to represent each haplotype, in pathogenicity test were able to induce typical symptoms of anthracnose in chayote fruits but varied in their virulence. All these species are reported for the first time associated with chayote Brazil and worldwide. *C. orbiculare* is not the causal agent of anthracnose chayote in Brazil.

Keywords: *Sechium edule*, *Colletotrichum*, multilocus phylogeny, morphology

Introduction

The chayote [*Sechium edule* (Jacq.) Swartz] is a herbaceous vegetable belonging to the Cucurbitaceae family (Lopes et al. 1994). Chayote is commercially produced in Brazil, Costa Rica, Italy, Mexico, Puerto Rico and India (Montano et al. 2000). In Brazil, it is among the 10 most consumed vegetables (Domingues et al. 2011). In general, species from Cucurbitaceae family are produced in relatively small quantities for local consumption and therefore do not usually appear on more significantly production statistics, although they are important items in the diet of many Brazilian people (Santi et al. 2013).

During their cultivation, vegetables may suffer with several harmful diseases that can difficult the growth and development. Anthracnose, caused by species of the genus *Colletotrichum*, can be considered the most important disease of chayote in Brazil. In Brazil, anthracnose occurs in all producing areas and usually with high severity (Lopes et al. 1994;

Reis; Henz and Brune 2008). Symptoms of anthracnose mainly occur on leaves and fruits, in any stage of plant development. In leaves, large circular lesions are formed, which can coalesce and cause blight. On fruits and stem, the lesions are elliptical and depressed, pale-pink color. Infections, when severe, cause falling leaves and fruit rotting. The disease is also very common in the post-harvest of fruits. Apparently healthy fruits when harvested can develop anthracnose symptoms after a few days. In storage conditions, lesions may coalesce to form larger and depressed lesions, which in moist conditions are filled with fungus spore masses of pink color. (Lopes et al. 1994; Sitterly and Keinath 1996; Reis, Henz and Brune 2008).

The *Colletotrichum* genus ranks as eighth among the most important pathogenic fungi worldwide, due to the economic importance of the phytopathological point of view, to cause anthracnose in a wide range of hosts including cereals and grasses, legumes, vegetables, crops perennials and fruit trees (Dean et al. 2012). The delimitation of species for the genus *Colletotrichum* was held by long-time based on classic descriptive criteria (Cannon et al. 2012) such as size of conidia, presence, absence and morphology of the arrows and appressorial characters. Other additional criteria were later included as host range (Sutton 1980) and mycelial growth rate (Cai et al. 2009; Talhinas et al. 2002).

Colletotrichum species identification based on morphology is problematic because there are few reliable characteristics. Many of these characteristics are plastic, varying according to the methods and experimental conditions, which may influence the morphological characters and generate overlap between species (CAI et al. 2009; Damm et al. 2009; Hyde et al. 2009; Cannon et al. 2012). Therefore, Cai et al. (2009) proposed that identification, epitypification, or description of new species *Colletotrichum* should be based on a multi-gene phylogeny in conjunction with recognizable distinctive phenotypic characters, such as morphology, pathogenicity and cultural characteristics (CAI et al. 2009). Thus, many *Colletotrichum* strains have being successfully identified and epitypified by morphological and multilocus phylogeny (Damm et al. 2012a, b; Weir et al. 2012; Cannon et al. 2012; Damm et al. 2013; Doyle et al. 2013; Gunjan et al. 2013; Lima et al. 2013; Liu et al. 2014; Hyde et al. 2014; Vieira et al. 2014). This suggests that the molecular phylogeny could lead to better understanding and identification of this genus (Damm et al. 2012a).

The etiology of chayote anthracnose have been assigned to the species *C. orbiculare* (syn. *C. lagenarium*) which is an important pathogen also reported as the causal agent of anthracnose in other cucurbits such as cucumber (*Cucumis sativus* L.), melon (*Cucumis melo* L.), watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai], zucchini (*Cucurbita pepo*

L.), squash (*Cucurbita maxima* Duchesne) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poir). In addition, this fungal species is reported in about 40 species of host plants throughout the world (Farr and Rossman 2015). This species belongs to orbiculare complex and is considered specific to the Cucurbitaceae family (Damm et al. 2013).

The correct identification and characterization of the diversity of species of *Colletotrichum*, pathogenic to a specific host plant, is fundamental to the development of more efficient control strategies, as well as providing a better understanding of the epidemiology of the disease (Phoulivong 2011). However, there are no worldwide studies on the molecular characterization of *Colletotrichum* species associated to chayote anthracnose using a wide collection of isolates, representing different regions of production. The only study carried out in Brazil, used only three isolates of *Colletotrichum* obtained from chayote and the author used just the ITS region. Using this approach the authors could identify only one isolated, as *C. lagenarium* (Sussel 2005). More recently in a study, which performed the epityfication of the orbiculare complex, no single chayote isolate was used (Damm et al. 2013).

Therefore, the aim of this study was to identify the species of *Colletotrichum* associated with chayote anthracnose in different production poles of Brazil, based on DNA sequence data, morphological and cultural characteristics, as well as pathogenicity and virulence tests.

Material and Methods

Sampling and fungal isolation

Fruits and leaves chayote showing anthracnose symptoms were collected in different producing regions of Brazil (Table 1). It included samples from Pernambuco, Santa Catarina, Rio Grande do Sul and Minas Gerais States and from the Distrito Federal (Fig. 1). Tissue fragments of fruits and leaves with symptoms of anthracnose were surface disinfested in 70 % ethanol for 30 s and 1 % NaClO for 1 min. Samples were then rinsed in sterile distilled water for 30 s and dried before small pieces (4-5 mm) of tissue were taken from the margin between necrotic and apparently healthy tissue to be plated on potato dextrose agar (PDA) (Acumedia, Lansing, USA) amended with 0.5 g of streptomycin sulfate (PDAS). Plates were incubated at 25 °C with a 12-h photoperiod provided by fluorescent light for 7 days. The fungi were identified following sporulation. Seventy-five isolates were morphologically identified as

Colletotrichum spp. (Sutton 1980) and single spore cultures were obtained using the procedure described by Goh (1999). Pure cultures were stored in sterilized water in Eppendorf tubes and stock cultures in PDA slants at 5 °C in the dark. The isolates were deposited in the culture collection of Universidade Federal Rural de Pernambuco, Coleção de Fungos Fitopatogênicos “Professora Maria Menezes” (CMM), Recife, Pernambuco, Brazil.

DNA extraction

Isolates were grown on PDA for 7 days at 25 °C with a 12h photoperiod. Using a sterile 10 µl pipette tip, a small amount of aerial mycelium was scraped from the colony surface and genomic DNA was extracted using the AxyPrepTM Multisource Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Scientific Inc., Union City, USA) according to the manufacturer protocol. DNA concentrations were estimated visually in agarose gel by comparing band intensity with a DNA ladder of 1 kb (Axygen).

PCR amplification and DNA sequencing

All strains in this study were amplified for the β -tubulin (TUB2) gene, as an initial measure of genetic diversity. A subset of 32 isolates (Table 1), selected to represent the range of genetic diversity, were further sequenced for partial actin (ACT), calmodulin (CAL), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) genes and rDNA-ITS (ITS) region. These DNA regions were amplified by polymerase chain reaction (PCR) reaction (Table 2).

The PCR amplification for GAPDH and CAL were carried out using the primers-pair GDF1 and GDR1 (Templeton et al. 1992) and CL1 and CL2 (O’Donnell et al. 2000) respectively. The partial ACT, TUB and ITS regions were amplified with the primers-pair ACT512F and ACT783R (Carbone and Kohn 1999), Bt2a and Bt2b (Glass and Donaldson 1995) or T1 (O’Donnell and Cigelnik 1997) and Bt-2b (Glass and Donaldson 1995), and ITS 1 and ITS 4 (White et al. 1990) respectively. The PCR amplifications were performed in a final volume of 50 µL containing 1 µL of DNA, 28.2 µL of water, 2.5 µL of each primer, 5 µL of 10x PCR buffer, 4 µL of MgCl₂, 0.3 µL of Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (InvitrogenTM) and 1.5 µL DMSO² and 5.0 µl dNTP (InvitrogenTM).

