



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Morgana Elis Lopes

**Caracterização morfológica, filogenia e relação patógeno-hospedeiro de isolados de *Colletotrichum* associados à ocorrência de antracnose em feijoa [*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret] no Sul do Brasil**

Florianópolis  
2019

Morgana Elis Lopes

**Caracterização morfológica, filogenia e relação patógeno-hospedeiro de isolados de *Colletotrichum* associados à ocorrência de antracnose em feijoa [*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret] no Sul do Brasil**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutora em Ciências  
Orientador: Prof. Rubens Onofre Nodari, Dr.

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lopes, Morgana Elis

Caracterização morfológica, filogenia e relação patógeno hospedeiro de isolados de *Colletotrichum* associados à ocorrência de antracnose em feijoa [*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret] no Sul do Brasil / Morgana Elis Lopes ; orientador, Rubens Onofre Nodari , 2019.

76 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Goiabeira-serrana. 3. *Colletotrichum treobromicola*. 4. *Formae specialis*. 5. Análise multigênica. I. , Rubens Onofre Nodari. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

Morgana Elis Lopes

**Caracterização morfológica, filogenia e relação patógeno-hospedeiro de isolados de *Colletotrichum* associados à ocorrência de antracnose em feijoa [*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret] no Sul do Brasil**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Amauri Bogo, Dr.

Universidade do Estado de Santa Catarina

Prof. Robson Marcelo Di Pietro, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Joel Donazzolo Dr.

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Ciências.

Assinado de forma digital por Claudio  
Roberto Fonseca Sousa  
Soares:50108557553  
Dados: 2019.10.15 16:29:32 -03'00'

Prof. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares, Dr.

Coordenador do Programa

**Rubens Onofre**  
**Nodari:144811**  
**62015**

Digitally signed by  
Rubens Onofre  
Nodari:14481162015  
Date: 2019.10.15 22:02:28  
+02'00'

Prof. Rubens Onofre Nodari, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2019.

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, irmãos e sobrinhos por todo amor, afeto, compreensão, apoio e todas as inúmeras coisas que não caberiam em milhões de páginas. Agradeço infinitamente a vocês pelo simples fato de existirem e estarem na minha vida.

Agradeço, sem palavras, o meu orientador Rubens Onofre Nodari, primeiramente pela honra de trabalhar com alguém que eu admiro e por aceitar enfrentar comigo todos os obstáculos. Muito obrigada pela paciência e por não ser apenas um orientador, mas também amigo e conselheiro. Muito obrigada ao professor Nelson Massola e sua equipe por todo auxílio, disponibilidade e orientação. Obrigada a professora Mayara Cadahh e ao pesquisador Bevan Weir, pelo auxílio nas metodologias e análises.

Muito obrigada Gregório Lombardi por toda ajuda. Obrigada aos meus amigos do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (Leila, Julia, Lilian, Márcia Faima, Juan, Yohan, Thiago, Vanessa, Fernando, Luciano, Hugo, Poliana (toda família Francescato), Patrick, Edison, Dani, Luiza, Duda, Anyela, Lenon, Daniel Steiner, Dani de Conti, Paulinha, Catarina, Newton, Gustavo, Pedro Henrique, Carol Cristofolini, Karina, Fabio, Joe, Carol Pimeta, Carol Zanata e quem eu esqueci, porque eu sempre faço isso.

Meu imenso obrigada aos membros do laboratório de fitopatologia, pessoal do LaBarro (solos), pessoal dos Laboratórios de Botânica, Microbiologia, Entomologia, Sementes, Morfologia Vegetal, Morfogênese e Bioquímica Vegetal, sem a ajuda de vocês nada disso teria sido possível. Obrigada às Epagris, CAV, CAPES e CNPq e todos os órgãos que tornaram esse trabalho possível.

Imenso obrigada aos meus amigos de sempre e para sempre Leilane, Murilo, Amanda, Pablo, Alison (Beto), Carol Welzel, Day, Ana, Fê, Su, Marcelo, Lucas, Bruno, Amanda, Aline, Daniel, Moca Torinelli, Victor e outras inúmeras pessoas que talvez nesse momento não lembrei, mas que moram no meu coração.

Muito obrigada a todos os amigos, professores e servidores do PPGRGV e do PGA. Muito obrigada Berna por toda paciência e dedicação (você é incrível). Obrigada ao pessoal da Academia Ellite pela amizade e risadas diárias. Muito obrigada a todos os meus amigos de Joinville e Canoinhas que felizmente são muitos e fazem parte de uma caminhada mais longa. Obrigada a minha filhota canina que se chama Acca sellowiana, por ser minha companheira diária nos dias felizes e tristes.

Obrigada às minhas terapeutas Ana e Mara por terem transformado minha forma de ver a vida, ao projeto Amanhecer – UFSC, as aplicações de Reiki e papos com minha amiga

Lilian, as longas conversas sobre a vida (Leila, Hugo, Julia, Day, Lilo, Márcia Fanta, Carol Welze, Thiago, Yohan, Marcel, Anderson, Cris) não sei como agradece-los. Obrigada à todas as garrafas de vinho e barras de chocolate, pelo auxílio nas madrugadas de estudo. Obrigada mais uma vez ao meu orientador pelo clube das 18h.

Obrigada Floripa, pelos mais lindos pores do sol, pelas trilhas (ahhh não posso esquecer de agradecer imensamente aos amigos parceiros de trilhas). Obrigada por todos esses 14 anos de fortes emoções. Enfim, muito obrigada a tudo e a todos que estarão nas minhas melhores memórias, para sempre.

