



**Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia**

**LEVANTAMENTO DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* EM  
MORANGUEIRO, COM ÊNFASE NO DISTRITO FEDERAL,  
BRASIL**

**LINCOLN VICENTE ARAÚJO DOS SANTOS BIZERRA**

**Brasília – 2018**

**LINCOLN VICENTE ARAÚJO DOS SANTOS BIZERRA**

**LEVANTAMENTO DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* EM  
MORANGUEIRO, COM ÊNFASE NO DISTRITO FEDERAL,  
BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade de  
Brasília como requisito parcial para obtenção  
do título de Mestre em Fitopatologia pelo  
Programa de Pós-graduação em Fitopatologia.

**Orientador**

Dr. Adalberto Corrêa Café Filho

**BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL  
BRASIL  
2018**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Bizerra, Lincoln Vicente Araújo do Santos

Levantamento de espécies de *Colletotrichum* em morangueiro, com ênfase no Distrito Federal, Brasil. / Lincoln Vicente Araújo dos Santos Bizerra.

Brasília, 2018.

p. 45.

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. Morango – Antracnose, flor preta, podridão da coroa.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Levantamento de espécies de *Colletotrichum* em morangueiro, com ênfase no Distrito Federal, Brasil.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me conceder as oportunidades que tive em toda a minha vida.

Agradeço ao meu pai, minha mãe e minha irmã pelo apoio prestado nas fases mais difíceis pelas quais passei. Sei que nada seria sem eles e que seu amor incondicional é a minha maior força.

Agradeço à Bruna Portugal, a qual não tenho como agradecer em uma vida o que fez por mim. Nenhuma palavra aqui escrita representaria a minha gratidão.

À minha amiga Jennifer Decloquement, por ser a melhor amiga que uma pessoa pode ter. Sua amizade tornou muito mais fácil meus dias mais difíceis.

Aos amigos Justino Dias, Débora Guterres e Samuel Galvão, por serem meus exemplos de profissionais e amigos.

Aos meus amigos Rildo Alexandre, Deziany Ferreira, Aline Silva, Raycenne Rosa e Rebeca Mesquita que de formas diferentes fizeram meus dias mais felizes e tornaram possível a conclusão desse trabalho.

Gostaria de agradecer também a todos os membros do Laboratório de Micologia da UnB que de alguma forma contribuíram para a conclusão desse trabalho.

Agradeço ao professor Dr. Adalberto C. Café Filho por me inspirar em entrar para a pós-graduação, assim como por me inspirar, apoiar e orientar durante esse período. Ao Prof. Dr. Danilo Batista Pinho pelas instruções e ensinamentos, sem os quais esse trabalho não seria possível. Ao Dr. Ailton Reis pela presteza, apoio e por disponibilizar isolados fúngicos.

Agradeço aos Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller e Dr. Eudes de Arruda Carvalho, por comporem a banca examinadora.

Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Mestrado.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do professor Dr. Adalberto Corrêa Café Filho, com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**LEVANTAMENTO DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* EM MORANGUEIRO, COM ÊNFASE NO DISTRITO FEDERAL, BRASIL**

**LINCOLN VICENTE ARAÚJO DOS SANTOS BIZERRA**

DISSERTAÇÃO APROVADA em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_ por:

---

Dr. Eudes de Arruda Carvalho  
Embrapa Cenargen (Examinador Externo)

---

Dr. Robert Neil Gerard Miller  
Universidade de Brasília (Examinador Externo)

---

Dr. Adalberto Corrêa Café Filho  
Universidade de Brasília (Presidente – Orientador)

**BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL  
BRASIL  
2018**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	iii
<b>RESUMO GERAL</b> .....	iv
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	vi
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>1 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	11
<b>1.1 O morangueiro</b> .....	11
<b>1.2 Produção de morango</b> .....	12
<b>1.3 Principais doenças do morangueiro</b> .....	13
<b>1.4 Antracnose, flor preta e podridão da coroa em morangueiro</b> .....	15
<b>1.5 Sintomatologia</b> .....	16
<b>1.6 Etiologia da antracnose em fruto, flor preta e podridão da coroa</b> .....	17
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
<b>2.1 Coleta das amostras</b> .....	19
<b>2.2 Isolamento e armazenamento dos isolados</b> .....	19
2.2.1 Obtenção dos isolados com sintomas de flor preta e antracnose.....	19
2.2.2 Obtenção dos isolados a partir de amostras com sintomas de podridão da coroa .....	19
2.2.5 Armazenamento dos isolados.....	20
<b>2.3 Extração do DNA genômico</b> .....	20
<b>2.4 Amplificação e purificação de DNA</b> .....	21
<b>2.5 Identificação prévia</b> .....	22
<b>2.6 Análises Filogenéticas</b> .....	22
<b>2.7 Caracterização morfológica</b> .....	23
<b>3 RESULTADOS</b> .....	25
<b>3.1 Caracterização molecular</b> .....	25
<b>3.2 Caracterização morfológica dos isolados</b> .....	26
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	27
<b>4.1 Caracterização molecular</b> .....	27
<b>4.2 Caracterização morfológica</b> .....	28
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	31
<b>Referências bibliográficas</b> .....	32
<b>TABELAS</b> .....	36
<b>FIGURAS</b> .....	45

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1.** Lista de iniciadores utilizados para amplificação de diferentes regiões gênicas dos isolados de *Colletotrichum* sp.....36

**Tabela 2.** Números de acesso do GenBank das sequências de DNA de *Colletotrichum* sp. utilizados na análise filogenética.....37

**Tabela 3.** Relação de isolados de *Colletotrichum* em morangueiro.....43

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Sintomas e sinais de antracnose (A e B), Flor preta (C e D) e Podridão da coroa (E e F). Em C é possível verificar a esporulação de *Colletotrichum* sp. em flor de morangueiro.....17
- Figura 2:** Rede de haplótipos baseada em sequências da região gênica GAPDH. Destacados em vermelho os isolados escolhidos para sequenciamento das regiões gênicas  $\beta$ -tubulina e ITS.....45
- Figura 3:** Árvore filogenética concatenada com as sequências das regiões gênicas GAPDH,  $\beta$ -tubulina e ITS obtida por Máxima Verossimilhança. Os valores de Bootstrap superiores a 75% são indicados acima dos nós. *C. orchidophilum* foi utilizado como outgroup. As tabelas indicam as plantas hospedeiras e países de ocorrência das espécies com as quais os isolados em estudo agruparam. Os isolados em estudo são destacados em vermelho e possuem símbolos que indicam o local de coleta e o sintoma causado.....46
- Figura 4:** Conídios do isolado de *Colletotrichum nymphaeae*, código 2058.....48
- Figura 5:** Conídios do isolado de *Colletotrichum tamarilloi*, código 2031.....49
- Figura 6:** Conídios do isolado de *Colletotrichum* sp. código 1960.....49



## RESUMO GERAL

BIZERRA, Lincoln Vicente Araújo dos Santos. **Levantamento de espécies de *Colletotrichum* em morangueiro, com ênfase no Distrito Federal, Brasil.** 2018. 45p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, DF.

O gênero *Colletotrichum* reúne vários dos principais patógenos do morangueiro. Devido à sua agressividade elevada e a capacidade de infectar vários tecidos da planta, ocasionando antracnose, podridão da coroa e flor preta, o gênero é responsável por prejuízos econômicos constantes nas regiões produtoras. Várias espécies de *Colletotrichum* são associadas às doenças em diferentes partes da planta e sua identificação precisa é fundamental para a recomendação de estratégias de controle eficientes. No Brasil, apenas a espécie *C. siamense* já foi identificada utilizando uma abordagem molecular, não havendo informação sobre as espécies que ocorrem nas demais regiões produtoras, incluindo o Distrito Federal, onde o cultivo do morangueiro é uma atividade agrícola de considerável importância econômica. Assim, os objetivos desse trabalho foram: (i) determinar espécies de *Colletotrichum* que ocorrem no morangueiro com ênfase no Distrito Federal, Brasil; (ii) estabelecer as relações filogenéticas entre as espécies de *Colletotrichum* associadas aos diferentes tecidos da planta. Foram realizadas coletas de frutos, flores e coroas de morangueiro apresentando sintomas típicos da infecção por *Colletotrichum* em propriedades de Brazlândia e Recanto das Emas no Distrito Federal; Atibaia em São Paulo; São Francisco de Paula no Rio Grande do Sul; Castelo e Domingos Martins, no Espírito Santo; Goianápolis e Padre Bernardo, no Goiás. Foram obtidos 52 isolados de *Colletotrichum* spp. dos quais o DNA total foi extraído. A amplificação e sequenciamento da região gênica GAPDH foi realizado para todos isolados para identificação prévia. As regiões gênicas ITS e  $\beta$ -tubulina de nove isolados representativos foram amplificadas e sequenciadas para identificação e análise filogenética. Foram identificadas as espécies *C. nymphaeae* e *C. tamarilloi*, sendo este o primeiro relato de *C. nymphaeae* causando antracnose e flor preta em morangueiro no Brasil e o primeiro relato de *C. tamarilloi* associado ao morangueiro no mundo. Quatro isolados

pertencentes ao complexo *C. acutatum* não puderam ser inequivocamente identificados ao nível de espécie.

Palavras-chave: identificação; antracnose; flor preta; podridão da coroa; *Fragaria* sp. ; *GAPDH*.

---

Orientador- Dr. Adalberto Corrêa Café Filho – Universidade de Brasília

## GENERAL ABSTRACT

BIZERRA, Lincoln Vicente Araújo dos Santos. **Survey of *Colletotrichum* species in strawberry, with emphasis on Distrito Federal, Brazil.** 2018. 45p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, DF.

The genus *Colletotrichum* gathers several of the main strawberry pathogens due to the genus high aggressiveness and the ability to infect several plant tissues, causing anthracnose, crown rot and flower blight, and is responsible for constant economic losses in the growing regions worldwide. Several species of *Colletotrichum* are associated with strawberry diseases in different parts of the plant, and thus, the precise identification of *Colletotrichum* is essential for the recommendation of efficient control strategies and reduction of residues of agrochemicals in the commercialized fruits. Therefore, the objectives of this project are (i) to determine the species of *Colletotrichum* occurring in the strawberry plants in Brazil, with emphasis in the Distrito Federal; (ii) to establish the phylogenetic and pathogenicity relationships among *Colletotrichum* genotypes associated with different plant tissues. Fruit, flowers and strawberry crowns showing typical symptoms of *Colletotrichum* infection were collected in growing properties in the administrative regions Brazlândia and Recanto das Emas in Distrito Federal; in the municipalities of Atibaia in São Paulo; São Francisco de Paula in Rio Grande do Sul; Castelo and Domingos Martins, in Espírito Santo; and Goianópolis and Padre Bernardo, in Goiás. In total, 50 isolates were obtained and had genomic DNA extracted. The amplification and sequencing of the GAPDH gene region of all the isolates was performed in order to carry out the preliminar identification. The ITS and  $\beta$ -tubulin gene regions of nine representative isolates were amplified and sequenced for more detailed identification and phylogenetic analysis. The species *C. nymphaeae* and *C. tamarilloi* were identified and associated with strawberry symptoms in the evaluated regions, representing the first report of *C. nymphaeae* causing anthracnose and flower blight in strawberry in Brazil and the first worldwide report of *C. tamarilloi* associated with strawberry to science.

It was not possible to accurately identify four isolates of *C. acutatum* complex, which may belong to the species *C. paranaense*, *C. costaricense* or *C. limeticola*.

Keywords: Identification; anthracnose; flower blight; crown rot; *Fragaria* sp.; *GAPDH*.

---

Guidance Committee- Dr. Adalberto Corrêa Café Filho (Advisor)

## INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria* spp.) é um fruto consumido *in natura* ou processado para produção de sucos, sorvetes, bolos, tortas, doces e geleias. O Distrito Federal é a sétima maior região produtora do país com uma produção que já em 2008 atingia 6 mil toneladas, gerando uma receita anual de R\$ 30 milhões de reais (Henz *et al.* 2009).

O cultivo do morangueiro no Distrito Federal iniciou-se na década de 70, e atualmente é considerada uma atividade agrícola de relevante importância econômica para a região. Embora a cultura tenha uma alta rentabilidade, grandes prejuízos são observados devido a ocorrência de doenças. O fungo *Colletotrichum* é o principal patógeno da cultura devido a agressividade elevada e a capacidade de infectar vários tecidos da planta (Howard *et al.* 1992), ocasionando diferentes sintomas (mancha foliar, antracnose, podridão da coroa, flor preta) e prejuízos econômicos constantes nas regiões produtoras do Distrito Federal e do mundo.

Os principais sintomas observados em plantas infectadas com *Colletotrichum* spp. são a mancha foliar; antracnose em frutos verdes e maduros; (“flor preta”); e necrose de pecíolos, pedúnculos e estolhos. Outro sintoma importante é a podridão da coroa que resulta na murcha e morte da planta (Howard *et al.* 1992). Historicamente, as espécies de *Colletotrichum* associadas ao morangueiro são *C. acutatum* J.H. Simmonds, *Colletotrichum theobromicola* Delacr (= *C. fragariae* A.N. Brooks) e *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (Freeman & Katan, 1997; Ureña-Padilla *et al.*, 2002).

A podridão da coroa do morangueiro é associada principalmente a *C. theobromicola* (= *C. fragariae*) e *C. gloeosporioides*. O fungo infecta o tecido da coroa causando lesões avermelhadas e necróticas, que resultam na murcha e morte da planta. *Colletotrichum acutatum* também pode ocasionar a murcha e morte das plantas, no entanto, os sintomas observados são oriundos da infecção dos estolhos e da raiz (Howard *et al.*, 1992 ; Freeman & Katan, 1997 ; Maas, 1998; Ureña-Padilla *et al.*, 2002).