PCR reactions were carried out in a thermal cycler (MultiGeneTM OptiMax; Labnet international, Edison, NJ, EUA). The cycling parameters for GAPDH, CAL and ACT consisted of a denaturation step at 94°C for 2 min, followed by 35 cycles at 94°C for 45 s, 60

°C for 45 s, 72°C for 1 min and a final cycle at 72°C for 10 min. The cycling parameters for TUB2 consisted of a denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 34 cycles at 94°C for 30 s, 52 °C for 30 s, 72°C for 1 min and a final cycle at 72°C for 10 min. The cycling parameters for ITS region consisted of 3 min denaturing step at 95 ° C, followed by 34 cycles at 95 ° C for 1 min, 50 ° C for 1 min, 72 ° C for 1 min e 30 s a final cycle at 10 min for 72 ° C.

The PCR amplification products were separated by electrophoresis in 1.5 % agarose gels in 1.0× Tris-acetate acid EDTA (TAE) buffer and were photographed under UV light after staining ethidium bromide (0.5 µg ml⁻¹) for 1 min. PCR products were purified using the AxyPrep™PCR CleanupKit (Axygen) following the manufacturer's instructions. The DNA sequencing for GAPDH, ACT, CAL, GS, TUB2 genes and ITS region was carried out by Macrogen Inc. (Seoul, Korea).

Phylogenetic analysis

Sequences were assembled using the Staden Package (Staden et al. 1998). An alignment comprising 75 sequences of the TUB2 gene region was generated with Clustal W implemented in MEGA v. 5 (Tamura et al. 2011) and manually adjusted to maximize sequence similarity. A distance tree using the Neighbor Joining (NJ) algorithm (Saitou and Nei 1987) was built in, MEGA v.5 to identify distinct haplotypes among the sequences. Sequences were compared with the NCBI sequence database using the BLAST algorithm as an approximate identification and to find reference strains to use in the phylogenetic analysis.

Based on the TUB2 NJ tree, a subset of 32 isolates (Table 1), representing the range of genetic diversity, were selected for further analysis using sequences from actin (ACT), β -tubulin (TUB2), calmodulin (CAL) and (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) GAPDH genes and the rDNA ITS (ITS) region.

Phylogenies were estimated using maximum likelihood (ML) as implemented in GARLI v0.951 (Zwickl 2006). The analysis used a General Time-Reversible (GTR) nucleotide substitution model, estimated base frequencies, and a gamma distribution model of among-site rate variation. Statistical support for phylogenetic clustering was calculated using an ML bootstrap approach with 100 bootstrap replicates; bootstrap scores were summarised using FigTree v1.4.0 (Rambaut 2012).

Morphological studies of *Colletotrichum* species

Based on fungal species identified on phylogenetic analyses, 32 *Colletotrichum* isolates [*C. brevisporum* (7), *C. fructicola* (3), *C. clivae* (6), *C. karstii* (1), *Colletotrichum* sp. 1 (6) and *Colletotrichum* sp. 2 (9)] were further characterized by colony morphology and conidial characteristics. A 4-mm-diameter mycelial plug from the growing margin of a 5-day-old colony was placed in the centre of a 90-mm-diameter PDA plate, and four replicates of each isolate were incubated at 25 °C with a continuous fluorescent light (24h). The colony colour and diameter from each isolate were recorded during 7 days. The colony colour was evaluated using the mycological colour chart (Rayner 1970) and the colony diameter (mm) was measured in two perpendicular directions. The colony diameter data were used to calculate the mycelial growth rate (mm day^{-1}). After 6 days, conidia were mounted in 100% lactic acid and digital images recorded with a Samsung SDC-415 camera (Samsung Co., Seoul, Korea) on an Olympus BX41 microscope (Olympus Co., Tokyo, Japan). The length and width of 50 conidia per isolate were measured with the Motic Image Plus v. 2.0 image analysis software (Motic Group Co., Beijing, China).

One-way analyses of variance (ANOVA) were conducted to determine the significance of differences in conidia dimensions and growth rates with *Colletotrichum* species, and means were compared by Fisher's least significant difference (LSD) test at the 5% significance level using STATISTIX v. 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, USA).

Pathogenicity and virulence in fruits

The isolates used in the morphological characterization were selected for pathogenicity and virulence tests on detached fruits of chayote under controlled conditions. Fruits were washed in running water, surface disinfected in 70 % ethanol for 1 min and 1 % NaOCl for 5 min, then rinsed in sterile distilled water. The fruits were placed on plastic trays on top of four paper towels wetted with distilled water to increase humidity. Each fruit was placed on a sterilized Petri dish to avoid direct contact with water. Fruits were wounded at one point by pricking the surface with one sterile pin to a depth of 3 mm. The fruits were inoculated using the colonized agar plug method since part of the isolates did not produce conidia in culture. A mycelial plug (5 mm in diameter) removed from the margin of a 7-day-old PDA culture was placed on the wound. A non-colonized agar plug was used as the control. The trays were enclosed in plastic bags and incubated at 25 °C in the dark. The plastic bags and paper towels were removed after 48 h and the fruits were kept at the same temperature. Isolate virulence was assessed by measuring lesion length eighth days after

inoculation. Five replicate experiments were arranged in a completely randomized design with two replicates (fruits) per treatment (isolate). Differences in virulence caused by *Colletotrichum* species was determined by a one-way ANOVA and means were compared by LSD test at the 5 % significance level using STATISTIX.

Results

Phylogenetic analyses

The initial analysis of the partial sequence TUB2 gene of the 75 isolates revealed a total of eleven haplotypes (H1–H11). Initial analysis of these haplotypes revealed that three (H1-H2-H9) belong to the *C. orbiculare* species complex and two (H4-H5) belong to the *C. gloeosporioides* species complex. The haplotype 3 (H3) TUB2 sequence had a high degree of similarity (100%) with sequences of type species of *C. karstii* deposited in the GenBank. Haplotypes 6 (H6) had a high degree of similarity (100 %) with sequences of type species of *C. brevisporum* and the haplotypes 7, 8 and 10 (H7-H8-H10) had similarity (98 %) with sequences of type species of *C. cliviae*. The haplotypes 4 and 5 (H4-H5) had a high degree of similarity (99%) with sequences of type species of *C. fructicola*. The haplotype 11 (H11) had little similarity with the species *C. brevisporum*.

The diversity analyses from 75 isolates of *Colletotrichum* spp. showed the following haplotype distribution within the species identified in phylogenetic analyses: *Colletotrichum* sp.(1) with 26 isolates in total, 23 belong to haplotypes H1, 2 isolates in H2 and 1 isolate in H9. *Colletotrichum* sp. (2) 9 isolates all in H11; *C. fructicola* with 1 isolate in H4 and 2 isolates in H5; *C. brevisporum* with 28 isolates in H6; *C. karstii* 1 isolate in H3 and *C. cliviae* with 8 isolates, 4 isolates belong to H7, 2 isolates belong to H8 and 2 isolates in H10.

Thirty two isolates representing all haplotypes were further used for multilocus analysis. The sequences were concatenated to form an aligned supermatrix of 2867 characters. The locus boundaries in the alignment were: TUB2: 1–762, ACT: 763–1073, CAL: 1074–1900 GAPDH: 1901–2240, ITS: 2241– 2867. From the blast algorithm thirty six sequences of *Colletotrichum* type species from the GenBank were included in the analysis (Table 3). The combined dataset resulted in six well supported clades. Four clades corresponded to species previously described: six isolates clustered with *C. cliviae*, seven isolates belong to the *C. brevisporum*, three isolates with *C. fructicola* and one isolate with *C. karstii*. Two clade of six and seven isolates with support of 99 and 97 % of bootstrap respectively, both well supported

in ML analysis, did not cluster with any known species, which indicate that these isolates belong to two new species (Fig. 2).

Morphological and cultural characterization

The *Colletotrichum* isolates were grouped into eight distinct morphological types (morphotypes 1 to 8), based on colony characteristics (Fig. 3). The morphotype 1, had pale mouse grey (15''''d) and cinnamon center (15''i). Morphotype 2 comprised isolates which had rosy vinaceous (5''d) colonies, in reverse flesh (3''f) colonies. The morphotype 3 had white mycelia with greyish sepia center (15''''b), in reverse greyish rose (71''d) with fuscous black (5''''k) colonies. Isolates belonging to morphotype 4 had sky grey (45''''d), in reverse violaceous black (63''''k) colonies. The morphotype 5 had pale vinaceous (5''f) colonies which were brick (9''b) in reverse. Isolates belonging to morphotype 6 which had lavender grey (45''''f) which were in reverse pale purplish grey (71''''d) with the center violaceous black (63''''k) colonies. The morphotype 7 had white mycelia and peach (7d) in reverse colonies. Morphotype 8 comprised isolates which had mouse grey (13''''') colonies with white edges colonies. The *C. brevisporum* isolates were included in morphotypes 2, 4 and 5. Isolates identified as *C. cliviae* were all included in the morphotype 3. Isolates of *Colletotrichum fructicola* comprised morphotypes 6 and 7. The isolate of *C. karstii* belonged to morphotype 5. *Colletotrichum* sp.(1) belonged to morphotype 8 and *Colletotrichum* sp.(2) is represented by morphotypes 1 and 2. The species of *Colletotrichum* found in this study presented differences in conidial size and growth rates no congruent with the data of the previously described species (Table 4).

