



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



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**Etiologia e epidemiologia das espécies de
Colletotrichum relacionadas com a antracnose
em frutos de mangueira no Nordeste brasileiro**

Nelson Bernardi Lima

**Recife – PE
2013**

NELSON BERNARDI LIMA

**ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DAS ESPÉCIES DE *Colletotrichum*
RELACIONADAS COM A ANTRACNOSE EM FRUTOS DE MANGUEIRA NO
NORDESTE BRASILEIRO**

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Prof. Marcos Paz Saraiva Câmara, Ph.D – Orientador

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff – Co-orientador

**RECIFE-PE
FEVEREIRO-2013**

Ficha catalográfica

L732e Lima, Nelson Bernardi
Etiologia e epidemiologia das espécies de *Colletotrichum*
relacionadas com a antracnose em frutos de mangueira no nordeste
brasileiro / Nelson Bernardi Lima. – Recife, 2013.
71 f. : il.

Orientador: Marcos Paz Saraiva Câmara.
Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal
Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2013.
Referências.

1. *Mangifera indica*, 2. Filogenia multilocus 3. Morfologia 4. Nova
espécie 5. Virulência 6. Gama de hospedeiros I. Câmara, Marcos
Paz Saraiva, orientador II. Título

CDD 632

**ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DAS ESPÉCIES DE *Colletotrichum*
RELACIONADAS COM A ANTRACNOSE EM FRUTOS DE MANGUEIRA NO
NORDESTE BRASILEIRO**

NELSON BERNARDI LIMA


Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 20 de fevereiro de 2013.

ORIENTADOR:

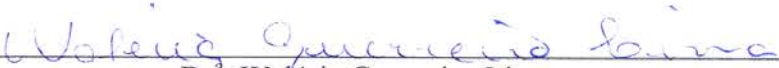

Prof. Marcos Paz Saraiva Câmara, Ph.D

EXAMINADORES:


Prof.^a. Dr.^a. Elaine Malosso


Prof.^a. Dr.^a. Sônia Maria Alves de Oliveira


Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino


Dr.^a. Waléria Guerreiro Lima

**RECIFE-PE
FEVEREIRO, 2013**

*Aos meus pais Julio Lima e Adélia Bernardi, e
minha querida Marília, pelo exemplo de vida,
caráter, dedicação e amor, meu eterno
agradecimento.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Marcos Paz Saraiva Câmara e Sami Jorge Michereff, pelo empenho, atenção, dedicação, amizade, orientação e valiosos ensinamentos, que muito contribuíram para minha formação;

Ao Departamento de Agronomia da UFRPE, pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação.

Aos professores que compõem o Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, da UFRPE, pelos ensinamentos transmitidos com seriedade e compromisso.

Aos Professores Dr. Marcos Moraes, Dr. Valdir Balbino e Dra. Maria Angélica Guimarães Barbosa pela amizade, valiosa colaboração e disponibilidade durante a execução deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da bolsa de estudo;

Meu agradecimento a toda equipe que compõe o Laboratório de Micologia pela valiosa ajuda em todas as etapas de execução deste trabalho;

Aos amigos, Carine Naue, Hailson Alves, Josicléda Galvêncio, Leonardo Tavares, Rômulo Diniz, Mariote Netto, Willie Anderson, Valéria Costa, Kamila Correa, Breno Oliveira, Mayume a minha imensa gratidão, pelo companheirismo em todos os momentos dessa trajetória, amizade e momentos de descontração;

À Darcy Martins, Romildo Angeiras, Adelmo e Adriane, pela amizade e presteza, ao longo do curso.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO GERAL	vii
GENERAL ABSTRACT	viii
CAPÍTULO I	9
Referências Bibliográficas	17
CAPÍTULO II – Five <i>Colletotrichum</i> species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil	23
Abstract	24
Introduction	24
Material and methods	25
Results	30
Discussion	33
Acknowledgments	34
References	35
CAPÍTULO III – Epidemiologia comparativa de espécies de <i>Colletotrichum</i> obtidas de frutos de mangueira no Nordeste do Brasil	49
Resumo	50
Abstract	50
Introdução	51
Material e métodos	53
Resultados	56
Discussão	58
Referências	61
Conclusões Gerais	70

RESUMO GERAL

A antracnose causada por espécies de *Colletotrichum* é uma das doenças mais importantes da cultura da mangueira em todo o mundo. Neste estudo, espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose em frutas de mangueira, no nordeste do Brasil, foram coletadas e caracterizadas a partir de marcadores moleculares, morfologia, epidemiologia e sensibilidade a fungicidas. As sequências do gene gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GPDH), de 143 isolados de *Colletotrichum*, foram analisadas como uma primeira medida de diversidade genética. Um subgrupo de 47 isolados, selecionados para representar a gama de diversidade genética e origem geográfica, foram sequenciados usando os genes parcial actina (ACT), β -tubulina (TUB2), calmodulina (CAL), glutamina sintetase (GS) e genes rDNA-região ITS (ITS). A análise multilocus das sequências, juntamente com um exame crítico dos caracteres fenotípicos, revelou quatro espécies descritas anteriormente (*Colletotrichum asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale* e *C. karstii*) e uma nova espécie. A nova espécie foi introduzida como *Colletotrichum dianesii* e formalmente descrita e ilustrada. Apenas *C. asianum* e *C. karstii* tinham sido relatadas a partir de manga, enquanto as outras espécies representam o primeiro relato associado à antracnose em frutos de mangueira no mundo. De modo geral, as cultivares Tommy Atkins, Palmer e Keith foram suscetíveis às espécies de *Colletotrichum*. A menor virulência da maioria das espécies de *Colletotrichum* foi observada na cultivar Tommy Atkins. Todas as espécies de *Colletotrichum* foram patogênicas à gama de hospedeiros inoculada (manga, mamão, banana, goiaba e pimentão). Para todas as espécies de *Colletotrichum* as temperaturas entre 25 e 30°C proporcionaram lesões maiores, entretanto, foi comprovado que as espécies têm exigências térmicas diferentes para expressarem a máxima virulência em frutos. Todas as espécies de *Colletotrichum* apresentaram o crescimento micelial reduzido na presença dos fungicidas tiofanato metílico, difenoconazole e azoxistrobina. A resposta de sensibilidade variou de acordo com o fungicida e a espécie de *Colletotrichum*.

Keywords: *Mangifera indica*, filogenia multilocus, morfologia, nova espécie, virulência, gama de hospedeiros

GENERAL ABSTRACT

Colletotrichum species are the most important and widespread form of decay affecting mango fruit worldwide. In this study, *Colletotrichum* species associated with fruit anthracnose isolated from mango in northeastern Brazil were subject to molecular and morphological analyses, epidemiology and sensitivity to fungicide. The partial sequence of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) gene of 143 *Colletotrichum* isolates was amplified, as an initial measure of genetic diversity. A subset of 47 isolates, selected to represent the range of genetic diversity and geographic origin, were further sequenced using the partial actin (ACT), β -tubulin (TUB2), calmodulin (CAL), glutamine synthetase (GS) genes and rDNA-ITS (ITS) region. Multilocus sequence analysis, together with a critical examination of the phenotypic characters, revealed four previously described species (*Colletotrichum asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale* and *C. karstii*) and one new species. The new species is introduced as *Colletotrichum dianesii* and formally described, illustrated and compared with similar taxa. Only *C. asianum* and *C. karstii* have previously been reported from mango, while the other species represent the first report associated with the mango fruits worldwide. In general, mango cultivars were susceptible to *Colletotrichum* species, although *C. karstii* did not infect the cultivars Keith and Palmer. The highest virulence of *Colletotrichum* species was observed in the cultivar Tommy Atkins. All *Colletotrichum* species were pathogenic to host range (mango, papaya, banana, guava and sweet pepper), which deserves attention in view of the existence of constant potential inoculum source. For all *Colletotrichum* species temperatures between 25 and 30° C provided the highest lesions, however it was found that the species have different thermal requirements for expressing the maximum virulence in fruits. All *Colletotrichum* species had reduced mycelial growth in the presence of fungicides methyl thiophanate and difenoconazole an azoxystrobin, regardless of the active principle. The sensitivity response varied with the fungicide and *Colletotrichum* species.

Keywords: *Mangifera indica*, multilocus phylogeny, morphology, new species, virulence, host range

Capítulo I

Introdução Geral

ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DAS ESPÉCIES DE *Colletotrichum* RELACIONADAS COM A ANTRACNOSE EM FRUTOS DE MANGUEIRA NO NORDESTE BRASILEIRO

INTRODUÇÃO GERAL

A CULTURA DA MANGUEIRA

A mangueira (*Mangifera indica* L.) pertence à classe Dicotyledoneae e à família Anacardiaceae. O gênero *Mangifera* inclui cerca de 60 espécies, das quais a *M. indica* é a mais importante, embora existam outras espécies que produzam frutos comestíveis. É uma árvore de porte médio a grande, com copa simétrica, de forma arredondada baixa a piramidal alta, variando de baixa e densa a ereta e aberta, e com folhas sempre verdes (SANTOS-SEREJO, 2005).

O maior número de espécies de *Mangifera* ocorre na Península Malaia, Indonésia, Tailândia, Indochina e Filipinas (BOMPARD, 1989; MUKHERJEE, 1985). A classificação mais recente das espécies foi baseada na morfologia floral (KOSTERMANS; BOMPARD, 1993) e incluiu 69 espécies, a maioria das quais são incluídas em dois subgêneros *Mangifera* e *Limus*, outras 11 espécies ocupam uma posição incerta. Eiadthong et al. (1999) descreveram as relações filogenéticas entre as espécies de *Mangifera* utilizando a técnica de RFLP (Polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição) e amplificação de DNA do cloroplasto (cpDNA).

Com base nos relatos antigos de viajantes e do registro histórico, acredita-se que a mangueira teve origem na Índia e espalhou-se para o Sudeste Asiático e então para o Novo Mundo e a África. O registro histórico fornece dados, por vezes, conflitantes da distribuição da mangueira. Segundo Mukherjee e Litz (1997) a mangueira foi introduzida em algumas ilhas do arquipélago indonésio em tempos recentes, no entanto, a mangueira foi cultivada em Java em 900-1100 AC, de modo que o templo em Borobudur foi construído com esculturas de Buda em contemplação sob uma mangueira. Com base nas recentes evidências taxonômicas e moleculares, agora é admissível que a mangueira evoluiu dentro de uma grande área incluindo o Norte-ocidental de Myanmar, Bangladesh e nordeste da Índia.

A difusão global da cultura da mangueira e seu cultivo fora do centro de origem provavelmente não ocorreram até o início das viagens européias e da descoberta da colonização nos séculos XV e XVI. Uma vez que, as sementes da mangueira não podem

sobreviver por mais de alguns dias ou semanas. Assim as sementes devem ter sido transportadas como frutas maduras, mudas ou, mais tarde, como vegetais enxertados. Acredita-se que os portugueses transportaram mangas de suas colônias na Índia para colônias africanas, embora Purseglove (1972) tenha sugerido que a cultura poderia ter sido introduzida na África através da Pérsia e da Arábia no século X pelos comerciantes árabes. Os portugueses, posteriormente, introduziram a mangueira no Brasil a partir de suas colônias africanas. Os espanhóis, depois da passagem de Magalhães pelo Oceano Pacífico, introduziram a mangueira em suas colônias do Novo Mundo, através dos portos comerciais do México e Panamá. A mangueira foi introduzida para as Índias Ocidentais em meados de século XVIII, provavelmente do Brasil. Atualmente a mangueira é amplamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre.

IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A manga é a fruta mais importante da Ásia e atualmente ocupa o quinto lugar em produção total entre as principais frutas no mundo inteiro. Em primeiro lugar está a banana (105.815.354 t) seguida por citros (105.440.168 t), uva (65.584.233 t) e maçãs (59.444.377 t) (FAOSTAT, 2012). Segundo a FAO (2012), a produção de manga no mundo aumentou de 16.903.407 t em 1990 para 28.221.510 t em 2005. Grande parte desta nova produção ocorreu fora dos centros tradicionais da cultura da manga no Sul e Sudeste Asiático. Os líderes atuais, depois da Índia, incluem a China (4.519.380 t), a Tailândia (3.277.250t), a Indonésia (2.131.140 t), o Paquistão (1.88.8450 t), o México (1.827.310 t) e o Brasil (1.249.520 t). Como resultado, as mangas estão amplamente disponíveis como frutas frescas e na forma de produtos processados, sendo um componente importante da dieta em muitos países subdesenvolvidos nas regiões tropicais e subtropicais.

No Brasil, o processo de expansão da cultura da manga ocorreu principalmente a partir da década de 80 e estendeu-se até os anos 90. A produção brasileira de manga, segundo os dados da Produção Agrícola Municipal (PAM) do IBGE, revela um crescimento da ordem de 38,23 % no período de 1990 a 2000. De um desempenho estagnado, observou-se uma pequena recuperação a partir de 1993, quando o volume produzido ascendeu, gradativamente, do patamar de 402 mil toneladas para 538 mil toneladas em 2000 (IBGE, 2012).

Em 2009 a produção brasileira de manga foi de 1.249.520 t e a área cultivada alcançou 76.568 hectares (IBGE, 2012). A região Nordeste é maior produtora do Brasil, com destaque

para o Vale do Submédio Rio São Francisco (Bahia e Pernambuco) e, em menor escala, a mesorregião do Centro-Sul Baiano (CORREIA; ARAUJO, 2010). No Nordeste, a manga é cultivada em todos os estados, em particular nas áreas irrigadas da região semi-árida, que apresentam excelentes condições para o desenvolvimento da cultura e obtenção de elevada produtividade e qualidade das frutas. No ano de 2009, o Vale do São Francisco contava com aproximadamente 23.000 hectares de mangueiras em produção, com perspectivas de aumento de área em função das condições climáticas favoráveis e da implantação de novos perímetros irrigados (MELO et al., 2009).

Em 2010, o país embarcou 124.694 toneladas de manga, 13,15% a mais que em 2009. Desse total, 99.002 t saíram do vale do São Francisco para desembarcar em solo internacional, ou seja, aproximadamente 80% dos embarques nacionais. Em valores, o setor movimentou US\$ 119,9 milhões, o que representou variação positiva de 23,15% na comparação com o ano anterior (KIST et al., 2012).

Entretanto, muitos problemas são encontrados na cadeia produtiva da manga e, em muitos casos, limitam à sua exploração comercial. As doenças de plantas são responsáveis por grandes perdas em culturas de importância econômica, principalmente aquelas que ocorrem em frutíferas no período pós-colheita. A intensificação do cultivo e algumas práticas não adequadas de manejo têm gerado problemas fitossanitários e conseqüentemente perdas na produção, que podem ser quantitativas (redução na produção) e qualitativas (afeta a aparência dos frutos). Um ponto em comum a respeito das principais doenças da mangueira é a etiologia fúngica. Dentre estas, destacam-se a malformação floral e vegetativa ou embonecamento (*Fusarium subglutinans* Wollenweb et. Reinking), o oídio (*Oidium mangiferae* Bert.), a morte-descendente (*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon et. Maubl), podridões pedunculares em frutos (*L. theobromae*, *Pestalotiopsis mangiferae* (Henn.) Steyaert, *Alternaria alternata* (Fr.) Kiessler, e *Fusicoccum* spp.) e a antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. et Sacc., uma das doenças mais frequentes e que, em geral, causa as maiores perdas econômicas em áreas produtoras de manga no mundo (BATISTA; BARBOSA, 2008).

ANTRACNOSE DA MANGUEIRA

A mangueira é uma frutífera suscetível a uma grande diversidade de doenças causadas por fungos, bactérias e outros organismos que podem não só limitar a sua produção, como

também comprometer a qualidade dos frutos, o que é particularmente importante quando se destinam à exportação. Dentre as principais doenças da mangueira destaca-se a antracnose, causada pelo fungo *C. gloeosporioides*, que em virtude de sua ampla disseminação nas regiões produtoras resulta em grandes prejuízos na produção e qualidade dos frutos (SILVA; FONSECA; MOREIRA, 2002)

A antracnose é considerada uma doença economicamente importante no Nordeste do Brasil (SERRA; SILVA, 2004). A doença pode ocasionar prejuízos que variam em função do grau de suscetibilidade da planta hospedeira e das condições ambientais.

A doença é mais severa em condições chuvosas, sob temperaturas elevadas e alta umidade. Incide em todos os órgãos aéreos da planta como ramos, folhas, flores e frutos. Tem maior ocorrência nos países tropicais e subtropicais, contribuindo para a redução direta da qualidade e quantidade do produto e aumentando os custos de produção com a necessidade de controle no campo e na pós-colheita. Nas folhas, a antracnose aparece como pontos necróticos irregulares de necrose em ambos os lados das folhas da mangueira. As lesões coalescem e muitas vezes formam grandes áreas necrosadas, frequentemente ao longo das margens da folha. Lesões desenvolvem-se principalmente em tecidos jovens, conídios são formados em lesões de todas as idades (SILVA, FONSECA, MOREIRA, 2002).

As flores afetadas enegrecem e secam o pedúnculo, prejudicando a frutificação em toda a panícula. Na ráquis da inflorescência e suas ramificações, aparecem manchas de coloração marrom escuras, profundas e secas, alongadas no sentido longitudinal, destruindo grande número de flores. Sob condições favoráveis, o fungo pode invadir os galhos e causar a morte descendente (PLOETZ et al., 1994).

Na casca das frutas maduros, antes ou após a colheita, surgem pequenas manchas arredondadas, deprimidas de coloração marrom escuras ou pretas. Essas lesões comumente coalescem e atingem o interior das frutas, causando uma extensa decomposição da polpa. Um segundo tipo de sintoma é a “mancha em lágrima”, que são regiões lineares necrosadas nas frutas, que podem ou não estar associadas à rachaduras superficiais na epiderme que dão a fruta o aspecto de “pele de crocodilo”, ou podem se desenvolver em largura, causando fendas profundas que se estendem da epiderme à polpa (NELSON, 2008).

O patógeno produz uma grande quantidade de conídios em massas mucilaginosas de coloração variando do rosa ao laranja (acérvulos), principalmente em condições de elevada umidade, sobre folhas e inflorescências infectadas e frutas abortadas mumificadas. Os conídios são disseminados por respingos de chuva e causam novas infecções em qualquer órgão da planta. Durante o armazenamento, não é comum o fungo ser disseminado de uma

fruta para outra. Entretanto, sabe-se que um único isolado pode infectar hospedeiros diferentes (YANG et al., 2012). Dessa forma, conídios de *Colletotrichum* spp. produzidos em outros hospedeiros, como abacate, mamão, banana e citros, também podem infectar e causar doenças em frutos de mangueira (AGRIOS, 2005a).