## RESUMO

Feijoa ou goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* O. Berg) é uma Myrtaceae que ocorre naturalmente no sul do Brasil e Uruguai. Esta espécie está passando pelo processo de domesticação em seu centro de origem e embora não seja amplamente conhecida, apresenta grande potencial econômico. O fungo fitopatogênico pertencente ao gênero *Colletotrichum* é o agente causal da antracnose, principal doença encontrada nos pomares dessa frutífera. Esse fungo pertence à classe dos *Coelomycetes* e, segundo relatos, pode causar até 100% de perda em pomares. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar, morfológico e geneticamente, o agente causal da antracnose em frutos de feijoa. A pesquisa visa, também, verificar a amplitude da sua gama de hospedeiros através da realização de inoculações cruzadas entre isolados e frutos de feijoa (*Acca sellowiana*), goiabeira comum (*Psidium guajava*), macieira (*Malus domestica*) das variedades Fuji e Gala e morangueiro (*Fragaria ananassa*). Os isolados de *Colletotrichum* foram coletados em 17 diferentes locais, nos estados de Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS), formando um conjunto de 40 colônias monospóricas. Para verificar os padrões morfológicos, dos isolados, foram analisadas características como: Índice de crescimento micelial (ICM), comprimento (C), largura (L), relação C/L e formato de conídios e apressórios. A análise filogenética multigênica foi baseada no sequenciamento de DNA de seis locos: espaçador interno transcrito (ITS) e genes Gliceraldehide-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), calmodulina (CAL), actina sintase (ACT), quitina sintetase (CHS) e  $\beta$ -tubulina 2 (TUB). Dados morfológicos mostraram que a taxa de crescimento micelial (mm / dia) das 40 colônias, variou de 7,5 mm / dia a 10,2 mm / dia; o comprimento dos conídios (C) variou de 13,8  $\mu$ m a 19,4  $\mu$ m; a largura (L) variou de 4,0  $\mu$ m a 5,6  $\mu$ m; e a relação C / L variou de 2,5  $\mu$ m a 4,2  $\mu$ m. O tamanho dos apressórios variou de 7,2  $\mu$ m a 10,8  $\mu$ m de comprimento; de 5,4  $\mu$ m a 8,0  $\mu$ m, para largura, e de 1,1  $\mu$ m para 1,5  $\mu$ m, para C / L. Os isolados produziram conídios cilíndricos ou fusiformes, e apressórios globulares, ovalados e irregulares. As análises filogenéticas multi-gene revelaram que os sintomas de antracnose observados, nos pomares e populações naturais de feijoa, são causados pelo fungo fitopatogênico da espécie *Colletotrichum theobromicola*. Os resultados morfológicos se alinharam à espécie descrita pelos dados moleculares. As inoculações cruzadas, visando conhecer a gama de hospedeiros da espécie *C. theobromicola*, obtiveram maior sucesso na infecção de frutos perfurados do que em frutos não perfurados, de todas as espécies frutíferas testadas. Adicionalmente, isolados destas três espécies, inoculados em frutos de feijoa também conseguiram causar infecção, independentemente do método de inoculação. Estas conclusões, juntamente com dados sobre o estilo de vida dos isolados, permitirão maiores e melhores inferências sobre o estabelecimento e manejo de pomares comerciais. Resultados como os obtidos nessa pesquisa, também se mostram importante do que diz respeito ao estabelecimento de programas de melhoramento genético, controle de doenças e atividades de biovigilância.

**Palavras-chave:** Goiabeira-serrana. *Colletotrichum theobromicola*. *Formae specialis*. Análise multigênica.

## ABSTRACT

The feijoa or pineapple-guava (*Acca sellowiana* Berg), goiabeira-serrana in portuguese, is a fruit belonging to the Myrtaceae family, with natural occurrence in south of Brazil and Uruguay. This specie is in domestication process in its origin and diversity center. Anthracnose is the biggest feijoa disease in southern Brazil and is caused by the genus fungus *Colletotrichum*. This fungus belongs to the Coelomycetes class and it is one of the main factors that limit the commercial exploitation of feijoa fruit, causing in many cases, loss of 100 % in orchards. Thus, the present work intend to characterize, morphologically and genetically, the anthracnose causal agente in feijoa fruit. The research also wants to verify the amplitude of its host range by performing cross-inoculations between isolates and fruits of feijoa (*Acca sellowiana*), common guava (*Psidium guajava*), apple (*Malus domestica*) of Fuji and Gala varieties and strawberry (*Fragaria ananassa*). *Colletotrichum* isolates were collected from 17 different sites in the Santa Catarina state (SC) and Rio Grande do Sul state (RS), forming a set of 40 monosporic colonies. To verify the isolates morphological patterns, characteristics were analyzed as: mycelial growth index (ICM), length (C), width (L), C / L ratio and conidia and appressorium shape. Multigenic phylogenetic analysis was based on DNA sequencing of six loci: transcribed internal spacer (ITS) and Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), calmodulin (CAL), actin synthase (ACT), chitin synthetase (CHS) and  $\beta$ -tubulin 2 (TUB). Morphological data showed that the mycelial growth rate (mm / day) of the 40 colonies ranged from 7.5 mm / day to 10.2 mm / day; the length of conidia (C) ranged from 13.8  $\mu$ m to 19.4  $\mu$ m; the width (L) ranged from 4.0  $\mu$ m to 5.6  $\mu$ m; and the C / L ratio ranged from 2.5  $\mu$ m to 4.2  $\mu$ m. The appressoria size ranged from 7,2  $\mu$ m to 10,8  $\mu$ m in length; from 5.4  $\mu$ m to 8.0  $\mu$ m for width and from 1.1  $\mu$ m to 1.5  $\mu$ m for C / L. The isolates produced cylindrical or fusiform conidia and globules, nailed and irregular appressories. Multi-gene phylogenetic analyzes revealed that the anthracnose symptoms observed in orchards and natural feijoa populations are caused by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum theobromicola* specie. The morphological results aligned with the species described by the molecular data. The cross inoculations to know the host range of *C. theobromicola* species, were more successful in the infection of perforated fruits than in non-perforated fruits of all tested fruit species. Additionally, isolates of these three species inoculated in feijoa fruits also caused infection, regardless of the inoculation method. These findings, together with lifestyle data from the isolates, will allow for greater and better inferences about the establishment and management of commercial orchards. Results such as those obtained in this research are also important regarding the establishment of genetic improvement programs, disease control and biovigilance activities.

**Keywords:** Goiabeira-serrana. *Colletotrichum treobromicola*. *Formae specialis*. Multigenic analysis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espécime de feijoa em área de ocorrência natural no estado do Rio Grande do Sul.....	18
Figura 2 - Lesão típica de antracnose, com presença de massa conidial, em fruto de feijoa.....	21
Figure 3 - Locations and isolates labelling where feijoa fruit were collected with anthracnose lesions at Rio Grande do Sul and Santa Catarina states.....	30
Figure 4 - Bayesian inference phylogenetic tree of the 40 isolates from <i>Acca sellowiana</i> , Brazil. Results for the analysis of the markers ITS, GAPDH, CAL, ACT, CHS, and TUB. All the isolates from <i>Acca sellowiana</i> collected in Brazil were compared with the species characterized by Weir et al. (2012). The species found into the 40 isolates was <i>C. theobromicola</i> with PP = 1.0.....	35
Figure 5 - Box plots showing the variation in anthracnose lesions size (cm <sup>2</sup> ) produced by the two treatments (With or Without perforations), from de 4 <sup>th</sup> to 16 <sup>th</sup> day after de inoculation.....	38
Figure 6 - Feijoa fruits with anthracnose lesions. A) Anthracnose lesion in feijoa fruit without perforation in the same timeframe B) Anthracnose lesion in feijoa fruit with perforation in the same timeframe.....	39
Figure 7 - Box plots showing the variation in anthracnose lesions size (cm <sup>2</sup> ) from de 4 <sup>th</sup> to 16 <sup>th</sup> day after de inoculation, in fruits from two feijoa genotypes (BAG-85 and BAG-509) exposed to two treatments (With or Without perforation).....	40
Figure 8 - Box plots showing the variation in anthracnose lesions size (cm <sup>2</sup> ), with the two treatments (With or Without perforations) and by the three different <i>C. theobromicola</i> isolates (FRB6, IPÊ and SJQ6).....	41
Figure 9 - Box charts showing the variation in anthracnose lesions size (cm <sup>2</sup> ), in the two treatments (With or Without perforation) by the three different <i>C. theobromicola</i> isolates (FRB6, IPÊ and SJQ6) and for the two feijoa genotypes (BAG-85 and BAG-509).....	42
Figura 10 - Locais de coleta dos frutos de feijoa, nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.....	47
Figura 11 - Frutos de feijoa com ataque natural de antracnose. A) Lesão de antracnose em feijoa apresentado tamanho e esporulação para fins de caracterização. B) Secção do fruto cortado no meio da lesão para facilitar o isolamento.....	49