Pathogenicity and virulence in fruits

All isolates of *Colletotrichum* were pathogenic to the chayote fruit, resulting in anthracnose symptoms eight days after inoculation. Fruit symptoms in all species were similar, with development of sunken lesions, light brown coloration, and spore mass. *C. brevisporum* and *C. karstii* were the most virulent, while *C. cliviae* was the least. There were no significant ($P \leq 0.05$) differences in virulence among the other species (Fig. 4).

Discussion

This study represents the first attempt to characterize *Colletotrichum* species associated with anthracnose of chayote in Brazil and worldwide using isolates from several Brazilian regions and using a polyphasic approach. Phylogenetic analysis, showed that strains included in this study belong to three complexes: *C. gloeosporioides*, *C. boninense* and *C. orbiculare*. Six species of *Colletotrichum* were found associated with anthracnose of chayote fruits and leaves, *C. fructicola* (*C. gloeosporioides sensu lato*), *C. karstii* (*C. boninense s.l.*), *C. cliviae*, *C. brevisporum* and two unknown species, *Colletotrichum* sp. (1) that seems to belong in *C. orbiculare* complex e *Colletotrichum* sp. (2) that does not belong to any species complex.

The only study carried out in Brazil, involving cultural, morphological and molecular characterization using primer pairs ITS4 and CoINT (specific to *C. orbiculare*) and ITS4 and ITS5, identified only one species (*C. orbiculare*), however, these isolates were not sequenced (Susse, 2005). Due to limitations of ITS sequences and other markers (Silva et al. 2012), was appointed using more efficient markers for the identification of the genus *Colletotrichum* such as β -tubulin and GAPDH (Damm et al. 2012a). Moreover, the identification a single gene may also be inadequate to infer the relationships in a *Colletotrichum* species complex (Prihastuti et al. 2009; Hyde et al. 2014).

The epitypified of *C. orbiculare* isolates from different hosts associated with botanical families belonging to various countries by using multilocus sequencing of the ITS regions of genes, GAPDH, CHS-1, HIS3, ACT, TUB2, and SG) and phylogenetic analyzes, as afforded results, the presence of three clades, 9 subclades and confirmation of species, *C. lindemuthianum*, *C. malvarum*, *C. orbiculare*, *C. trifolii*, which would be known as belonging to the complex, and the recognition of four new species pathogenic to weed *C. bidentis*, *C. sidae*, *C. spinosum*, *C. tebestii* (Damm et al. 2013). In this paper, multilocus phylogenetic analyzes revealed that some isolates seem to belong to orbiculare complex, however, they do not grouped with *C. orbiculare stricto sensu* or any other species in the complex. Therefore, some isolates formed a distinct clade, which suggested a new species, *Colletotrichum* sp (1). This new species will be formally described and introduced into the *C. orbiculare* complex in the future.

According Damm et al. (2013), species of the orbiculare complex are restricted to herbaceous hosts and specific the four families of plants, Asteraceae, Cucurbitaceae, Fabaceae and Malvaceae. Therefore, other studies with *Colletotrichum* sp. (1) are needed to elucidate whether this rule is valid for the specie in question. For the *Colletotrichum* sp. (2) phylogenetic analysis reveals high support showing that it is closely related to *C. brevisporum*

(Fig. 1). These two species are similar in conidial shape, but differ in conidial size, *C. brevisporum* has length (2.4-8.7µm), while *Colletotrichum* sp. (2) has (3.8-13.1µm).

All *Colletotrichum* species in this study were pathogenic in fruits and differed significantly in virulence ($P < 0.05$). According to Simmonds (1965) and Freeman et al. (1998), the development of injury can vary considerably due to the interaction of factors such as the variety and stage of development of the fruit, humidity and temperature, and the concentration of inoculum. Furthermore, although the isolates were obtained from fruits and leaves injured, the pathogenicity test was conducted only in chayote fruit. Further study should be done to elucidate whether there are differences among virulence of these species depending on the plant tissue.

Based on multilocus data, six *Colletotrichum* spp. were found in association with chayote. *Colletotrichum brevisporum* was the predominant species. However, *Colletotrichum* sp. (1) demonstrated greater territorial distribution of all species. This species was found in practically every sampled area, in contrast, *C. cliviae* and *Colletotrichum* sp. (2) were found only in one area (Table 1).

Colletotrichum fructicola was originally reported causing coffee berry disease in Thailand (Prihastuti et al. 2009). *C. fructicola* biologically and geographically diverse (Lima et al. 2013). This species was also found as a leaf endophyte in several plants in Central America (originally described as *C. ignotum*, Rojas et al. (2010)). The species is presently known as a pathogen of *Persea americana* (Australia), *Malus domestica* (Brazil and USA), *Fragaria ananassa* (Canada and USA), *Limonium sinuatum* (Israel), *Pyrus pyrifolia* (Japan), *Dioscorea alata* (Nigeria), *Theobroma cacao* and *Tetragastris panamensis* (Panama), *Ficus edulis* (Germany) (Weir et al. 2012), Citrus (Peng et al. 2012; Huang et al. 2013), *Vitis* (China) (Peng et al. 2013), *Vaccinium macrocarpon*, *V. corymbosum*, and *Rhexia virginica* (USA) (Doyle et al., 2013). More recently it was reported causing disease in pear fruits (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) in China (Jiang et al. 2014) and as endophyte in *Lycium chinense* in Korea (Paul et al. 2014). In Brazil it was recently reported in *Mangifera indica* as endophyte and causing anthracnose (Lima et al. 2013; Vieira et al. 2014).

Colletotrichum brevisporum was described from *Neoregalia* sp. and *Pandanus pygmaeus* in Thailand (Noireung et al. 2012). This species was recently isolated as endophyte in *Lycium chinense* in Korea (Paul et al. 2014). In Brazil it was first reported recently to cause anthracnose in fruits of papaya (Vieira et al. 2013).

Colletotrichum cliviae was reported causing anthracnose of *Clivia miniata* in China (Yang et al. 2009). In Brazil, this species has recently been reported as endophyte in

Mangifera indica which was considered the first report of *C. cliviae* associated with a host outside of Asia (Vieira et al. 2014).

Colletotrichum karstii occurs on many host plants and is the most common and geographically diverse species in the *C. boninense* complex (Damm et al. 2012a). This species was first reported in China, to be associated with anthracnose in plants belonging to Orchidaceae. *Colletotrichum karstii* was isolated from grape (*Vitis vinifera*), chili (*Capsicum* spp.) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) associated with anthracnose in China (Yang et al. 2011) and from leaves and asymptomatic tissues of Citrus (Peng et al. 2012; Huang et al. 2013). In Brazil, it was also reported causing anthracnose on *Passiflora edulis* and mango fruits (Damm et al. 2012a; Lima et al. 2013). The species has been reported associated with Cucurbitaceae family in New Zealand in *Citrullus lanatus* (watermelon) and Japan in *Cucumis melo* (melon) (Damm et al. 2012a).

There are reports of other members cucurbitaceae family infected by other *Colletotrichum* species. *C. cocodes* was found associated with anthracnose on *Curcubita pepo* (zucchini) (Liu et al. 2013), *C. magna* (*Glomerella magna*) causing disease in watermelon in the United States and other cucurbits in Taiwan (Jenkins and Winstead 1964; Tsay et al. 2010), *C. melonis* belonging to the complex *C. acutatum*, reported in association with melon in Brazil and *C. karstii*, as reported earlier (Damm et al. 2012a, b).