O GÊNERO *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* foi proposto inicialmente por Tode (1790) com a denominação de *Vermicularia* Tode, porém, Corda (1837a) o reclassificou com a denominação de *Colletothrichum* (teleomorfo *Glomerella* Spauld. & H. Schrenk.). Entretanto, esse mesmo autor, em outro trabalho, alterou para a denominação vigente (CORDA, 1937b). Corda (1837a) caracterizou o gênero *Colletotrichum*, de maneira geral, como fungos que apresentam conídios hialinos, retos, fusiformes ou curvados e acérvulos com setas.

Este gênero possui espécies com diferentes estilos de vida, passando por espécies endofíticas, epífitas, saprófitas, fitopatogênicas e patogênicas ao homem (CANO; GUARRO; GENE, 2004; CANNON et al., 2012; KUMAR; HYDE, 2004; LIU; DUAN; XIE, 2007; PEREIRA; VIEIRA; AZEVEDO, 1999; PHOTITA et al., 2001, 2003, 2004; PRIHASTUTI et al., 2009).

As espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, geralmente são responsáveis pela antracnose e outras doenças de uma grande variedade de espécies de plantas, principalmente plantas de interesse agrônômico, incluindo cereais, leguminosas, plantas ornamentais, hortaliças e árvores frutíferas (CANNON et al., 2012; HYDE et al., 2009). Na literatura, a antracnose foi descrita em mais de 1000 espécies de plantas (MORIWAKI; TSUKIBOSHI; SATO, 2002).

Colletotrichum é um gênero cosmopolita de ampla distribuição geográfica. É encontrado em várias regiões do globo terrestre, com ocorrência nas zonas temperada, tropical e subtropical (DODD; ESTRADA; JEGER, 1992; FARR et al., 1989; FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; WALLER, 1992;). As lesões da antracnose têm maior severidade em regiões tropicais e subtropicais (MENEZES, 2002). Esse fungo ataca diferentes estádios de desenvolvimento da planta e é um dos gêneros de fungos maior importância econômica (BAILEY; JEGER, 1992; FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; HYDE et al., 2009; JEFFRIES et al., 1990; TOZZE JUNIOR; MELLO; MASSOLA JUNIOR, 2006;).

Diferentes espécies ou genótipos de *Colletotrichum* podem infectar diferentes partes da mesma planta hospedeira, causando doenças distintas, que ocorrem sucessivamente, durante o desenvolvimento da cultura (FREEMAN; SHABI; KATAN, 2000; WALLER, 1992). Por outro lado, diversos hospedeiros podem ser infectados por uma única espécie de *Colletotrichum*, como *C. coccodes* (Wallr.) S. Hughes que causa doenças em muitas espécies de olerícolas, incluindo pimenteira, batateira, abóbora e tomate (DILLARD, 1992; FREEMAN, 2000).

No processo de infecção, o conídio de *Colletotrichum* adere-se 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* de penetração entrando diretamente na superfície do tecido hospedeiro. Abaixo da cutícula e da epiderme, o fungo cresce e penetra nas células epidérmicas. Em consequência desse processo biológico, a hifa desenvolve-se intra e/ou intercelularmente, e pode permanecer latente por algum tempo. Nas condições ambientais favoráveis, ocorre a morte das células do hospedeiro, resultando nas lesões (AGRIOS, 2005b; BAILEY et al., 1992; JEFFRIES et al., 1990; PERFECT et al., 1999).

De acordo com Agrios (2005b), o micélio produz acérvulos e conídios logo abaixo da cutícula do tecido hospedeiro que rompe-se liberando, posteriormente, os conídios que causam mais infecção. Os conídios de *Colletotrichum* presentes nos acérvulos estão envolvidos por uma matriz gelatinosa alaranjada constituída de polissacarídeos e de proteínas solúveis em água. A matriz protege os conídios da dessecação, aumentando o potencial e a eficiência de germinação, além de facilitar a penetração no tecido do hospedeiro (MENEZES, 2002).

As células conidiogênicas de *Colletotrichum*, geralmente, são agregadas em conidiomatas (também denominados de acérvulos), e do mesmo modo, podem ser formadas nas ramificações laterais do micélio. No que diz respeito à formação de setas no acérvulo, em substrato natural ou em meio de cultivo, essa formação é variável em função dos diversos fatores ambientais, portanto, a sua presença ou ausência não deve ser utilizada como um caráter de valor taxonômico para separação de *taxa* (MENEZES, 2002).

O fitopatógeno é favorecido por temperatura e umidade relativa do ar elevadas. Os conídios são liberados e distribuídos apenas quando os acérvulos estão úmidos. Geralmente são disseminados por ventos, respingos de chuva, chuvas fortes ou por entrar em contato com insetos, outros animais, ferramentas, dentre outros (AGRIOS, 2005b). Os conídios germinam apenas na presença de água livre ou quando a umidade relativa do ar é bastante elevada (em torno de 100%) (AGRIOS, 2005b; MENEZES, 2002).

Segundo as estimativas encontradas na literatura, o número de espécies relacionadas à *Colletotrichum* varia bastante. De várias centenas (mais de 800 espécies que eram descritas e/ou atribuídas), foi reduzido a 11 espécies com 12 formas, baseando-se em caracteres morfológicos (morfologia dos conídios), relação com o estágio perfeito e patogenicidade, em que muitos táxons foram tratados como sinônimos de *C. gloeosporioides* e *C. dematium* (Pers. ex Fr.) Grove.

Sutton (1980) considerou 22 espécies, adotando para a distinção de espécies, os critérios taxonômicos de morfologia de conídios, apressórios e as características culturais das colônias. Mais tarde, Sutton (1992) reconheceu 39 espécies, incluindo uma variedade e oito *formae speciales*, com base nos padrões utilizados no trabalho anterior e na especificidade do hospedeiro. Kirk et al. (2008) na 10ª edição do Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi estimaram em 60 espécies.

Hyde et al. (2009) forneceram uma visão geral de 66 espécies de *Colletotrichum* que estão em uso corrente, descrevendo-as com base na morfologia e uma abordagem filogenética multilocus.

Com a publicação do trabalho de Cannon et al. (2012), mais 41 espécies foram intruduzidas no gênero *Colletotrichum*, elevando o número para mais de 100 espécies. É provável que mais espécies de *Colletotrichum* sejam reconhecidas com a utilização da análise multilocus.

Colletotrichum é um gênero taxonomicamente confuso, com necessidade urgente de revisão (CANNON; BRIDGE; MONTE, 2000; CANNON et al. 2012; JOHNSTON, 2000; JOHNSTON et al., 2008). Para contornar essa problemática, os pesquisadores têm utilizado, além de estudos morfológicos, outras metodologias, como dados de sequências do DNA, características culturais, fisiológicas e de patogenicidade, que são pontos necessários para que ocorra uma abordagem polifásica e uma identificação correta das espécies desse gênero (CANNON; BRIDGE; MONTE, 2000; CROUCH; CLARKE; HILLMAN, 2009; PRIHASTUTI et al., 2009; SUTTON, 1992).

De maneira geral, a correta identificação e caracterização das espécies de *Colletotrichum* são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de controle, além de propiciar um melhor entendimento da epidemiologia da doença.

Diante do exposto, a presente tese teve como objetivo caracterizar a diversidade de isolados de *Colletotrichum* spp. envolvidos na antracnose em frutos de mangueira no Nordeste do Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. Plant disease caused by fungi. In: AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th. ed. Amsterdam: Elsevier, 2005a. p. 385-614.
- AGRIOS, G. N. Plant diseases caused by fungi. In: AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. Burlington: Academic Press, 2005b. p. 385-614. [p. 496].
- KIST, B., VENCATO, A., SANTOS, C., CARVALHO, C., REETZ, E., POLL, H. (2012) Anuário Brasileiro de Fruticultura 2012. Editora gazeta, 128p
- BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. Preface. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: Centre for Agriculture and Biosciences International, 1992. p. 10-11.
- 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.
- BATISTA, D. C.; BARBOSA, M. A. G. Doenças da mangueira. In: FEIRA NACIONAL DA AGRICULTURA IRRIGADA, 1., Petrolina, PE, Brasil, 2008. **Minicursos** [CD-ROM]. Petrolina, 2008.
- BOMPARD, J. M. **Wild mangifera species in Kalimantan (Indonesia) and in Malaysia**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1989. 54 p.
- CANO, J.; GUARRO, J.; GENE, J. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 6, p. 2450-2454, 2004.
- CANNON, P. F.; BRIDGE, P. D.; MONTE, E. Linking the past, present and future of *Colletotrichum* systematics. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Eds.). **Colletotrichum: host specificity, pathology and host-pathogen interaction**. Saint Paul: American Phytopathological Society 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, p.181-213, 2012.
- CORDA, A. C. I. III - Abtheilung: die pilze Deutschlands. In: STURM, J. (Ed.). **Deutschlands flora in abbildungen nach der natur mit beschreibungen**. Nürnberg: Sturm, v. 3, n. 12, p. 1-144 [p. 41-42], [Tabela 21]. Escrito em 1831 e publicado em 1837a.
- CORDA, A. C. I. **Icones fungorum hucusque cognitorum**. Pragæ: J. G. Calve, v. 1. 1837b. 45 p. [p. 16-17].
- CORREIA, R. C.; ARAUJO, J. L. P. Cultivo da mangueira. 2. ed. Petrolina: Embrapa Semi-Arido, 2010. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML>

/Manga/CultivodaMangueira_2ed/mercado.htm. Acesso em: 10 jan. 2013.

CROUCH, J. A.; CLARKE, B. B.; HILLMAN, B. I. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* group. **Mycologia**, New York, v. 101, n. 5, p. 648-656, 2009.

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

DILLARD, H. R. *Colletotrichum coccodes*: the pathogen and its hosts. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.). **Colletotrichum**: biology, pathology and control. Wallingford: Centre for Agriculture and Biosciences International, 1992. p. 225-236.

DODD, J. C.; ESTRADA, A.; JEGER, M. J. Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates in the tropics. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.). **Colletotrichum**: biology, pathology and control. Wallingford: Centre for Agriculture and Biosciences International, 1992. p. 308-325.

EIADTHONG, W., YONEMONI, K., SUGIURA, A., UTSUNOMIYA, N., SUBHADRABANDHU, S. Analysis of phylogenetic relationship in *Mangifera* by restriction site analysis of an amplified region of cpDNA. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, p 145-155, 1999.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Faostat. 2012. Disponível em: <http://faostat.fao.org> . Acesso em: 22 jan. 2013.

FARR, D. F.; BILLS, G. F.; CHAMURIS, G. P.; ROSSMAN, A. Y. **Fungi on plants and plant products in the United States**. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 1989. 1252 p. [p. 637].

FREEMAN, S. Genetic diversity and host specificity of *Colletotrichum* species on various fruits. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Eds.). **Colletotrichum**: host specificity, pathology and host-pathogen interaction. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 2000. p. 131-144.

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

FREEMAN, S.; SHABI, E.; KATAN, T. Characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of anemone (*Anemone coronaria* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 12, p. 5267-5272, 2000.

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.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção agrícola municipal – culturas temporárias e permanentes. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2010/PAM2010_Publicacao_completa.pdf> Acesso em: 06 jan. 2013.

JEFFRIES, P.; DODD, J. C.; JEGER, M. J.; PLUMBLEY, R. A. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathology**, Oxford, v. 39, n. 3, p. 343-366, 1990.

JOHNSTON, P. R. The importance of phylogeny in understanding host relationships with *Colletotrichum*. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Eds.). **Colletotrichum: host specificity, pathology and host-pathogen interaction**. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 2000. p. 21-28.

JOHNSTON, P. R.; DODD, S.; PARK, D.; MASSEY, B.; CHARUCHINDA, B.; WAIPARA, N.; BUCKLEY, T. Are stable, consistent, reliable, and useful species names possible within *Colletotrichum*? In: PERES, A. N.; TIMMER, L. W. (Orgs.). *Colletotrichum* diseases of fruit crops. INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 9th., 2008, Torino. **Pre-Congress Workshop...** Pisa: Italian Society for Plant Pathology; Milano: Italian Association for Plant Protection, 2008. p. 1-7.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. **Ainsworth and Bisby's Dictionary of Fungi**. 10th ed. Wallingford: Centre for Agriculture and Biosciences International, 2008. 771 p. [p. 159].

KOSTERMANS, A. J. G. H.; BOMPARD, J. M. **The Mangoes: botany, nomenclature, horticulture, cultivation and utilization**. London: Academic Press, 1993. 352 p.

KUMAR, D. S. S.; HYDE, K. D. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii*. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 17, n. 1, p. 69-90, 2004.

LIMA NETO, F. P., SANTOS, C. A. F. & COSTA, J. G. Cultivares (2010). In: Cultivo da mangueira. Documento online. Embrapa Semi-Árido <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira_2ed/cultivares.htm>. Acesso em 2 janeiro 2013.

LIU, X. Y.; DUAN, J. X.; XIE, X. M. *Colletotrichum yunnanense* sp. nov., a new endophytic species from *Buxus* sp. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 100, n. 1, p. 137-144, 2007.

MARTINS, I.; PEIXOTO, J. R.; MELLO, S. C. M. de; JUNQUEIRA, N. T. V. **Reação de progênies de maracujazeiro-azedo ao fungo *Colletotrichum gloeosporioides***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 23 p (EMBRAPA-CENARGEN. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 145).

MELO, R. B.; SILVA, J. S.; CANDIDO, A. S.; FEITOSA, T. B.; SOUZA, O. C. Análise da produção e da exportação de manga no Pólo Petrolina(PE)/Juazeiro(BA). In: ENCONTRO

NORTE E NORDESTE DE CIÊNCIAS E ENGENHARIA DE MATERIAIS, 2., Teresina, PI, 2009. **Anais ...** Terezina: Editora Universitária da UFRN, 2009.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, (Suplemento), p. S23-S24, 2002.

MORIWAKI, J.; TSUKIBOSHI, T.; SATO, T. Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences. **Journal General Plant Pathology**, Tokyo, v. 68, n. 4, p. 307-320, 2002.

MUKHERJEE, S. K. **Systematic and ecogeographic studies of crop genepools: 1. *Mangifera***. Rome: IBPGR Secretariat. 1985. 86 p.

MUKHERJEE, S. K.; LITZ, R. E. Introduction: Botany and Importance In: LITZ, R. E. (Ed.) **The Mango: botany, production and uses**. Wallingford: CAB INTERNATIONAL, 1997, p 10, v.1, cap.5, 425-445.

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

PEREIRA, J. O.; VIEIRA, M. L. C.; AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 37-40, 1999.

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.

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; HYDE, K. D. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 12, p. 1508-1514, 2001.

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? **Fungal Diversity**, Kunming, v. 16, n. 1, p. 131-140, 2004.

PHOTITA, W.; LUMYONG, P.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D.; LUMYONG, S. Saprobic fungi on dead wild banana. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 85, n. 1, p. 345-356, 2003.

PLOETZ, R. C. Mango diseases caused by fungi: anthracnose. IN: PLOETZ, R. C., ZENTMEYER, G. A., NISHIJIMA, N. T., ROHRBASCH, K. G.; OHR, H.D. **Compendium of tropical fruit diseases**. St. Paul: APS Press, 1994. p. 13.

PRIHASTUTI, H.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in Chiang Mai, Thailand. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, n. 1, p. 89-109, 2009.

- PURSEGLOVE, J.W. Mangoes west of India. **Acta Horticulturae**, Korbeek-Lo, v. 24, p. 107–174; 1972.
- SANTOS-SEREJO, J. A. dos. Classificação e descrição botânica. In: PEREIRA, M. E. C.; FONSECA, N.; SOUZA, F. V. D. (Eds.). **Manga: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. cap.1, p. 15-17.
- SERRA, I. M. R. S.; SILVA, G. S. Caracterização morfofisiológica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* agentes de antracnose em frutíferas no Maranhão. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, p. 475-480, 2004.
- SILVA, C., FONSECA, E., MOREIRA, M. **Acultura da mangueira**. Documento. Univerversiade Federal de Lavras, 2002. Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/upload/boletim/extensao-tmp/boletim-extensao-024.pdf>. Acessado: 2013.
- SUTTON, B. C. **The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p. [p. 523-537].
- 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.
- TODE, H. J. **Fungi Mecklenburgenses selecti: nova fungorum genera complectens**. Lüneburg: Lemke, 1790. v. 1. 57 p. [p. 31].
- TOZZE JUNIOR, H. J.; MELLO, M. B. A.; MASSOLA JUNIOR, N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 71-79, 2006.
- YANG, Y. L.; CAI, L.; YU, Z.; LIU, Z.; HYDE, K. D. *Colletotrichum* species on Orchidaceae in southwest China. **Cryptogamie**, Paris, v. 32, n. 3, p. 229-253, 2012.
- WALLER, J. M. *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: Centre for Agriculture and Biosciences International, 1992. p. 167-185.

Capitulo II

**Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern
Brazil**

Fungal Diversity

Chiang Mai, Thailand

Qualis CAPES: A1

Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil

Nelson B. Lima¹, Marcus Vinicius de A. Batista², Marcos A. Morais Junior², Maria A.G. Barbosa³, Sami J. Michereff¹, Kevin D. Hyde⁴ and Marcos P.S. Câmara¹

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

²Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, 50732-970 Recife, Brazil

³Embrapa Semiárido, 56302-970 Petrolina, Brazil

⁴ School of Science, Mae Fah Luang University, Chiang Rai 57100, Thailand

Corresponding author: Marcos P. S. Câmara - e-mail: mcamara@depa.ufrpe.br

Telephone number: +55 8133206205

Fax number: +55 8133206200

Abstract

Colletotrichum species are the most important and widespread form of decay affecting mango fruit worldwide. In this study, *Colletotrichum* species associated with fruit anthracnose isolated from mango in northeastern Brazil were subject to molecular and morphological analyses. The partial sequence of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) gene of 143 *Colletotrichum* isolates was amplified, as an initial measure of genetic diversity. A subset of 47 isolates, selected to represent the range of genetic diversity and geographic origin, were further sequenced using the partial actin (ACT), β -tubulin (TUB2), calmodulin (CAL), glutamine synthetase (GS) genes and rDNA-ITS (ITS) region. The multilocus sequence analysis, together with a critical examination of the phenotypic characters, revealed four previously described species (*Colletotrichum asianum*, *Colletotrichum fructicola*, *Colletotrichum tropicale* and *Colletotrichum karstii*) and one new species. The new species is introduced as *Colletotrichum dianesii* and formally described, illustrated and compared with similar taxa. Only *C. asianum* and *C. karstii* have previously been reported from mango, while the other species represent the first report associated with the mango fruits worldwide. All species are reported for the first time associated with mango fruits in Brazil.