Figura 12 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), ilustrando a interação entre os fatores métodos de inoculação (presença ou ausência de perfurações) e diferentes isolados de feijoa. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não diferem para o fator métodos de inoculação para o mesmo isolado. ....	54
Figura 13 - Frutos das variedades Fuji (A) e Gala (B) inoculados com o isolado SJC de feijoa, na presença de perfurações, 14 dias após a inoculação. ....	55
Figura 14 - Frutos de macieira inoculados com o isolado SJC, sem a existência de perfurações (A e B) e inoculados com o mesmo isolado na presença de perfurações (C e D), 14 dias após a incubação. ....	55
Figura 15 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de frutos de macieira inoculados com isolados de feijoa, ilustrando a interação entre os fatores variedades Fuji e Gala, presença ou ausência de lesão e isolados de <i>Colletotrichum</i> . ....	56
Figura 16 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), ilustrando a interação entre os fatores métodos de inoculação (presença ou ausência de perfurações) e diferentes espécies frutíferas ( <i>Acca sellowiana</i> e <i>Psidium guajava</i> ). ....	58
Figura 17 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), ilustrando a interação entre os fatores métodos de inoculação (presença ou ausência de perfurações) e diferentes espécies frutíferas ( <i>Malus domestica</i> , variedades Fuji e Gala, e <i>Acca sellowiana</i> ). ....	59
Figura 18 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), ilustrando a interação entre os fatores métodos de inoculação (presença ou ausência de perfurações) e diferentes espécies/variedades frutíferas ( <i>Malus domestica</i> , variedades, Fuji e Gala e <i>Acca sellowiana</i> ). ....	60

## LISTA DE TABELAS

Table 1 - Means separation test for length (L), width (W), and length / width ratio (L/W) of appressoria and conidia, and Mycelial Growth Index (MGI), of 40 <i>Colletotrichum theobromicola</i> isolates from feijoa, collected in Santa Catarina and Rio Grande do Sul states, Brazil. ....	37
Tabela 2 - Identificação dos isolados, estado de procedência e em qual forma de produção o fruto coletado se encontrava. ....	48

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>17</b>
2.1	A FEIJOA .....	17
2.2	O GÊNERO <i>COLLETOTRICHUM</i> .....	19
2.3	PATÓGENO X HOSPEDEIRO .....	22
2.4	FILOGENIA PARA ESPÉCIES DO GÊNERO <i>COLLETOTRICHUM</i> .....	24
<b>3</b>	<b>ORGANIZAÇÃO DA TESE .....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 1. PHYLOGENETIC, MORPHOLOGY AND HOST- PATHOGEN RELATIONSHIP OF <i>COLLETOTRICHUM THEOBROMICOLA</i> ASSOCIATED WITH ANTHRACNOSE DISEASE IN FEIJOA (<i>ACCA SELLOWIANA</i>).....</b>	<b>28</b>
4.1	ABSTRACT .....	28
4.2	INTRODUCTION .....	28
4.3	MATERIAL E METHODS .....	30
4.3.1	<i>Colletotrichum</i> isolates .....	30
4.3.2	Molecular characterization and phylogenetic analysis.....	31
4.3.3	Morphological characterization .....	32
4.3.4	Host-Pathogen relationship .....	33
4.4	RESULTS AND DISCUSSION .....	34
4.4.1	Molecular characterization and phylogenetic analysis.....	34
4.4.2	Morphological characterization .....	36
4.4.3	Host-Pathogen relationship .....	38
4.5	CONCLUSION .....	43
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO 2. INOCULAÇÃO CRUZADA, DE ESPÉCIES DE <i>COLLETOTRICHUM</i>, EM FRUTÍFERAS DE CLIMA SUBTROPICAL E TEMPERADO .....</b>	<b>44</b>
5.1	RESUMO .....	44
5.2	ABSTRACT .....	44

5.3	INTRODUÇÃO .....	45
5.4	MATERIAL E MÉTODOS .....	46
5.4.1	<i>Obtenção e estabelecimento dos isolados de C. theobromicola de feijoa</i> 46	
5.4.2	<i>Isolamento monospórico</i> .....	49
5.4.3	<i>Obtenção dos frutos para ensaios de inoculação</i> .....	50
5.4.4	<i>Isolados de Colletotrichum de feijoa e das outras espécies frutíferas,</i> <i>utilizados nas inoculações cruzadas</i> .....	50
5.4.5	<i>Inoculações</i> .....	51
5.4.6	<i>Métodos de Inoculação</i> .....	51
5.5	RESULTADOS .....	53
5.5.1	<i>Resposta da infecção de isolados de Colletotrichum theobromicola de</i> <i>feijoa em frutos de outras espécies</i> .....	53
5.5.2	<i>Resposta da inoculação de isolados de Colletotrichum em frutos das suas</i> <i>espécies hospedeiras e em frutos de feijoa</i> .....	57
5.6	CONCLUSÃO .....	64
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A feijoa [*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret] é uma espécie frutífera que pertence à família Myrtaceae. Esse grupo compreende cerca de três mil espécies vegetais, sendo que muitas dessas são pouco conhecidas e utilizadas. A feijoa é uma dessas espécies que são pouquíssimo conhecidas em seu país de origem, o Brasil, onde é conhecida também por goiabeira-serrana; porém, já bastante difundida e apreciada em outros países. Contudo, que esta espécie está passando pelo processo de domesticação em seu centro de origem e diversidade, já sendo relatada a existência de pomares comerciais em localidades do planalto de Santa Catarina e do norte do Rio Grande do Sul. As principais características dos frutos de feijoa encontrados nesses dois estados são: polpa cor gelo, sabor doce, podendo variar de levemente ácido a ácido, com aroma marcante e muito diferente. O sabor tem sido um apelo para o mercado, pois os frutos produzidos em plantios comerciais, principalmente na Nova Zelândia e Colômbia, são destinados majoritariamente a exportação para países europeus, asiáticos, bem como para o Brasil.