The results of this study are important because they demonstrate that *C. orbiculare* is not the causal agent of chayote anthracnose in Brazil, as it has been previously reported. This study also provides the first record of *C. brevisporum*, *C. cliviae*, *C. fructicola*, *C. karstii* and two undescribed species, as causal agents of anthracnose in chayote. The first three species not yet reported in cucurbits worldwide. Isolates of *C. brevisporum* and *C. karstii* were the most virulent isolates. *C. karstii* is already known to have a wide geographical distribution. The precise identification of the species of *Colletotrichum* associated with chayote anthracnose will contribute to a better understanding of the etiology of the disease, which will result in better decision-making as management strategies.

Acknowledgments The Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) research fellowship and the Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

References

- Cai L, Hyde KD, Taylor PWJ, Weir B, Waller J, Abang MM, Zhang JZ, Yang YL, Phoulivong S, Liu ZY, Prihastuti H, Shivas RG, McKenzie EHC, Johnston PR (2009) A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Divers* 39:183–204
- Cannon PF, Damm U, Johnston PR, Weir BS (2012) *Colletotrichum*-current status and future directions. *Stud Mycol* 73:181–21
- Carbone I, Kohn LM (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553–556
- Damm U.; Woudenberg JHC, Cannon PF, Crous PW (2009) *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Divers* 39:45-87
- Damm U, Cannon P F, Woudenberg JHC, Crous PW (2012a) The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Stud Mycol* 73: 37-113
- Damm U, Cannon P F, LIU F, Barreto RW, Guatimosim E, Crous, PW (2013) The *Colletotrichum orbiculare* species complex: important pathogens of field crops and weeds. *Fungal Divers* 61:29-59
- Damm U, Cannon P F, Woudenberg JHC, Johnston P R, Weir B (2012b) The *Colletotrichum boninense* species complex. *Stud Mycol* 73:1-36
- Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster GD (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13:414–430
- Domingues RJ, Töfoli JG, Ferrari JT, Azevedo Filho JA(2011) Principais doenças fúngicas do chuchuzeiro (*Sechium edule*) no estado de São Paulo. *Biológico* 73: 5-9
- Doyle VP, Oudemans PV, Rehner SA, Litt A (2013) Habitat and host indicate lineage identity in *Colletotrichum gloeosporioides* s. l. from wild and agricultural landscapes in North America. *PLoS One* 8: e62394
- Farr DF, Rossman, AY (2015) Fungal databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS-USDA. Retrieved January 2, 2015, from <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm>
- Freeman S, Katan T, Shabi E (1998) Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease* 82: 596-605
- Glass NL, Donaldson G (1995) Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* 61:1323–1330
- Goh TK (1999) Single-spore isolation using a handmade glass needle. *Fungal Divers* 2:47–63
- Gunjan S, Navinder K, Weir BS, Hyde KD, Shenoy BD (2013) Apmat gene can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*. *Fungal Divers* 61:117–138
- Huang F, Chen Q, Hou X, Fu YS, Cai L, Hyde KD, Li HY (2013) *Colletotrichum* species associated with cultivated citrus in China. *Fungal Divers* 61:61–74
- Hyde KD, Cai L, McKenzie EHC, Yang YL, Zhang JZ, Prihastuti H, Hyde KD (2009) *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Divers* 39:1–17

- Hyde KD, Nilsson RH, Alias SA, Ariyawansa HA, Blair JE, Cai L, de Cock AWAM, Dissanayake AJ, Glockling SL, Goonasekara ID, Gorczak M, Hahn M, Jayawardena RS, van Kan JAL, Laurence MH, L evesque CA, Li XH, Liu JK, Maharachchikumbura SSN, Manamgoda DS, Martin FN, McKenzie EHC, McTaggart AR, Mortimer PE, Nair PVR, Pawłowska J, Rintoul TL, Shivas RG, Spies CFJ, Summerell BA, Taylor PWJ, Terhem RB, Udayanga D, Vaghefi N, Walther G, Wilk M, Wrzosek M, Xu JC, Yan JY, Zhou N (2014) One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera: I (2014). *Fungal Divers* 67:21–125
- Jenkins SF, Winstead NN (1964) *Glomerella magna*, cause of a new anthracnose of cucurbits. *Phytopathology* 54:452–454
- Jiang J, Zhai H.; Li, H, Wang Z, Chen Y, Hong N, Wang G, Chofong GN, Xu W (2014) Identification and characterization of *Colletotrichum fructicola* causing black spots on young fruits related to bitter rot of pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) in China. *Crop Protection* 58:41–48
- Lima NB, Batista MVA, Morais MA Jr, Barbosa MAG, Michereff SJ, Hyde KD, Camara MPS (2013) Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. *Fungal Divers* 61:75–88
- Liu F, Cai L, Crous PW, Damm U (2013) Circumscription of the anthracnose pathogens *Colletotrichum lindemuthianum* and *C. nigrum*. *Mycologia*. doi:10.3852/12-315
- Liu FL, Cai L, Crous PW, Damm U (2014) The *Colletotrichum gigasporum* species complex. *Persoonia* 33: 83–97
- Lopes JF, Oliveira CAS, Frana FH, Charchar JM, Marishima N, Fontes RR (1994) A cultura do chuchu. Embrapa Hortaliças, Brasília
- Montano HG, Davis RE, Dally EL, Pimentel JP, Brioso PST (2000) Identification and phylogenetic analysis of a new phytoplasma from diseased chayote in Brazil. *Plant Dis* 84:429–436.
- Noireung P, Phoulivong S, Fang L, Cai L, Eric HCM, Ekachai C, Jones EBG, Ali HB, Hyde DK (2012) Novel species of *Colletotrichum* revealed by morphology and molecular analysis. *Cryptogam. Mycol* 33, 347–362.
- O’Donnell K, Cigelnik E (1997) Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol Phylogenet Evol* 7:103–116
- O’Donnell K, Nirenberg HI, Aoki T, Cigelnik E (2000) A Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41:61–78
- Paul NC, Lee HB, Lee JH, Shin KS, Ryu TH, Kwon HR, Kim YK, Youn YN, Yu SH (2014) Endophytic Fungi from *Lycium chinense* Mill and Characterization of Two New Korean Records of *Colletotrichum*. *Int. J. Mol. Sci.* doi:10.3390/ijms150915272
- Peng L, Yang Y, Hyde KD, Bahkali AH, Liu Z (2012) *Colletotrichum* species on Citrus leaves in Guizhou and Yunnan provinces, China. *Cryptogamie Mycol* 33:267–283
- Peng L, Sun T, Yang Y, Cai L, Hyde KD, Bahkali AH, Liu Z (2013) *Colletotrichum* species on grape in Guizhou and Yunnan provinces, China. *Mycoscience* 53:29–41
- Prihastuti H, Cai L, Chen H, McKenzie EHC, Hyde KD (2009) Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Divers* 39:89–109
- Phoulivong S (2011) *Colletotrichum*, naming, control, resistance, biocontrol of weeds and current challenges. *Current Res in Environ and Appl Mycol* 1:53–73

- Rambaut A (2012) *Figtree v 1.4.0*. Molecular Evolution, Phylogenetics and Epidemiology. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Accessed 15 Jan 2013
- Rayner RW (1970) A mycological colour chart. Commonwealth Mycological Institute and British Mycological Society, Kew
- Reis A, Henz GP, Brune S (2008) Principais doenças do chuchu no Brasil. Embrapa Hortaliças, Brasília
- Rojas EI, Rehner SA, Samuels GJ, Van Bael S, Herre EA, et al. (2010). *Colletotrichum gloeosporioides s.l.* associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycol* 102:1318–1338
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor joining method: a new method for re-constructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
- Santi A, Scaramuzza WLMP, Soares DMJ, Scaramuzza JF, Dallacort, R, Krause W, Tieppo RC (2013). Desempenho e orientação do crescimento do pepino japonês em ambiente protegido. *Hortic Bras* 31(4):649-653
- Silva DN, Talinhas P, Várzea V, Cai L, Paulo OS, Batista D (2012).. Application of the *Apn2/ MAT* locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: an example from coffee (*Coffea* spp.) hosts. *Mycologia* 104(2):396-409
- Simmonds JH (1965). A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. *Qld J Agric and Anim Sci* 22: 437-459.
- Sitterly WR, Keinath AP (1996) Anthracnose. In: Zitter TA, Hopkins DL, Thomas CE (eds) *Compendium of cucurbit diseases*. APS Press, St. Paul, pp 24–25
- Staden R, Beal KF, Bonfield JK (1998) The Staden package. In: Misener S, Krawetz SA (eds) *Bioinformatics methods and protocols*. Humana, New York, pp 115–130
- Sussel AAB (2005) Caracterização de isolados de *Colletotrichum lagenarium*, agente causal da antracnose das cucurbitáceas. Dissertation University of São Paulo
- Sutton BC (1980) *The Coelomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew
- Talhinas P, Sreenivasaprasad S, Neves-Martins J, Oliveira H (2002) Genetic and morphological characterisation of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. *Phytopathol* 92(9): 986-996
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739
- Templeton MD, Rikkerink EHA, Solon SL, Crowhurst RN (1992) Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. *Gene* 122:225–230
- Tsay JG, Chen RS, Wang WL, Weng BC (2010) First Report of Anthracnose on Cucurbitaceous Crops Caused by *Glomerella magna* in Taiwan. *Plant Divers* 94(6):787-787
- Vieira WAS, Nascimento RJ, Michereff SJ, Hyde KD, Câmara MPS (2013). First Report of Papaya Fruit Anthracnose Caused by *Colletotrichum brevisporum* in Brazil. *Plant Disease Journ* 97(12):1,659.3 - 1,659.3 2013.
- Vieira WAS, Michereff SJ, Morais Jr MA, Hyde KD, Câmara MPS (2014). Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. *Fungal Divers*. doi:10.1007/s13225-014-0293-6