Lesões circulares, deprimidas e coalescentes em frutos são denominadas de antracnoses. Lesões regulares são comumente associadas com *C. theobromicola* e *C. gloeosporioides*, enquanto lesões irregulares são associadas com *C. acutatum* (Howard & Albregts, 1983; Freeman & Katan, 1997, Maas, 1998). Os sintomas de flor preta e necrose de pedúnculos, pecíolos e estolhos também são comumente associados com *C. acutatum*, *C. theobromicola* e *C. gloeosporioides* (Howard *et al.*, 1992; Maas, 1998).

No Brasil, a podridão da coroa é associada com *C. theobromicola*, enquanto a flor preta é causada por *C. acutatum*. Além disso, a antracnose em frutos é associada com *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* (Tanaka *et al.*, 2005; Coelho *et al.*, 2008; Reis & Costa, 2011; Moreira *et al.*, 2014). Entretanto, Tanaka & Passos (2002), por meio da inoculação artificial, comprovaram que as três espécies são capazes de infectar todos os tecidos da planta

A identificação precisa do patógeno é fundamental para o estabelecimento de estratégias de controle eficientes e desenvolvimento de cultivares resistentes, uma vez que diferentes níveis de resistência ao patógeno já foram observadas em cultivares de morango (Howard *et al.* 1992; Coelho *et al.*, 2008). Embora *Colletotrichum* ocasione grandes prejuízos na maioria das regiões produtoras de morango, a determinação da espécie fúngica associada com o órgão da planta é contraditória e confusa na literatura devido ao grande número de espécies encontradas e a sobreposição de características morfológicas (Cannon *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, o gênero foi intensamente estudado usando uma abordagem polifásica e as espécies patogênicas ao morangueiro foram agrupadas nos complexos *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. boninense* e *C. truncatum* (Cannon *et al.*, 2012; Damm *et al.*, 2012; Weir *et al.*, 2012; Bi *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2017).

Até o momento, as espécies *C. aenigma* B.S. Weir & P.R. Johnston, *C. changpingense* G. Zhang, *C. fructicola* Prihastuti, L. Cai & K.D. Hyde, *C. murrayae* Gutner e *C. siamense* Prihastuti, L. Cai & K.D. Hyde, do complexo *C. gloeosporioides*; *C. nymphaeae* (Pass) Aa, *C.*

*simmondsii* R.G. Shivas & Y.P. Tan, *C. fiorinae* Marcelino & Gouli ex R.G. Shivas & Y.P. Tan, *C. godetiae* Neerg, e *C. salicis* (Fuckel) Damm, P.F. Cannon & Crous, do complexo *C. acutatum*; *C. boninense* Moriwaki, Toy. Sato & Tsukib, do complexo *C. boninense*; e *C. truncatum* (Schwein.) Andrus & W.D. Moore do complexo *C. truncatum*, foram relatadas em associação com o morangueiro (Damm *et al.*, 2012; Baroncelli *et al.* 2015; Capobiango *et al.* 2016; Han *et al.* 2016; Jayawarden *et al.* 2016).

No Brasil, somente *C. siamense* causando antracnose em frutos de morango no estado de Minas Gerais foi identificada usando uma abordagem molecular (Capobiango *et al.* 2016), e até o momento não existem estudos taxonômicos sobre a ocorrência de *Colletotrichum* associado ao morangueiro no Distrito Federal. Portanto, os objetivos desse trabalho são: (i) determinar as espécies de *Colletotrichum* que ocorrem no morangueiro no Brasil, com ênfase no Distrito Federal; (ii) estabelecer as relações filogenéticas entre as espécies de *Colletotrichum* associadas aos diferentes órgãos do morangueiro.

# 1 REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 O morangueiro

O morangueiro (*Fragaria* spp.), pertencente à família Rosaceae, é uma planta herbácea, rasteira e perene, cultivada como bianual. É nativa de regiões de clima temperado da Europa e América do Sul. O morango é um pseudofruto, originado de uma flor com diversos ovários, cujo receptáculo floral é a parte comestível. Cada ovário origina um fruto denominado aquênio, que é popularmente conhecido como semente. A espécie de morangueiro mais plantada atualmente, *Fragaria x ananassa*, é um híbrido de duas espécies, *F. chiloensis* e *F. virginiana* (Antunes *et al.*, 2011).

O morango é considerado uma das principais espécies em conteúdo de flavonoides, compostos fenólicos com atividade antioxidante, cujo consumo está associado à prevenção da maioria das doenças crônicas de risco e degenerativas. O fruto é muito utilizado tanto para consumo *in natura*, quanto como ingrediente de doces e alimentos industrializados, tendo os frutos processados para produção de sucos, sorvetes, iogurtes, bolos, tortas, doces e geleias (Mexia *et al.*, 2005).

Morfologicamente pode-se dividir o morangueiro em cinco partes: sistema radicular, caule, folhas, estolho e sistema reprodutivo, que inclui inflorescência, flor e fruto. O sistema radicular é fasciculado e superficial, no qual 50 a 90% das raízes localizam-se nos primeiros 20 cm do solo. O caule é um rizoma curto, cilíndrico e retorcido de onde emergem, em roseta, as folhas trifoliadas. Essa região é comumente chamada de coroa. A planta pode ser constituída de uma ou mais coroas, as quais dão origem a folhas, inflorescências, estolhos e raízes adventícias (Mexia *et al.*, 2005; Trejo-Téllez & Gómez-Merino, 2014).

As folhas são trifoliadas, de coloração verde e disposição em espiral. O estolho é um ramo especializado que possui os dois primeiros entrenós longos e dão origem a plantas-filhas. A inflorescência é terminal que apresenta uma flor primária, que é a mais velha, duas flores



secundárias, quatro flores terciárias e oito flores quaternárias. As flores são hermafroditas, possuem geralmente cinco sépalas e cinco pétalas, essas são de coloração branca e formato variável. O fruto comercial é o conjunto formado pelo receptáculo floral hipertrofiado e os aquênios (Mexia *et al.*, 2005; Trejo-Téllez & Gómez-Merino, 2014).

As cultivares de morangueiro podem ser divididas em três categorias : cultivares de dias curtos (DC), de dias longos (DL) e cultivares indiferentes ao fotoperíodo ou de dias neutros (ID). Nas cultivares DC a iniciação floral ocorre durante dias com fotoperíodo inferior a 12 horas e normalmente, no Brasil, florescem durante o inverno. As cultivares DL florescem em dias com fotoperíodo superior a 12 horas e praticamente não são utilizadas no Brasil. E as cultivares ID florescem o ano todo exceto em temperaturas superiores a 30°C. Segundo informações levantadas junto a Empresa Brasileira de Assistência Rural (EMATER-DF), as cultivares de DC mais plantadas atualmente no Distrito Federal são: Camarosa, Oso Grande, Camino Real e Festival. Já as cultivares de dias neutros mais plantadas são: Portola, San Andreas, Monterey e Albion. Essas cultivares possuem características próprias quanto ao sabor, tempo de prateleira, produtividade, formato e resistência a doenças. Dessa forma, são escolhidas para o plantio levando em consideração o mercado consumidor e as especificidades da área de plantio e do produtor (Mexia *et al.*, 2005; Antunes, 2018).

## **1.2 Produção de morango**

O maior produtor de morango é a China, sendo responsável por cerca de 42% da produção mundial, seguida pelos Estados Unidos da América e pelo México que participam com 16% e 5% da produção, respectivamente. O Brasil possui produção pouco expressiva mundialmente, ocupando a 56<sup>a</sup> posição e participa com menos de 1% da produção mundial (FAOSTAT, 2018).

Desde o século XVIII o morango é cultivado em hortas domésticas no Brasil, ganhando importância econômica apenas no século XIX. No Distrito Federal (DF) a cultura foi introduzida por produtores de descendência japonesa oriundos da região de Atibaia, São Paulo, que até hoje é o maior polo de produção de morango daquele estado. A produção no DF é concentrada na Região Administrativa de Brazlândia, cujas condições climáticas somadas a altitude de aproximadamente 1000 metros fornecem boas condições ambientais para o desenvolvimento da cultura (Henz *et al.*, 2009).

A área plantada com morangos no Brasil é de aproximadamente 4.000 hectares, com produção anual estimada em 105 mil toneladas. Os principais estados produtores são Minas Gerais, Rio Grande do Sul, São Paulo, Espírito Santo, Paraná, Santa Catarina e Distrito Federal (Reisser Jr *et al.*, 2015). A produtividade média do Brasil é de 30 t/ha, semelhante a China, cuja produtividade é de 27 t/ha, porém muito inferior a países mais tecnificados como os Estados Unidos da América, onde esse valor é equivalente a 66 t/ha. De acordo com estimativas da EMATER, a produção de morangos no DF em 2017 foi de aproximadamente 3.675 toneladas, correspondendo a 3,5% da produção nacional (Henz *et al.*, 2009; FAOSTAT, 2018).

### **1.3 Principais doenças do morangueiro**

Diversas doenças são capazes de reduzir a produção do morangueiro. A maioria delas é causada por fungos, porém diversos vírus, algumas bactérias e nematoides também são capazes de ocasionar doenças. Entre as mais importantes doenças, pode-se ressaltar a mancha angular, mancha de pestalotiopsis, murcha de verticílio, mofo cinzento e mosqueado do morangueiro (Reis & Costa, 2011). No Distrito Federal, Furlanetto *et al.* (1996) registraram 7 espécies fúngicas em morango (*Colletotrichum acutatum*, *C. fragariae*, *Botrytis cinerae*, *Phomopsis obscurans*, *Ramularia brunnea*, *Marssonina fragariae* e *Hainesia lythri*) e uma

bacteriana (*Xanthomonas fragariae*). *Pestalotiopsis longisetula* também já foi registrada no DF (Pedroso & Café Filho, 2007). As principais doenças são brevemente discutidas a seguir.

Mancha angular: é a principal doença bacteriana do morangueiro, causada por *Xanthomonas fragariae*. O sintoma mais evidente é o surgimento de manchas angulares com aspecto de encharcamento na face abaxial das folhas. Tende a ser mais importante em regiões de clima ameno, tendo em vista que a temperatura ótima para o desenvolvimento do patógeno é de 20° C (Kim *et al.*, 2016).

Mancha de pestalotiopsis: doença fúngica causada por *Pestalotiopsis longisetula* (Guba) X.A. Sun & Q.X. Ge. O sintoma observado em campo são manchas circulares, necróticas em folhas e pecíolos. Essas manchas tendem a coalescer e necrosar parte da folha. Três cultivares são mais suscetíveis à essa doença: Oso Grande, Sweet Charlie e Camarosa (Teixeira *et al.*, 2015).

Murcha de verticílio: doença vascular causada pelos fungos *Verticillium dahliae* Kleb. e *V. albo-atrum* Reinke and Berthier. O sintoma é caracterizado pela murcha de folhas mais velhas que progride para o crestamento de folhas, ocasionando a morte da planta. O controle dessa doença é particularmente difícil devido a habilidade dos agentes causais em sobreviver por longo período no solo (Zebrowska *et al.*, 2006; Reis & Costa, 2011).

Mofa cinzento: uma das mais comuns doenças do morangueiro no Brasil, o mofa cinzento é causado por *Botrytis cinerea* Pers. O controle dessa doença atualmente é altamente dependente do uso de fungicidas e devido a alta pressão de seleção gerada pelo uso indiscriminado desses produtos ocasiona o surgimento de populações fúngicas altamente resistentes. Por isso tal doença vem ganhando grande importância na cultura do morangueiro (Grabke *et al.*, 2014).

Mosqueado do morangueiro: doença viral de maior importância para a cultura. É causado pelo vírus *Strawberry mottle virus* (SMV). Como o nome indica o sintoma principal é

o mosqueado, porém pode haver infecções conjuntas com outros vírus, o que causa variações dos sintomas. Há relatos, por exemplo, de infecções conjuntas de SMV e *Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV) gerando sintomas de amarelecimento das bordas foliares (Samtani *et al.*, 2017).

#### **1.4 Antracnose, flor preta e podridão da coroa em morangueiro**

Plantas de morango infectadas com *Colletotrichum* spp. apresentam diferentes sintomas em diferentes órgãos. Tais sintomas são mancha foliar, antracnose em frutos verdes e maduros, flor preta e podridão da coroa. No DF o sintoma de mancha foliar é de rara ocorrência. Justamente pela capacidade de infectar vários tecidos da planta e pela elevada agressividade, o fungo *Colletotrichum* é considerado o principal patógeno da cultura do morangueiro (Howard *et al.* 1992).

A doença foi descrita pela primeira vez na Austrália em 1965. No Brasil há relatos da ocorrência da doença desde 1984, porém apenas em 1992 foi identificado o fungo *Colletotrichum* como agente causal. No Distrito Federal o primeiro surto da doença ocorreu no cultivo de junho a outubro de 1989, acarretando perdas de até 68% da produção. Acredita-se que o patógeno tenha sido disseminado por mudas com infecção quiescente trazidas de outras regiões (Ueno, 1996; Poling, 2008).

Todos os sintomas causados por *Colletotrichum* resultam em sérias perdas na produção. A antracnose causa lesões em frutos verdes e maduros e impede a sua comercialização. A flor preta causa necrose em flores e impossibilita a produção de frutos. A podridão da coroa, por sua vez, ocasiona problemas vasculares e com o tempo, a murcha e morte completa da planta (Louws *et al.*, 2014).