A planta possui importantes propriedades farmacológicas, tais como: ação antioxidante (AQUINO et al., 2018; BEYHAN et al., 2010; TUNCEL; YILMAZ, 2015;), altos níveis de vitamina C (WESTON, 2010), atividade em células epiteliais intestinais humanas (PENG et al., 2008; TURCO et al., 2016), propriedades anticancerígenas (BONTEMPO, 2007), atividade antibacteriana e antifúngica (BASILE, 2010) e atuação no tratamento e prevenção do diabetes tipo 2 e artrite reumatoide, de acordo com a patente US 20150157678 (FOO; WARSON, 2015; MUNIZ, 2018). As flores de feijoa são comestíveis e o uso da espécie como planta ornamental também é viável devido ao seu tamanho e floração (SAZIMA; SAZIMA, 2007).

Nos últimos 25 anos, no Brasil, houve um avanço significativo nas pesquisas com feijoa, nas mais diversas áreas de conhecimento, bem como na produção e comercialização de seus frutos. Agricultores das regiões produtoras já iniciaram e outros mostram interesse pelo cultivo dessa frutífera, principalmente no sistema orgânico e agroecológico. Por se tratar de uma espécie nativa e com alto potencial econômico, sua produção e comercialização pode aumentar consideravelmente nos próximos anos.

Assim, para fomentar o plantio, cultivo e comercialização da feijoa, algumas de suas características fisiológicas e sanitárias precisam ser melhor compreendidas e, conseqüentemente, o estabelecimento da melhor forma de manejo de pomares com o intuito de minimizar perdas causadas por doenças, pragas e má condução dos pomares.

A ocorrência da antracnose tem sido relatada por produtores como o principal motivo de perdas nos pomares. A espécie de fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides*, foi descrito inicialmente por ANDRADE e DUCROQUET (1994) como sendo o agente causal de lesões de antracnose em frutos de feijoa. Os sintomas característicos de antracnose como: mancha depressiva, necrose, muitas vezes esporulação rósea no centro da lesão, em estágio mais avançado pode causar o tombamento de plântulas e até a perda de 100% dos frutos. No entanto, a caracterização feita por ANDRADE e DUCROQUET (1994), baseou-se apenas em fatores morfológicos e culturais do patógeno, dificultando a indicação exata da espécie causadora de antracnose em feijoa.

Cientificamente, a caracterização de um microrganismo fitopatogênico apresenta maior confiabilidade quando se une análises morfológicas, moleculares, patogênicas, entre outras. A obtenção de resultados destas análises proporciona maior embasamento para programas de melhoramento genético, seleção de variedades resistentes ou mesmo controle químico adequado, sendo esse último algo ainda não estabelecido para essa cultura.

Assim, este trabalho pretende avançar no conhecimento científico com o uso conjunto de análises morfológicas, moleculares e de patogenicidade do agente causal da antracnose e a reação dos frutos de feijoa, bem como aprofundar o conhecimento da relação patógeno x hospedeiro, no sul do Brasil. Espera-se os resultados obtidos também possam contribuir para futuras atividades de melhoramento genético e práticas de manejo dos cultivos da feijoa no sul do Brasil. A obtenção de variedades resistentes seria um ganho importante na busca de uma maior e melhor produtividade de frutos de feijoa e, conseqüentemente, a valorização de uma espécie brasileira.

Este projeto é parte do esforço de docentes e estudantes da Universidade Federal de Santa Catarina, bem como de pesquisadores da EPAGRI, que buscam subsidiar as atividades relacionadas a expansão do cultivo da espécie no Sul do Brasil.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 A FEIJOA

Coletada em 1819 por Sellow, a espécie foi inicialmente descrita por Berg e inserida no gênero *Acca* em 1856 e, posteriormente, como pertencente ao gênero Feijoa em 1859. Atualmente é aceito o nome *Acca sellowiana*, por ser o mais antigo (CACIOPPO, 1988; DUCROQUET et al., 2000; MATTOS, 1986), embora *Feijoa sellowiana* continua sendo também utilizado. Dentre as mirtáceas da América Latina, a feijoa se destaca como uma das espécies mais conhecida e utilizada no mundo. A área plantada vem crescendo inclusive nos seus centros de diversidade primária (Brasil e Uruguai).

A espécie entra em produção a partir do quarto ano, é uma espécie hermafrodita predominantemente alógama, dispõe de mecanismos que favorecem a fecundação cruzada, tais como alta frequência de auto-incompatibilidade tardia (FINATTO et al., 2011), seu estigma torna-se receptivo 24 h antes da deiscência das anteras, o que indica tendência à dicogamia por protoginia. Apresenta crescimento lento e vistosa floração, a característica discolor da sua folhagem faz com que a feijoa apresente potencial ornamental, podendo também ser utilizada em reflorestamentos (DUCROQUET; RIBEIRO, 1991; LEGRAND; KLEIN, 1997).

*A. sellowiana* distingue-se por produzir um fruto comestível de sabor marcante, com expressivo potencial sensorial (DUCROQUET et al., 2000), nutricional e com grandes possibilidades para seu processamento e transformação (CAMACHO, 2003; DUCROQUET et al., 2000; KINUPP; BARROS, 2008). Também foram registrados usos potenciais na área farmacêutica, como fontes de flavonoides com propriedades anticancerígenas (BONTEMPO et al., 2007; LAPCIK et al., 2005), ação antioxidante (KELES et al., 2011); antibacteriana e antifúngica (BASILE et al., 1997); aumento da mineralização óssea (prevenção e tratamento da osteoporose) (AYOUB et al., 2009); ação anti-inflamatória (MONFORTE et al., 2013; ROSSI 2007); e imunoproteção (IELPO et al., 2000). Entretanto, um de seus primeiros e mais importantes usos, é como planta ornamental em programas de paisagismo (BRAUN; PETRY, 2007; SAZIMA; SAZIMA, 2007).