- Zwickl DJ (2006). Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. PhD Thesis, University of Texas
- Weir BS, Johnston PR, Damm U (2012) The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud Mycol* 73:115–180
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White YJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and application. Academic, San Diego, pp 315–322
- Yang YL, Liu ZY, Cai L, Hyde KD, Yu ZN, McKenzie EHC (2009) *Colletotrichum* anthracnose of Amaryllidaceae. *Fungal Divers* 39: 123–146
- Yang YL, Cai L, Yu ZN, Liu ZY, Hyde KD (2011) *Colletotrichum* species on Orchidaceae in southwest China. *Cryptog Mycol* 32:229–253

Table 1 Collection data of *Colletotrichum* species from chayote

Specie	Specimen no.	Plant tissue	Complex	Location
<i>C.karstii</i> ¹	CMM 633	Fruit	<i>C. boninense sensu lato.</i>	Brazil, Caxias do Sul, RS
<i>C.fruticola</i> ¹	CMM 24	Leaf	<i>C. gloeosporioides s.l.</i>	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C.fruticola</i> ¹	CMM 65	Leaf	<i>C. gloeosporioides s. l.</i>	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C.fruticola</i> ¹	CMM 67	Leaf	<i>C. gloeosporioides s.l.</i>	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C.cliviae</i> ¹	CMM 29	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C.cliviae</i> ¹	CMM 30	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C.cliviae</i>	CMM 31	Fruit	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C.cliviae</i> ¹	CMM 48	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C.cliviae</i> ¹	CMM 51	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C.cliviae</i> ¹	CMM 55	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C.cliviae</i>	CMM 71	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C.cliviae</i> ¹	CMM 73	Fruit	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C. brevisporum</i> ¹	CMM 630	Fruit	Brazil, Brasília de Minas, MG
<i>C. brevisporum</i> ¹	CMM 636	Fruit	Brazil, Brazlândia, DF
<i>C. brevisporum</i> ¹	CMM 642	Fruit	Brazil, Brasília de Minas, MG
<i>C. brevisporum</i> ¹	CMM 756	Fruit	Brazil, Ibirité, MG
<i>C. brevisporum</i> ¹	CMM 766	Fruit	Brazil, Planaltina, DF
<i>C. brevisporum</i> ¹	CMM 784	Fruit	Brazil, Ibirité, MG
<i>C. brevisporum</i>	CMM 830	Fruit	Brazil, Taguatinga, DF
<i>C. brevisporum</i> ¹	CMM 839	Fruit	Brazil, Ceilandia, DF
<i>C. brevisporum</i>	CMM 1	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C. brevisporum</i>	CMM 10	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C. brevisporum</i>	CMM 11	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C. brevisporum</i>	CMM 13	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C. brevisporum</i>	CMM 15	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C. brevisporum</i>	CMM 17	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C. brevisporum</i>	CMM 20	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C. brevisporum</i>	CMM 21	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C. brevisporum</i>	CMM 32	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C. brevisporum</i>	CMM 33	Fruit	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C. brevisporum</i>	CMM 42	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C. brevisporum</i>	CMM 43	Fruit	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C. brevisporum</i>	CMM 45	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C. brevisporum</i>	CMM 47	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C. brevisporum</i>	CMM 54	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C. brevisporum</i>	CMM 58	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C. brevisporum</i>	CMM59	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C. brevisporum</i>	CMM 60	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>C. brevisporum</i>	CMM 64.	Leaf	Brazil, Chã Grande
<i>C. brevisporum</i>	CMM 72	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE

Table 1 (Continued)

Specie	Specimen no.	Plant tissue	Complex	Location
<i>Colletotrichum</i> sp. (1)	CMM 162	Leaf	Brazil, Planaltina, DF
<i>Colletotrichum</i> sp. (1)	CMM 261	Fruit	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Gama, DF
<i>Colletotrichum</i> sp. (1) ¹	CMM 634G	Fruit	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Brazlândia, DF
<i>Colletotrichum</i> sp. (1) ¹	CMM 721	Leaf	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brasil, Tijucas, SC
<i>Colletotrichum</i> sp. (1) ¹	CMM 719	Leaf	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Tijucas, SC
<i>Colletotrichum</i> sp. (1)	CMM 629E	Leaf	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Caxias do Sul, RS
<i>Colletotrichum</i> sp. (1)	CMM 637G	Leaf	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Brazlândia, DF
<i>Colletotrichum</i> sp. (1)	CMM 639G	Leaf	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Brazlândia, DF
<i>Colletotrichum</i> sp. (1)	CMM 641G	Fruit	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Brasília de Minas, MG
<i>Colletotrichum</i> sp. (1) ¹	CMM 643G	Fruit	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Brasília de Minas, MG
<i>Colletotrichum</i> sp. (1)	CMM 715	Leaf	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Tijucas, SC
<i>Colletotrichum</i> sp. (1)	CMM 717	Leaf	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Tijucas, SC
<i>Colletotrichum</i> sp. (1)	CMM 741	Fruit	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Planaltina, DF
<i>Colletotrichum</i> sp. (1)	CMM 797	Fruit	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Ceilandia 2, DF
<i>Colletotrichum</i> sp. (1)	CMM 801	Leaf	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Taguatinga, DF
<i>Colletotrichum</i> sp. (1)	CMM 804	Fruit	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Ibitité, MG
<i>Colletotrichum</i> sp. (1) ¹	CMM 808	Fruit	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Samambaia, DF
<i>Colletotrichum</i> sp. (1)	CMM 816	Fruit	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Ceilandia, DF
<i>Colletotrichum</i> sp. (1)	CMM 817	Fruit	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Ceilandia, DF
<i>Colletotrichum</i> sp. (1)	CMM 818	Fruit	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Ceilandia, DF
<i>Colletotrichum</i> sp. (1) ¹	CMM 822	Fruit	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Ceilandia, DF
<i>Colletotrichum</i> sp. (1)	CMM 823	Fruit	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Ceilandia, DF
<i>Colletotrichum</i> sp. (1)	CMM 825	Fruit	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Ceilandia, DF
<i>Colletotrichum</i> sp. (1)	CMM 827	Leaf	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Ceilandia, DF
<i>Colletotrichum</i> sp. (1)	CMM 834	Fruit	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Taguatinga, DF
<i>Colletotrichum</i> sp. (1)	CMM 835	Leaf	<i>C. orbiculare</i> s.l.	Brazil, Taguatinga, DF
<i>Colletotrichum</i> sp. (2) ¹	CMM 7	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>Colletotrichum</i> sp. (2) ¹	CMM 12	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>Colletotrichum</i> sp. (2) ¹	CMM 16	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>Colletotrichum</i> sp. (2) ¹	CMM 27	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>Colletotrichum</i> sp. (2) ¹	CMM 36	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>Colletotrichum</i> sp. (2) ¹	CMM 36	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>Colletotrichum</i> sp. (2) ¹	CMM 40	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>Colletotrichum</i> sp. (2) ¹	CMM 44	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>Colletotrichum</i> sp. (2) ¹	CMM 44	Leaf	Brazil, Chã Grande, PE
<i>Colletotrichum</i> sp. (2) ¹	CMM 56	Fruit	Brazil, Chã Grande, PE
<i>Colletotrichum</i> sp. (2) ¹	CMM 74	Fruit	Brazil, Chã Grande, PE