Keywords: anthracnose, multilocus phylogeny, morphology, new species, plant disease

Introduction

Mango (*Mangifera indica* L.) is an important fruit crop in Brazil and other tropical and subtropical countries of the world (Evans and Mendoza 2009). In Brazil, the main areas of cultivation are in the northeastern region and in these areas mango are mainly produced for export. In 2010, Brazil exported 124,694 tons of mangoes worth approximately US\$ 119,929 million (Anuário Brasileiro de Fruticultura 2012). Mango is affected by a number of diseases at all stages of its development, from seedlings in the nursery, to the fruits in storage or transit (Ploetz 2003; Prakash 2004). Anthracnose, caused by species of *Colletotrichum*, is the most important disease of mango in Brazil; the disease limits productivity and reduces fruit quality, thus directly affecting fruit export (Santos Filho and Matos 2003). In India, losses due to anthracnose have been estimated to be 2-39 % (Prakash 2004).

The genus *Colletotrichum* includes a number of plant pathogens of major importance, causing diseases of a wide variety of woody and herbaceous plants (Hyde et al. 2009; Wikee

et al. 2011; Cannon et al. 2012). Identification of *Colletotrichum* species was previously based on morphology and to a lesser extent host association (Hyde et al. 2009). A polyphasic approach, using combined sequence analysis of at least six gene loci, coupled with morphological data is, however, now recommended for accurate species identification in the genus (Cai et al. 2009, 2011). Ko et al. (2011) noted the need to resurvey plant pathogens such as *Colletotrichum* with molecular based studies, as previous data based on morphology was likely to be incorrect. The genus was recently voted the worlds eighth most important group of plant pathogenic fungi, based on perceived scientific and economic importance (Dean et al. 2012) and thus requires modern study.

Anthrachnose caused by *C. gloeosporioides* is the most important and widespread form of decay affecting mango fruit worldwide (Jeffries et al. 1990; Prusky and Keen 1993; Freeman et al. 1998; Ploetz 2003). However, following epitypification of *C. gloeosporioides* (Cannon et al. 2008), Phoulivong et al. (2010) were able to show that *C. gloeosporioides* was actually not a common pathogen on fruits in the tropics and it was not the cause of mango anthracnose in Laos and Thailand.

In Brazil, anthracnose of mango is attributed exclusively to *C. gloeosporioides* (Santos Filho and Matos 2003; Ribeiro 2005) and there are no studies on the molecular characterization of *Colletotrichum* species associated with mango. Therefore, the objective of this study was to characterize species of *Colletotrichum* from a large number of isolates associated with mango anthracnose in the northeastern Brazil based on DNA sequence data, morphology, and pathogenicity and virulence tests.

Material and methods

Sampling and fungal isolation

During 2010 and 2011, mango fruits showing anthracnose symptoms were collected in 10 orchards (70 samples per orchard) located in São Francisco Valley, Assú Valley and Zona da Mata Pernambucana, northeastern Brazil. The orchards from Zona da Mata Pernambucana did not receive any fungicide applications, and the other two orchards received at least one spray with methyl benzimidazole carbamates (MBC), demethylation inhibitor (DMI) or other fungicides. Samples were recovered from the cultivar Tommy Atkins. Fruit tissues 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 onto potato dextrose agar (PDA) (Acumedia, Lansing, USA) amended with 0.5 g l^{-1} streptomycin sulfate (PDAS). Plates were incubated at $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ with a 12-h photoperiod provided by fluorescent light for 5 to 7 days. The growing edges of any fungal hyphae developing from the tissues were then transferred aseptically to PDA. When direct examination showed that the fungus was sporulating on the mango fruits, spore masses were picked off with a sterilized wire loop and streaked on the surface of water agar. After incubation overnight ($25 \text{ }^{\circ}\text{C}$), single germinated spores were picked up with a sterilized needle and transferred to PDA (Abang 2003; Chomnunti et al. 2011). The fungi were identified following sporulation. One-hundred and forty-three 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 at $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and stock cultures were stored in PDA slants at $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ in the dark.

DNA extraction

Isolates were grown on PDA for 7 days at $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ with a 12h photoperiod. Using a sterile $10 \text{ }\mu\text{l}$ pipette tip, a small amount of aerial mycelium was scraped from the colony surface and genomic DNA was extracted using the AxyPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Scientific Inc., Union City, USA) following the manufacturer's instructions. DNA concentrations were estimated visually in agarose gel by comparing band intensity with a DNA ladder 1 kb (Axygen).

PCR amplification and DNA sequencing

All strains in this study were amplified with the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) gene, as an initial measure of genetic diversity. A subset of 47 isolates, selected to represent the range of genetic diversity and geographic origin (Table 1), were further sequenced for partial actin (ACT), β -tubulin (TUB2), calmodulin (CAL), glutamine synthetase (GS) genes and rDNA-ITS (ITS) region were amplified by polymerase chain reaction (PCR) reaction.

The PCR amplification for GPDH, CAL and GS were carried out using the primers-pair GDF1 and GDR1 (Peres et al. 2008), CL1 and CL2 (Prihastuti et al. 2009), and GSF1 and GSR1 (Guerber et al. 2003), respectively. The partial ACT, TUB2 and ITS region were

amplified with primers-pair ACT512F and ACT783R (Prihastuti et al. 2009), Bt2a and Bt2b (Glass and Donaldson 1995), and ITS 1 and ITS 4 (White et al. 1990), respectively (Table 2).

Each 50- μ l polymerase chain reaction (PCR) mixture included 21 μ l of PCR-grade water, 1 μ l of DNA template, 1.5 μ M of each primer, and 1 μ l of PCR Master Mix (2X) (0.05 μ l μ l⁻¹ de *Taq* DNA polimerase, reaction buffer, 4 mM MgCl₂, 0.4 mM of each dNTP; Thermo Scientific, Waltham, USA). PCR reactions were carried out in a thermal cycler (Biocycler MJ 96; Applied Biosystems, Foster City, USA). The cycling parameters for GPDH and GS 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 CAL were initiated at 94 °C for 2 min followed by 35 cycles at 94 °C for 1 min, 54°C for 30 s, 72 °C for 30 s and a final step at 72 °C for 10 min. The cycling parameters for partial ACT, TUB2 and ITS region consisted of a 2 min denaturing step at 94°C followed by 34 cycles at 94 °C for 1 min, 55 °C for 30 sec, 72 °C for 1 min and a final cycle of 10 min at 72 °C.

The PCR amplification products were separated by electrophoresis in 1.5 % agarose gels in 1.0 \times Tris-acetate acid EDTA (TAE) buffer and were photographed under UV light after staining with ethidium bromide (0.5 μ g ml⁻¹) for 1 min. PCR products were purified using the AxyPrep™ PCR Cleanup Kit (Axygen) following the manufacturer's instructions. DNA sequencing for GPDH, ACT, CAL, GS, TUB2, CAL genes and ITS region were performed using a ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) at the Sequencing Platform LABCEN/CCB in the Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brazil).

Phylogenetic analysis

The quality of the nucleotide sequences and the contig assembly were carried out using the Staden Package (Staden et al. 1998). Multiple sequence alignments of each gene used Clustal W as implemented in MEGA v. 5 (Tamura et al. 2011), and manually adjusted to allow maximum sequence similarity.

Bayesian inference (BI) was used to reconstruct the phylogenetic trees using MrBayes v. 3.2.1 (Ronquist et al. 2012). Bayesian inference has significant advantages over other methods of analysis such as maximum likelihood and maximum parsimony (Archibald et al. 2003) and provides measures of clade support as posterior probabilities rather than random resampling bootstraps (Weir et al. 2012). jModelTest v. 0.1.1 (Posada 2008) was used to carry

out the statistical selection of best-fit models of nucleotide substitution using the Bayesian Information Criterion (BIC) (Table 3). The nucleotide multiple sequence alignments of all genes were concatenated and the analysis on the full data set were run twice for 5×10^7 generations. Samples were taken from the posterior every 1000 generations. Convergence of all parameters was checked using the Tracer program (Rambaut and Drummond 2007). Therefore, the first 25 % of generations were discarded as burn-in.

Sequences of *Colletotrichum* species obtained from GenBank were included in the analyses (Table 1). Seventy one isolates were used in the initial BI (A) analysis using a concatenated alignment for six genes: ACT, CAL, GS, GPDH, TUB2 and ITS. *Colletotrichum theobromicola* was used as outgroup in this analysis. A second analysis of BI (B) was carried out to confirm the identity of two isolates of *Colletotrichum karstii*. The second analysis was based on a concatenated alignment of four genes: ACT, GPDH, ITS and TUB2. *Colletotrichum gloeosporioides* was used as outgroup in this analysis.

Sequences derived in this study are deposited in GenBank. Representative isolates of different *Colletotrichum* species obtained in this study were deposited in the Culture Collection of Phytopathogenic Fungi “Prof. Maria Menezes” (CMM) at the Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife, Brazil).

Morphological studies of *Colletotrichum* species

Based on the fungal species that were identified on phylogenetic analyses, 47 *Colletotrichum* isolates [*C. asianum* (13), *C. fructicola* (2), *C. tropicale* (6), *C. karstii* (2) and *Colletotrichum* sp. (24)] 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 28 °C with a continuous fluorescent light (24h). The colony colour and diameter from isolates 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 7 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). For the new *Colletotrichum* species, appressoria were

produced using a slide culture technique, in which 10 mm² squares of PDA were placed in an empty Petri dish. The edge of the agar was inoculated with spores taken from a sporulating culture and a sterile cover slip was placed over the inoculated agar (Johnston and Jones 1997). The length and width of 50 appressoria per isolate were measured with the Motic Image Plus v. 2.0. Mean and standard errors of the conidial and appressoria measurements were calculated.

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 morphological characterization were selected for pathogenicity and virulence tests on detached fruits of mango (cv. Tommy Atkins) under controlled conditions. The fungal inoculum was produced in Petri dishes containing PDA, which were incubated for 7 days at 28 °C under 12-h photoperiod. Spore suspensions were prepared adding 20 mL of sterile distilled water to the surface of the cultures, brushing with a soft bristle brush, and filtering through a double layer of cheesecloth. Spore concentration was determined using a hemacytometer and adjusted to 10⁶ conidia ml⁻¹ with sterile water. Mango fruits at stage three of maturation (Assis 2004), without disease symptoms and which were not treated with fungicides, were washed in running water, surface disinfested in 70 % ethanol for 1 min and 1 % NaClO for 3 min, then rinsed in sterile distilled water. Since non-wounded treatment caused no lesions of *Colletotrichum* (non published data), after drying each fruit was wounded at the medium region by pushing the tip of four sterile pins through the surface of the skin to a depth of 3 mm. Six microliters of conidial suspension were dispensed at wound site on the fruits. Negative controls were fruits treated with sterile distilled water. Inoculated fruits were placed in large plastic containers. Before, the bottom of each container was lined with four paper layers wetted in distilled water to increase humidity. Each fruit was put on a sterilized Petri dish to avoid direct contact with water. The plastic containers were partially sealed with plastic bags to maintain relatively high humidity and incubated at 25 °C in the dark. The plastic bags and paper towels were removed after 24 h, and fruits were kept at the same temperature. Fruits were monitored for the onset of symptoms for 10 days. Isolates were considered pathogenic when the lesion area advanced beyond the 4-mm diameter initial

injury. The virulence of the isolates was evaluated by measurement of the lesion length at 10 days after inoculation in two perpendicular directions on each fruit. The experiment was arranged in a completely randomized design with six replicates per treatment (isolate) and four fruits per replicate. The experiment was conducted twice. Difference in virulence caused by *Colletotrichum* species was determined by 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 GPDH gene of the 143 isolates revealed a total of nine haplotypes (H1–H9). Initial analysis of these haplotypes reveal that eight (H1–H8) belong to the *C. gloeosporioides* species complex, all of them within the “musa clade” *sensu* (Weir et al. 2012). The haplotype 9 (H9) GPDH sequence had a high degree of similarity (99 %) with sequences of type species of *C. karstii* deposited in the GenBank. Forty seven isolates representing all haplotypes were further used for multilocus analysis. Sequences of the ACT gene of the *Colletotrichum* species ranged from 249 to 297 bp. TUB2 gene ranged from 404 to 467 bp. Sequences of the CAL gene ranged from 628 to 707 bp. The sequences of the GPDH gene ranged from 203 to 279 bp. The GS gene ranged from 854 to 1015 bp. The sequences of the ITS region ranged from 484 to 598 bp.

Bayesian inference with the haplotypes that belong to the *C. gloeosporioides* complex that was performed with the combined datasets of partial ACT, TUB2, CAL, GS, GPDH and the ITS region comprised 3220 characters after alignment. The gene boundaries in the alignment were: ACT: 1–293, BT2b: 294–734, CAL: 735–1424, GAPDH: 1425–1729, GS: 1730–2647, ITS: 2648–3218. Sequences of *Colletotrichum* type species from the GenBank were included in the analysis (Table 1). The combined dataset resulted in four well supported clades. Three clades corresponded to species previously described: *C. asianum* (13), *C. fructicola* (2) and *C. tropicale* (6). The fourth clade containing the majority of isolates (24) did not cluster with any known species, which indicate that these isolates belong to new species (Fig. 1). The BI analysis of the two isolates from haplotype 9 using the combined datasets of ACT, GPDH, ITS and TUB2 cluster these isolates with the type species of *C. karstii* with high BI support (Fig. 2).

The diversity analyses from 143 isolates of *Colletotrichum* spp. show the following haplotype distribution within the species identified in phylogenetic analyses: *Colletotrichum* sp. 74 isolates belong to haplotypes H1 (46), H2 (19) and H4(9); *C. fructicola*: 2 isolates, all in H5; *C. asianum* 58 isolates, H3 (35) and H7 (23); *C. tropicale* 7 isolates, H8 (6) and H6 (1); *Colletotrichum karstii* 2 isolates, all in H9.

Morphological and cultural characterization

The *Colletotrichum* isolates grouped into seven distinct morphological types (morphotypes 1 to 7), based on colony characteristics (Fig. 3). Twelve percent of all isolates belonged to morphotype 1, which comprised white mycelia lacking conidial masses. Morphotype 2 (29 %) comprised isolates which had pale greenish grey (33''''f), in reverse buff (19''f) colonies. Eleven percent of all isolates belonged to morphotype 3 with rosy vinaceous colonies (5''d), in reverse rosy buff (13''f). Isolates belonging to morphotype 4 (6 %) had cinnamon (15''b), in reverse cinnamon (15''i) colonies. Isolates belonging to morphotype 5 (8.3 %) had sky grey colonies (45''''d), which in reverse were sky grey (53''''d). The morphotype 6 (4.1 %) had pale mouse grey (15''''''d) colonies which were pale mouse grey (15''''''b) in reverse. Isolates belonging to morphotype 7 (4.1 %) which had orange (13b) colonies which were saffron (13d) in reverse. Isolates identified as *C. asianum* are represented in the morphotypes 1, 2, 3, 4, 5 and 6. The *C. fructicola* isolates were all included in morphotype 1. *C. tropicale* includes the morphotypes 1, 2 and 3. Isolates of *Colletotrichum* sp. comprised morphotypes 1, 2, 3, 4 and 5. The isolates of *C. karstii* belonged to morphotype 7. The species of *Colletotrichum* found in this study show differences in conidial size and growth rates. The previously described species show conidial dimensions and growth rate compatible with what is described in the literature (Table 4).

Taxonomy

Colletotrichum dianasii N. B. Lima, M. P. S. Câmara & S. J. Michereff **sp. nov.** (Figs 4a-f)
MycoBank: MB803223.

Etymology: named in honor of professor José Carmine Dianese, University of Brasília (Brazil), for his contribution to Brazilian mycology.

Description: colonies on PDA at first white and becoming pale brownish to pinkish, reverse pale yellowish to pinkish, max. of 47.8 mm diam. in 5 days at 28°C, growth rate 7.60–9.55 mm day⁻¹ (\bar{x} = 8.60 ± 0.95, n = 6) (Figs 5a,b). Aerial mycelium greyish white, dense, cottony, absent conidial masses. *Sclerotia* absent. *Acervuli* brown to dark brown present in culture. Setae present but rare (Figs 5c,d). *Conidia* 10.6–14.3 × 3.9–5.2 μm (\bar{x} = 12.06 ± 0.93 × 4.51 ± 0.40, n = 50), common in mycelium, one-celled, smooth-walled, hyaline, cylindrical with obtuse to slightly rounded ends, sometimes oblong (Fig. 5f). *Appressoria* 5.8–9.7 × 4.2–6.9 μm (\bar{x} = 7.71 ± 0.87 × 5.5 ± 0.5, n = 50) in slide cultures, brown, ovoid, sometimes clavate (Fig. 5e).

Teleomorph: not produced in culture.

Holotype: BRAZIL- Pernambuco, Petrolina, Farm Mapel (40° 34' 23", 9° 18' 40"), on *Mangifera indica* fruits, 11 Apr 2010, Coll. N. Lima (holotype living culture CMM 4083; isotype in MFLU XXXXX);

Known distribution: Pernambuco, Brazil.

Additional specimens examined: Additional specimens examined: Brazil, Pernambuco, Petrolina, Farm Mapel (40°34' 23", 9°18'40"), on *Mangifera indica* fruit, 11 May 2010, coll. N. B. Lima (paratype living culture CMM4081, ex-paratype living culture MFLU XXXXX). Brazil, Pernambuco, Petrolina, Farm Mapel (40°34' 23", 9°18'40"), on *Mangifera indica* fruit, 11 May 2010, coll. N. B. Lima (paratype living culture CMM4082, ex-paratype living culture MFLU XXXXX). Brazil, Rio Grande do Norte, Ipanguaçu, Farm São João (36°53'03'', 5°31'29"), on *Mangifera indica* fruit, 9 Jun 2010, coll. N. B. Lima (paratype living culture CMM4097, ex-paratype living culture MFLU XXXXX). Brazil, Rio Grande do Norte, Ipanguaçu, Farm São João (36°53'03'', 5°31'29"), on *Mangifera indica* fruit, 9 Jun 2010, coll. N. B. Lima (paratype living culture CMM4096, ex-paratype living culture MFLU XXXXX). Brazil, Pernambuco, Petrolina, Farm copa fruit (40°34'00", 9°23'08"), on *Mangifera indica* fruit, 23 May 2010, coll. N. B. Lima (paratype living culture CMM4089, ex-paratype living culture MFLU XXXXX). Brazil, Pernambuco, Petrolina, Farm copa fruit (40°34'00", 9°23'08"), on *Mangifera indica* fruit, 23 May 2010, coll. N. B. Lima (paratype living culture CMM4088, ex-paratype living culture MFLU XXXXX).