Apesar destas características e possibilidades os plantios comerciais de feijoa, no Brasil, ainda são escassos. A razão para se creditar no aumento no número de pomares da espécie está ligada à vários fatores como, por exemplo, seu potencial para produção e processamento (ZURITA, 2003), especialmente naqueles países que apresentam as condições

agroecológicas e geográficas condizente com o estabelecimento de plantações, como é o caso da Colômbia (FISCHER, 2003) e do Brasil (DUCROQUET et al., 2000).

Segundo a classificação botânica (*Myrtacea*) essa frutífera é um arbusto que possui folhas persistentes e dificilmente ultrapassa a altura de 6 m, com fuste ramificado, especialmente quando encontrada em campo aberto (DUCROQUET et al., 2000) (Figura 1). Possui exigências climáticas do ambiente em que está inserida, uma vez que esta se desenvolve, no caso do Estado de Santa Catarina, preferencialmente, em altitudes superiores a 1000 m e baixas temperaturas, resistindo até  $-12,6^{\circ}\text{C}$  e florescendo quando a probabilidade de geada diminui (DUCROQUET et al., 2000). Em maiores latitudes, como no sul do Rio Grande do Sul e norte do Uruguai, se desenvolve ao nível do mar.

Figura 1 - Espécime de feijoa em área de ocorrência natural no estado do Rio Grande do Sul



Os frutos de feijoa são classificados como bagas, possuem grande potencial sensorial e chegam a pesar 350 g. Embora possuem tamanho e forma semelhantes à da goiaba comum (*Psidium guajava*), os frutos de feijoa possuem polpa cor gelo, sabor doce-acidulado, aroma suave, mas marcante (DUCROQUET; RIBEIRO, 1991) sendo que, a qualidade do aroma está relacionada à produção de etilbutirato, metil e etilbenzoato, além de aldeídos aromáticos. O fruto também é rico em iodo (3 mg/100 mg), o teor de vitamina C da polpa é aproximadamente

80 mg/100 g valor superior ao da laranja (DUCROQUET et al., 2000; THORP & BIELESKI, 2002). Os valores de alguns minerais encontrados nos frutos por 100 g de polpa são: potássio – 166 mg; sódio – 5 mg; cálcio – 4 mg; magnésio – 8 mg; fósforo – 10 mg e ferro – 0,05 mg (MORTON, 1987). Frutos de feijoa de populações uruguaias são as que possuem os frutos com casca mais fina.

A feijoa é conhecida mundialmente, desde sua introdução no continente Europeu por volta de 1890. Hoje a espécie é plantada também nos Estados Unidos, Colômbia, Nova Zelândia, Ucrânia (e outras ex-repúblicas soviéticas da região do Cáucaso), Turquia, Itália, entre outras. Atualmente, os principais países produtores são a Colômbia e a Nova Zelândia, que exportam o fruto para diversos outros países, inclusive o Brasil.

O levantamento e a coleta da diversidade fenotípica existente no Estado de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná possibilitou tanto a implantação de um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) pela EPAGRI como a realização de dezenas de estudos de genética e fisiologia na Universidade Federal de Santa Catarina (ex: SÁNCHEZ-MORA et al., 2019). Além disso, a parceria EPAGRI-UFSC vem proporcionando tanto a conservação da diversidade genética e do avanço no conhecimento científico, como a manutenção de um programa de melhoramento genético. A inexistência de variedades adaptadas e competitivas comercialmente, no Brasil, foi o fator que motivou o desenvolvimento e processo de domesticação e melhoramento dessa espécie, no Brasil e no Uruguai, iniciado em 1985.

O Brasil, por ser o maior centro de diversidade, possui uma grande vantagem com relação aos outros países que pesquisam e cultivam a feijoa, devido ao fácil acesso às populações de ocorrência natural e aos bancos de germoplasma (DUCROQUET et al., 2000). Portanto, estudar essa espécie e contribuir para sanar as dúvidas, que são obstáculos ao seu amplo desenvolvimento comercial, é imensamente importante e oportuno. Neste sentido, uma das principais lacunas refere-se aos diversos aspectos científicos e práticos relacionados ao agente causal da antracnose na goiabeira serrana. Avanços neste sentido podem contribuir para a diversificação agrícola, uma vez que a feijoa pode ser mais uma alternativa de fonte de renda e bem-estar, principalmente para os pequenos agricultores do Sul do Brasil.

## 2.2 O GÊNERO *COLLETOTRICHUM*

O gênero *Colletotrichum* Corda (Teleomorfo: *Glomerella* Stonem.), engloba os fungos imperfeitos pertencentes ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, família *Glomerellaceae*

(Index Fungorum, 2015). Estes apresentam uma associação teleomórfica com estirpes homotáticas ou heterotáticas de Ascomicetos do gênero *Glomerella* (BAXTER et al., 1985; SKIPP et al., 1995). Os fungos filamentosos deste gênero, formam o oitavo grupo mais importante de fungos patogênicos, causando danos econômicos significativos em culturas de regiões tropicais, subtropicais e temperadas (FREEMAN et al., 1998). As espécies de *Colletotrichum* são descritas como a principal causadora da doença conhecida como antracnose, mas também podem causar podridão vermelha da cana de açúcar, podridão da coroa de morango e banana, mancha marrom do feijão-caupi, entre outros (CANNON et al., 2012).

O gênero *Colletotrichum* foi descrito por Corda em 1831. Em uma classificação mais antiga Tode (1790) e posteriormente Fries (1825) classificaram o gênero como *Vermicularia*. Já Saccardo (1884) descreveu que *Vermicularia* era uma fase do desenvolvimento de estruturas de *Colletotrichum*. Em 1849 Desm. e Mont. já haviam descrito fungos, com características semelhantes, como pertencente ao gênero *Gloesporium*. Essas variações se deram devido às características morfológicas não estáveis encontradas nas estruturas do patógeno. Em 1957, então, Von Arx verificou que várias espécies inseridas nos grupos *Colletotrichum*, *Vermicularia* e *Gloesporium* pertenciam, na verdade, à um mesmo gênero. Assim, estabeleceu-se como *Colletotrichum* o gênero dos fungos patogênicos analisados.