Table 2 Primers used in this study, with sequences and references

Gene	Product name	Primer	Direction	Sequence (5' - 3')	Reference
ACT	Actin	ACT-512F	Forward	ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC	Carbone & Kohn (1999)
		ACT-783R	Reverse	TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT	Carbone & Kohn (1999)
CAL	Calmodulin	CL1C	Forward	GAA TTC AAG GAG GCC TTC TC	O'Donnell et al. (2000)
		CL2C	Reverse	CTT CTG CAT CAT GAC CTG GAC	O'Donnell et al. (2000)
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GDF	Forward	GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA	Templeton et al. (1992)
		GDR	Reverse	GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT	Templeton et al. (1992)
					White et al. (1990)
ITS	Internal transcribed spacer	ITS1	Forward	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	White et al. (1990)
		ITS4	Reverse	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	
TUB2	β -Tubulin 2	T1	Forward	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	O'Donnell & Cigelnik (1997)
		Bt2a	Forward	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC	Glass & Donaldson (1995)
		Bt2b	Reverse	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	Glass & Donaldson (1995)

Table 3 Strains of *Colletotrichum* studied in this paper with details of culture collection, host, location and GenBank accessions of the sequences

Species	Culture Accession No. ¹	Host	Location	GenBank Accession No. ²				
				ITS	GAPDH	ACT	TUB2	CAL
<i>C. aenigma</i> *	ICMP 18608	<i>Persea americana</i>	Israel	JX010244	JX010044	JX009443	JX010389	JX009683
<i>C. aeschynomene</i> <i>s</i> *	ICMP 17673	<i>Aeschynomene virginica</i>	USA	JX010176	JX009930	JX009483	JX010392	JX009721
<i>C. alienum</i> *	ICMP 12071	<i>Malus domestica</i>	New Zealand	JX010251	JX010028	JX009572	JX010411	JX009654
<i>C. annellatum</i> *	CBS 129826	<i>Hervea indica</i>	Australia	JQ005222	JQ005309	JQ005570	JQ005656	JQ005743
<i>C. asianum</i> *	ICMP 18580	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	FJ972612	JX010053	JX009584	JX010406	FJ917506
<i>C. beeveri</i> *	CBS 128527	<i>Brachyglottis repanda</i>	New Zealand	JQ005171	JQ005258	JQ005519	JQ005605	JQ005692
<i>C. bidentis</i> *	COAD 1020	<i>Bidens subalternans</i>	Brazil	KF178481	KF178506	KF178578	KF178602	-
<i>C. boninense</i> *	CBS 123755	<i>Crinum asiaticum</i> <i>var. sinicum</i>	Japan	JQ005153	JQ005240	JQ005501	JQ005588	JQ005674
<i>C. brasiliense</i> *	CBS 128501	<i>Passiflora edulis</i>	Brazil	JQ005235	JQ005322	JQ005583	JQ005669	JQ005756
<i>C. brevisporum</i>	BCC 38876	<i>Neoregalia</i> sp	Thailand	JQ247623	JQ247599	JQ247647	JQ247635	-
<i>C. cliviae</i> *	CBS 125375	<i>Clivia miniata</i>	China	JX519223	GQ856756	JX519240	JX519249	GQ849464
<i>C. colombiense</i> *	CBS 129818	<i>Passiflora edulis</i>	Colômbia	JQ005174	JQ005261	JQ005522	JQ005608	JQ005695
<i>C. curcumae</i> *	IMI 288937	<i>Curcuma longa</i>	Índia	GU227893	GU228285	GU227991	GU228187	-
<i>C. cymbidiicola</i> *	IMI 347923	<i>Cymbidium</i> sp.	Austrália	JQ005166	JQ005253	JQ005514	JQ005600	JQ005687

Table 3 (Continued)

<i>C. fruticola</i> *	ICMP 18581	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	JX010165	JX010033	FJ907426	FJ917508	JX010405
<i>C. gloeosporioides</i> *	CBS 112999	<i>Citrus sinensi</i>	Italy	JQ005239	JQ005500	JQ00558	FJ917512	JQ005152
<i>C. hippeastri</i> *	CBS 125376	<i>Hippeastrum vittatum</i>	China	JQ005231	JQ005318	JQ005579	JQ005665	JQ005752
<i>C. karstii</i> *	CORCG6	<i>Vanda</i> sp.	China	HM585409	HM585391	HM581995	HM585428	HM582013
<i>C. lindemuthianum</i> *	CBS 144.31	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Germany	JQ005779	JX546712	JQ005842	JQ005863	-
<i>C. malvarum</i> *	CBS 527.97	<i>Malvaceae</i>	unknown	KF178480	KF178504	KF178577	KF178601	-
<i>C. musae</i> *	ICMP19119	<i>Musa</i> sp.	USA	JX010146	JX010050	JX009433	HQ596280	JX009742
<i>C. novae-zelandiae</i> *	CBS 128505	<i>Capsicum annuum</i>	New Zealand	JQ005228	JQ005315	JQ005576	JQ005662	JQ005749
<i>C. nupharicola</i> *	ICMP 18187	<i>Nupharlutea</i> subsp. <i>polysepala</i>	USA	JX010187	JX009972	JX009437	JX010398	JX009663
<i>C. oncidii</i> *	CBS 129828	<i>Oncidium</i> sp.	Germany	JQ005169	JQ005256	JQ005517	JQ005603	JQ005690
<i>C. orbiculare</i> *	CBS 570.97	<i>Cucumis sativus</i>	Europe	KF178466	KF178490	KF178563	KF178587	-
<i>C. parsonsiae</i> *	CBS 128525	<i>Parsonia capsularis</i>	New Zealand	JQ005233	JQ005320	JQ005581	JQ005667	JQ005754
<i>C. petchii</i> *	CBS 378.94	<i>Dracaena marginata</i>	Italy	JQ005223	JQ005310	JQ005571	JQ005657	JQ005744
<i>C. phyllanthi</i> *	CBS 175.67	<i>Phyllanthus acidus</i>	Índia	JQ005221	JQ005308	JQ005569	JQ005655	JQ005742
<i>C. queenslandium</i> *	ICMP 1778	<i>Carica papaya</i>	Australia	JX010276	JX009934	JX009447	JX010414	JX009691
<i>C. salsolae</i> *	ICMP 19051	<i>Salsola tragus</i>	Hungary	JX010242	JX009916	JX009562	JX010403	JX009696
<i>C. siamense</i> *	ICMP 18578	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	JX010171	JX009924	FJ907423	JX010404	FJ917505
<i>C. sidae</i> *	CBS 504.97	<i>Sida spinosa</i>	USA	KF178470	KF178495	KF178567	KF178591	-
<i>C. spinosum</i> *	CBS 515.97	<i>Xanthium spinosum</i>	Austrália	KF178474	KF178498	KF178571	KF178595	-

Table 3 (Continued)

<i>C. trifolii</i> *	CBS 158.83	<i>Trifolium</i>	USA	KF178478	KF178502	KF178575	KF178599	-
<i>C. tebeestii</i>	CBS 522.97	<i>Malva pusilla</i>	Canadá	KF178473	KF17855	KF178570	KF178594	-
<i>C. tropicale</i> *	ICMP18653	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá	JX010264	JX010007	JX009489	JX010407	JX009719

¹CBS Culture Collection of the Centraal bureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity centre, Utrecht, The Netherlands ; COAD Coleção Octávio Almeida Drummond, Viçosa, Brazil; CMM Culture Collection of Phythopathogenic Fung “Prof. Maria Menezes”, Recife, Brazil; ICMP International Collection of Microorganisms from Plants, Landcare Research, Auckland, New Zealand; IMI International Mycological Institute, CABI-Bioscience, Egham, Bakenham Lane, U.K.; * ex-type or ex-epitype.²ITS partial rDNA-ITS region; GAPDH: glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase; ITS: partial rDNA-ITS; ACT: actin; TUB-2: partial β -tubulin (tub2); CAL: calmodulin; region.