Pathogenicity and virulence in fruits

All isolates of *Colletotrichum* were pathogenic to mango fruits. Ripe fruits affected by anthracnose develop sunken, prominent, dark brown to black decay. There were significant ($P \leq 0.05$) differences in virulence among the species, wherein *C. asianum* and *C. tropicale* were most virulent, developing the largest lesions (19.86 mm and 15.25 mm, respectively). The less virulent species were *C. diancesii* and *C. karstii*, with lesions varying from 12.76 to 11.68 mm. *Colletotrichum fructicola* presented an intermediate behavior, with lesion of 13.70 mm.

Discussion

This study represents the first attempt to characterize *Colletotrichum* species associated with anthracnose of mango fruits in Brazil using a phylogenetic approach. Although *C. gloeosporioides* has previously been shown to be the causal agent of tropical fruit rots, the most striking discovery of this study is that none of the 47 strains isolated from mango fruits with anthracnose symptoms belong to the species *C. gloeosporioides*. Phoulivong et al. (2010) were able to show that *C. gloeosporioides* was actually not a common pathogen in the tropics and it was not the cause of anthracnose in mango in Laos and Thailand.

Phylogenetic analysis, showed that most of the strains included in this study belong to the “gloeosporioides complex”. Five species of *Colletotrichum* were found associated with anthracnose of mango fruits, *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. diancesii* e *C. karstii*. *C. asianum* and *C. karstii* have been previously recorded from mango (Damm et al. 2012; Weir et al. 2012).

Colletotrichum diancesii was the most frequently isolated species with 51.1% of all the isolates, indicating that it is the most frequent *Colletotrichum* species associated to mango in northeastern of Brazil. Phylogenetic analysis of the *C. diancesii* clade reveals high support in the Bayesian method and shows it to be closely related to *C. siamense* (Fig. 1). These two species are similar in conidial shape but differ in conidial size, *C. diancesii* having longer conidia with a mean length of 12.06 μm , when compared with *C. siamense* (10.18 μm). *Colletotrichum diancesii* also differs from *C. siamense* in growth rate, with 8.60 mm day^{-1} and 9.30 mm day^{-1} , respectively.

Colletotrichum asianum was the second most prevalent species with 27.7 % of all isolates. This species was described by Prihastuti et al. (2009) in *Coffea arabica* from Thailand. This study represents the first report this species associated with the mango fruits in

Brazil. However, it is already known from *Mangifera indica* in Australia, Colombia, Japan, Panama and the Philippines (Weir et al. 2012).

Colletotrichum tropicale was described by Rojas et al. (2010) from *Theobroma cacao* in Panamá. This study represents the first report this species associated with the mango fruits worldwide. Rojas et al. (2010) noted that *C. tropicale* has been isolated from a wide range of hosts in forests in tropical America, from rotting fruit as well as leaf endophytes.

Colletotrichum fructicola was originally reported causing coffee berries in Thailand (Prihastuti et al. 2009). This species was also found as a leaf endophyte in several plants in Central America (originally described as *C. ignotum*, Rojas et al. (2010). *C. fructicola* isolates found so far are biologically and geographically diverse. The species is presently known from *C. arabica* (Thailand), *Pyrus pyrifolia* (Japan), *Limonium* (Israel), *Malus domestica* and *Fragaria* × *ananassa* (USA), *Persea americana* (Australia), *Ficus* (Germany), *Malus domestica* (Brazil), *Dioscorea* (Nigeria), and *Theobroma* and *Tetragastris* (Panama) (Weir et al. 2012), and *Vitis* (China) (Peng et al. 2013). This is the first report of this species causing anthracnose in mango worldwide.

Colletotrichum karstii was recently reported from mango from Australia (Damm et al. 2012). It occurs on many host plants and is the most common and geographically diverse species in the *C. boninense* complex. This species was reported in China from *Vanda* sp. leaf and on several other orchids (Yang et al. 2011) and from Citrus leaves (Peng et al. 2012), as well as in infections from *Phalaenopsis* orchid petals in United States (Jadrane et al. 2012). Some isolates from *Passiflora edulis* in Brazil that were identified initially as *C. boninense* (Tozze et al. 2010), after were identified as *C. karstii* by GAPDH sequences (Damm et al. 2012).

The *Colletotrichum* isolates from mango analyzed in this study showed high variability based on GPDH gene and the morphological characteristics. Five species were identified, with the majority of the species had more than one haplotype and a high number of morphotypes. The greater the genetic diversity of a population, greater evolutionary potential and hence the more likely it to adapt to changing environmental conditions (McDonald and Linde 2002). That is, the greater the diversity, the greater the chance there is an individual that is adapted to certain restrictive condition covering the population. Accordingly, such information is relevant because it can assist in the implementation of disease control measures more effectively.

Acknowledgments We are grateful to Sequencing Platform LABCEN/CCB in the Universidade Federal de Pernambuco for use its facilities. This work was financed by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). MPS Câmara, SJ Michereff and MA Morais Junior also acknowledge the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) research fellowship. KD Hyde thanks to NRCT of Thailand - Colletotrichum 54201020003 for support. This work was also supported by a grant from the National Plan of Science and Technology, King Abdulaziz City of Science and Technology, Riyadh

References

- Abang MM (2003) Genetic diversity of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causing anthracnose disease of yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria. J. Cramer, Berlin
- Anuário Brasileiro da Fruticultura (2012). Editora Gazeta, Santa Cruz do Sul
- Archibald JK, Mort ME, Crawford DJ (2003) Bayesian inference of phylogeny: a non-technical primer. *Taxon* 52:187–191
- Assis JS (2004) Cultivo da mangueira: colheita e pós-colheita. Embrapa Semi-Árido, Petrolina. <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/Cultivo daMangueira/colheita.htm>. Accessed 23 November 2012
- 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
- Cai L, Udayanga D, Manamgoda DS, Maharachchikumbura SSN, McKenzie EHC, Guo LD, Liu XZ, Bahkali AH, Hyde KD (2011). The need to carry out re-inventory of plant pathogenic fungi. *Tropical Plant Pathol* 36:205–213
- Cannon PF, Buddie AG, Bridge PD (2008) The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycotaxon* 104:189–204
- Cannon PF, Damm U, Johnston PR, Weir BS (2012) *Colletotrichum* – current status and future directions. *Stud Mycol* 73:181–213
- Chomnunti P, Schoch CL, Aguirre-Hudson B, Ko Ko TW, Hongsanan S, Jones EBG, Kodsueb R, Phookamsak R, Chukeatirote E, Bahkali AH, Hyde KD (2011) Capnodiaceae. *Fungal Divers* 51:103–134

- Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC, Johnston PRP, Weir BS, Tan Y, Shivas RG, Crous PW (2012), 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
- Evans EA, Mendoza OJ (2009) World mango trade and the economics of mango production. In: Liz RE (ed) CABI International, Wallingford. pp 606–627
- Freeman S, Katan T, Shabi E (1998) Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Dis* 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
- Guerber JC, Liu B, Correll JC, Johnston PR (2003) Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia* 95:872–895
- 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
- Jadrane I, Kornievsky M, Desjardin DE, He ZH, Cai L, Hyde K (2012) First Report of flower anthracnose caused by *Colletotrichum karstii* in white *Phalaenopsis* orchids in the United States. *Plant Dis* 96:1227
- Jeffries P, Dodd JC, Jeger MJ, Plumbley RA (1990) The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit. *Plant Pathol* 39:353–366
- Johnston PR, Jones D (1997) Relationship among *Colletotrichum* isolates from fruit rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia* 89:420–430
- Ko TWK, Stephenson SL, Bahkali AH, Hyde KD (2011) From morphology to molecular biology: can we use sequence data to identify fungal endophytes? *Fungal Divers* 50:113–120
- McDonald BA, Linde C (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu Rev Phytopathol* 40:349–79
- 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

- Peres NA, MacKenzie SJ, Peever TL, Timmer LW (2008) Postbloom fruit drop of citrus and key lime anthracnose are caused by distinct phylogenetic lineages of *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* 98:345–352
- Phoulivong S, Cai L, Chen H, Mckenzie EHC, Abd-Elsalam K, Chukeatirote E, Hyde KD (2010). *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Divers* 44:33–43.
- Ploetz RC (2003) Diseases of mango. In: Ploetz RC (ed) Diseases of tropical fruit crops. CABI Publishing, Wallingford. pp 327–363
- Posada D (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25: 1253–1256
- Prakash O (2004) Diseases and disorders of mango and their management. In: Naqvi SAMH (ed) Diseases of fruits and vegetables: diagnosis and management. vol. I. Kluwer, Dordrecht, pp 511–619
- 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
- Prusky D, Keen NT (1993) Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay. *Plant Dis* 77:114–119
- Rambaut A, Drummond AJ (2007) Tracer v1.4. Available from: <<http://beast.bio.uk/Tracer>>.
- Rayner RW (1970) A mycological colour chart. Commonwealth Mycological Institute and British Mycological Society, Kew.
- Ribeiro IJA (2005) Doenças da mangueira. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (eds) Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4th edn. Ceres, São Paulo, pp 457–465
- 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. *Mycologia* 102:1318–1338
- Ronquist F, Teslenko M, Van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes v. 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biol* 61:539–542
- Santos Filho HP, Matos AP (2003) Doenças da mangueira. In: Freire FCO, Cardoso JE, Viana FMP (eds) Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp 435–491

- Staden R, Beal KF, Bonfield JK (1998) The Staden package, 1998. In: Misener S, Krawetz SA (eds) Bioinformatics methods and protocols. Humana, New York, pp 115–130
- Sutton BC (1980) The Coelomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739
- Tozze Jr HJ, Fischer IH, Camara MPS, Massola Jr NS (2010) First report of *Colletotrichum boninense* infecting yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) in Brazil. *Australas Plant Dis Notes* 5:70–72
- 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 Press, San Diego, pp 315–322
- Wiikee S, Cai L, Pairin N, Mckenzie EHC, Su YY, Chukeatirote E, Thi HN, Bahkali AH, Moslem MA, Abdelsalam K, Hyde KD (2011) *Colletotrichum* species from Jasmine (*Jasminum sambac*). *Fungal Divers* 46:171–182
- Yang YL, Cai L, Yu ZN, Liu ZY, Hyde KD (2011) *Colletotrichum* species on *Orchidaceae* in southwest China. *Cryptogamie Mycol* 32:229–253

Table 1 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					
				ACT	CAL	GAPDH	ITS	GS	TUB2
<i>Colletotrichum aenigma</i>	ICMP 18608*	<i>Persea americana</i>	Israel	JX009443	JX009683	JX010044	JX010244	JX010078	JX010389
<i>C. aeschynomenes</i>	ICMP 17673*, ATCC 201874	<i>Aeschynomene virginica</i>	USA	JX009483	JX009721	JX009930	JX010176	JX010081	JX010392
<i>C. alatae</i>	CBS 304.67*, ICMP 17919	<i>Dioscorea alata</i>	India	JX009471	JX009738	JX009990	JX010190	JX010065	JX010383
<i>C. alienum</i>	IMI 313842, ICMP 18691	<i>Persea americana</i>	Australia	JX009580	JX009664	JX010018	JX010217	JX010074	JX010385
<i>C. asianum</i>	MFLU 090232 BCC	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	FJ903188	FJ917501	FJ972571	FJ 972605	FJ 972586	FJ 907434
	MFLU 090234 BCC*	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	FJ907421	FJ917503	FJ972573	FJ 972615	FJ 972598	FJ 907436
	CMM4056	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, São Francisco Valley	KC533720	KC517232	KC517165	KC329789	KC430871	KC517277
	CMM 4057	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, São Francisco Valley	KC533747	KC517233	KC517168	KC329792	KC430897	KC517278
	CMM 4058	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Zona da Mata	KC533748	KC517238	KC517173	KC329797	KC430874	KC517282
	CMM4059	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Zona da Mata	KC533750	KC517239	KC517174	KC329798	KC430875	KC517283
	CMM4060	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Zona da Mata	KC533749	KC517241	KC517176	KC329799	KC430876	KC517285
	CMM4061	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Zona da Mata	KC533736	KC517235	KC517170	KC329794	KC430872	KC517280
	CMM4062	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Zona da Mata	KC533721	KC517236	KC517171	KC329795	KC430873	KC517281
	CMM4063	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Zona da Mata	KC533722	KC517240	KC517175	KC329771	KC430902	KC517284
	CMM4064	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Zona da Mata	KC533724	KC517243	KC517178	KC329801	KC430901	KC517287
	CMM4065	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Zona da Mata	KC533723	KC517242	KC517177	KC329800	KC430877	KC517286
	CMM4066	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Zona da Mata	KC533751	KC517234	KC517169	KC329793	KC430909	KC517279
	CMM4067	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Zona da Mata	KC533725	KC517244	KC517179	KC329803	KC430878	KC517288
	CMM4068	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Zona da Mata	KC533752	KC517237	KC517172	KC329796	KC430898	KC517291
<i>C. boninense</i>	CSSN1	<i>Crinum asiaticum</i>	China	GQ856774		GQ856743	GQ485597		GQ849437
	MAFF305972*	<i>C. asiaticum</i> var. <i>sinicum</i>	Japan	HM582001		HM585386	HM585399		HM585421
<i>C. dianesii</i>	CMM4077	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, São Francisco Valley	KC517295	KC517203	KC517156	KC329773	KC430903	KC517248
	CMM4078	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, São Francisco Valley	KC533745	KC517205	KC517158	KC329775	KC430886	KC517250
	CMM4079	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, São Francisco Valley	KC533746	KC517206	KC517159	KC329776	KC430893	KC517251
	CMM4080	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, São Francisco Valley	KC517297	KC517207	KC517160	KC329777	KC430885	KC517252
	CMM4081	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, São Francisco Valley	KC517304	KC517218	KC517166	KC329790	KC430880	KC517263
	CMM4082	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, São Francisco Valley	KC517296	KC517204	KC517157	KC329774	KC430895	KC517249
	CMM4083	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, São Francisco Valley	KC517298	KC517209	KC517194	KC329779	KC430894	KC517254
	CMM4084	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Assú Valley	KC517307	KC517228	KC517201	KC329811	KC430890	KC517273
	CMM4085	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Assú Valley	KC533740	KC517230	KC517196	KC329813	KC430891	KC517275
	CMM4086	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Assú Valley	KC533742	KC517229	KC517195	KC329812	KC430883	KC517274
	CMM4087	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Assú Valley	KC533741	KC517231	KC517197	KC329814	KC430887	KC517276
	CMM4088	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, São Francisco Valley	KC517300	KC517210	KC517162	KC329781	KC430900	KC517255
	CMM4089	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, São Francisco Valley	KC517302	KC517211	KC517163	KC329783	KC430879	KC517256
	CMM4090	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, São Francisco Valley	KC533735	KC517208	KC517161	KC329778	KC430899	KC517253
	CMM4091	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Assú Valley	KC533737	KC517221	KC517180	KC329804	KC430908	KC517266
	CMM4092	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Assú Valley	KC533739	KC517226	KC517192	KC329809	KC430907	KC517271
	CMM4093	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Assú Valley	KC533734	KC517225	KC517164	KC329808	KC430892	KC517270
	CMM4094	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, São Francisco Valley	KC517294	KC517202	KC517155	KC329772	KC430884	KC517247
	CMM4095	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, São Francisco Valley	KC517305	KC517219	KC517167	KC329791	KC430881	KC517264
	CMM4096	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Assú Valley	KC533733	KC517223	KC517190	KC329806	KC430896	KC517268
	CMM4097	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Assú Valley	KC533732	KC517222	KC517189	KC329805	KC430888	KC517267

(continued)