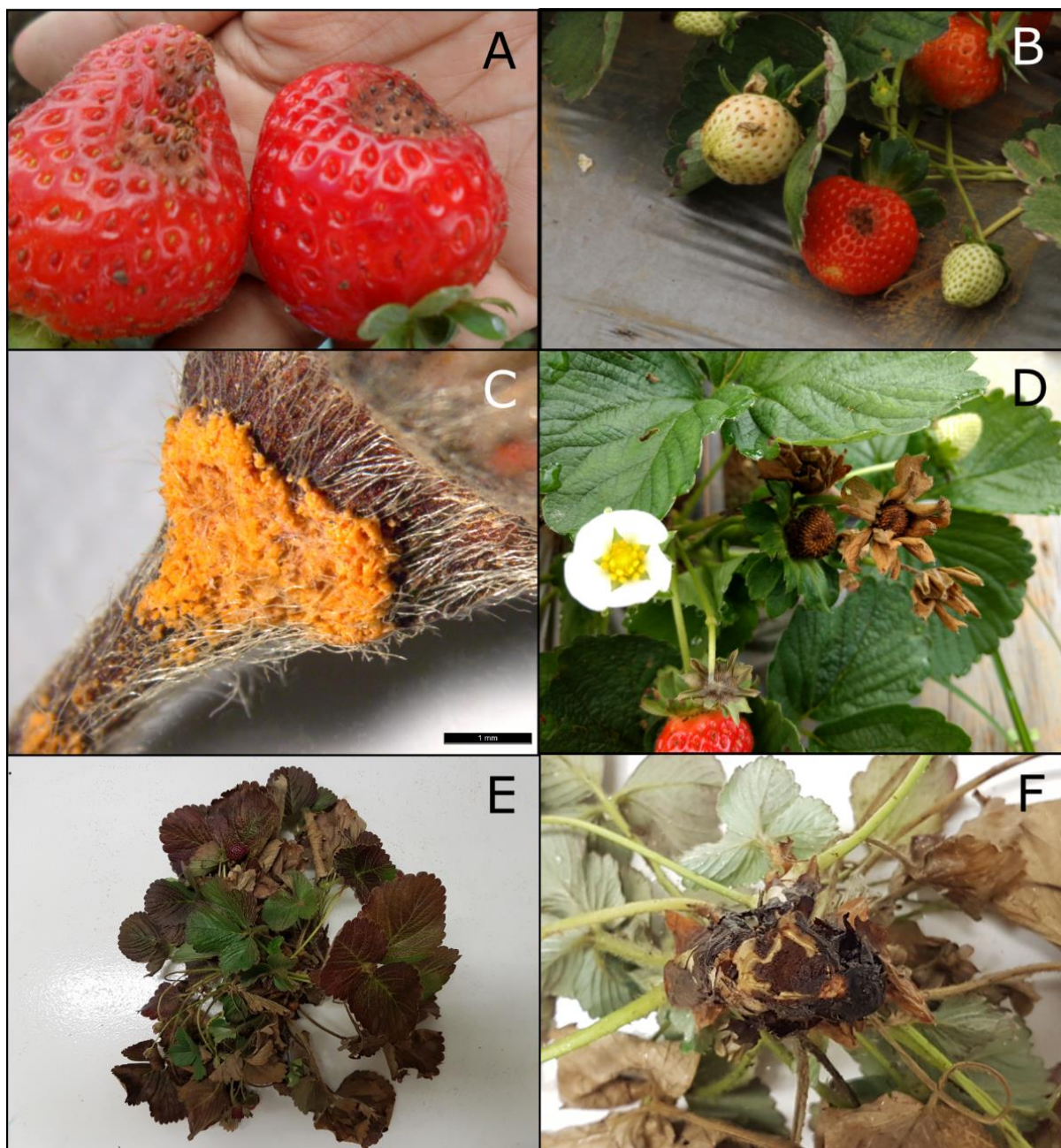
O controle é principalmente pelo emprego de genótipos resistentes, mudas sadias, aplicação de fungicidas e manejo cultural. No DF, Kasoski et al (2001) estudaram a eficiência de fungicidas no controle da flor preta e Coelho *et al* (2008) o manejo cultural.

### **1.5 Sintomatologia**

Os sintomas são diversos a depender do local de infecção na planta. Em frutos ocorrem sintomas de antracnose, que é caracterizado por lesões circulares, necróticas e deprimidas. Inicialmente as lesões são pequenas, porém podem aumentar de dimensão e coalescer. Não raramente é possível encontrar frutos totalmente necrosados (Howard *et al.*, 1992; Maas, 1998).

Quando o fungo infecta a região da coroa, os sintomas são manchas marrons no sistema vascular na altura do rizoma e com o avanço da doença as folhas tornam-se marrons, há murcha da planta e finalmente sua morte. Popularmente esse conjunto de sintomas é chamado no Brasil de “mancha chocolate” (Howard *et al.*, 1992; Maas, 1998 ; Reis & Costa, 2011).

As flores atacadas tornam-se necróticas e assumem coloração enegrecida, por isso esse sintoma é chamado popularmente de “flor preta”. Geralmente a infecção ocorre em diversas flores de uma inflorescência (Howard *et al.*, 1992; Maas, 1998 ; Reis & Costa, 2011). A figura 1 ilustra os sintomas encontrados durante as coletas desse trabalho.



**Figura 1:** Sintomas e sinais de antracnose em frutos (A e B), Flor preta (C e D) e Podridão da coroa (E e F). Em C é possível verificar a esporulação de *Colletotrichum* sp. em flor de morangueiro.

### 1.6 Etiologia da antracnose em fruto, flor preta e podridão da coroa

As doenças antracnose, flor preta e podridão da coroa são causadas por espécies fúngicas do gênero *Colletotrichum*, classificado no filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, ordem Glomerellales, família Glomerellaceae (MYCOBANK, 2018). Até o momento 19 espécies de *Colletotrichum* foram relatadas em morangueiro no mundo (Farr

& Rossman, 2018). No Brasil existem relatos de apenas quatro espécies de *Colletotrichum* em morangueiro, *C. acutatum*, *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* e *C. siamense*, sendo que somente a última espécie foi identificada por técnicas moleculares e características morfológicas. No DF foram relatados *C. acutatum* e *C. fragariae*, a partir de características morfológicas (Furlanetto *et al.*, 1992)

Atualmente, identificação precisa a nível de espécie em *Colletotrichum* é baseada em análise molecular e morfológica. Para identificação molecular, a região gênica ITS foi inicialmente utilizada como *barcode* devido a alta disponibilidade de sequências em bancos de dados e à facilidade de sequenciamento dessa região. Porém, a utilização apenas dessa região não é recomendado para grupos taxonômicos próximos, como espécies pertencentes ao mesmo complexo de espécies, pois há baixa variação entre nucleotídeos (SCHOCH *et al.*, 2012). Atualmente até oito regiões gênicas são utilizadas para a discriminação de espécies desse gênero. Todavia, três regiões gênicas são consideradas suficientes para a maioria das espécies, são elas: *ITS*, *GAPDH* e  *$\beta$ -tubulina*. Quanto a morfologia, as dimensões e formato dos conídios são as características mais utilizadas, assim como o formato e as dimensões do apressório (Damm *et al.*, 2012).

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta das amostras**

Frutos, flores e coroas apresentando sintomas típicos da infecção por *Colletotrichum* foram coletados em áreas produtoras de morango no Distrito Federal e nos estados de Goiás, Espírito Santo, São Paulo e Rio Grande do Sul, Brasil, entre os anos de 2017 e 2018. As amostras foram acondicionadas em recipientes plásticos e transportadas até o Laboratório de Micologia da Universidade de Brasília. Durante a coleta foram registrados o local de coleta e o tipo de sintoma e a cultivar de morangueiro.

### **2.2 Isolamento e armazenamento dos isolados**

#### **2.2.1 Obtenção dos isolados com sintomas de flor preta e antracnose**

O isolamento de *Colletotrichum* spp. a partir de frutos e flores com sintomas de antracnose e flor preta, respectivamente, foi realizado pelo método direto (Alfenas *et al.*, 2016), no qual conídios foram retirados dos tecidos das planta contendo sinais do patógeno e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA).

Frutos e flores assintomáticos ou sintomáticos sem a presença de estruturas reprodutivas do patógeno foram acondicionados em câmara úmida por cinco dias. Após esse período, as amostras contendo estruturas fúngicas foram submetidas ao isolamento direto. Para garantir a uniformidade genética dos isolados, as culturas foram obtidas a partir da ponta de uma única hifa.

#### **2.2.2 Obtenção dos isolados a partir de amostras com sintomas de podridão da coroa**

Devido à ausência de sinais do patógeno em plantas com sintomas de podridão da coroa, o isolamento dos fungos foi feito pelo método indireto (Alfenas *et al.*, 2016). Em câmara



de fluxo, foram retirados os tecidos externos da coroa do morangueiro, em seguida os tecidos que apresentavam lesões foram cortados em cubos de aproximadamente 5 mm de espessura. Foi realizada a desinfecção superficial com álcool 70% (1 min) e hipoclorito de sódio 2% (5 min). Após a desinfecção foi realizada a lavagem em água destilada esterilizada (ADE) três vezes consecutivas, seguida pela secagem em papel de filtro esterilizado. Posteriormente, os tecidos foram transferidos para placas de Petri contendo BDA. Após três dias, as colônias desenvolvidas foram repicadas para placa de Petri contendo BDA para obtenção das culturas a partir da ponta de uma única hifa.

#### 2.2.5 Armazenamento dos isolados

O armazenamento em água esterilizada, tradicionalmente conhecido como Método Castellani (Alfenas et al. 2016), foi realizado em culturas com aproximadamente sete dias de crescimento, das quais foram retirados seis discos de micélio de aproximadamente 5 mm de diâmetro e depositados em tubos de 2 ml contendo 1 ml de água esterilizada. O armazenamento em glicerol foi realizado da mesma forma, substituindo a água por glicerol a 10% esterilizado. Essas amostras foram depositadas na Coleção de Culturas de Fungos da Universidade de Brasília e mantidas a 17° C.

### **2.3 Extração do DNA genômico**

Os isolados foram cultivados durante sete dias em placas de Petri contendo BDA coberto com papel celofane esterilizado. Após o crescimento das colônias, o micélio foi removido com auxílio de um palito de madeira e colocado em microtubos de 1,5 ml contendo 30 µl de tampão Tris-EDTA (TE). A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega Inc.) conforme protocolo adaptado por Pinho et

al. (2012). A presença de DNA foi determinada por meio da eletroforese em gel de agarose a 1%. Após a confirmação, as amostras foram armazenadas a -20 °C para posterior utilização.

## 2.4 Amplificação e purificação de DNA

Para cada reação de PCR foram utilizados os seguintes reagentes: 6,25 µl de MyTaq, 0,3 µl de cada iniciador (senso e anti-senso), 1 µl de DNA genômico (25 ng/µl) e 4,25 µl de água ultrapura. Para a identificação prévia, todos os isolados foram amplificados e sequenciados com os iniciadores da região GAPDH (Tabela 1). Isolados representativos de cada espécie e diferentes sintomas foram selecionados para amplificação e sequenciamento do rDNA e da região β-tubulina (Tabela 1).

Foram utilizados diferentes parâmetros durante o ciclo da PCR para cada região gênica, a saber:

- **GAPDH:** Desnaturação inicial a 95°C por 1,5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.
- **rDNA:** Desnaturação inicial a 95°C por 1,5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 53°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.
- **β-tubulina:** Desnaturação inicial a 95°C por 1,5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em géis com 2% de agarose corados com corante fluorescente GelRed e visualizados sob luz UV para verificar o tamanho

e pureza das amplificações. Os produtos de PCR foram tratados com as enzimas Exonuclease I e Shrimp Alkaline Phosphatase para remoção dos resíduos de dNTPs e iniciadores seguindo o protocolo do fabricante (ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent - Thermo Fisher Scientific) e sequenciados pela Macrogen Inc., Coréia do Sul (<http://www.macrogen.com>). As sequências de nucleotídeos obtidas foram editadas com o software Geneious versão 11.1.5 (Kearse *et al.*, 2012). As sequências foram analisadas quanto a presença de posições ambíguas, as quais foram corrigidas manualmente com comparação das sequências senso e anti-senso.

## **2.5 Identificação prévia**

Para identificação inicial, a região parcial do gene *GAPDH* de todos os isolados foi amplificada e sequenciada. Os produtos de sequenciamento foram alinhados utilizando a estratégia G-INS-i, apropriada para alinhamento de genes com homologia global disponível no software de alinhamento múltiplo MAFFT (Kato & Standley, 2013). A matriz alinhada foi submetida ao algoritmo MedianNetwork (Bandelt *et al.*, 2000) disponível no software SplitsTree (Huson & Bryant, 2006) para determinação dos grupos filogenéticos. A partir dos resultados, foram selecionados isolados representativos de cada grupo de sintomas identificados para posterior sequenciamento das regiões genômicas adicionais  *$\beta$ -tubulina* e ITS e realização de análises filogenéticas posteriores.

## **2.6 Análises Filogenéticas**

Após sequenciamento das regiões adicionais, todas as fitas consenso geradas foram comparadas com sequências já depositadas no GenBank (Benson *et al.*, 2005) e Q-Bank (Bonants *et al.*, 2013) utilizando o algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponível online através da plataforma NCBI (National Center of Biotechnology Information) (Madden *et al.*, 1996) para aproximação da identidade taxonômica e identificação de possíveis contaminantes.

As sequências foram alinhadas utilizando a estratégia E-INS-i disponível no software MAFFT (Kato & Standley, 2013), indicada para alinhamento de regiões gênicas compostas de múltiplos domínios conservados (observado nas porções exônicas de marcadores codantes e porções dos marcadores ribossomais) e a presença de longos *gap*'s (presentes nas porções intrônicas e espaçadores dos marcadores ribossomais). Em todas as análises as regiões  *$\beta$ -tubulina*, ITS e *GAPDH* foram concatenadas no software Mesquite (Maddison & Maddison, 2018). Sequências representativas dos diferentes complexos dentro de *Colletotrichum* foram selecionadas com base no trabalho de Damm *et al.* (2012) e baixadas através do Genbank (Tabela 2). As reconstruções filogenéticas foram realizadas utilizando a otimização por Máxima Verossimilhança no software RaxML (8.2.9, Stamatakis 2014). Na análise, a busca pela melhor árvore foi realizada com o método *randomized, stepwise addition parsimony tree* sob o modelo GTR+GAMMA. O suporte dos ramos foi calculado com base em 1000 réplicas de bootstrap utilizando também o modelo GTR+GAMMA. Todas as análises foram realizadas na plataforma online CIPRES Science Gateway 3.1 (Miller *et al.* 2010).