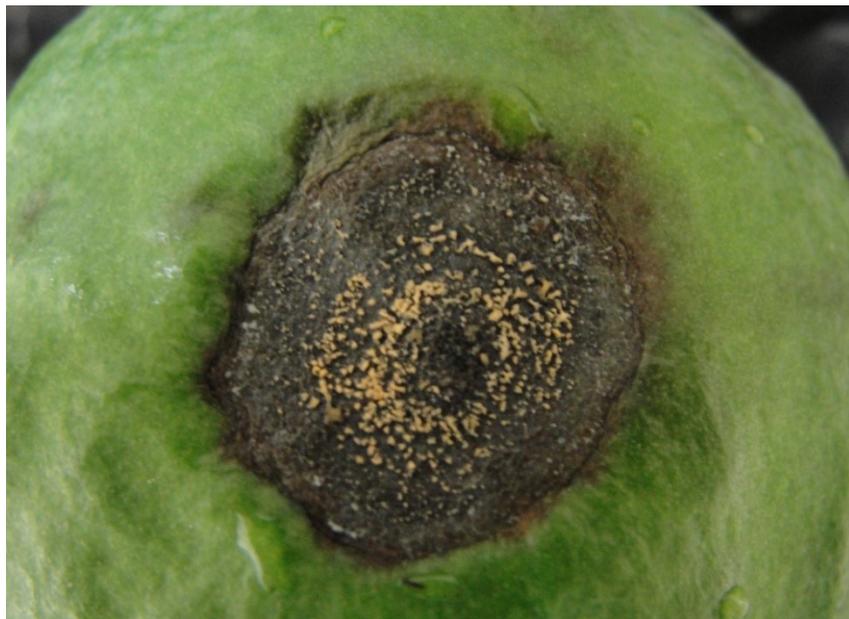
Sutton em 1980 e 1992 analisou características morfológicas, culturais e patogênicas, de isolados de *Colletotrichum* e assim as suas espécies passaram a ter parâmetros de classificação melhor estabelecidos. De acordo com o mesmo autor, esses patógenos apresentam acérvulos em forma de disco achatado, subepidérmico, com espinhos ou setas, conidióforo simples e alongado, conídios hialinos unicelulares que podem ser ovalados ou oblongos. Os conídios nos acérvulos estão envolvidos por uma matriz gelatinosa, chamada cirros de conídios, constituída de polissacarídeos e proteínas solúveis em água. Essa matriz provavelmente protege os conídios da dissecação e aumenta a eficiência de germinação e penetração no tecido hospedeiro (MENEZES, 2002). Os conídios não constituem estruturas de sobrevivência porque sua viabilidade diminui rapidamente. O micélio, porém, pode permanecer viável por longo período em sementes infectadas, em restos de cultura, ou ainda como infecções latentes, não mostrando as plantas sintomas das doenças.

Os sintomas de antracnose são bastante característicos e atingem, em várias espécies, a parte aérea das plantas, com sintomas e sinais nas folhas, flores e frutos. Nas folhas apresentam-se como lesões irregulares no limbo ou nas nervuras, as quais são inicialmente pardo-escurecidas e posteriormente esbranquiçadas no centro e com pontuações escuras e

salientes (LOPEZ; PEREIRA, 2010). Nos frutos as lesões mostram-se inicialmente como manchas pequenas, deprimidas, arredondadas e de coloração clara. Estas manchas aumentam de tamanho, em estágios mais severos da doença, chegam à 3 cm de diâmetro e estendem-se para regiões mais profundas, muitas vezes cobertas por uma massa mucilaginosa de esporos (Figura 2). Quando ocorre grande número de lesões em locais próximos, estas coalescem, provocam podridão generalizada e tornam-se enegrecidas devido ao crescimento de outros organismos saprofíticos (VIDA et al., 2006).

A gama de hospedeiros é também bastante ampla, incluindo mais de uma centena de angiospermas, sendo uma das doenças de maior importância em plantas cultivadas, especialmente em hortícolas e solanáceas. Em algumas espécies de *Colletotrichum* houve a especialização para determinados grupos de hospedeiros, como frutíferas e gramíneas forrageiras.

Figura 2 - Lesão típica de antracnose, com presença de massa conidial, em fruto de feijoa.



Os danos envolvem desde o prejuízo no crescimento da planta, até lesões nos produtos comerciais, especialmente quando o patógeno se encontra na forma latente, manifestando-se somente após a colheita e transporte, desvalorizando os produtos e causando prejuízos para consumidores e comerciantes. Em condições favoráveis e sem tratamentos químicos, as perdas relatadas estão entre 70 a 80 % em cafeeiro (PEREIRA et al., 2009), 40 % em bananeira

(CORDEIRO; MATOS; KIMATI, 2005) e podem chegar até 100 % em solanáceas e na goiaba (*P. guajava*) (KUROZAWA; PAVAN, 1997).

A forma de infecção inicial se dá de maneira semelhante para todas as espécies do gênero *Colletotrichum*, sendo maiores as diferenças depois de ocorrer a penetração, quando duas principais estratégias de infecção poderão se dar. Inicialmente ocorre a adesão do conídio à cutícula e a produção do tubo germinativo, que posteriormente diferencia-se em apressório. Estruturas de penetração emergem da base deste e penetram diretamente na cutícula, porém há relatos sobre a ocorrência de penetração indireta, através do estômato ou de ferimentos, sem a formação de apressório (MATOS; KIMATI, 2005).

Depois de ocorrida a penetração, algumas espécies alternam uma fase biotrófica, associada à formação de grandes hifas no meio intracelular, com outra fase necrotrófica altamente destrutiva, com a produção de estreitas hifas secundárias que se ramificam ao longo do tecido do hospedeiro. Esta se constitui em uma das principais estratégias infectivas adotadas por algumas espécies do gênero *Colletotrichum*. Neste processo, 24 h após a penetração, a célula do hospedeiro perde completamente a sua integridade funcional e começa a deteriorar-se (O'CONNEL et al., 2000).

A segunda estratégia de infecção se dá pela penetração do patógeno na cutícula, mas não entrada imediata no lúmen da célula e sim desenvolvimento abaixo da cutícula. Nos primeiros estágios de penetração, há o desenvolvimento entre as paredes das células epidérmicas e do hospedeiro, sua turgência e dissolução. Somente mais tarde, penetram nas células, espalhando-se rapidamente pelo tecido, tanto dentro quanto fora das células, matando-as e dissolvendo sua parede. Esse tipo de estratégia de infecção não está associada à produção de micélios primários e secundários morfologicamente diferentes (O'CONNEL et al., 2000).

Em feijoa tem sido descrita a ocorrência de antracnose apenas em frutos, diferentemente de outras espécies frutíferas que são acometidas em vários órgãos. Sendo assim percebe-se a importância de entender mais sobre a capacidade de infecção que os isolados, de *Colletotrichum* provenientes de feijoa, apresentam. Levanta-se, nesse contexto, a hipótese de que folhas de feijoa sejam capazes de impedir a penetração e estabelecimento do patógeno, ou mesmo que o fungo permaneça latente, nas nervuras e limbo foliar, por longos períodos.