Species	Culture Accession No. ¹	Host	Location	GenBank Accession No. ²					
				ACT	CAL	GAPDH	ITS	GS	TUB2
<i>C. dianesii</i>	CMM4098	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Assú Valley	KC533738	KC517224	KC517191	KC329807	KC430889	KC517269
	CMM4099	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Assú Valley	KC517303	KC517212	KC517200	KC329784	KC430904	KC517257
	CMM4100	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Assú Valley	KC517306	KC517227	KC517193	KC329810	KC430882	KC517272
<i>C. fructicola</i>	MFLU 090228 BCC*	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	FJ907426	FJ917508	FJ972578	FJ 972603	FJ 972593	FJ 907441
	MFLU 090226 BCC	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	FJ907427	FJ917509	FJ972579	FJ972602	FJ972592	FJ907442
	CMM4069	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, São Francisco Valley	KC517299	KC517245	KC517188	KC329780	KC430906	KC517289
	CMM4070	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, São Francisco Valley	KC517301	KC517246	KC517187	KC329782	KC430910	KC517290
	MFLU 090226 BCC	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	FJ907427	FJ917509	FJ972579	FJ 972602	FJ 972592	FJ 907442
<i>C. gloeosporioides</i>	CBS 953.97	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	FJ 907430	FJ 917512	FJ 972582	FJ 972609	FJ 972589	FJ 907445
<i>C. hippeastri</i>	CSSG1/CBS125376	<i>Hippeastrum vittatum</i>	China	GQ856788		GQ856764	GQ485599		GQ849446
	CSSN3/CBS125379	<i>Hippeastrum vittatum</i>	China	GQ856776		GQ856759	GQ485601		GQ849439
<i>C. horii</i>	NBRC 7478*, ICMP 10492	<i>Diospyros kaki</i>	Japan	JX009438	JX009604	GQ329681	GQ329690	JX010137	JX010450
<i>C. karstii</i>	CORCG6(CGMCC3.14194)	<i>Vanda</i> sp.	China	HM581995		HM585391	HM585409		HM585428
	CORCK1	<i>Calanthe argenteo-striata</i>	China	HM581991		HM585387	HM585406		HM585424
	CMM4101	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, São Francisco Valley	KC533743		KC517198	KC295235		KC517292
	CMM4102	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, São Francisco Valley	KC533744		KC517199	KC295236		KC517293
<i>C. musae</i>	CBS 116870*	<i>Musa</i> sp.	USA	JX009486	JX009661	JX009936	JX010189	JX010087	JX010397
<i>C. nupharicola</i>	CBS 470.96*, ICMP 18187	<i>Nuphar lutea</i> subsp. <i>polysepala</i>	USA	JX009437	JX009663	JX009972	JX010187	JX010088	JX010398
<i>C. queenslandicum</i>	ICMP 1778*	<i>Carica papaya</i>	Australia	JX009447	JX009691	JX009934	JX010276	JX010104	JX010414
<i>C. salsolae</i>	ICMP 19051*	<i>Salsola tragus</i>	Hungary	JX009562	JX009696	JX009916	JX010242	JX010093	JX010403
<i>C. siamense</i>	MFLU 090230 BCC*	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	FJ907423	FJ917505	FJ972575	FJ972613	FJ972596	FJ907438
	MFLU 090231 BCC	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	FJ907422	FJ917504	FJ972574	FJ972614	FJ972597	FJ907437
	MFLU 090229 BCC	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	FJ907420	FJ917502	FJ972572	FJ972604	FJ972599	FJ907435
	ICMP 12567	<i>Persea americana</i>	Australia	JX009541	JX009697	JX009940	JX010250	JX010076	JX010387
	DAR 76934, ICMP 18574	<i>Pistacia vera</i>	Australia	JX009535	JX009707	JX010002	JX010270	JX010080	JX010391
	ICMP 18121	<i>Dioscorea rotundata</i>	Nigeria	JX009460	JX009715	JX009942	JX010245	JX010092	JX010402
	ICMP 17795	<i>Malus domestica</i>	USA	JX009506	JX009703	JX010051	JX010162	JX010082	JX010393
	CBS 125378*, ICMP 18642	<i>Hymenocallis americana</i>	China	GQ856775	JX009709	JX010019	JX010278	JX010100	JX010410
	CBS 130420*, ICMP 19118	<i>Jasminum sambac</i>	Vietnam	HM131507	JX009713	HM131497	HM131511	JX010105	JX010415
<i>C. theobromicola</i>	CBS 124945*, ICMP 18649	<i>Theobroma cacao</i>	Panama	JX009444	JX009591	JX010006	JX010294	JX010139	JX010447
<i>C. tropicale</i>	CBS 124949*, ICMP 18653	<i>Theobroma cacao</i>	Panama	JX009489	JX009719	JX010007	JX010264	JX010097	JX010407
	MAFF 239933, ICMP 18672	<i>Litchi chinensis</i>	Japan	JX009480	JX009722	JX010020	JX010275	JX010086	JX010396
	CMM4071	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, São Francisco Valley	KC533726	KC517213	KC517181	KC329785	KC430868	KC517258
	CMM4072	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, São Francisco Valley	KC533727	KC517214	KC517182	KC430866	KC430866	KC517259
	CMM4073	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, São Francisco Valley	KC533730	KC517217	KC517185	KC329788	KC430870	KC517262
	CMM4074	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, São Francisco Valley	KC533728	KC517215	KC517183	KC329786	KC430867	KC517260
	CMM4075	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, Zona da Mata	KC533731	KC517220	KC517186	KC329802	KC430905	KC517265
	CMM4076	<i>Mangifera indica</i>	Brazil, São Francisco Valley	KC533729	KC517216	KC517184	KC329787	KC430869	KC517261
<i>C. truncatum</i>	CBS120709	<i>Capsicum frutescens</i>	India	GQ856783		GQ856753	GQ485593		GQ849429
	CSSX2	<i>Crinum asiaticum</i>	China	GQ856766		GQ856750	GQ485595		GQ849424

¹ATCC American Type Culture Collection, Virginia, USA; CBS Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands; CGMCC China General Microbiological Culture Collection, Beijing, China; CMM Culture Collection of Phytopathogenic Fung "Prof. Maria Menezes", Recife, Brazil; DAR Queensland Plant Pathology Herbarium (Australia), Queensland, Australia; ICMP International Collection of Micro-organisms from Plants, Landcare Research, New Zealand; IMI International Mycological Institute, CAB International, Egham, Surrey, U.K.; MAFF: MAFF Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Tsukuba, Japan; MFLU Mae Fah Luang University Herbarium, Thailand; NBRC Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japan. * ex-type or ex-epitype. ²ACT: actin; TUB-2: partial β -tubulin (tub2); CAL: calmodulin; GS: glutamine synthetase; GAPDH: glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase; ITS: partial rDNA-ITS region.

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

Gene	Product name	Primer	Direction	Sequence (5' - 3')
ACT	Actin	ACT-512F	Forward	ACT ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC
		ACT-783R	Reverse	ACT ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC
CAL	Calmodulin	CL1	Forward	GAR TWC AAG GAG GCC TTC TC
		CL2	Reverse	TTT TTG CAT CAT GAG TTG GAC
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GDF	Forward	GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA
		GDR	Reverse	GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT
GS	Glutamine synthetase	GSF1	Forward	ATG GCC GAG TAC ATC TGG
		GSR1	Reverse	GAA CCG TCG AAG TTC CAG
ITS	Internal transcribed spacer	ITS-1	Forward	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A
		ITS-4	Reverse	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
TUB2	β -Tubulin 2	Bt2a	Forward	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC
		Bt2b	Reverse	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC

Table 3 Nucleotide substitution models used in phylogenetic analyses

Gene	Model - analysis A	Model - Analysis B
ACT	K80+G	K80+G
CAL	TrNef+G	-
GAPDH	HKY+G	K80+G
GS	HKY+G	-
ITS	TIM3ef+I+G	TrNef+G
TUB2	TrNef	K80+G

Table 4 Summary of morphological data of *Colletotrichum* isolates

Species	Conidia			Growth rate (mm day ⁻¹)
	Length (μ m)	Width (μ m)	Shape	
<i>Colletotrichum asianum</i>	13.40 \pm 2.36b (5.60-21.00)	4.31 \pm 0.61b (2.70-5.60)	Cylindrical	5.16 \pm 1.62c (2.60-10.10)
<i>C. diancesii</i>	12.06 \pm 1.54c (10.6-14.30)	4.30 \pm 0.69b (3.90-5.20)	Cylindrical	8.01 \pm 1.71a (4.30-13.38)
<i>C. fructicola</i>	-	-	-	6.56 \pm 0.34b (6.10-7.02)
<i>C. karstii</i>	14.52 \pm 2.87a (10.40-20.20)	4.90 \pm 0.15a (3.80-6.50)	Cylindrical	5.20 \pm 0.86bc (3.65-6.44)
<i>C. tropicale</i>	14.12 \pm 1.17a (9.4-16.6)	4.82 \pm 0.49a (3.6-6.0)	Cylindrical	6.48 \pm 1.04b (4.41-8.24)

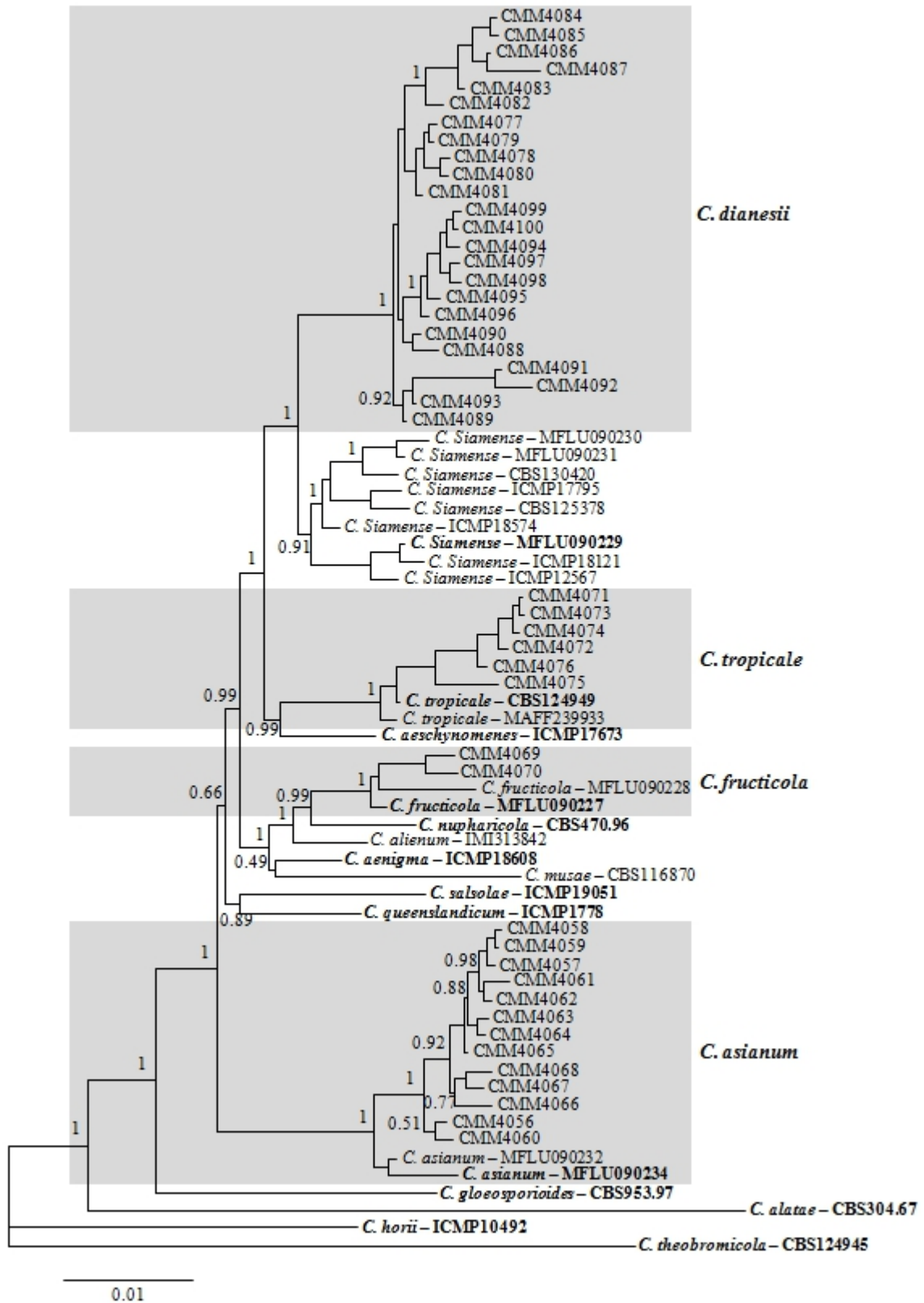


Fig. 1 A Bayesian inference phylogenetic tree from 72 of *Colletotrichum* isolates using the combined partial sequence data of ACT, CAL, GAPDH, GS, ITS and TUB2 genes. The tree shows the phylogenetic relationships of *Colletotrichum* species isolated from *Mangifera indica* and selected *Colletotrichum* species of the “Musae clade” sensu Weir (Weir et al 2012). Bayesian posterior probability values ≥ 0.5 are shown in each node. Ex-type or ex-epitype sequences are emphasised in bold font. Culture accession numbers are listed. *Colletotrichum theobromicola* was used as outgroup. The scale bar indicates the number of expected changes per site

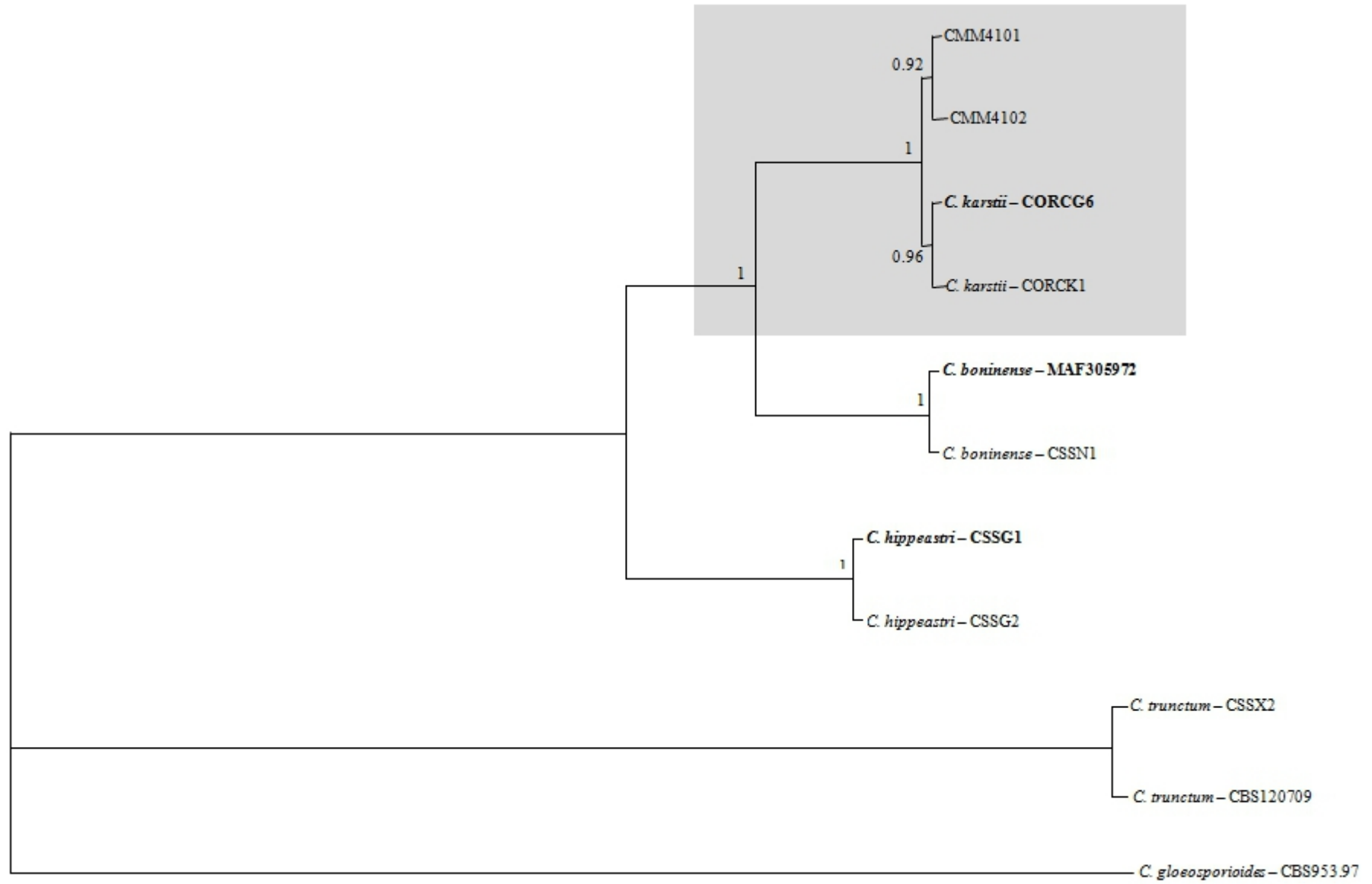


Fig. 2 A Bayesian inference phylogenetic tree of 11 isolates to confirm the identity of two isolates of *Colletotrichum karstii*. The tree was built using concatenated sequences of the partial ACT, GAPDH, ITS and TUB2 genes each with a separate model of DNA evolution. Bayesian posterior probability values ≥ 0.5 are shown in each node. Ex-type or ex-epitype sequences are emphasised in bold font. Culture accession numbers are listed. *Colletotrichum gloeosporioides* was used as outgroup. The scale bar indicates the number of expected changes per site

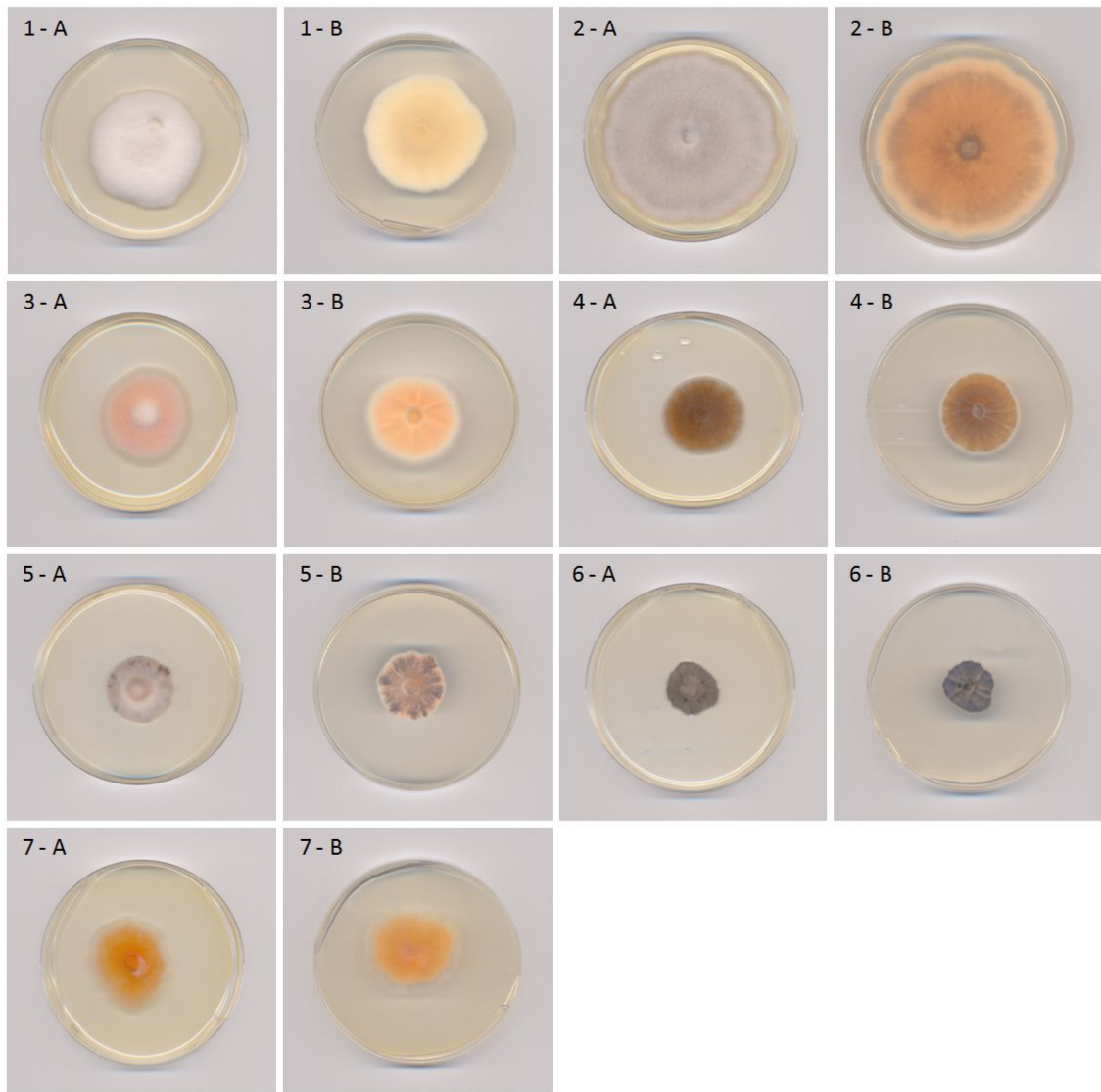


Fig. 3 Morphotypes (1 to 7) of isolates of *Colletotrichum* from mango fruits. Colony characteristics: Plates in A aerial view, reverse view in B