O resultado das análises foi visualizado no software FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) e exportada para o software Inkscape (<http://www.inkscape.org/>), para edições gráficas. A espécie *C. orchidophilum* Damm, P.F. Cannon & Crous, foi utilizada como grupo externo (*outgroup*).

## **2.7 Caracterização morfológica**

Foram avaliadas as dimensões e o formato dos conídios de três isolados representativos de espécies distintas, previamente identificadas por análises filogenéticas. Foi coletado micélio superficial obtido à partir de cultura em meio BDA 7 dias após a repicagem, com auxílio de uma agulha previamente esterilizada, e depositado em solução de lactoglicerol e fixadas entre lâmina e lamínula para observação em microscópio de luz e visualização das

estruturas. As mensurações e imagens de 50 conídios foram obtidas no microscópio de luz Leica DM 2500, provido de câmara digital Leica DFC 490, acoplada a um computador com o programa LeicaQwin – Plus.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Caracterização molecular

Foram obtidos 52 isolados de *Colletotrichum* de morango, todos depositados na Coleção de Culturas de Fungos da Universidade de Brasília. Esses isolados foram coletados em oito cidades de quatro estados brasileiros, como demonstrado na Tabela 3. A comparação das 52 sequências da região gênica *GAPDH* nos bancos de dados GenBank e Q-bank, comprovaram que todos os isolados de antracnose, flor preta e podridão da coroa em morangueiro pertencem ao gênero *Colletotrichum*. A árvore filogenética obtida com as sequências da região *GAPDH* não separou os isolados em clados distintos, por isso foi gerada uma rede de haplótipos (Figura 2). A rede de haplótipos identificou quatro haplótipos distintos. O haplótipo 1, com maior número de representantes é constituído por 31 isolados. O haplótipo 2, agrupa 19 isolados e os haplótipos 3 e 4 são constituídos por um isolado cada.

A partir da rede de haplótipos, nove isolados representativos foram selecionados, levando em consideração o sintoma e a posição filogenética, para a identificação precisa da espécie. A quantidade de isolados selecionados por haplótipo foram: três no haplótipo 1, quatro no haplótipo 2, um no haplótipo 3 e um no haplótipo 4.

Os nove isolados juntamente com 145 espécimes selecionados na literatura (Tabela 2) foram utilizados para inferir a árvore com as sequências das regiões ITS, *GAPDH* e  *$\beta$ -tubulina*.

Os isolados 2058, 2056, 1989, e 1985 agruparam com isolados da espécie *Colletotrichum nymphaeae*. O isolado 2031 agrupou com espécimes de *C. tamarilloi*. Os isolados 1957, 1966, 1960 e 1959 agruparam com isolados de *C. limeticola*, *C. paranaense* e *C. costaricense*, sendo que os três primeiros formam um clado monofilético, como pode ser observado na Figura 3.

### 3.2 Caracterização morfológica dos isolados

Os isolados da espécie *Colletotrichum nymphaeae* apresentaram conídios unicelulares, hialinos, elipsoidais a cilíndricos, arredondados nas extremidades e, em alguns casos, agudos, com tamanho (representados no presente trabalho da seguinte forma: comprimento mínimo – comprimento máximo × largura mínima – largura máxima) 6,0 – 16,0 × 2,0 – 7,5 µm.

O isolado da espécie *C. tamarilloi* apresenta conídios unicelulares, hialinos, retos, com extremidades arredondadas, ou às vezes com uma ou duas extremidades agudas, de tamanho 10,0 – 18,0 × 3,0 – 6,5 µm.

Os isolados de *Colletotrichum* sp. apresentam conídios de tamanho 6,0 – 11,5 × 2,0 – 4,0 µm. Assim como *C. tamarilloi*, os conídios são hialinos, asseptados, retos, com extremidades arredondadas, as vezes com uma ou duas extremidades agudas.

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização molecular

Foi realizada a identificação precisa de duas espécies associadas a antracnose no Distrito Federal e demais regiões geográficas amostradas, *C. nymphaeae* e *C. tamarilloi*. Além disso, *C. nymphaeae* foi encontrada em Goianópolis – GO e Brazlândia – DF. Enquanto *C. tamarilloi* foi encontrada apenas em Atibaia – SP. Parte dos isolados foram agrupados com três espécies, *C. limeticola*, *C. paranaense* e *C. costaricense*. Os isolados que agruparam com *C. limeticola*, *C. paranaense* e *C. costaricense*, foram encontrados apenas em Brazlândia - DF.

*Colletotrichum nymphaeae* é uma espécie polífaga relatada em 20 hospedeiras pertencentes a 14 famílias botânicas distintas (Farr & Rossman, 2018). Há relatos dessa espécie causando doenças em goiabeira (*Psidium guajava*), Maçã (*Malus pumila* e *M. domestica*) no Brasil (Bragança *et al.*, 2016). Além disso, já foi relatada causando antracnose e podridão da coroa no morangueiro na Austrália, Colômbia, Costa Rica, Dinamarca, Espanha, Estados Unidos da América, França, Irã, Israel, Itália, Portugal, Quênia, Reino Unido e Suíça (Baroncelli *et al.*, 2015a ; Baroncelli *et al.*, 2015b ; Munir *et al.*, 2016 ; Shivas *et al.*, 2016 ; Karimi *et al.*, 2017). Ainda não há relatos dessa espécie causando doenças em morangueiro no país, portanto esse é o primeiro relato de *C. nymphaeae* no morangueiro no Brasil.

Ainda é possível ressaltar que essa espécie foi encontrada causando sintomas de antracnose em frutos e de flor preta no morangueiro. Levando em consideração que *C. nymphaeae* é uma espécie pertencente ao complexo *C. acutatum*, esse dado condiz com a informação de que no Brasil, a flor preta e a antracnose podem ser causadas por *C. acutatum* sensu lato (Furlanetto *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 2005; Coelho *et al.*, 2008; Reis & Costa, 2011; Moreira *et al.*, 2014).

*Colletotrichum tamarilloi* foi descrita recentemente em associação com *Cyphomandra betacea* (= *Solanum betaceum*, Solanaceae) na Colômbia e no Equador (Damm *et al.*, 2012 ;



Caicedo *et al.*, 2017). Dessa forma, esse é o primeiro relato de *C. tamarilloi* causando doença em morangueiro no mundo.

Os isolados 1957, 1960, 1966 e 1959 de *Colletotrichum* sp., agruparam-se com três espécies distintas, *C. limeticola*, *C. paranaense* e *C. costaricense*, sendo que os três taxa formaram um clado monofilético (Figura 3). Devido ao baixo valor de *bootstrap* não é possível afirmar a identificação precisa dos isolados. Para solucionar esse grupo é necessário o sequenciamento de outras regiões gênicas.

Assim como *C. tamarilloi*, *C. limeticola* é uma espécie descrita recentemente e relatada apenas nos Estados Unidos da América e em Cuba (Damm *et al.*, 2012) e restrita a plantas do gênero *Citrus*, sendo *Ci. aurantifolia* e *Ci. medica* as duas espécies de hospedeiras relatadas (Damm *et al.*, 2012, Guarnaccia *et al.*, 2017). *Colletotrichum paranaense* C.A.D. Bragança & Damm foi descrita em 2016 no Brasil como patógeno de pequi ( *Caryocar brasiliense*), maçã (*Malus domestica*) e ameixeira (*Prunus domestica*). Ainda não há relatos da ocorrência dessa espécie em outros locais ou como patógeno de outras hospedeiras (Bragança *et al.*, 2016).

*Colletotrichum costaricense* Damm, P.F. Cannon & Crous foi descrita em 2012 causando doença em plantas de *Coffea* sp. na Costa Rica, não havendo relato em outros países ou hospedeiras (Damm *et al.*, 2012).

Nenhuma dessas três espécies foi associada ao morangueiro até o momento. Portanto, o sequenciamento de regiões gênicas adicionais deve ser realizado para a identificação precisa dos isolados 1957, 1959, 1960, e 1966.

#### **4.2 Caracterização morfológica**

A caracterização morfológica de *C. nymphaeae* foi ligeiramente variável com relação a descrição original feita por Aa (1978). A forma do conídio foi semelhante: tanto os descritos

nesse estudo, quanto os da descrição original são unicelulares, hialinos, elipsoidais a cilíndricos, arredondados nas extremidades e, em alguns casos, agudos (Figura 4). Houve variação quanto o tamanho dos conídios, sendo os descritos no presente trabalho menores quanto ao comprimento e mais variável quanto a largura ( $6,4 - 15,78 \times 2,2 - 7,31 \mu\text{m}$ ), porém havendo sobreposição dos valores, que o trabalho de descrição original ( $11,8 - 23,0 \times 4,2 - 5,6 \mu\text{m}$ ). Discrepâncias quanto a forma e ao tamanho dos conídios foram relatados por Damm *et al.* (2012). Essas diferenças morfológicas apresentadas no presente trabalho e nos trabalhos de referência demonstram a dificuldade de identificação do agente causal para essa doença baseando-se apenas em caracteres morfológicos (Aa, 1978 ; Damm *et al.*, 2012).

Para *C. tamarilloi*, a caracterização morfológica foi semelhante, com certa variação quanto comparado com a descrição original realizada por Damm *et al.* (2012). A forma foi variável, pois os conídios observados no presente trabalho apesar de serem unicelulares, hialinos e retos, possuem divergência quanto a forma das extremidades (Figura 5). Os conídios descritos no trabalho original possuem extremidades principalmente agudas e em alguns casos, uma ou as duas extremidades podem ser arredondadas. Já os observados no presente trabalho tem como padrão extremidades arredondadas e em alguns casos, uma ou as duas extremidades agudas, às vezes apresentam constrição na região mediana. Quanto ao tamanho dos conídios é possível afirmar que os resultados obtidos nesse trabalho ( $10,1 - 17,9 \times 3,4 - 6,3 \mu\text{m}$ ) condizem com os relatados na descrição original da espécie ( $8,5 - 15 \times 2,5 - 4,5 \mu\text{m}$ ). A diferença na morfologia do conídio reforça a dificuldade de utilizar apenas caracteres morfológicos como forma de identificação das espécies fúngicas causadoras de antracnose, flor preta ou podridão da coroa em morangueiro (Damm *et al.*, 2012).

Como parte dos isolados agrupou com três diferentes espécies de *Colletotrichum* é plausível realizar a comparação da morfologia de tais espécimes com as espécies em questão. No trabalho da descrição original de *C. limeticola* de Damm *et al.* (2012), o conídio é descrito

como hialino, liso, unicelular, reto, às vezes pouco flexuoso, cilíndrico com uma extremidade arredondada e uma levemente aguda ou truncada, ou ambas extremidades levemente agudas e suas medidas são:  $10 - 20 \times 3.5 - 4,5 \mu\text{m}$ . Já o conídio de *C. costaricense* é descrito por Damm *et al.* (2012) como hialino, liso, unicelular, reto, cilíndrico, com ambas extremidades agudas, com medidas  $9 - 28 \times 3 - 4,5 \mu\text{m}$ . Por sua vez, o conídio de *C. paranaense* é descrito por Bragança *et al.*(2016) como hialino, liso, unicelular, reto, cilíndrico, às vezes levemente constricto no meio, ambas extremidades agudas ou uma extremidade arredondada e medidas  $4 - 22.5 \times 2 - 5 \mu\text{m}$ . Os isolados observados no presente trabalho possuem conídios hialinos, unicelulares, lisos, retos, geralmente uma extremidade aguda e outra arredondada, ocorrendo casos das duas extremidades serem agudas ou arredondadas, as medidas são  $6,4 - 11,6 \times 2,2 - 4,2 \mu\text{m}$  (Figura 6). Quando comparados os dados da morfologia dos isolados obtidos nesse trabalho com os dados das três espécies próximas, percebe-se que há grande sobreposição das medidas dos conídios, assim como grande semelhança na forma. Outros caracteres morfológicos, como formato e dimensões do apressório, não analisados no presente trabalho poderiam contribuir para melhor caracterização dos isolados. Dessa forma, não é possível afirmar a qual espécie os isolados do presente trabalho pertencem utilizando apenas como base os dados morfológicos. A caracterização molecular com incorporação de outras regiões gênicas, é essencial.