### 2.3 PATÓGENO X HOSPEDEIRO

O conhecimento sobre relações patógeno x hospedeiro dentro do gênero *Colletotrichum*, ainda não está muito bem estabelecido. Segundo Cannon (2012), por muito tempo acreditou-se que todas as espécies de *Colletotrichum* tinham seu hospedeiro específico. Atualmente, contudo, sabe-se que inúmeros fatores interferem nessa relação, dificultando fazer inferências sobre a capacidade patogênica e especificidade de um microrganismo. Segundo Freeman (1993) a patogênese de um fungo em um hospedeiro, está ligada a penetração através dos tecidos vegetais, indução dos sintomas da doença e disseminação do patógeno pela esporulação.

Caso o patógeno seja compatível com o hospedeiro, este iniciará o processo de formação de manchas necróticas. Por outro lado, caso a interação não seja compatível, o fungo cessa o crescimento e pode formar lesões de hipersensibilidade. Essa afinidade e compatibilidade de um fungo com uma espécie vegetal está ligada a genes de virulência. FREEMAN e RODRIGUEZ (1993) e REDMAN et al. (1999) descreveram que a modificação de apenas um gene de patogenicidade, foi capaz de transformar um isolado patogênico, em um isolado endofítico. O isolado endofítico conferiu, então, proteção à uma espécie vegetal contra outros patógenos.

Nem sempre, porém, colônias endofíticas ou latentes trarão benefícios para o hospedeiro, muitas vezes a modificação de condições ambientais, entre outros fatores, pode fazer com que o mesmo se torne patogênico. Em vários casos, espécies de *Colletotrichum* que são endofíticas para um hospedeiro, podem permanecer em restos culturais e causar grandes perdas às culturas subsequentes. Outro caso que dificulta a estimativa da gama de hospedeiros de uma espécie patogênica é ocorrência de infecções quiescentes. Estas, geram lesões após a maturação do hospedeiro, a frequente ocorrência desse tipo de infecção torna o gênero *Colletotrichum*, também, um dos maiores patógenos causadores de doença de pós colheita (SKIPP et al., 1995).

Existem, porém, fungos que são específicos de alguma espécie vegetal, sendo denominados *Formae speciales*. Estes, bem como raças de fungos que se mostram específicos costumam causar danos graves ao seu hospedeiro, mas ser totalmente não patogênico para outras espécies. Nestes casos, testes de patogenicidade, por inoculações cruzadas, são realizados como forma de estimar a gama de hospedeiros de um fungo fitopatogênico (DENOYES; BAUDRY, 1995; FURTADO et al., 1999; MUNIZ et al., 1998; PERES et al., 2002).

Com relação a interação patógeno x hospedeiro, fungos do gênero *Colletotrichum* são conhecidos por causarem níveis variáveis de danos e perdas à espécies vegetais. O conhecimento do nível de patogenicidade, gama de hospedeiro e abrangência de ataque é muito importante em fungos considerados bastantes patogênicos, como é o caso dos do gênero *Colletotrichum*, tendo em vista que em meio à uma epidemia a infecção e a esporulação são fatores importantes para o progresso da doença (MANANDHAR; HARTMAN, 1995). Os dados obtidos com avaliações nesse contexto, são importantes para o estabelecimento de tratamentos culturais, programas de melhoramento genético, de biovigilância e etc.

#### 2.4 FILOGENIA PARA ESPÉCIES DO GÊNERO *COLLETOTRICHUM*

A identificação das espécies de *Colletotrichum* patogênicas a um determinado hospedeiro propicia uma melhor compreensão da epidemiologia da doença e faz-se uma etapa fundamental para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de controle (ANDRADE et al., 2007). Além disso, as análises filogenéticas são ferramentas utilizadas atualmente para confirmar a inserção de um organismo em uma determinada espécie, bem como sua posição evolutiva perante as espécies filogeneticamente mais próximas.

Há ferramentas clássicas da fitopatologia e da genética que podem ser utilizadas visando a identificação do agente etiológico, bem como caracterizar a diversidade genética existente entre as possíveis raças ou isolados. Tradicionalmente, a realização da caracterização de espécies de *Colletotrichum* era feita por caracterização morfológica, cultural e patogenicidade, entre outros (SUTTON, 1992). A utilização de todas essas ferramentas de caracterização juntamente com análises genéticas, como por exemplo a detecção de sequências de DNA específicas, tem tornado a caracterização, a nível de espécie, bastante precisa. Para o gênero *Colletotrichum* a caracterização de espécies baseada na morfometria sempre foi um processo bastante difícil, devido a grande variabilidade dentro e entre espécies desse gênero.

Neste contexto, mostram-se as técnicas de biologia molecular (tais como isoenzimas, DNA mitocondrial e ribossomal, os diversos tipos de marcadores moleculares, a reação da polimerização em cadeia (PCR), sequenciamento de DNA, entre outras) importantes ferramentas no estudo da taxonomia de fungos fitopatogênicos. Com o advento destes métodos, aliadas às morfológicas e fisiológicas, entre outras, a identificação e caracterização do patógeno pode se dar de maneira muito mais precisa e conclusiva. Nesse mesmo contexto de grande variabilidade de características do gênero, Weir et al. (2012) relataram a existência de complexos dentro do

gênero *Colletotrichum*, ou seja, grupos que anteriormente eram tidos como espécies de *Colletotrichum* puderam ser, através de análises filogenéticas, descritos como um complexo contendo várias espécies.

Atualmente, para a caracterização das espécies pertencentes aos complexos de *Colletotrichum*, são utilizadas sequências específicas de DNA. Estas são capazes de diferenciar isolados desse patógeno dentro de uma espécie ou entre espécies que são acometidas por *Colletotrichum*. Além do uso das regiões ITS para a discriminação de espécies do gênero *Colletotrichum*, regiões como, por exemplo, GAPDH tem sido utilizada neste tipo de estudo, na distinção dos complexos estudados. Nesse caso o iniciador forward GDF (5'-GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA-3') e o iniciador reverse GDR (5'-GGGTGGAGTCGTACTIONTGGAGCATGT-3') anelam-se a regiões codificadoras do gene G3PD (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) promovendo a amplificação de produtos úteis para a diferenciação de espécies ou complexos de espécies do gênero *Colletotrichum* (PERES et al., 2004). O gene calmodulin (CAL), por meio do par de iniciadores CL1 5'-GA(GA)T(AT)CAAGGAGGCCTTCTC e CL2A 5'-TTTTTGCATCATGAGTTGGAC, também têm sido amplificados e utilizados na identificação de espécies do gênero *Colletotrichum* (O'DONNELL, 2000). Essas três, conjuntamente com outras regiões, que formam parte da estratégia denominada de bar coding, estão sendo amplamente indicadas para a caracterização molecular de fungos fitopatogênicos como o *Colletotrichum*.