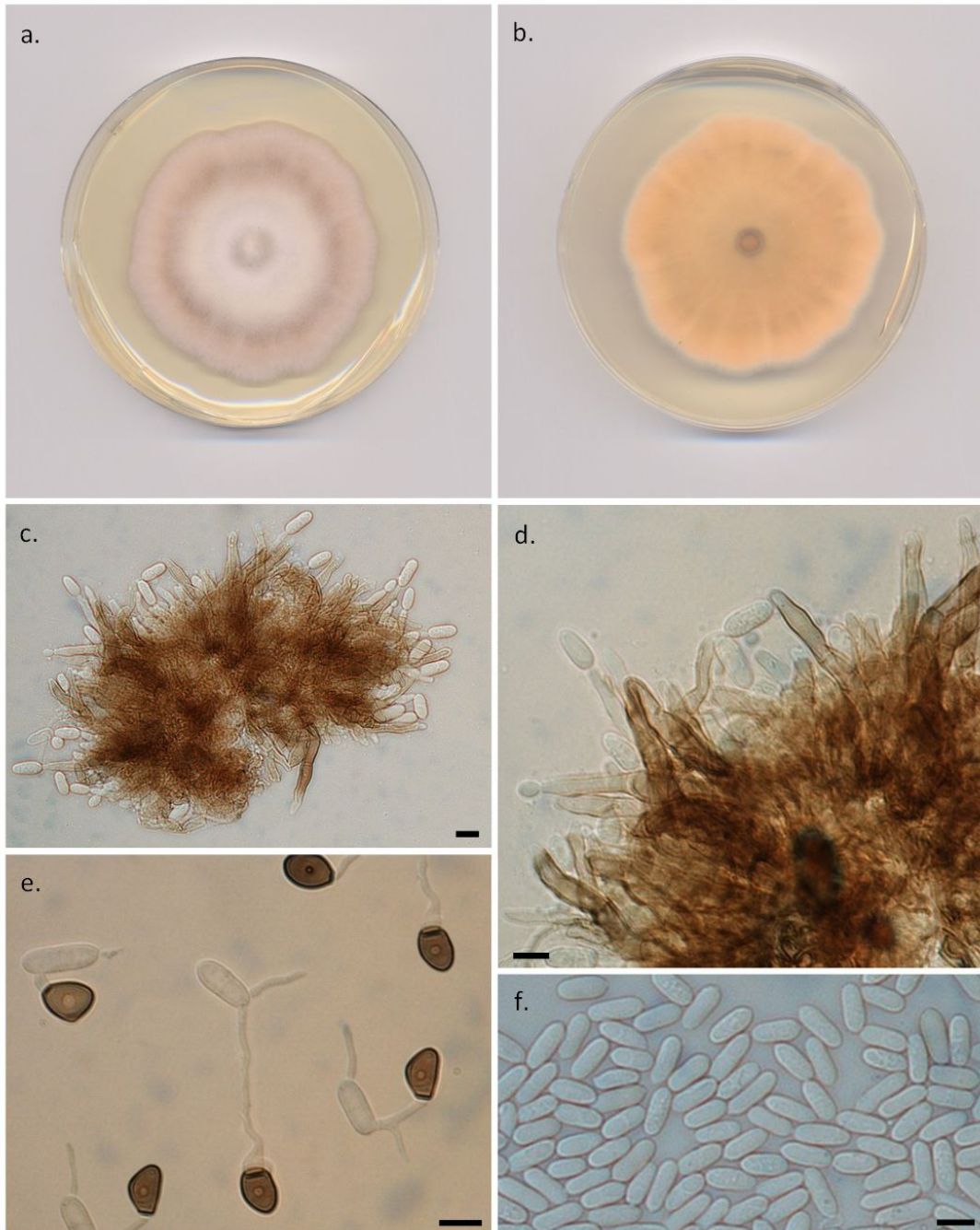


Fig. 4 *Colletotrichum diancesii* (from holotype.). Upper (a) and reverse (b) sides of cultures on PDA 7 days after inoculation; (c) brown to dark brown conidiomata and dark brown setae; (d) Conidiogenous cells; (e) Appressoria; (f) conidia. Bars: 10 μm

Capítulo III

**Epidemiologia comparativa de espécies de *Colletotrichum* obtidas de frutos de
mangueira no Nordeste do Brasil**

European Journal of Plant Pathology

Dordrecht, Holanda

Qualis CAPES: A2

Epidemiologia comparativa de espécies de *Colletotrichum* obtidas de frutos de mangueira no Nordeste do Brasil

Nelson B. Lima¹, Maria A.G. Barbosa², Waléria G. Lima¹, Sami J. Michereff¹, Marcos P.S. Câmara¹

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

²Laboratório de Fitopatologia, Embrapa Semiárido, 56302-970 Petrolina, PE, Brazil

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

Número de telefone: +55 8133206205

Número de Fax: +55 8133206200

Resumo A antracnose, causada por várias espécies de *Colletotrichum*, é a principal doença da mangueira no Nordeste do Brasil, pois limita a produção e reduz drasticamente a qualidade dos frutos, afetando diretamente a exportação. Os objetivos desse trabalho foram avaliar a virulência das cinco espécies de *Colletotrichum* prevalentes nos pomares do Nordeste brasileiro (*C. asianum*, *C. dianesii*, *C. fructicola*, *C. karstii* e *C. tropicale*) em relação a diferentes cultivares de manga e gama de hospedeiros, bem como determinar a influência da temperatura na intensidade da doença induzida pelas espécies e o efeito de fungicidas sobre o crescimento micelial destas. De maneira geral, as cultivares de manga foram suscetíveis a *Colletotrichum* spp., embora *C. karstii* não tenha causado infecção nas cultivares Palmer e Keith. A menor virulência da maioria das espécies de *Colletotrichum* foi observada na cultivar Tommy Atkins. Todas as espécies de *Colletotrichum* foram patogênicas à gama de hospedeiros inoculada (manga, mamão, banana, goiaba e pimentão), o que merece destaque, tendo em vista a existência constante de potencial fonte de inóculo. Para todas as espécies de *Colletotrichum* as temperaturas entre 25 e 30°C proporcionaram maiores lesões, entretanto foi comprovado que as espécies têm exigências térmicas diferentes para expressarem a máxima virulência em frutos. Todas as espécies de *Colletotrichum* tiveram o crescimento micelial reduzido na presença dos fungicidas tiofanato metílico, difenoconazole e azoxistrobina, independente do princípio ativo. A resposta de sensibilidade variou de acordo com o fungicida e a espécie de *Colletotrichum*.

Palavras-chave adicionais: antracnose, *Mangifera indica*, virulência, gama de hospedeiros, fungicidas

Abstract Anthracnose, caused by several species of *Colletotrichum*, is a major disease of mango in northeastern Brazil, because it limits the production and drastically reduces fruit quality, directly affecting exports. The objectives of this study were to evaluate the virulence of five prevalent species of *Colletotrichum* in mango orchards in northeastern Brazil (*C. asianum*, *C. dianesii*, *C. fructicola*, *C. karstii* and *C. tropicale*) for different mango cultivars and host range, as well as determine the influence of temperature on disease intensity induced by the species and the effect of fungicides on mycelial growth. In general, mango cultivars were susceptible to *Colletotrichum* species, although *C. karstii* did not infected the cultivars Keith and Palmer. The highest virulence of *Colletotrichum* species was observed in the cultivar Tommy Atkins. All *Colletotrichum* species were pathogenic to host range (mango, papaya, banana, guava and sweet pepper), which deserves attention in view of the existence of

constant potential inoculum source. For all *Colletotrichum* species temperatures between 25 and 30° C provided the highest lesions, however it was found that the species have different thermal requirements for expressing the maximum virulence in fruits. All *Colletotrichum* species had reduced mycelial growth in the presence of fungicides methyl thiophanate and difenoconazole an azoxystrobin, regardless of the active principle. The sensitivity response varied with the fungicide and *Colletotrichum* species.

Additional Keywords: anthracnose, *Mangifera indica*, virulence, host range, fungicides

Introdução

A mangueira (*Mangifera indica* L.) representa uma das culturas de mais elevado potencial econômico nas áreas tropical e subtropical do mundo (Castro Neto e Reinhardt 2003). No Brasil, a manga é uma fruta de grande destaque comercial, contribuindo com as exportações de frutas frescas (Melo et al. 2009). As principais áreas de cultivo estão localizadas na região Nordeste, onde as frutas são produzidas principalmente para a exportação. Em 2010, o Brasil exportou 124.694 t de mangas, com um valor aproximado de US\$ 119,9 milhões (Anuário Brasileiro de Fruticultura 2012). As doenças são responsáveis por grandes perdas na cadeia produtiva da manga, principalmente aquelas que ocorrem no período pós-colheita. A antracnose, causada por espécies de *Colletotrichum*, é a principal doença da manga no Brasil, pois limita a produtividade e reduz a qualidade das frutas, o que afeta diretamente a exportação destas (Santos Filho e Matos 2003). Na Índia, perdas de 2 a 39 % têm sido estimadas devido à antracnose (Prakash 2004).

A antracnose afeta várias partes da mangueira, incluindo folhas jovens, panículas florais e frutas. Os maiores prejuízos ocorrem nas frutas, pela formação de manchas escuras irregulares na casca, as quais podem coalescer e atingir toda a superfície do fruto. Os frutos são infectados no campo, mas o fungo permanece quiescente até o estabelecimento de condições favoráveis ao seu desenvolvimento (Arauz 2000; Dodd et al. 1997; Ploetz 2003). Diante disso, faz-se necessária a adoção de um manejo preventivo adequado, durante a floração e desenvolvimento dos frutos, bem como na pós-colheita (Arauz 2000; Dodd et al. 2007; Ploetz 2003; Prakash 2004; Santos Filho e Matos 2003; Zambolim e Junqueira 2004).

A antracnose da mangueira é mais severa em temperaturas elevadas e alta umidade, podendo alcançar quase 100% de incidência em frutos produzidos sob condições muito úmidas (Arauz 2000). Sendo assim, tem maior ocorrência nos países tropicais e subtropicais,

aumentando os custos de produção com a necessidade de controle (Dodd et al. 1992). Além disso, o reduzido tempo de vida útil na pós-colheita, sob condições normais de temperatura ambiente, associado ao curto período de colheita, condicionam a oferta e os preços no mercado (Jerônimo et al. 2007). Outro fator importante referente aos prejuízos está relacionado com a cultivar, uma vez que o grau de tolerância em relação à doença é bastante variável (Zambolim e Junqueira 2004). Vale ressaltar, também, que pouco se sabe a respeito dos aspectos epidemiológicos da doença. Estudos referentes ao tema são escassos e pouco contribuem para elucidar os problemas relacionados à incidência e severidade da antracnose (Acosta-Ramos et al. 2003; Huerta-Palacios et al. 2009).

Colletotrichum gloeosporioides era considerada, até recentemente, a espécie de *Colletotrichum* mais importante causando antracnose em manga em nível mundial (Jeffries et al. 1990; Waller et al. 1992; Freeman et al. 1998; Ploetz 2003). Porém, após a epitificação de *C. gloeosporioides* (Cannon et al. 2008), Phoulivong et al. (2010) demonstrou que essa espécie não era um patógeno comum em frutos nos trópicos, inclusive em manga. No Brasil, a antracnose da mangueira era atribuída exclusivamente a *C. gloeosporioides* (Ribeiro 2005; Santos Filho e Matos 2003), mas um estudo filogenético realizado com isolados obtidos de pomares do Nordeste brasileiro revelou que quatro espécies previamente descritas (*C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale* e *C. karstii*) e uma nova espécie (*C. dianesii*) causavam antracnose na principal região produtora (Lima et al. 2013).

Com a introdução de várias novas espécies de *Colletotrichum* nos últimos anos, é importante estabelecer se estas são hospedeiro-específicas ou possuem uma ampla gama de hospedeiros, se existe variabilidade na virulência em função de cultivares e condições ambientais, bem como a sensibilidade diferencial a fungicidas. Esses aspectos podem ter importantes implicações para o manejo das doenças baseado no controle químico, na resistência genética do hospedeiro e na quarentena (Phoulivong 2011).

Os objetivos desse trabalho foram avaliar a virulência das espécies de *Colletotrichum* prevalentes nos pomares do Nordeste brasileiro em relação a diferentes cultivares de manga e gama de hospedeiros, bem como determinar a influência da temperatura na intensidade da doença induzida pelas espécies e o efeito de fungicidas sobre o crescimento micelial destas.

Material e métodos

Isolados fúngicos

Em todos os experimentos foram utilizados 28 isolados de cinco espécies de *Colletotrichum* (*C. asianum*, *C. dianesii*, *C. fructicola*, *C. karstii* e *C. tropicale*), obtidos de frutos de manga coletados em pomares no Nordeste do Brasil (Tabela 1). Os isolados foram identificados por inferência filogenética baseada na sequência completa da região do espaço interno transcrito (ITS) e na sequência parcial dos genes gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GPDH), actina (ACT), β -tubulina (TUB2), calmodulina (CAL) e glutamina sintetase (GS), como descrito previamente (Lima et al. 2013). Os isolados encontram-se depositados na Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos "Prof. Maria Menezes" (CMM) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brasil) e culturas estoque foram mantidas em meio batata dextrose ágar – BDA (Acumedia, Lansing, MI, USA) inclinado a 5°C no escuro.

Virulência de espécies de *Colletotrichum* em cultivares de manga

A virulência das cinco espécies de *Colletotrichum* foi avaliada em frutos de manga das cultivares Palmer, Keith e Tommy Atkins, no estágio 4 de maturação (Assis 2010). Os frutos foram lavados com detergente em água corrente, desinfestados superficialmente em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% por 3 min e novamente lavados com água destilada. Após a secagem, a epiderme de cada fruta foi perfurada em um ponto na região mediana, à profundidade de 3 mm, com auxílio de alfinete esterilizado. Um disco de micélio (5 mm de diâmetro) de cada isolado foi removido da margem de colônia com 7 dias de crescimento em BDA e transferido para cada ponto da epiderme ferida. Para a testemunha, foram utilizados discos de BDA não colonizados pelo fungo. As frutas foram colocados em bandejas plásticas forradas com papéis toalhas umedecidos com água destilada e cobertos com saco plástico, para manter a umidade relativa do ar elevada. As bandejas foram incubadas a 25°C no escuro. Após 48 h, foram removidos os sacos plásticos e os papéis toalhas das bandejas, e os frutos foram mantidos na mesma temperatura. As cultivares foram inoculadas separadamente e para cada cultivar o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento (isolado) e uma fruta por repetição. A virulência dos isolados foi

avaliada aos 10 dias após a inoculação, pela medição do diâmetro da lesão (cm) em duas direções perpendiculares e calculo do diâmetro médio da lesão (DLE).

Virulência de espécies de *Colletotrichum* em gama de hospedeiros

A virulência das cinco espécies de *Colletotrichum* foi avaliada na gama de hospedeiros constituída de manga (cv. Tommy Atkins) no estágio 4 de maturação (Assis 2004), mamão (cv. Golden), banana (cv. Pacovan) e goiaba (cv. Paluma) nos estádios 3, 5 e 5 de maturação (Ministério da Integração Nacional 2000), respectivamente, bem como de pimentão (cv. Atlante) em ponto de colheita. Os frutos foram desinfestados, inoculados e acondicionados em câmara úmida como descrito no ensaio com diferentes cultivares de manga. As bandejas foram incubadas a 25°C no escuro. Os sacos plásticos e os papéis toalhas foram removidos após 48 h, e os frutos foram mantidos à mesma temperatura. Os hospedeiros foram inoculados separadamente e para cada hospedeiro o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento (isolado) e dois fruto por repetição. A virulência dos isolados foi avaliada aos sete dias após a inoculação, como descrito no ensaio com diferentes cultivares de manga.

Influência da temperatura na intensidade da antracnose induzida pelas espécies de *Colletotrichum*

Para avaliação da influência da temperatura na intensidade da antracnose induzida pelas cinco espécies de *Colletotrichum*, manga da cv. Tommy Atkins no estágio 4 de maturação foram lavados, desinfestados, inoculados e acondicionados em câmara úmida como descrito no ensaio com diferentes cultivares de manga. As bandejas contendo as frutas foram armazenadas em câmaras incubadoras com temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30 e 35°C, no escuro. Os sacos plásticos e papéis toalhas foram removidos das bandejas após 48 h e as frutas foram mantidas nas condições iniciais de temperatura. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 28x6, com quatro repetições por combinação isolado x temperatura e uma fruta por repetição. A virulência dos isolados foi avaliada como descrito no ensaio com diferentes cultivares de manga.