## 5 CONCLUSÕES

- Nas regiões geográficas amostradas, os sintomas de antracnose em frutos e flor preta do morangueiro são causados por *Colletotrichum nymphaeae* e *Colletotrichum* sp. enquanto podridão da coroa do morangueiro está associada ao *Colletotrichum* sp. Não foi possível estabelecer relação entre *C. tamarilloi* e o sintoma em morangueiro devido a falta de informação durante a coleta.
- Esse é o primeiro relato de *C. nymphaeae* como agente etiológico da antracnose em morangueiro no Brasil;
- *Colletotrichum tamarilloi* é relatado pela primeira vez como agente etiológico da antracnose em morangueiro no Brasil e no mundo;
- *Colletotrichum tamarilloi* e *Colletotrichum* sp. foram encontrados somente em Atibaia –SP e Brazlândia-DF, respectivamente, enquanto *C. nymphaeae* foi identificado em Brazlândia – DF e Goianápolis – GO;

## Referências bibliográficas

- Aa, van der H.A. (1978) A leaf spot disease of *Nymphaea alba* in the Netherlands. **Netherlands Journal of Plant Pathology** 84: 109-115.
- Alfenas, A.C.; Ferreira, F.A.; Mafía, R.G., Gonçalves, R.C. (2016) Isolamento de fungos fitopatogênicos. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: 2ª Ed. UFV.
- Antunes L.E.C., Carvalho G.L., Santos A.M. (2011) A cultura do morango. 2. ed. rev. e ampl. – Brasília, DF, **Embrapa Informação Tecnológica** p. 52.
- Bandelt H.J., Macaulay V., Richards M. (2000) Median networks: speedy construction and greedy reduction, one simulation, and two case studies from human mtDNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 16: 8-28.
- Baroncelli, R., Sarrocco, S., Zapparata, A., Tavarini, S., Angelini, L.G., Vannacci, G. (2015). Characterization and epidemiology of *Colletotrichum acutatum* sensu lato (*C. chrysanthemi*) causing *Carthamus tinctorius* anthracnose. **Plant Pathology** 64: 375-384.
- Baroncelli, R., Zapparata, A., Sarrocco, S., Sukno, S.A., Lane, C.R., Thon, M.R., Vannacci, G., Holub, E., Sreenivasaprasad, S. (2015) Molecular diversity of anthracnose pathogen populations associated with UK strawberry production suggests multiple introductions of three different *Colletotrichum* species. **Plos One** 10: 1-21.,
- Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Wheeler D.L. (2005) GenBank. **Nucleic Acids Research** 33.
- Bi Y., Guo W., Zhang G. J., Liu S. C., Chen Y. (2017) First report of *Colletotrichum truncatum* causing anthracnose of strawberry in China. **Plant Disease** 101: 832.
- Bonants P., Edema M., Robert V. (2013) Q-bank, a database with information for identification of plant quarantine plant pest and diseases. **EPPO-QBOL Conference**.
- Braganca, C.A.D., Damm, U., Baroncelli, R., Massola Jr. N.S., and Crous, P.W. (2016) Species of the *Colletotrichum* complex associated with anthracnose diseases of fruit in Brazil. **Fungal Biology** 120: 547-561.
- Caicedo, J.D., Lalangui, K.P., Pozo, A.N., Cevallos, P.A., Arahana, V.S., and Mendez, K.S. (2017) Multilocus molecular identification and phylogenetic analysis of *Colletotrichum tamarilloi* as the causal agent of Tamarillo (*Solanum betaceum*) anthracnose in the Ecuadorian highlands. **European Journal of Plant Pathology** 148: 983-996.
- Cannon P.F., Damm U., Johnston P.R., Weir B.S. (2012) *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology** 73:181-213.
- Capobiango N.P., Pinho D.B., Zambolim L., Pereira O.L., Lopes U.P. (2016) Anthracnose on strawberry fruits caused by *Colletotrichum siamense* in Brazil. **Plant Disease** 1121:859.
- Coelho M.V.S., Palma F.R., Café-Filho A.C. (2008) Management of strawberry anthracnose by choice of irrigation system, mulching material and host resistance. **International Journal of Pest Management** 54: 347-354.

Damm U., Cannon P., Woudenberg J., Crous P. (2012) The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology** 73: 37-113.

FAOSTAT. Área colhida, rendimento e produção nos principais países produtores de morango. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 28 jun. 2018.

Farr D.F., Rossman A.Y. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Disponível em: <<https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>>. Acesso em: 30 de jun. 2018.

Furlanetto C., Café Filho A.C., Tomita, C.K., Cavalcanti, M. (1996). Doenças do morangueiro e aspectos da produção no Distrito Federal. *Horticultura Brasileira* 14 (2): 218-220.

Freeman S., Katan T. (1997) Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. **Phytopathology** 87: 516-521.

Guarnaccia V., Groenewald J.Z., Polizzi G., and Crous P.W. (2017) High species diversity in *Colletotrichum* associated with citrus diseases in Europe. **Persoonia** 39: 32-50.

Henz G.P., Araujo T.M., Pereira S.F. (2009) Produção de Morango no Distrito Federal. Brasília-DF. **Embrapa-CNPq**.

Howard C., Albrechts E. (1983) Black leaf spot phase of strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Disease** 67: 1144-1156.

Howard C.M., Maas J., Chandler C., Albrechts E. (1992) Anthracnose of strawberry caused by the *Colletotrichum* complex in Florida. **Plant Disease** 76: 976-981.

Huson D.H., Bryant D. (2006) Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies, **Molecular Biology and Evolution** 23: 254-267. Disponível em: <[www.splitstree.org](http://www.splitstree.org)>.

Jayawardena R.S., Huang J.K., Jin B.C., Yan J.Y., Li X.H., Hyde K.D., Bahkali A.H., Yin S.L., Zhang G.Z. (2016) An account of *Colletotrichum* species associated with strawberry anthracnose in China based on morphology and molecular data. **Mycosphere** 7: 1147-1163.

Karimi, K.; Ahari, A.B.; Arzanlou, M.; Amini, J.; Pertot, I.; and Rota-Stabelli, O. (2017) Application of the consolidated species concept to identify the causal agent of strawberry anthracnose in Iran and initial molecular dating of the *Colletotrichum acutatum* species complex. **European Journal of Plant Pathology** 147: 375-387.

Katoh K., Standley D.M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution** 30:772–780.

Kim D., Gang G., Jeon C., Kang N.J., Lee S., Kwak Y. (2016) Epidemiology and control of strawberry bacterial angular leaf spot disease caused by *Xanthomonas fragariae*. **Plant Pathology Journal** 32: 290-299.

Koski R.M., Furlanetto C., Tomita C. K., Café Filho A.C. (2001). Efeito de fungicidas em *Colletotrichum acutatum* e controle da antracnose do morangueiro. *Fitopatologia Brasileira* 26: 662-666.

Louws F., Ridge G., Harrison J. (2014) Anthracnose crown rot of strawberry. **NC State Extension Publications**. Disponível em: <<https://content.ces.ncsu.edu/anthracnose-crown-rot-of-strawberry>>. Acesso em: 30 de jun. de 2018.

Maas J.L. (1998) Compendium of Strawberry Diseases. **American Phytopathological Society** (APS Press).

Madden T.L., Tatusov R.L. Zhang, J. (1996) Applications of network BLAST server **Methods Enzymology** 266: 131-141.

Maddison W.P., Maddison D.R. (2018). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.40. Disponível em:<<http://mesquiteproject.org>>.

Mexia A., Nunues A.P., Cicílio A., Mateus C., Andrade C.S., Figueiredo E., Valério E., Salvado E., Sequeira J.C., Reis L.G., Sousa M.B., Lopes M.C., Palha M.G., Ferreira M.A., Albano S., Curado T. (2005) Manual do Morangueiro. **Projecto PO AGRO DE&D** 193.

Miller M.A., Pfeiffer W., Schwartz T. (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. **Proceedings of the 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**: 1–8.

Moreira L.M., Costa H., Ruaro L., Mio L.L.M.D. (2014) Doenças do morangueiro. In: Zawadneak MaC, Schuber JM, Móggor ÁF, eds. Como Produzir Morangos. Curitiba: UFPR, 159-194.

Munir M., Amsden B., Dixon E., Vaillancourt L. Ward Gauthier N.A. (2016) Characterization of Colletotrichum species causing bitter rot of apple in Kentucky orchards. **Plant Disease**. 100: 2194-2203.

MYCOBANK. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/BioLMIcs.aspx?TableKey=14682616000000067&Rec=33692&Fields=All>>. Acesso em: 30 de jun. 2018.

Pedroso C.A., Café Filho, A.C. (2004). Ocorrência de Pestalotiopsis longisetula em morango no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira** 29: S133 (Abstract).

Poling. E.B. (2008) Anthracnose on strawberry: its etiology, epidemiology, and pathology, together with management strategies for strawberry nurseries: introduction to the workshop. **Hortscience** 43: 59-65.

Reis A., Costa H. (2011) Principais Doenças do Morangueiro no Brasil e seu Controle. **Circular Técnica**.

Reisser Jr C., Antunes L.E.C., Aldrighi M., Vignolo G. (2014) Panorama do cultivo de morangos no Brasil. **Hostifrúti**.

Samtani J.B., Johnson C.S., Flanagan R., Starke K., Poling B., Martin R. (2017) Mixed infection of strawberry mottle virus and strawberry mild yellow edge virus in the southeastern United States. **Virginia Tech**.

Schoch, C. L. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 109: 6241–6246.

Shivas R.G., Tan Y.P., Edwards J., Dinh Q., Maxwell A., Andjic V., Liberato J.R., Anderson C., Beasley D.R., Bransgrove K., Coates L.M., Cowan K., Daniel R., Dean J.R., Lomavatu M.F., Mercado-Escueta D., Mitchell R.W., Thangavel R., Tran-Nguyen L.T.T., Weir, B.S. (2016) *Colletotrichum* species in Australia. **Australas. Plant Pathology** 45: 447-464.

Stamatakis A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics** 30:1312–1313.

Tanaka M.A.S., Betti J.A., Kimati H. (2005) Doenças do morangueiro (*Fragaria x ananassa*). In: Kimati H., Amorim L., Bergamin Filho A., Camargo L., Rezende J., eds. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 489-499.

Tanaka M.A.S., Passos F.A. (2002) Caracterização patogênica de *Colletotrichum acutatum* e *C. fragariae* associados à antracnose do morangueiro. **Fitopatologia Brasileira** 27: 484-488.

Teixeira M.A., Martins R.M.S., Vieira R. F., Vildoso C.I.A., Adami A.A.V., Ferreira A.C. (2014) *In vitro* identification and control of *Pestalotiopsis longisetula* fungus, pathogen of the strawberry crop. **Revista Agrogeoambiental** 7: 59-65.

Trejo-Téllez L.I., Gómez-Merino F.C. (2014) Nutrient management in strawberry: effects on yield, quality and plant health. In: **Strawberries: Cultivation, Antioxidant Properties and Health Benefits**. cap. 11.

Ueno B. (1996) Antracnose do morangueiro ("flor preta") causada por *Colletotrichum acutatum*. **Informe de Pesquisa IAPAR** 119.

Ureña-Padilla A., Mackenzie S., Bowen B., Legard D. (2002) Etiology and population genetics of *Colletotrichum* spp. causing crown and fruit rot of strawberry. **Phytopathology** 92: 1245-1252.

Weir B.S., Damm U., Johnston P.R. (2012) The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology** 73:115–180.

Zebrowska J., Horthyński J., Cholewa T., Honcz K. (2006) Resistance to *Verticillium dahliae* (Kleb.) in the strawberry breeding lines. **Communications in Agricultural and Applied Biological Science** 71: 1031-1036.



## TABELAS

**Tabela 1.** Lista de iniciadores utilizados para amplificação de diferentes regiões gênicas dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Iniciador	Região gênica	Sequência do iniciador	Referência
T1_P1	$\beta$ -tubulina	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	(O'DONNELL & CIGELNIK, 1997)
Bt2b_P6	$\beta$ -tubulina	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	(GLASS & DONALDSON, 1995)
CYLTUB1R	$\beta$ -tubulina	AGTTGTCCGGACGGAAGAG	(CROUS <i>et al.</i> , 2006)
V9G	rDNA	TTACGTCCCTGCCCTTTGTA	(HOOG & GERRITS VAN DEN ENDE, 1998)
LR5	rDNA	TCCTGAGGGAAACTTCG	(VILGALYS & HESTER, 1990)
GDF1	GAPDH	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	(TEMPLETON <i>et al.</i> , 1992; GUERBER <i>et al.</i> , 2003)
GDR1	GAPDH	GGGTGGAGTCGTACTTGAGCATGT	(TEMPLETON <i>et al.</i> , 1992; GUERBER <i>et al.</i> , 2003)

**Tabela 2.** Números de acesso do GenBank das sequências de DNA de *Colletotrichum* spp. utilizados na análise filogenética. \* Espécime-tipo.

Espécie	Isolado	Hospedeiro	País	ITS	GAPDH	BTUB
<i>Colletotrichum acutatum</i>	CBS 127539	<i>Aspalathus linearis</i> , anthracnose on stems and leaves	África do Sul	JQ948377	JQ948708	JQ950028
	CBS 127540	Water that was used to irrigate <i>Aspalathus linearis</i> seedlings in a nursery	África do Sul	JQ948373	JQ948704	JQ950024
	CBS 14429	<i>Capsicum annuum</i> , fruit	Sri Lanka	JQ948401	JQ948732	JQ950052
	CBS 112996*	<i>Carica papaya</i>	Austrália	JQ005776	JQ948677	JQ005860
	IMI 216370	<i>Coffea arabica</i> , berry lesion	Tanzânia	JQ948398	JQ948729	JQ950049
	CBS 127602	<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> , fruit rot	Austrália	JQ948359	JQ948690	JQ950010
	CBS 111993	<i>Grevillea</i> sp.	Austrália	JQ948349	JQ948680	JQ950000
	CBS 112759	<i>Hakea sericea</i>	África do Sul	JQ948391	JQ948722	JQ950042
	CBS 129919	<i>Hoodia</i> sp.	África do Sul	JQ948370	JQ948701	JQ950021
	CBS 112990	<i>Leucadendron</i> sp., cv. Safari Sunset	África do Sul	JQ948360	JQ948691	JQ950011
	CBS 126505	<i>Lobelia</i> sp., cv. Blue Moon, leaf spots	Holanda	JQ948387	JQ948718	JQ950038
	CBS 36973	<i>Lupinus angustifolius</i>	Nova Zelândia	JQ948350	JQ948681	JQ950001
	CBS 115393	<i>Mimetes</i> sp.	África do Sul	JQ948365	JQ948696	JQ950016
	IMI 384175	<i>Nerium oleander</i> , leaf	Nova Zelândia	JQ948369	JQ948700	JQ950020
	CBS 127598	<i>Olea europaea</i>	África do Sul	JQ948363	JQ948694	JQ950014
	CBS 126506	<i>Phlox</i> sp., leaf spots	Holanda	JQ948388	JQ948719	JQ950039
	CBS 110735	<i>Pinus radiata</i>	África do Sul	JQ948354	JQ948685	JQ950005
	IMI 336479	<i>Pistacia vera</i> , pericarp	Austrália	JQ948367	JQ948698	JQ950018
	CBS 113006	<i>Protea cynaroides</i>	África do Sul	JQ948390	JQ948721	JQ950041
	CBS 128499	<i>Pyrus pyrifolia</i> , black spot on fallen, immature fruit	Nova Zelândia	JQ948368	JQ948699	JQ950019
<i>Colletotrichum australe</i>	CSL 287	<i>Statice</i> sp.	Reino Unido	JQ948389	JQ948720	JQ950040
	CBS 116478*	<i>Trachycarpus fortunei</i>	África do Sul	JQ948455	JQ948786	JQ950106
	CBS 131325	<i>Hakea</i> sp.	Austrália	JQ948456	JQ948787	JQ950107
<i>Colletotrichum brisbanense</i>	CBS 29267*	<i>Capsicum annuum</i>	Austrália	JQ948291	JQ948621	JQ949942
<i>Colletotrichum chrysanthemi</i>	IMI 364540	<i>Chrysanthemum coronarium</i> , leaf spot	China	JQ948273	JQ948603	JQ949924
	CBS 126518	<i>Carthamus</i> sp., twisted stem	Holanda	JQ948271	JQ948601	JQ949922