Table 4 Summary of morphological data of *Colletotrichum* isolates

Species	Conidia ¹		Growth rate (mm day ⁻¹) ²	
	Length (µm)	Width (µm)	Shape	
<i>Colletotrichum brevisporum</i>	6.14±1.36 (2.4-8.7)	1.93±0.33 (0.9-2.5)	Cylindrical	8.52±0.23b
<i>C. Cliviae</i>	7.10±1.06 (2.4-17)	2.21±1.76 (1.3-7)	Cylindrical	11.48±0.25a
<i>C. fructicola</i>	6.19±0.67 (2.2-7.8)	1.99±0.45 (1.2-2.9)	Cylindrical	11.04±0.35a
<i>C. karstii</i>	6.39±0.65 (5.0-8.0)	2.53±0.24 (1.0-3.0)	Cylindrical	8.13±0.62b
<i>Colletotrichum</i> sp. (1)	5.12±0.42 (4.0-11.9)	2.10±0.83 (1.5-2.1)	Cylindrical	3.92 ± 0.25c
<i>Colletotrichum</i> sp. (2)	6.85±1.14 (3.8-13.1)	2.53±0.23 (1.5-4.4)	Cylindrical	8.26±0.20b

¹Average length and width of 50 conidia per isolated. ²Average mycelial growth rate from 4 repetitions per isolated, with evaluation after 6 days.

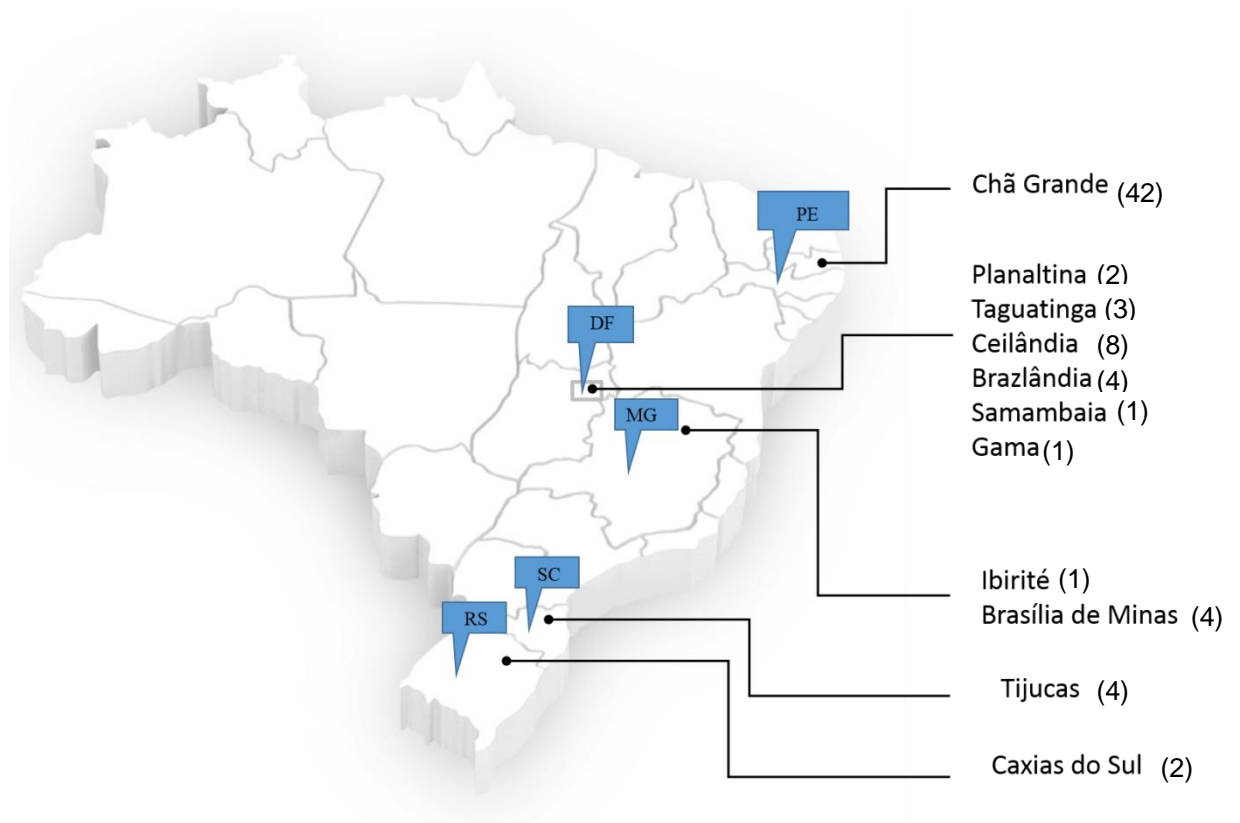


Fig. 1 Collection sites of *Colletotrichum* spp. isolates of production fields of chayote in Brazil, located in the states of Pernambuco (PE), Distrito Federal (DF), Minas Gerais (MG), Santa Catarina (SC) and Rio Grande do Sul (RS). The numbers in parentheses represent the amount of isolated placed in each municipality.

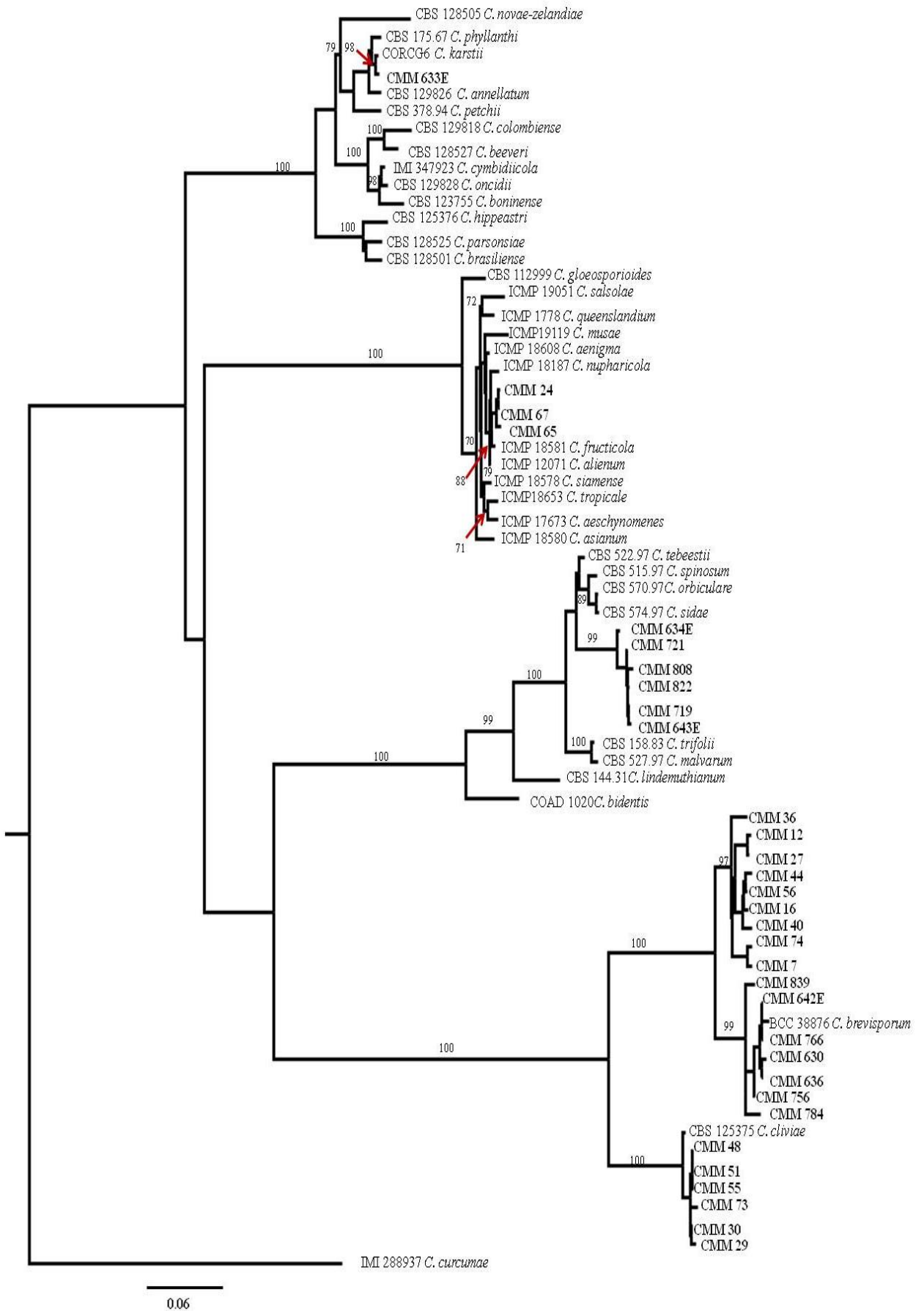


Fig. 2 A maximum likelihood tree from 62 of *Colletotrichum* isolates based on a multilocus dataset (ACT, TUB2, CAL, GAPDH and ITS). The tree shows the phylogenetic relationships of *Colletotrichum* species isolated from *Sechium edule* and with other members of *C. boninense*, *C. gloeosporioides*, *C. orbiculare* species complex and *C. brevisporum* and *C. cliviae* strains. *C. curcumae* is used as outgroup. Bootstrap support values above 50 % (left) are shown at the nodes. The scale bar indicates the number of substitutions per nucleotide position.