Efeito de fungicidas sobre o crescimento micelial das espécies de *Colletotrichum*

A sensibilidade das cinco espécies de *Colletotrichum* a fungicidas foi determinada em meio de cultura suplementado com fungicida e avaliação do crescimento micelial. Um pré-ensaio foi realizado para identificar a dose discriminante de cada fungicida para as cinco espécies de *Colletotrichum*. Foram utilizadas formulações comerciais dos fungicidas tiofanato metílico (Cercobin 700 WP, 700 g kg⁻¹ de ingrediente ativo (i.a.), Iharabras, São Paulo, SP, Brasil), difenoconazole (Score EC, 250 g l⁻¹ i.a., Syngenta, São Paulo, SP, Brasil) e azoxistrobina (Amistar 500 WG, 500 g kg⁻¹ i.a., Syngenta, São Paulo, SP, Brasil). Os fungicidas tiofanato metílico, difenoconazole e azoxistrobina foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionados ao meio BDA fundente (45°C) para alcançar as concentrações de 10 µg de i.a. ml⁻¹, 0,5 µg de i.a. ml⁻¹ e 1µg de i.a ml⁻¹, respectivamente. Em todas as concentrações (incluindo a testemunha), a concentração final de DMSO no meio de cultura foi de 0.1% (v/v). Discos de micélio (5 mm de diâmetro) de cada isolado foram removidos da margem de colônia com 7 dias de crescimento em BDA e transferidos para o centro de placas de Petri contendo BDA suplementado com os fungicidas. Placas de Petri contendo BDA sem fungicida foram utilizadas como testemunha. Foram utilizadas quatro placas (repetições) por combinação isolado x fungicida. Após sete dias de incubação a 25°C no escuro, o crescimento radial (diâmetro) de cada colônia foi mensurado em duas direções perpendiculares e obtido o diâmetro médio da colônia. A porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) foi calculada com a fórmula $ICM = [(C - N)/T] \times 100$, onde C é o diâmetro da colônia da testemunha (sem fungicida) e N é o diâmetro da colônia para o tratamento com o fungicida.

Análise dos dados

Os dados obtidos para as cinco espécies de *Colletotrichum* nos experimentos com diferentes cultivares de manga, gama de hospedeiros e fungicidas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste LSD de Fisher ($P=0,05$). No experimento com diferentes temperaturas, os valores dos diâmetros das lesões versus temperaturas foram ajustados para curvas de regressão usando o modelo polinomial cúbico ($y = a + bx + cx^2 + dx^3$). A temperatura ótima, definida como aquela que propiciou o maior tamanho das lesões, foi estimada usando o modelo de regressão e o sumário numérico com o auxílio do programa TableCurve™ 2D v. 5.01 (SYSTAT Software Inc., Chicago, IL, USA).

Os valores de temperatura ótima para as espécies de *Colletotrichum* foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste LSD de Fisher ($P=0,05$). As análises de variância e as comparações de médias foram realizadas com o programa STATISTIX v. 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA)

Resultados

Virulência de espécies de *Colletotrichum* em cultivares de manga

Houve diferença significativa na virulência entre as espécies de *Colletotrichum* inoculadas nas cultivares Keith ($P=0,025$) e Palmer ($P<0,001$). Nessas cultivares, *C. karstii* não demonstrou patogenicidade, diferindo das demais espécies. No entanto, quando a relação parasitária foi estabelecida e os sintomas se desenvolveram, as espécies patogênicas a essas cultivares não diferiram em virulência (Fig. 1). Os tamanhos das lesões induzidas pelas espécies patogênicas de *Colletotrichum* variaram de 12,3 cm (*C. dianesii*) a 14,9 cm (*C. asianum*) na cultivar Keith e de 12,6 cm (*C. tropicale*) a 16,9 cm (*C. dianesii*) na cultivar Palmer. Na cultivar Tommy Atkins, todas as espécies de *Colletotrichum* evidenciaram patogenicidade, mas não diferiram significativamente ($P<0,001$) na virulência (Fig. 1). Os níveis de doença induzidos pelas espécies de *Colletotrichum* nessa cultivar foram inferiores aos observados nas demais, com exceção do induzido por *C. karstii*. Em Tommy Atkins os tamanhos das lesões variaram de 5,5 cm a 6,5 cm, induzidas por *C. fructicola* e *C. tropicale*, respectivamente (Fig. 1).

Virulência de espécies de *Colletotrichum* em gama de hospedeiros

Todos os isolados das espécies de *Colletotrichum* foram patogênicos à gama de hospedeiros inoculada (Tab. 2). As espécies de *Colletotrichum* apresentaram diferenças significativas na virulência quando inoculadas em goiaba ($P=0,034$) e pimentão ($P=0,047$), mas não diferiram quando inoculadas em manga ($P=0,849$), mamão ($P=0,674$) e banana ($P=0,531$). Em goiaba, as maiores lesões foram induzidas por *C. tropicale*, que diferiu significativamente de *C. dianesii* e *C. fructicola*. Esta última espécie apresentou menor virulência em goiaba quando comparada às demais. Em pimentão, *C. karstii* induziu as maiores lesões, mas diferiu significativamente apenas de *C. dianesii* (Tabela 2).

Influência da temperatura na intensidade da antracnose induzida pelas espécies de *Colletotrichum*

Todas as temperaturas acima de 10°C proporcionaram desenvolvimento de lesões em frutos de manga (cv. Tommy Atkins) inoculados com as espécies de *Colletotrichum*, verificando-se que temperaturas entre 25 e 30°C proporcionaram maiores lesões, sendo estas reduzidas à medida que a temperatura aumentava. Houve diferença significativa ($P=0,026$) na temperatura ótima para a máxima virulência das espécies de *Colletotrichum* em manga, onde *C. asianum* e *C. diancesii* apresentaram temperaturas de 29,3°C e 29,4°C, respectivamente, não diferindo entre si e de *C. fructicola* (27,1°C), mas diferindo de *C. karstii* (26,4°C) e *C. tropicale* (25,8°C), que não diferiram entre si (Fig. 2). Houve diferença significativa ($P=0,034$) na virulência entre as espécies de *Colletotrichum* sob condições de temperatura ótima, sendo que *C. karstii* apresentou menor virulência que as demais espécies, que não diferiram significativamente entre si ($P=0,674$).

Efeito de fungicidas sobre o crescimento micelial das espécies de *Colletotrichum*

Todas as espécies de *Colletotrichum* tiveram o crescimento micelial reduzido na presença de fungicidas, independente do princípio ativo utilizado. A resposta de sensibilidade variou de acordo com o fungicida e a espécie de *Colletotrichum* (Fig. 3). Para tiofanato metílico, *C. diancesii* apresentou a maior inibição do crescimento micelial (86,7%), enquanto *C. fructicola* foi a menos inibida (25,7%), diferindo entre si e das demais espécies. As espécies *C. asianum*, *C. karstii* e *C. tropicale* apresentaram níveis de inibição intermediários entre esses dois extremos e não diferiram entre si (Fig. 3). O fungicida difenoconazole inibiu o crescimento de todas as espécies de *Colletotrichum* em níveis superiores a 50%. As maiores inibições por esse fungicida foram apresentadas por *C. diancesii* (72,3%) e *C. asianum* (72,3%), enquanto *C. tropicale* foi a espécie menos inibida (53,5%) (Fig. 3). Dentre os fungicidas avaliados, azoxistrobina propiciou as menores reduções do crescimento micelial das espécies de *Colletotrichum*. A maior inibição de crescimento por azoxistrobina foi registrada em *C. asianum* (45,0%) e a menor em *C. karstii* (8,8%), não diferindo significativamente entre si.

Discussão

Este é o primeiro estudo de epidemiologia comparativa das espécies de *Colletotrichum* prevalentes em pomares de mangueira no Nordeste do Brasil. Foram efetuadas análises da virulência de *C. asianum*, *C. diancesii*, *C. fructicola*, *C. karstii* e *C. tropicale* em frutos de diferentes cultivares de mangueira e em uma gama de hospedeiros, bem como investigada a influência da temperatura na intensidade da antracnose induzida por essas espécies e o efeito de fungicidas sobre o crescimento micelial.

A inexistência de diferença na virulência entre as espécies de *Colletotrichum* quando a relação parasitária tenha se estabelecido com as cultivares de manga indica que as espécies do patógeno não apresentam variabilidade na virulência. Por outro lado, como a patogenicidade é um caráter qualitativo, a interação espécie de *Colletotrichum* x cultivar de manga determina o estabelecimento ou não da relação parasitária. A patogenicidade demonstrada por *C. karstii* em Tommy Atkins e não patogenicidade em Keit e Palmer indica a possível preferência de algumas espécies de *Colletotrichum* por determinados cultivares de mangueira, que pode ser decorrente das características dos isolados (Alahakoon et al. 1994) ou ainda das características intrínsecas da própria fruta inoculada. É importante ressaltar que *C. karstii* foi reportada recentemente pela primeira vez nos pomares de mangueira da Austrália (Damm et al. 2012) e do Nordeste brasileiro (Lima et al. 2013), embora essa espécie tenha sido descrita originalmente na China a partir de isolados obtidos de orquídeas (Yang et al. 2011). Como os isolados de *C. karstii* utilizados nesse estudo foram obtidos originalmente de frutos de Tommy Atkins com sintomas de antracnose, era esperada a confirmação da patogenicidade nessa cultivar.

A menor virulência da maioria das espécies de *Colletotrichum* em Tommy Atkins pode estar relacionada com a maior resistência à deterioração na fase de pós-colheita quando comparada a outras cultivares, sendo muito menos perecível que as demais cultivares produzidas para o mercado externo, além de ser parcialmente resistente à antracnose (Lima Neto et al. 2010). As cultivares Keith e Palmer demonstraram menor resistência às espécies patogênicas de *Colletotrichum* e propiciaram desempenhos semelhantes na virulência dessas espécies. O não estabelecimento da relação parasitária com *C. karstii* indica a elevada resistência dessas cultivares em relação a essa espécie de *Colletotrichum*, embora as mesmas sejam consideradas muito suscetíveis à antracnose (Zambolim e Junqueira 2004).

A patogenicidade de todas as espécies de *Colletotrichum* na gama de hospedeiros testada (manga, mamão, banana, goiaba e pimentão) demonstra que as mesmas não possuem

especificidade por hospedeiro, assemelhando-se ao constatado em estudos envolvendo espécies desse fungo inoculadas em diversos hospedeiros. Como exemplo, pimentão, goiaba, manga, mamão e maçã foram inoculados com *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. siamense* e *C. simmondsii* e desenvolveram sintomas de antracnose (Phoulivong et al. 2010), enquanto *C. karstii*, *C. orchidearum* e *C. siamense* foram capazes de infectar frutos de maçã, pimentão e tomate (Yang et al. 2012). Esses resultados corroboram informações da literatura de que o gênero *Colletotrichum* é formado por espécies cosmopolitas com ampla gama de hospedeiros (Cannon et al., 2012; Freeman et al. 1998; Hyde et al. 2009), sendo comum que uma única espécie de *Colletotrichum* infecte múltiplos hospedeiros (Hyde et al. 2009; Phoulivong 2011). A similaridade na virulência entre as espécies de *Colletotrichum* inoculadas em frutos de manga, mamão e banana indica a ausência de variabilidade na virulência, o que não pode ser afirmado quando consideradas as reações em goiaba e pimentão. Portanto, existem indícios que a variabilidade na virulência pode estar associada a interações específicas patógeno x hospedeiro, que no caso do presente estudo pode ser decorrente das características dos isolados fúngicos e/ou das propriedades intrínsecas das espécies frutíferas inoculadas.

Não existem estudos em nível mundial sobre a influência da temperatura na intensidade da antracnose induzida em manga pelas espécies de *Colletotrichum* prevalentes no Nordeste brasileiro, pois a maioria das informações existentes são relacionadas a *C. gloeosporioides*. Nesse estudo, temperaturas acima de 10°C proporcionaram o desenvolvimento de lesões em manga inoculadas com as espécies de *Colletotrichum*, assemelhando-se ao constatado para *C. gloeosporioides* (Dodd et al. 1991). Em geral, infecções são favorecidas por temperaturas entre 20 e 30°C (Arauz 2000; Fitzell et al. 1984), embora neste estudo a maior virulência das espécies de *Colletotrichum* ocorreu nas temperaturas entre 25 e 30°C. A diferença constatada entre as espécies de *Colletotrichum* quanto à temperatura ótima para a máxima virulência em manga pode estar associada a requerimentos específicos para germinação de esporos e formação de apressórios, semelhante ao constatado entre isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de manga de diferentes localidades (Arauz 2000; Dodd et al. 1991). Portanto, para a melhor compreensão do efeito da temperatura sobre a intensidade da doença, há necessidade de estudos complementares sobre os requerimentos específicos de temperatura e umidade para a germinação de esporos e formação de apressórios das espécies de *Colletotrichum* prevalentes nos pomares de mangueira do Nordeste brasileiro.

Fungicidas são amplamente utilizados para o controle da antracnose em manga, pois o aumento no valor do produto (fruto), geralmente compensa os insumos químicos

relativamente caros. Nesse estudo foi avaliado o efeito dos fungicidas tiofanato metílico, difenoconazole e azoxistrobina, intensivamente utilizados nos pomares de mangueira do Nordeste brasileiro, sobre o crescimento micelial das espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose. Pelos resultados obtidos, o controle da antracnose com tiofanato metílico seria eficiente se a espécie predominante fosse *C. dianessi*, mas teria baixa eficácia se a espécie predominante fosse *C. fructicola*. De maneira similar, a aplicação de azoxistrobina seria muito eficiente no controle da doença caso *C. asianum* predominasse no pomar, mas a eficácia desse fungicida seria baixa se *C. karstii* fosse a espécie predominante. Por outro lado, a aplicação de difenoconazole teria eficácia elevada no controle da antracnose, tendo em vista que inibe em níveis elevados e similares todas as espécies de *Colletotrichum*. Portanto, como o inóculo existente nos pomares de mangueira não é constituído de uma única espécie de *Colletotrichum*, mas de um conjunto de espécies, com a predominância de uma ou poucas espécies, na maioria das situações é fundamental a identificação das espécies mais prevalentes nos pomares para que o fungicida utilizado tenha a eficácia esperada.

Importantes subsídios para o desenvolvimento de estratégias de manejo da antracnose da mangueira no Nordeste brasileiro foram propiciados por esse estudo de epidemiologia comparativa das espécies prevalentes de *Colletotrichum*. O uso de cultivares com bons níveis de resistência às diferentes espécies de *Colletotrichum*, como Tommy Atkins, pode ser efetivo no controle da antracnose em virtude da inexistência de variabilidade na virulência entre as espécies patogênicas. A ampla gama de hospedeiros das espécies de *Colletotrichum* associadas à mangueira no Nordeste brasileiro pode constituir um sério problema para o manejo da antracnose, tendo em vista a existência constante de hospedeiros suscetíveis. A predominância de determinadas espécies de *Colletotrichum* em causar doença em manga pode ser decorrente das condições de temperatura predominantes, uma vez que ficou comprovada que as espécies têm exigências térmicas diferentes para expressarem a máxima virulência em frutos, podendo indicar uma adaptabilidade ecotípica da espécie. Como alguns fungicidas utilizados para o controle da antracnose da mangueira podem ter efeito diferencial sobre as espécies de *Colletotrichum*, esse aspecto deve ser considerado na escolha dos princípios ativos a serem utilizados.

Referências

- Acosta-Ramos, M., Noriega-Cantú, D., Nieto-Angel, D., & Téliz-Ortiz, D. (2003). Efecto del manejo integrado del mango (*Mangifera indica* L.) en la incidencia de enfermedades y en la calidad de frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 46-55.
- Alahakoon, P. W., Brown, A. E., & Sreenivaprasad, S. (1994). Cross infection potential of genetic groups of *Colletotrichum gloeosporioides* on tropical fruits. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 44, 93–103.
- Anuário Brasileiro da Fruticultura (2012). Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta.
- Arauz, L. F. (2000). Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. *Plant Disease*, 84, 600–611.
- Assis, J.S. (2010). Cultivo da mangueira: Colheita e pós-colheita. Resource document. http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira_2ed/colheita.htm. Accessed on 15 January 2013.
- Cannon, P. F., Buddie, A. G., & Bridge, P. D. (2008). The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycotaxon*, 104, 189–204.
- Cannon, P. F., Damm, U., Johnston, P. R., & Weir, B. S. (2012). *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology*, 73, 181–213.
- Castro Neto, M. T., & Reinhardt, D. H. (2003). Relações entre parâmetros de crescimento do fruto de manga cv. Haden. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25, 35–37.
- Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., & Crous, P. W. (2012) The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73, 37–113.
- Dodd, J. C., Estrada, A. B., Matcham, J., Jeffries, P., & Jeger, M. J. (1991). The effect of climatic factors on *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of mango anthracnose in the Philippines. *Plant Pathology*, 40, 568–575.
- Dodd, J. C., Estrada, A., & Jeger, M. (1992). Epidemiology of *C. gloeosporioides* in the tropics. In J. A. Bailey & M. J. Jeger (Eds.), *Colletotrichum: Biology, pathology and control* (pp. 308–325). Wallingford: CAB International.