<i>Colletotrichum cosmi</i>	CBS 85373*	<i>Cosmos</i> sp., seed	Holanda	JQ948274	JQ948604	JQ949925	
<i>Colletotrichum costaricense</i>	CBS 33075*	<i>Coffea arabica</i> , cv. Typica, berry	Costa Rica	JQ948180	JQ948510	JQ949831	
<i>Colletotrichum cuscatae</i>	CBS 21178	<i>Coffea</i> sp., twig	Costa Rica	JQ948181	JQ948511	JQ949832	
	IMI 304802*	<i>Cuscuta</i> sp.	Dominica	JQ948195	JQ948525	JQ949846	
	CBS 128498	<i>Actinidia</i> sp., fruit rot of ripe fruit	Nova Zelândia	JQ948337	JQ948667	JQ949988	
	CBS 126523	<i>Berberis</i> sp., tips with black discolouration	Holanda	JQ948322	JQ948652	JQ949973	
	IMI 363003	<i>Camellia reticulata</i>	China	JQ948339	JQ948669	JQ949990	
	CBS 98169	<i>Coffea arabica</i> , branch	Angola	JQ948327	JQ948657	JQ949978	
	CBS 125970	<i>Cyclamen</i> sp., bulb, symptoms	Itália	JQ948341	JQ948671	JQ949992	
	CBS 128517	<i>Fiorinia externa</i> (elongate hemlock scale, insect)	Estados Unidos	JQ948292	JQ948622	JQ949943	
	IMI 345578	<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>	Nova Zelândia	JQ948334	JQ948664	JQ949985	
	CBS 129940	<i>Grevillea</i> sp.	Alemanha	JQ948335	JQ948665	JQ949986	
	IMI 384569	<i>Kalmia</i> sp.	Estados Unidos	JQ948340	JQ948670	JQ949991	
	CSL 473	<i>Liriodendron tulipifera</i>	Reino Unido	JQ948345	JQ948675	JQ949996	
	CSL 318	<i>Magnolia</i> sp.	Reino Unido	JQ948346	JQ948676	JQ949997	
	CBS 78686	<i>Malus sylvestris</i> , fruit	Itália	JQ948303	JQ948633	JQ949954	
	<i>Colletotrichum fioriniae</i>	CBS 125396	<i>Malus domestica</i> , fruit lesion	Estados Unidos	JQ948299	JQ948629	JQ949950
	CBS 127601	<i>Mangifera indica</i> , stem endophyte	Austrália	JQ948311	JQ948641	JQ949962	
	CBS 16786	<i>Myriophyllum spicatum</i> , submerged stem	Estados Unidos	JQ948324	JQ948654	JQ949975	
CBS 129946	<i>Olea europaea</i>	Portugal	JQ948342	JQ948672	JQ949993		
CBS 126509	<i>Parthenocissus</i> sp., cv. Disci, soft rot	Holanda	JQ948316	JQ948646	JQ949967		
CBS 125956	<i>Penstemon</i> sp., symptoms in the bottom part of the plant	Holanda	JQ948321	JQ948651	JQ949972		
CBS 29367	<i>Persea americana</i>	Austrália	JQ948310	JQ948640	JQ949961		
IMI 324991	<i>Piper nigrum</i>	Desconhecido	JQ948338	JQ948668	JQ949989		
CBS 126526	<i>Primula</i> sp., leaf spots	Holanda	JQ948323	JQ948653	JQ949974		
CBS 124958	<i>Pyrus</i> sp., fruit rot	Estados Unidos	JQ948306	JQ948636	JQ949957		
ATCC 12097	<i>Rhododendron</i> sp.	Estados Unidos	JQ948307	JQ948637	JQ949958		
CBS 20035	<i>Rubus</i> sp.	Estados Unidos	JQ948293	JQ948623	JQ949944		
CBS 49092	<i>Solanum lycopersicum</i>	Nova Zelândia	JQ948326	JQ948656	JQ949977		
CBS 129948	<i>Tulipa</i> sp.	Reino Unido	JQ948344	JQ948674	JQ949995		

	CBS 126508	<i>Vaccinium corymbosum</i> (blueberry), fruit rot	Holanda	JQ948315	JQ948645	JQ949966
	CBS 129947	<i>Vitis vinifera</i>	Portugal	JQ948343	JQ948673	JQ949994
<i>Colletotrichum godetiae</i>	CBS 79672	<i>Aeschynomene virginica</i>	Estados Unidos	JQ948407	JQ948738	JQ950058
	CBS 131332	<i>Agrimonia eupatoria</i> , leaf spot	Áustria	JQ948429	JQ948760	JQ950080
	CBS 126512	Bonzai, sunken brown spots on fruit	Holanda	JQ948412	JQ948743	JQ950063
	IMI 351248	<i>Ceanothus</i> sp.	Reino Unido	JQ948433	JQ948764	JQ950084
	CBS 16050	<i>Citrus aurantium</i> , fruit rot	Desconhecido	JQ948406	JQ948737	JQ950057
	CBS 13344*	<i>Clarkia hybrida</i> , cv. Kelvon Glory, seed	Dinamarca	JQ948402	JQ948733	JQ950053
	IMI 351262	<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>	Bélgica	JQ948422	JQ948753	JQ950073
	CBS 17159	<i>Juglans regia</i>	Desconhecido	JQ948405	JQ948736	JQ950056
	IMI 362149b	<i>Laurus nobilis</i> , dead fallen leaf	Reino Unido	JQ948427	JQ948758	JQ950078
	CBS 129942	<i>Mahonia aquifolium</i> , leaf spots	Alemanha	JQ948428	JQ948759	JQ950079
	CBS 19853	<i>Malus sylvestris</i> , fruit	Holanda	JQ948432	JQ948763	JQ950083
	CBS 15525	Nut shell	Desconhecido	JQ948410	JQ948741	JQ950061
	CBS 19332	<i>Olea europaea</i>	Grécia	JQ948415	JQ948746	JQ950066
	CBS 126520	<i>Parthenocissus</i> sp., leaf and stem spots	Holanda	JQ948426	JQ948757	JQ950077
	CBS 129911	<i>Podocarpus</i> sp.	África do Sul	JQ948434	JQ948765	JQ950085
	CBS 126522	<i>Prunus cerasus</i> , fruit, die-back	Holanda	JQ948411	JQ948742	JQ950062
	CBS 129934	<i>Prunus dulcis</i>	Israel	JQ948431	JQ948762	JQ950082
	IMI 376331	<i>Prunus</i> sp., fruit	Noruega	JQ948409	JQ948740	JQ950060
	CBS 129951	<i>Vitis</i> sp.	Reino Unido	JQ948430	JQ948761	JQ950081
	CBS 129917	<i>Schinus molle</i>	México	JQ948441	JQ948772	JQ950092
	CBS 129809	<i>Solanum betaceum</i> , fruit, anthracnose	Colômbia	JQ948439	JQ948770	JQ950090
	CBS 127561	<i>Ugni molinae</i> , twig, tip necrosis	Chile	JQ948442	JQ948773	JQ950093
<i>Colletotrichum guajavae</i>	IMI 350839*	<i>Psidium guajava</i> , fruit	Índia	JQ948270	JQ948600	JQ949921
<i>Colletotrichum indonesiense</i>	CBS 127551*	<i>Eucalyptus</i> sp.	Indonésia	JQ948288	JQ948618	JQ949939
<i>Colletotrichum johnstonii</i>	IMI 357027	<i>Citrus</i> sp.	Nova Zelândia	JQ948443	JQ948774	JQ950094
	CBS 128532*	<i>Solanum lycopersicum</i> , fruit rot	Nova Zelândia	JQ948444	JQ948775	JQ950095
<i>Colletotrichum kinghornii</i>	CBS 19835*	<i>Phormium</i> sp.	Reino Unido	JQ948454	JQ948785	JQ950105
<i>Colletotrichum laticiphilum</i>	CBS 112989*	<i>Hevea brasiliensis</i>	Índia	JQ948289	JQ948619	JQ949940
	CBS 129827	<i>Hevea brasiliensis</i> , leaf, anthracnose	Colômbia	JQ948290	JQ948620	JQ949941

<i>Colletotrichum limetticola</i>	CBS 11414*	<i>Citrus aurantifolia</i> , young twig	Estados Unidos, Florida	JQ948193	JQ948523	JQ949844
<i>Colletotrichum lupini</i>	IMI 351261	<i>Camellia</i> sp.	Reino Unido	JQ948177	JQ948507	JQ949828
	CBS 129944	<i>Cinnamomum verum</i>	Portugal	JQ948178	JQ948508	JQ949829
	IMI 375715	<i>Lupinus albus</i>	Austrália	JQ948161	JQ948491	JQ949812
	CBS 46676	<i>Manihot utilissima</i> , leaf	Ruanda	JQ948160	JQ948490	JQ949811
<i>Colletotrichum melonis</i>	CBS 15984*	<i>Cucumis melo</i> , peel of fruit	Brasil	JQ948194	JQ948524	JQ949845
<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	CBS 100064	<i>Anemone</i> sp.	Holanda	JQ948224	JQ948554	JQ949875
	CBS 126528	<i>Capsicum</i> sp.	Indonésia	JQ948219	JQ948549	JQ949870
	CBS 122110	<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> , cv. Redchief, fruit rot	Bulgária	JQ948235	JQ948565	JQ949886
	CBS 122111	<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> , cv. Redchief, fruit rot	Bulgária	JQ948236	JQ948566	JQ949887
	IMI 301119	<i>Fragaria vesca</i>	Quênia	JQ948266	JQ948596	JQ949917
	CBS 112202	<i>Fragaria</i> sp., fruit lesions	Espanha	JQ948234	JQ948564	JQ949885
	CBS 127612	<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>	Estados Unidos	JQ948230	JQ948560	JQ949881
	CBS 119294	<i>Leucaena</i> sp., fruit	México	JQ948205	JQ948535	JQ949856
	CBS 129926	Litter	Tailândia	JQ948216	JQ948546	JQ949867
	CBS 17351	<i>Mahonia aquifolium</i> , leaf	Itália	JQ948200	JQ948530	JQ949851
	IMI 370491	<i>Malus pumila</i> , fruit	Brasil	JQ948204	JQ948534	JQ949855
	CBS 51678	<i>Nuphar luteum</i> , leaf spot	Holanda	JQ948198	JQ948528	JQ949849
	CBS 52677*	<i>Nymphaea alba</i> , leaf	Holanda	JQ948199	JQ948529	JQ949850
	CBS 23149	<i>Olea europaea</i>	Portugal	JQ948202	JQ948532	JQ949853
	IMI 360386	<i>Pelargonium graveolens</i> , petiole, leaf and twig	Índia	JQ948206	JQ948536	JQ949857
	CSL 455	<i>Photinia</i> sp.	Reino Unido	JQ948217	JQ948547	JQ949868
	CBS 48282	<i>Protea</i> sp.	Austrália	JQ948213	JQ948543	JQ949864
	CBS 15827	<i>Phaseolus</i> sp.	Holanda	JQ948215	JQ948545	JQ949866
<i>Colletotrichum orchidophilum</i>	CBS 63180	<i>Ascocenda</i> sp.	Estados Unidos	JQ948152	JQ948482	JQ949803
	CBS 119291	<i>Cycnoches aureum</i>	Panamá	JQ948154	JQ948484	JQ949805
	CBS 63280*	<i>Dendrobium</i> sp.	Estados Unidos	JQ948151	JQ948481	JQ949802
	IMI 309357	<i>Phalaenopsis</i> sp.	Reino Unido	JQ948153	JQ948483	JQ949804
<i>Colletotrichum paxtonii</i>	CBS 50297		“West Indies”	JQ948286	JQ948616	JQ949937
	IMI 165753*		Santa Lúcia	JQ948285	JQ948615	JQ949936
	CBS 102054	<i>Phormium</i> sp., leaf spot	Nova Zelândia	JQ948448	JQ948779	JQ950099
	CBS 118201	<i>Phormium</i> sp., leaf	Nova Zelândia	JQ948449	JQ948780	JQ950100