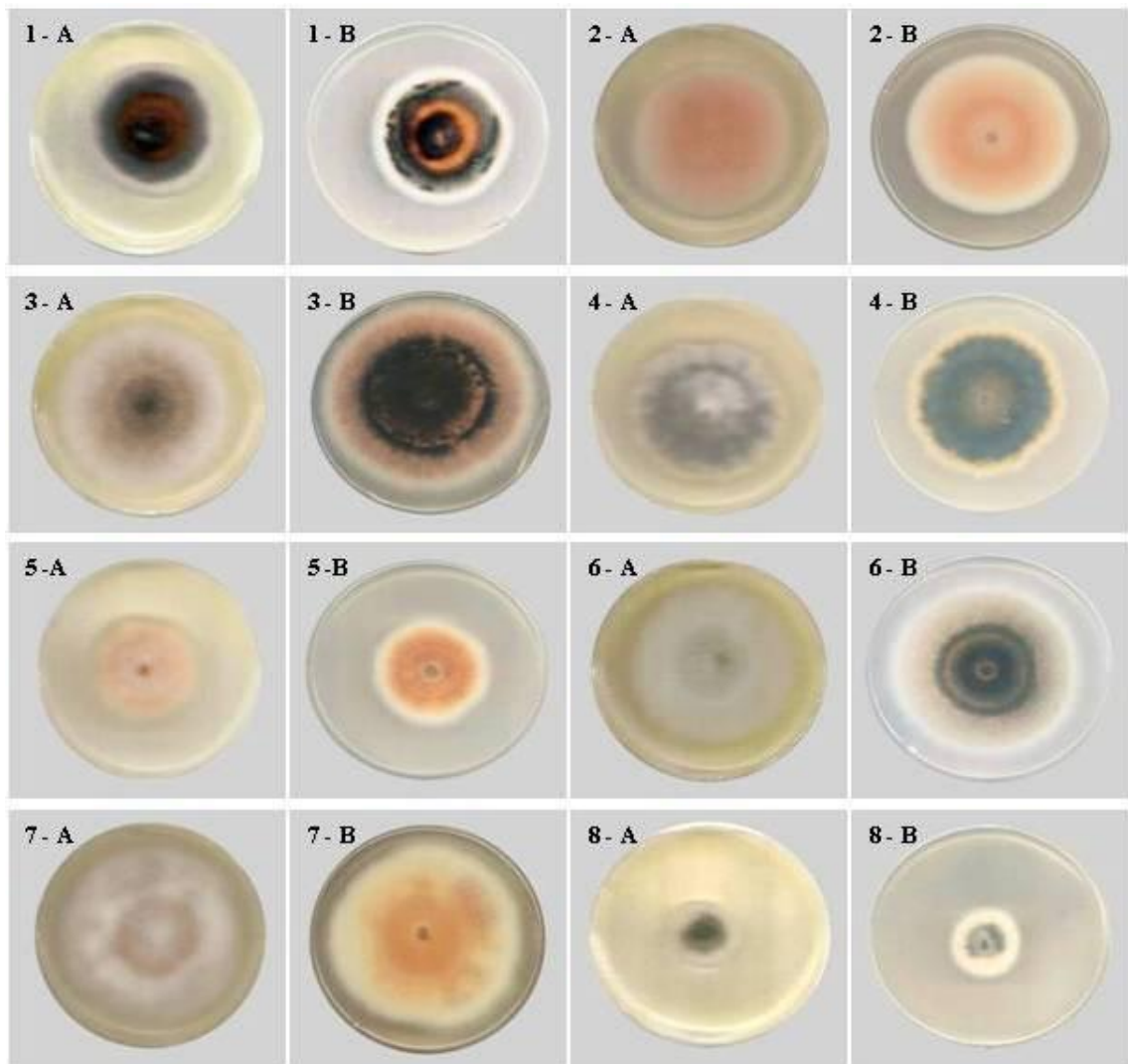


Fig. 3 Morphotypes (1 to 8) of isolates of *Colletotrichum* from chayote. Colony characteristics: Plates in A aerial view, reverse view in B. 1A-B: *Colletotrichum* sp. (2); 2A-B: *C. brevisporum* and *Colletotrichum* sp. (2); 3A-B: *C. cliviae*; 4A-B: *C. brevisporum*; 5A-B: *C. brevisporum* and *C. karstii*; 6A-B: *C. fructicola*; 7A-B: *C. fructicola*; 8A-B: *Colletotrichum* sp. (2).

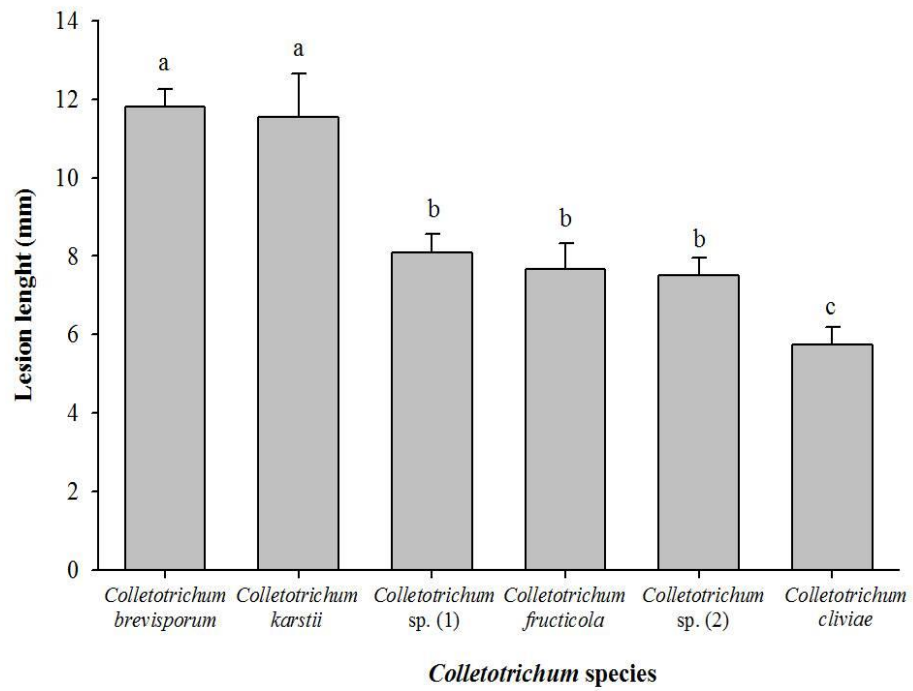


Fig. 4 Mean lesion lengths (mm) caused by *Colletotrichum* species associated with chayote anthracnose, 8 days after inoculation with agar plug onto wounded fruits. Bars above columns are the standard error of the mean. Columns with same letter do not differ significantly according to Fisher's LSD test ($P \leq 0.05$)

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

1. *Colletotrichum orbiculare sensu stricto* não foi encontrado causando antracnose do chuchuzeiro em nenhum polo de produção no Brasil;
2. Os isolados de *Colletotrichum* do chuchuzeiro agruparam-se em 3 complexos de espécies: *Colletotrichum boninense*, *C. gloeosporioides* e *C. orbiculare*.
3. A antracnose em frutos de chuchuzeiro é causada por seis espécies de *Colletotrichum* (*C. brevisporum*, *C. cliviae*, *C. fructicola*, *C. karstii*, *Colletotrichum sp.* (1) e *Colletotrichum sp.* (2));
4. Todos os isolados de *Colletotrichum* foram patogênicos em frutos de chuchuzeiro, com diferentes níveis de virulência
5. As duas espécies de *Colletotrichum* não reconhecidas entre as espécies já descritas, devem ser formalmente descritas como novas.