- Dodd, J. C., Prusky, D., & Jeffries, P. (1997). Fruit diseases. In R. E. Litz (Ed.), *The mango: Botany, production and uses* (pp. 257–291). Wallingford: CAB International.
- Fitzell, R. D., Peak, C. M., & Darnell, R. E. (1984). A model for estimating infection levels of anthracnose disease of mango. *Annals of Applied Biology*, *104*, 451–458.
- Freeman, S., Katan, T., & Shabi, E., (1998) Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*, *82*, 596–605.
- Huerta-Palacios, G., Holguín-Meléndez, F., Benítez-Camilo, F., & Toledo-Arreola, J. (2009). Epidemiología de la antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc.] en mango (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *94*, 42–59.
- 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. (2009). *Colletotrichum*-names in current use. *Fungal Diversity*, *39*, 147–183.
- Jeffries, P., Dodd, J. C., Jeger, M. J., & Plumbley, R. A. (1990). The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit. *Plant Pathology*, *39*, 353–366.
- Jeronimo, E. M., Brunini, M. A., Arruda, M. C., Cruz, J. C. S., Fischer, I. H., & Gava, G. J. C. (2007). Conservação pós-colheita de mangas ‘Tommy Atkins’ armazenadas sob atmosfera modificada. *Semina. Ciência Agrárias*, *28*, 417–426.
- Lima, N. B., Batista, M. V. A., Morais Junior, M. A., Barbosa, M. A. G., Michereff, S. J., Hyde, K. D. & Câmara, M. P. S. (2013). Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. *Fungal Diversity* (submitted).
- Lima Neto, F. P., Santos, C. A. F., & Costa, J. G. (2010). Cultivo da mangueira: Cultivares. Resource document. http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira_2d/cultivares.htm. Accessed on 15 January 2013.
- Melo, R. B., Silva, J. S., Candido, A. S., Feitosa, T. B., & Souza, O. C. (2009). *Análise da produção e da exportação de manga no Pólo Petrolina(PE)/Juazeiro(BA)* (Paper presented

- at the 2nd Encontro Norte e Nordeste de Ciências e Engenharia de Materiais, Teresina, PI, 2009).
- Ministério da Integração Nacional. (2000). Frutiséries. Resource document. <http://www.mi.gov.br/infraestruturahidrica/publicacoes/frutiseries.asp>. Accessed on 0
Accessed on 15 January 2013.
- Phoulivong, S. (2011). *Colletotrichum*, naming, control, resistance, biocontrol of weeds and current challenges. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 1, 53–73.
- Phoulivong, S., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E. H. C., Abd-Elsalam, K., Chukeatirote, E., Hyde, K. D. (2010). *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity*, 44, 33–43.
- Ploetz, R. C. (2003). Diseases of mango. In: R. C. Ploetz (Ed.), *Diseases of tropical fruit crops* (pp. 327–363). Wallingford: CAB International.
- Prakash, O. (2004). Diseases and disorders of mango and their management. In S. A. M. H. Naqvi (Ed.), *Diseases of fruits and vegetables: Diagnosis and management* (pp. 511–619). Dordrecht: Kluwer.
- Ribeiro, I. J. A. (2005). Doenças da mangueira. In H. Kimati, L. Amorim, J. A. M. Rezende, A. Bergamin Filho, & L. E. A. Camargo (Eds.), *Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas*, 4th ed. (pp. 457–465). São Paulo: Ceres.
- Santos Filho, H. P., Matos, A. P. (2003). Doenças da mangueira. In F. C. O. Freire, J. E. Cardoso, & F. M. P. Viana (Eds.), *Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial* (pp. 435–491). Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.
- Waller, J. M. (1992). *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. In J. A. Bailey & M. J. Jeger (Eds.), *Colletotrichum: Biology, pathology and control* (pp. 167–185). Wallingford: CAB International.
- Yang, Y.L., Liu, Z. Y., Cai, L., Hyde, K. D., Yu, Z. N., & McKenzie, E. H. C. (2011) *Colletotrichum* anthracnose of Amaryllidaceae. *Fungal Diversity*, 39, 123–146.
- Yang, Y. L., Cai, L., Yu, Z., Liu, Z., & Hyde, K. D. (2012) *Colletotrichum* species on Orchidaceae in southwest China. *Cryptogamie Mycologie*, 32, 229–253.

Zambolim, L., & Junqueira, N. (2004). Manejo integrado de doenças da mangueira. In D. E. Rozane, R. J. Darezzo, R. L. Aguiar, G. H. A. Aguilera, & L. Zambolim (Eds.), *Manga: Produção integrada, industrialização e comercialização* (pp. 377–408). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.

Tabela 1 Isolados de cinco espécies de *Colletotrichum* obtidos de frutos coletados em pomares de mangueira (var. Tommy Atkins) localizados em municípios do Nordeste do Brasil

Isolado ^a	Espécie	Município (Estado) ^b
CMM 4061	<i>Colletotrichum asianum</i>	Recife (PE)
CMM 4066	<i>C. asianum</i>	Cabo de Santo Agostinho (PE)
CMM 4068	<i>C. asianum</i>	Cabo de Santo Agostinho (PE)
CMM 4063	<i>C. asianum</i>	Cabo de Santo Agostinho (PE)
CMM 4065	<i>C. asianum</i>	Cabo de Santo Agostinho (PE)
CMM 4058	<i>C. asianum</i>	Recife (PE)
CMM 4056	<i>C. asianum</i>	Casa Nova (BA)
CMM 4057	<i>C. asianum</i>	Casa Nova (BA)
CMM 4092	<i>Colletotrichum dianesii</i>	Ipanguaçu (RN)
CMM 4091	<i>C. dianesii</i>	Ipanguaçu (RN)
CMM 4088	<i>C. dianesii</i>	Petrolina (PE)
CMM 4093	<i>C. dianesii</i>	Ipanguaçu (RN)
CMM 4082	<i>C. dianesii</i>	Casa Nova (BA)
CMM 4083	<i>C. dianesii</i>	Casa Nova (BA)
CMM 4084	<i>C. dianesii</i>	Ipanguaçu (RN)
CMM 4086	<i>C. dianesii</i>	Ipanguaçu (RN)
CMM 4085	<i>C. dianesii</i>	Ipanguaçu (RN)
CMM 4087	<i>C. dianesii</i>	Ipanguaçu (RN)
CMM 4069	<i>Colletotrichum fructicola</i>	Petrolina (PE)
CMM 4070	<i>C. fructicola</i>	Petrolina (PE)
CMM 4075	<i>Colletotrichum tropicale</i>	Recife (PE)
CMM 4076	<i>C. tropicale</i>	Casa Nova (BA)
CMM 4071	<i>C. tropicale</i>	Casa Nova (BA)
CMM 4073	<i>C. tropicale</i>	Casa Nova (BA)
CMM 4101	<i>Colletotrichum karstii</i>	Petrolina (PE)
CMM 4102	<i>C. karstii</i>	Petrolina (PE)

^a CMM = Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos "Prof. Maria Menezes" da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brasil)

^b BA = Bahia, PE = Pernambuco, RN = Rio Grande do Norte

Tabela 2 Virulência (tamanho da lesão) em manga (cv. Tommy Atkins), mamão (cv. Golden), banana (cv. Pacovan), goiaba (cv. Paluma) e pimentão (cv. Atlante) de cinco espécies de *Colletotrichum* associadas com a antracnose da mangueira no Nordeste do Brasil

Espécie	Tamanho da lesão (cm)				
	Manga	Mamão	Banana	Goiaba	Pimentão
<i>Colletotrichum asianum</i>	5,6 ± 0,5 a ^a	1,5 ± 0,4 a	4,9 ± 0,1 a	5,0 ± 0,8 ab	1,1 ± 0,3 ab
<i>Colletotrichum diancesii</i>	5,8 ± 0,4 a	1,9 ± 0,3 a	5,2 ± 0,1 a	4,5 ± 0,7 b	0,7 ± 0,2 b
<i>Colletotrichum fructicola</i>	5,6 ± 0,9 a	1,4 ± 0,7 a	5,5 ± 0,3 a	1,1 ± 0,9 c	1,4 ± 0,5 ab
<i>Colletotrichum karstii</i>	5,5 ± 0,9 a	1,8 ± 0,7 a	5,0 ± 0,3 a	4,6 ± 0,9 ab	1,9 ± 0,5 a
<i>Colletotrichum tropicale</i>	6,4 ± 0,6 a	2,2 ± 0,5 a	4,8 ± 0,2 a	5,8 ± 0,9 a	0,9 ± 0,3 ab

^a Média ± erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste LSD de Fisher ($P=0,05$)

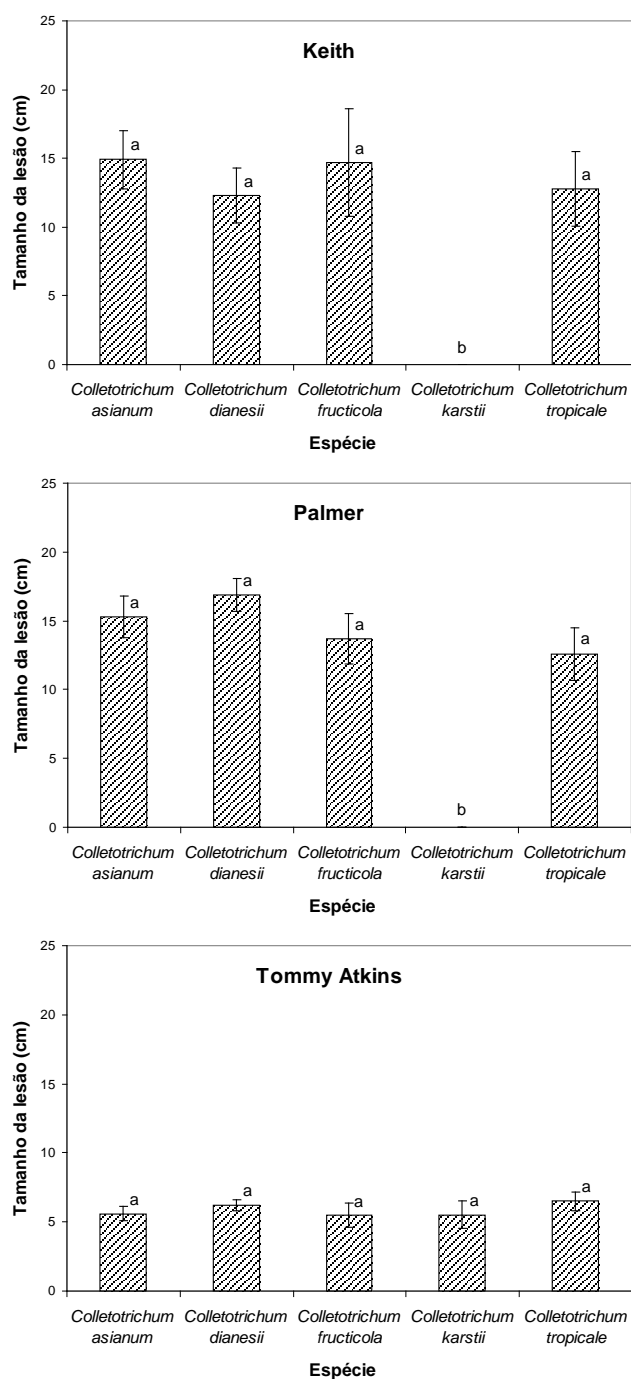


Figura 1 Virulência (tamanho da lesão) em cultivares de manga (Keith, Palmer e Tommy Atkins) de cinco espécies de *Colletotrichum* associadas com a antracnose da mangueira no Nordeste do Brasil. As barras representam o erro padrão e as médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste LSD de Fischer ($P=0,05$).

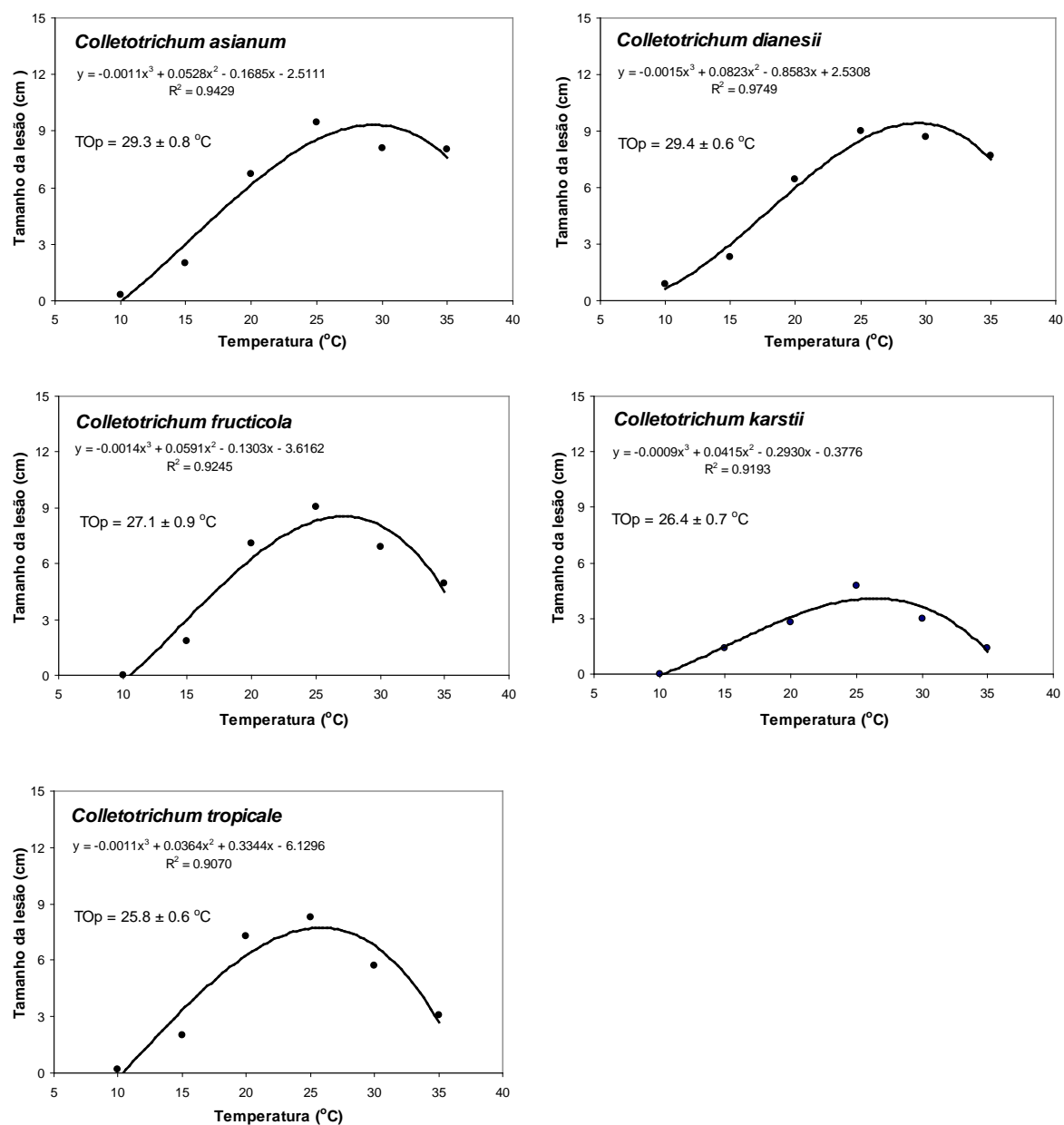


Figura 2 Influência da temperatura na virulência (tamanho da lesão) em manga (cv. Tommy Atkins) de cinco espécies de *Colletotrichum* associadas com a antracnose da mangueira no Nordeste do Brasil. TOp = temperatura ótima (média \pm erro padrão) para a virulência.

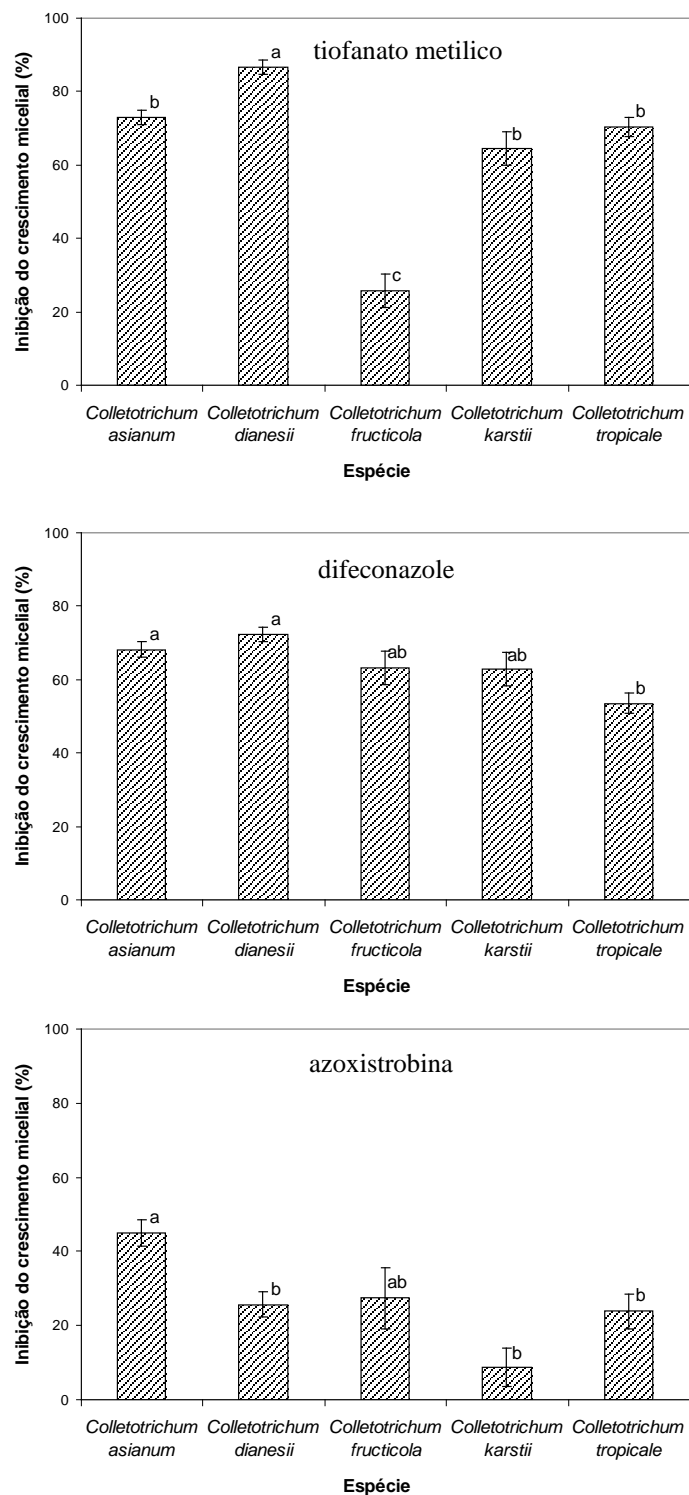


Figura 3 Sensibilidade de cinco espécies de *Colletotrichum* associadas com a antracnose da mangueira no Nordeste do Brasil aos fungicidas tiofanato metílico ($10 \mu\text{g}$ de i.a. ml^{-1}), difenoconazole ($0,5 \mu\text{g}$ de i.a. ml^{-1}) e azoxistrobina ($1,0 \mu\text{g}$ de i.a. ml^{-1}). As barras representam o erro padrão e as médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste LSD de Fisher ($P=0,05$).

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

1. *Colletotrichum gloeosporioides* não é o agente etiológico da antracnose em frutas de mangueira no Nordeste do Brasil;
2. A antracnose em frutas de mangueira, no Nordeste brasileiro, é causada por cinco espécies de *Colletotrichum* (*C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. karstii* e *C. dianesii*);
3. O uso de cultivares com bons níveis de resistência às diferentes espécies de *Colletotrichum* é componente essencial no manejo integrado da antracnose;
4. A ampla gama de hospedeiros das espécies de *Colletotrichum* associadas à mangueira no Nordeste do Brasil constitui um sério problema para o manejo da antracnose;
5. A identificação correta das espécies de *Colletotrichum* é essencial no desenvolvimento de estratégias eficientes de controle.