<i>Colletotrichum pseudoacutatum</i>	CBS 43677*	<i>Pinus radiata</i>	Chile	JQ948480	JQ948811	JQ950131
<i>Colletotrichum pyricola</i>	CBS 128531*	<i>Pyrus communis</i> , fruit rot	Nova Zelândia	JQ948445	JQ948776	JQ950096
<i>Colletotrichum rhombiforme</i>	CBS 129953*	<i>Olea europaea</i>	Portugal	JQ948457	JQ948788	JQ950108
	CBS 131322	<i>Vaccinium macrocarpum</i>	Estados Unidos	JQ948458	JQ948789	JQ950109
<i>Colletotrichum salicis</i>	CBS 129972	<i>Acer platanoides</i> , symptomatic leaves	Estados Unidos	JQ948466	JQ948797	JQ950117
	CBS 46583	<i>Araucaria excelsa</i> , anthracnose and dieback	Estados Unidos	JQ948468	JQ948799	JQ950119
	IMI 345585	<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> , petiole spot	Nova Zelândia	JQ948476	JQ948807	JQ950127
	CBS 11314	<i>Malus domestica</i> , cv. Manks Küchenapfel, fruit	Alemanha	JQ948478	JQ948809	JQ950129
	CBS 18097	<i>Populus canadensis</i> , cv. Dorschkamp	Holanda	JQ948464	JQ948795	JQ950115
	CBS 128559	<i>Pyrus pyrifolia</i> , fruit rot	Nova Zelândia	JQ948471	JQ948802	JQ950122
	CBS 129356	<i>Rhododendron</i> sp.	Latvia, Riga	JQ948470	JQ948801	JQ950121
	CBS 19156	<i>Salix</i> sp.	Alemanha	JQ948461	JQ948792	JQ950112
	CBS 11514	<i>Solanum lycopersicum</i> , fruit	Alemanha	JQ948477	JQ948808	JQ950128
	CBS 23949	Desconhecido	Desconhecido	JQ948469	JQ948800	JQ950120
<i>Colletotrichum scovillei</i>	CBS 126529*	<i>Capsicum</i> sp.	Indonesia	JQ948267	JQ948597	JQ949918
	CBS 120708	<i>Capsicum annuum</i>	Tailândia	JQ948269	JQ948599	JQ949920
<i>Colletotrichum simmondsii</i>	CBS 122122*	<i>Carica papaya</i> , fruit	Austrália	JQ948276	JQ948606	JQ949927
	CBS 126524	<i>Cyclamen</i> sp., deformations and brown staining of stem tip	Holanda	JQ948281	JQ948611	JQ949932
	CBS 29567	<i>Fragaria</i> sp., fruit	Austrália	JQ948278	JQ948608	JQ949929
	IMI 313840	<i>Mangifera indica</i>	Austrália	JQ948284	JQ948614	JQ949935
	CBS 111531	<i>Protea cynaroides</i>	Estados Unidos	JQ948282	JQ948612	JQ949933
<i>Colletotrichum sloanei</i>	IMI 364297*	<i>Theobroma cacao</i> , leaf	Malaysia	JQ948287	JQ948617	JQ949938
<i>Colletotrichum tamarilloi</i>	CBS 129814*	<i>Solanum betaceum</i> , fruit, anthracnose	Colombia	JQ948184	JQ948514	JQ949835
	CBS 129811	<i>Solanum betaceum</i> , fruit, anthracnose	Colombia	JQ948185	JQ948515	JQ949836
	CBS 129954	<i>Solanum betaceum</i>	Colombia	JQ948188	JQ948518	JQ949839
<i>Colletotrichum walleri</i>	CBS 125472*	<i>Coffea</i> sp., leaf tissue	Vietnam	JQ948275	JQ948605	JQ949926
<i>Colletotrichum</i> sp	CBS 129820	<i>Passiflora edulis</i> , fruit, scab	Colombia	JQ948183	JQ948513	JQ949834
<i>Colletotrichum</i> sp	IMI 384185	<i>Caryocar brasiliense</i>	Brasil	JQ948191	JQ948521	JQ949842
<i>Colletotrichum</i> sp	CBS 101611	Fern	Costa Rica	JQ948196	JQ948526	JQ949847

<i>Colletotrichum sp</i>	CBS 129810	<i>Solanum betaceum</i> , fruit, anthracnose	Colombia	JQ948179	JQ948509	JQ949830
<i>Colletotrichum paranaense</i>	CBS 134729	-		KC204992	KC205026	KC205060
<i>Colletotrichum citri</i>	ZJUC41	-		KC293581	KC293741	KC293661
<i>Colletotrichum cairnsense</i>	BRIP 63642	<i>Capsicum annuum</i> (chili)	Austrália	KU923672	KU923704	KU923688
<i>Colletotrichum carthami</i>	SAPA100011	<i>Carthamus tinctorium</i>	Sapporo, Hokkaido, Japão	AB696998	-	AB696992

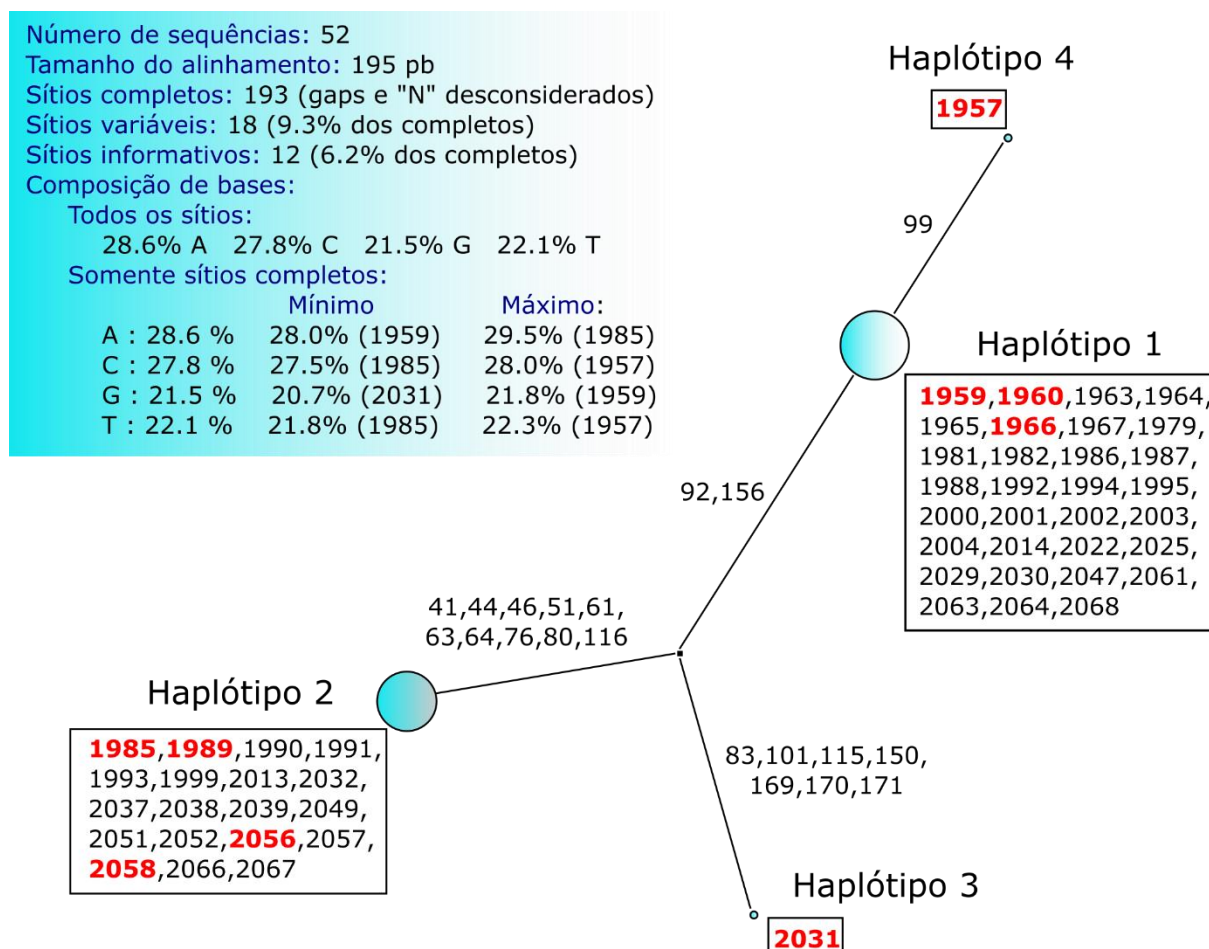
**Tabela 3.** Relação de isolados de *Colletotrichum* em morangueiro

<b>Haplótipo</b>	<b>Isolado</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Sintoma</b>
1	1959	Brazlândia - DF	Antracnose em fruto
	1960	Brazlândia - DF	Flor preta
	1963	Brazlândia - DF	Flor preta
	1964	Brazlândia - DF	Antracnose em fruto
	1965	Brazlândia - DF	Antracnose em fruto
	1966	Brazlândia - DF	Podridão da coroa
	1967	Brazlândia - DF	Antracnose em fruto
	1979	Brazlândia - DF	Antracnose em fruto
	1981	Brazlândia - DF	Antracnose em fruto
	1982	Brazlândia - DF	Antracnose em fruto
	1986	Brazlândia - DF	Flor preta
	1987	Brazlândia - DF	Flor preta
	1988	Brazlândia - DF	Antracnose em fruto
	1992	Brazlândia - DF	Flor preta
	1994	Brazlândia - DF	Flor preta
	1995	Brazlândia - DF	Antracnose em fruto
	2000	Brazlândia - DF	Antracnose em fruto
	2001	Brazlândia - DF	Antracnose em fruto
	2002	Brazlândia - DF	Antracnose em fruto
	2003	Brazlândia - DF	Antracnose em fruto
	2004	Brazlândia - DF	Antracnose em fruto
	2014	Brazlândia - DF	Flor preta
	2022	Brazlândia - DF	Antracnose em fruto
	2025	Castelo-ES	Antracnose em fruto
	2029	Domingos Martins-ES	Antracnose em fruto
	2030	Brazlândia - DF	Antracnose em fruto
	2047	Brazlândia - DF	Antracnose em fruto
	2061	Brazlândia - DF	Antracnose em fruto
	2063	Castelo-ES	Antracnose em fruto
	2064	Castelo-ES	Antracnose em fruto
2068	Domingos Martins-ES	Antracnose em fruto	
2	1985	Brazlândia - DF	Antracnose em fruto
	1989	Brazlândia - DF	Flor preta
	1990	Brazlândia - DF	Flor preta
	1991	Brazlândia - DF	Flor preta
	1993	Brazlândia - DF	Antracnose em fruto
	1999	Brazlândia - DF	Antracnose em fruto
	2013	Brazlândia - DF	Podridão da coroa
	2032	Padre Bernardo-GO	Antracnose em fruto
	2037	São Francisco de Paula-RS	Antracnose em fruto
	2038	Padre Bernardo-GO	Antracnose em fruto
	2039	Brazlândia - DF	Flor preta



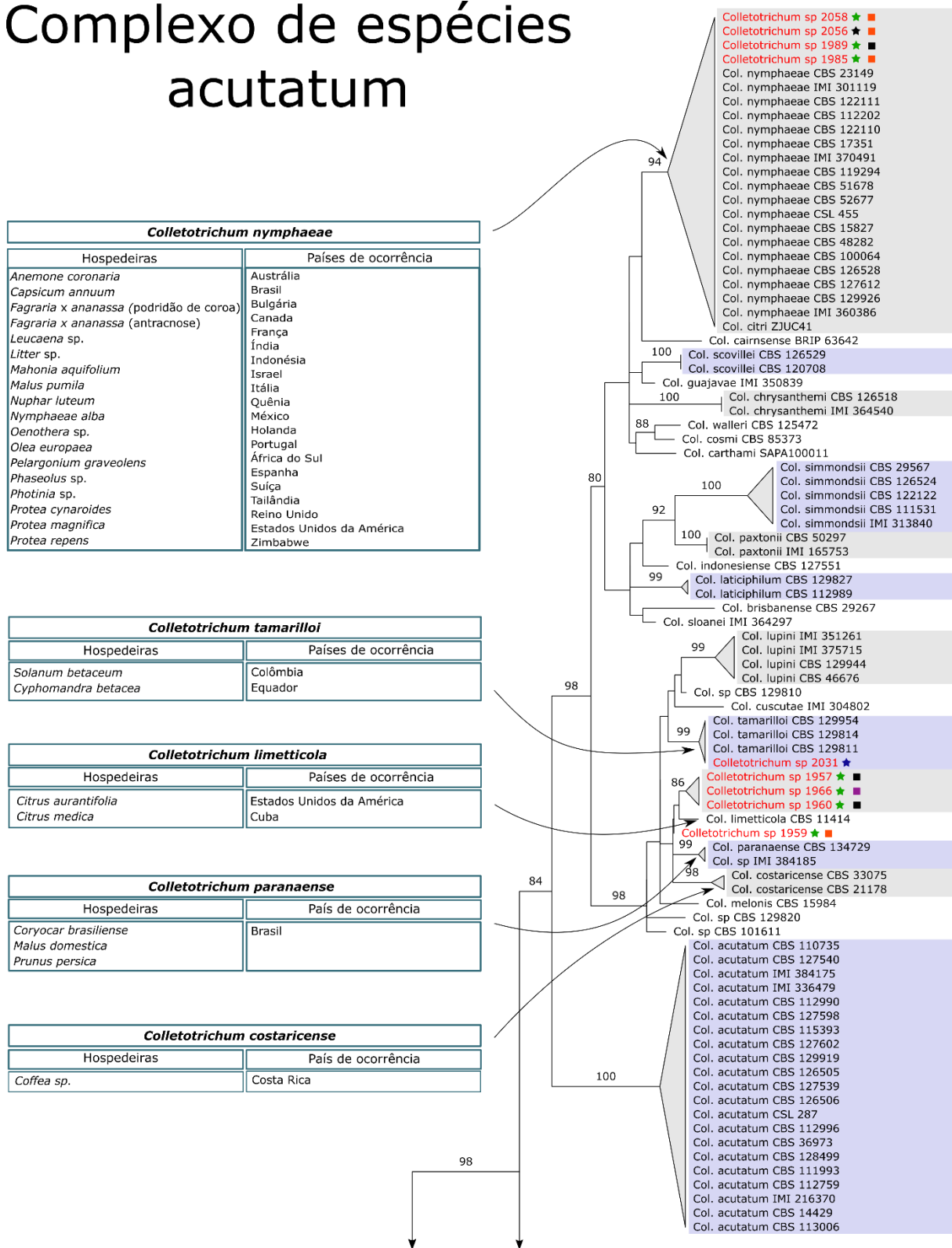
	2049	Padre Bernardo-GO	Antracnose em fruto
	2051	Recanto das Emas-DF	Antracnose em fruto
	2052	Recanto das Emas-DF	Antracnose em fruto
2	2056	Goianápolis-GO	Antracnose em fruto
	2057	Padre Bernardo-GO	Antracnose em fruto
	2058	Brazlândia - DF	Antracnose em fruto
	2066	Brazlândia - DF	Antracnose em fruto
	2067	Padre Bernardo-GO	Antracnose em fruto
3	2031	Atibaia-SP	
4	1957	Brazlândia - DF	Flor preta

## FIGURAS



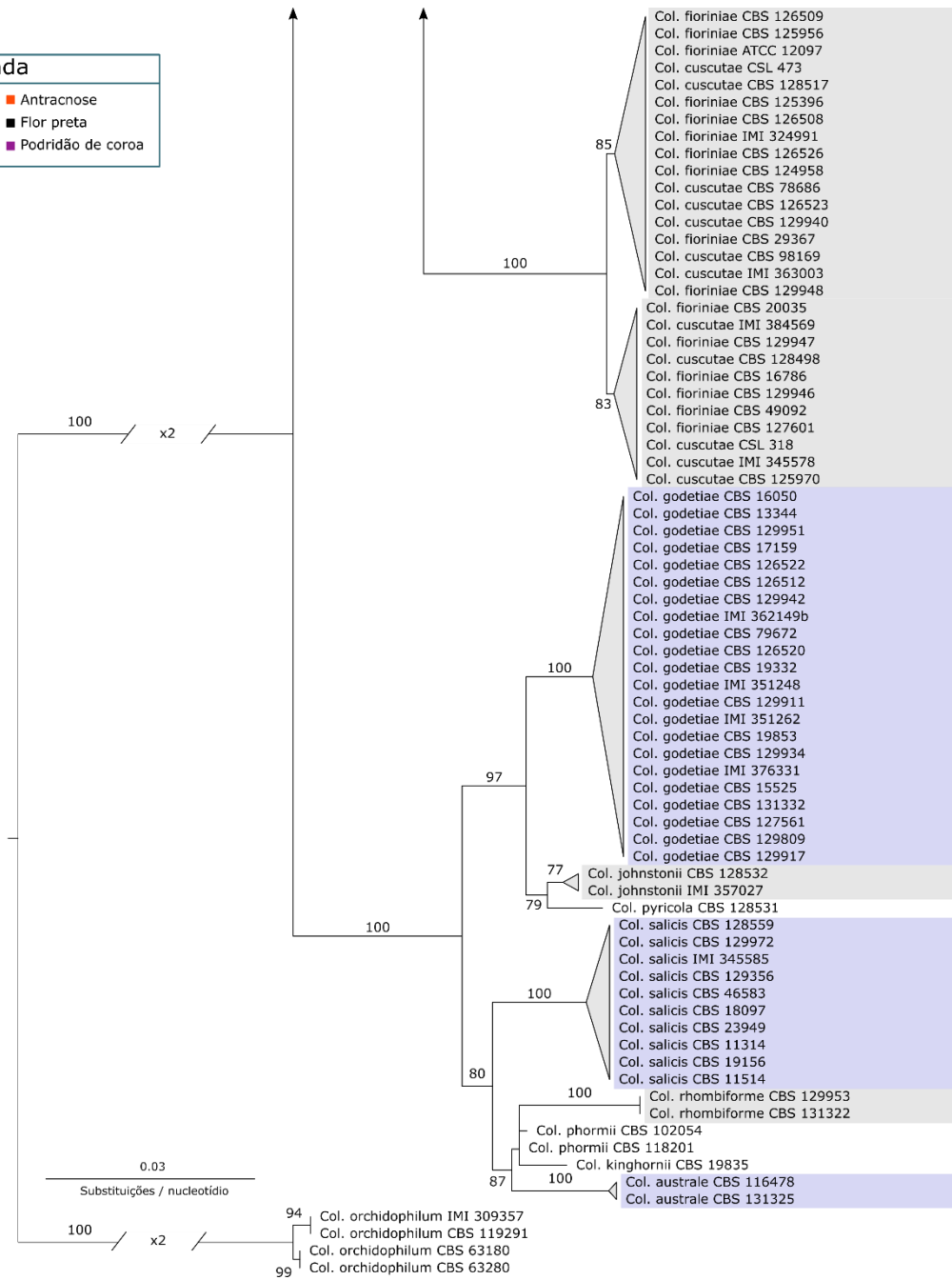
**Figura 2:** Rede de haplótipos baseada em seqüências da região gênica GAPDH. Destacados em vermelho os isolados escolhidos para seqüenciamento das regiões gênicas  $\beta$ -tubulina e ITS.

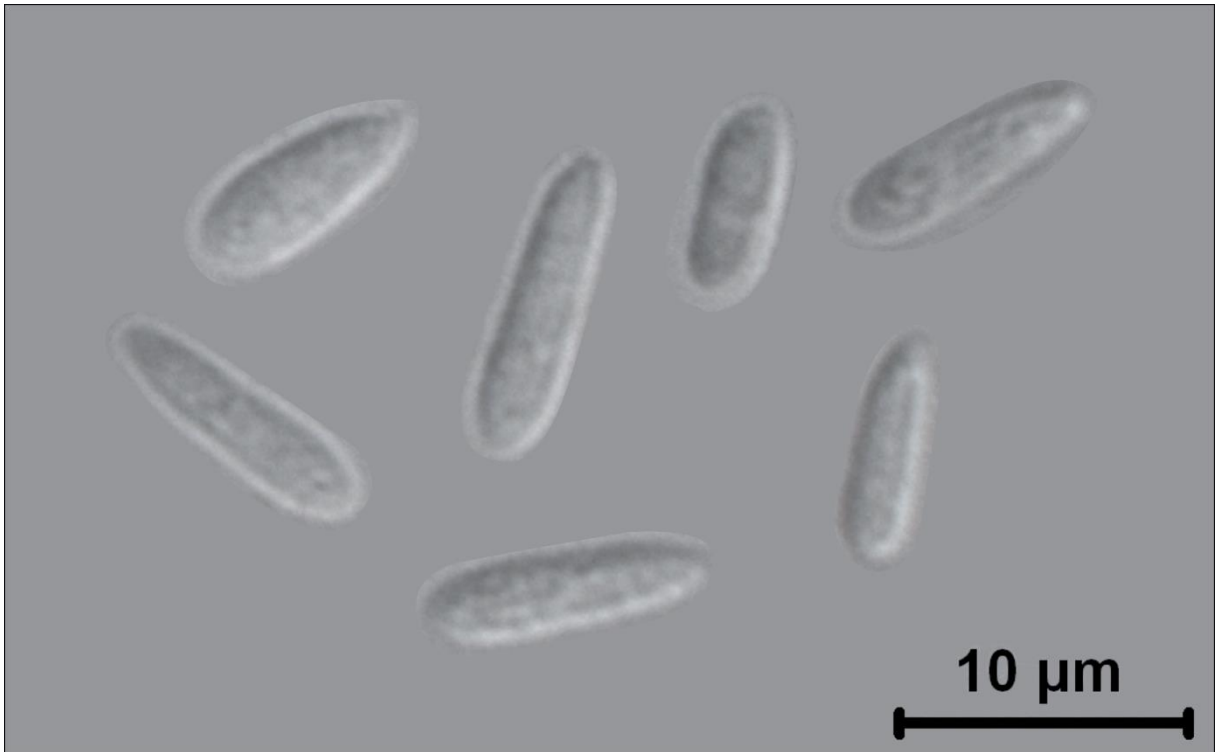
# Complexo de espécies acutatum



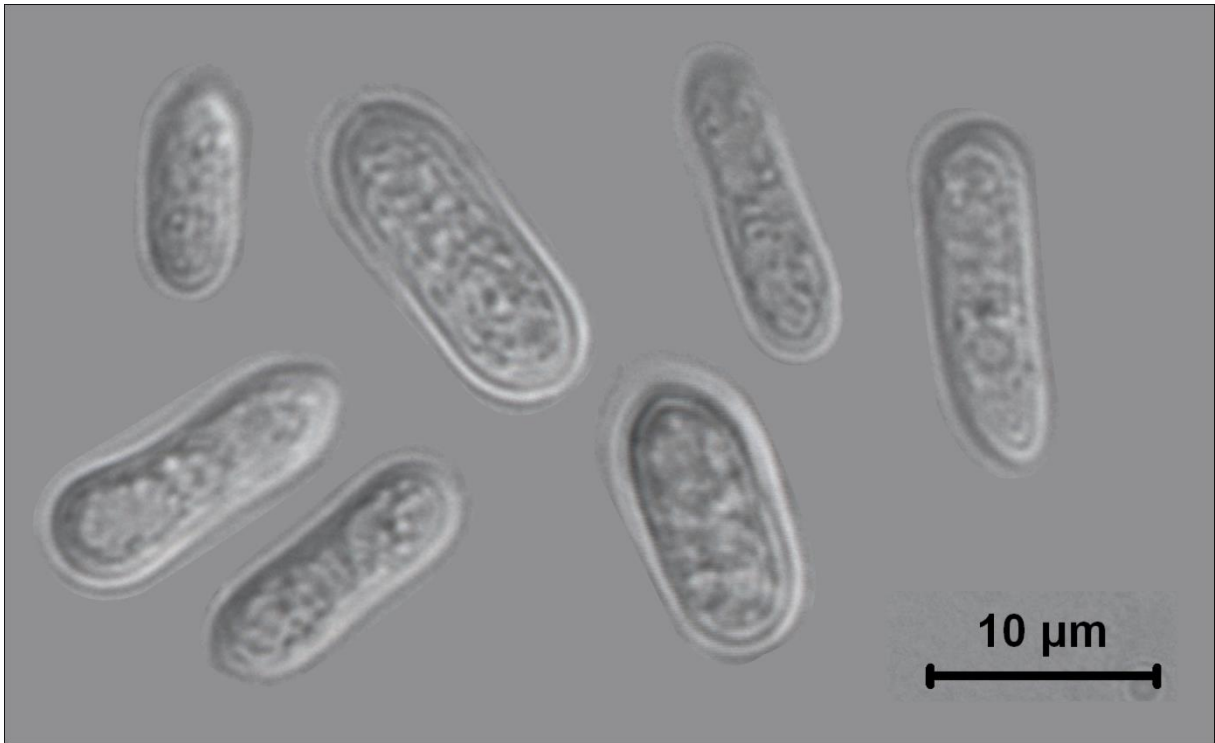
**Figura 3:** Árvore filogenética concatenada com as sequências das regiões gênicas GAPDH,  $\beta$ -tubulina e ITS obtida por Máxima Verossimilhança. Os valores de Bootstrap superiores a 75% são indicados acima dos nós. *C. orchidophilum* foi utilizado como outgroup. As tabelas indicam as plantas hospedeiras e países de ocorrência das espécies com as quais os isolados em estudo agruparam. Os isolados em estudo são destacados em vermelho e possuem símbolos que indicam o local de coleta e o sintoma causado.

Legenda	
★ Brazlândia - DF	■ Antracnose
★ Atibaia - SP	■ Flor preta
★ Goiânia - GO	■ Podridão de coroa

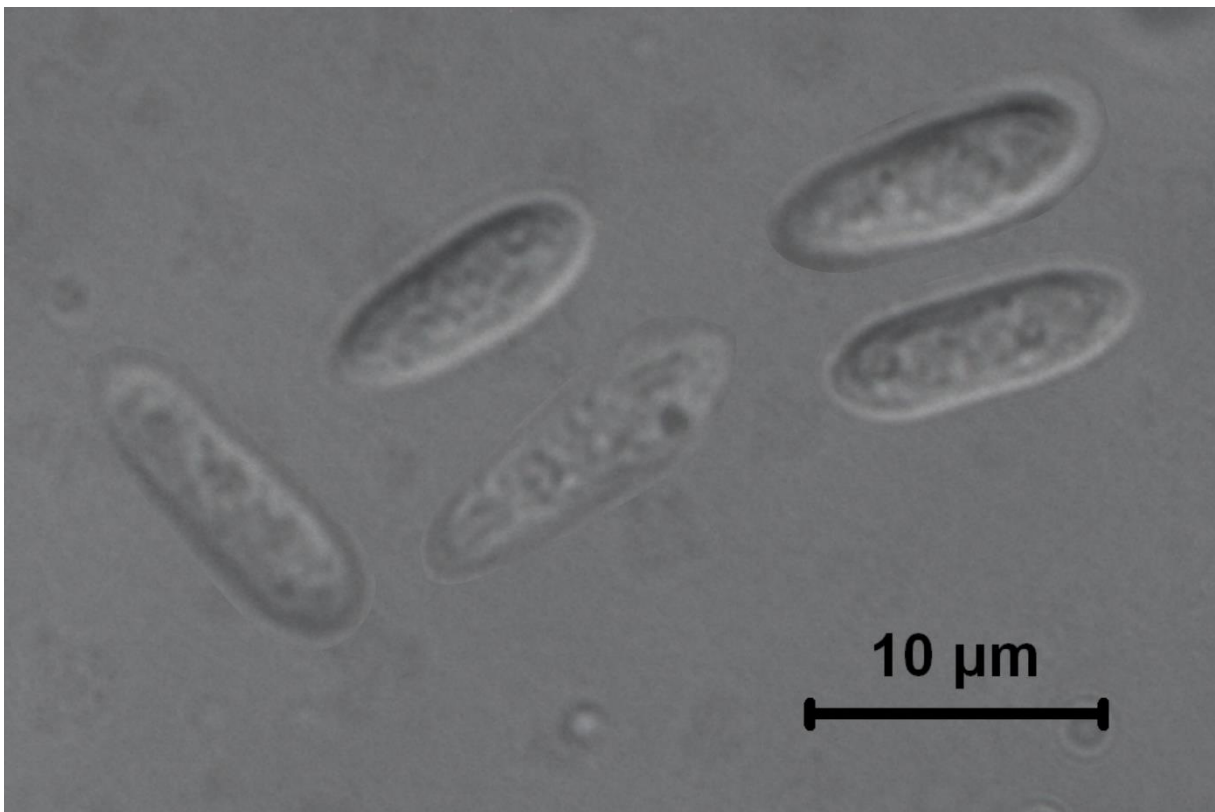




**Figura 4:** Conídios do isolado de *Colletotrichum nymphaeae*, código 2058.



**Figura 5:** Conídios do isolado de *Colletotrichum tamarilloi*, código 2031.



**Figura 6:** Conídios do isolado de *Colletotrichum* sp., código 1960.