Assim, os avanços recentes no desenvolvimento de marcadores moleculares como ITS (WHITE et al., 1990; TAPIA-TUSSELL, 2008; PILEGGE et al., 2009), tem auxiliado na identificação de distintas espécies do gênero, ou mesmo para identificar a qual complexo do gênero *Colletotrichum*, descrito por Damm et al. (2012), os isolados pertencem. Um dos principais exemplos descritos por Weir et al. (2012), diz respeito ao *Colletotrichum gloeosporioides*, que anteriormente era tido como uma espécie e, após a caracterização genética com o uso do bar coding, é tido como um complexo contendo 22 espécies de *Colletotrichum*. O mesmo tem sido feito para outros complexos tidos anteriormente como espécie única (ex: *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum fragariae*).

Desta forma, as sequências dos locos Internal transcribed spacer ITS 1(F), ITS 4, Quitina sintase (CHS),  $\beta$ tubulina (TUB), Actina (ACT), Calmodulina (CAL) e Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), entre outros, serão utilizados no desenvolvimento do bar coding de identificação de isolados do gênero *Colletotrichum* no presente trabalho. A existência de complexos dentro do gênero *Colletotrichum* mostra a complexidade desse grupo de fungos

fitopatogênicos, bem como aumenta a gama de possíveis espécies que causam as características de antracnose em feijoa.

### 3 ORGANIZAÇÃO DA TESE

Esta Tese está dividida em dois capítulos. O primeiro teve como objetivo identificar e caracterizar isolados de *Colletotrichum*, que causam lesão de antracnose em feijoa. Tais análises visam atender à demanda de informações precisas sobre esse patógeno e auxiliar no desenvolvimento de práticas de manejo de pomares de feijoa, a fim de reduzir perdas causadas pela doença. Para tanto, analisamos as características morfológicas do patógeno, interação do patossistema, bem como as relações filogenéticas usando seis marcadores moleculares.

O segundo capítulo trata da realização de infecções cruzadas para verificar se isolados de *C. theobromicola* de feijoa, são capazes de causar doença em outros hospedeiros. A capacidade de colonização e produção de sintomas característicos de antracnose, de *C. theobromicola*, foi avaliada em três outras espécies frutíferas que estavam em fase de produção no mesmo período do ano. Assim, isolados retirados de frutos de macieira, goiabeira comum e morangueiro, foram inoculados em frutos de feijoa e assim verificar se as espécies de *Colletotrichum* testadas são capazes de reproduzir sintomas em seu hospedeiro anfitrião e também nas outras espécies frutíferas. Com o estabelecimento das infecções cruzadas poderão ser feitas inferências sobre características dos patógenos, como a capacidade do mesmo infectar mais de uma espécie.

Por fim foi incluído um tópico sobre Considerações finais, que apresenta os avanços e as principais implicações do presente estudo.

## 4 CAPÍTULO 1. Phylogenetic, morphology and host-pathogen relationship of *Colletotrichum theobromicola* associated with anthracnose disease in feijoa (*Acca sellowiana*)<sup>1</sup>

### 4.1 ABSTRACT

Feijoa (*Acca sellowiana*) is a native fruit of Brazil and Uruguay that has both a unique aroma and flavor, pharmacological properties, and ornamental features, among other ones. This species has been considered in its geographic origin and diversity regions as an alternative for small and medium farmers, but the occurrence of typical anthracnose symptoms in feijoa orchards has made it difficult or unfeasible for the production and commercialization of these fruits without the use of pesticides. Little is known about the causal agent of anthracnose symptoms in feijoa fruit, since that knowledge is required to design orchard management strategies. To elucidate some of the unknowns about the pathogen, this work analyzed its morphological, and pathogenic characteristics, as well as performed a multi-gene phylogenetic analysis based on the DNA sequencing of six loci: internal transcribed spacer (ITS) and genes Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Calmodulin (CAL), Actin synthase (ACT), Chitin synthase (CHS), and  $\beta$ -Tubulin 2 (TUB) of n isolates collected in fruits of orchard and naturally grown feijoa trees in Santa Catarina and Rio Grande do Sul, Brazil. Morphological data showed that the mycelial radial growth rate (mm/day) of 40 established colonies ranged from 7.5 mm/day to 10.2 mm/day; the length of the conidia (L) ranged from 13.8  $\mu\text{m}$  to 19.4  $\mu\text{m}$ ; the width (W) ranged from 4.0  $\mu\text{m}$  to 5.6  $\mu\text{m}$ ; and the L/W ratio ranged from 2.5  $\mu\text{m}$  to 4.2  $\mu\text{m}$ . The size of the appressoria ranged from 7.2  $\mu\text{m}$  to 10.8  $\mu\text{m}$  in length; from 5.4  $\mu\text{m}$  to 8.0  $\mu\text{m}$ , for width, and from 1.1  $\mu\text{m}$  to 1.5  $\mu\text{m}$ , for L/W. The isolates produced cylindrical or fusiform conidia, and appressory globules, nailed and irregular. The multi-gene phylogenetic analyses revealed that the anthracnose symptoms observed in the fruit, at both orchards and natural populations of feijoa, is caused by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum theobromicola*, assigned to *Gloeosporioides complex*. The morphological data also aligns the assigned species. These results, together with data on the life style of the isolates, will allow greater and better inferences about the management and handling of commercial orchards.

**Keywords:** Conidia. Appressoria. Multigene analysis. Aggressiveness.

### 4.2 INTRODUCTION

Feijoa (*Acca sellowiana* (O.Berg) Burret) is a fruit species native to southern Brazil and northern Uruguay. Its fruits have great potential for *in natura* consumption and its by-products are already commercialized in countries such as Australia, New Zealand, Ukraine and Colombia, among others. Some important pharmacological properties of feijoa were reported,

---

<sup>1</sup> Artigo submetido à revista Fungal Biology para publicação.

such as antioxidant action (AQUINO et al., 2018; BEYHAN et al., 2010; TUNCEL & YILMAZ, 2015), high levels of vitamin C (WESTON et al., 2010), activity in human intestinal epithelial cells (TURCO et al., 2016), anticancer properties (BONTEMPO et al., 2007), antibacterial and antifungal activities (BASILE et al., 2010), treatment and prevention of inflammation-related diseases, including inflammatory bowel disease (PENG et al., 2018), and acting in the treatment and prevention of type 2 diabetes and rheumatoid arthritis according to the US 20150157678 patent (FOO & WARSON, 2015; MUNIZ et al., 2018). The feijoa flowers are edible and the use of the species as an ornamental plant is feasible due to its size and colorful flowering (SAZIMA; SAZIMA, 2007).

In Brazil, the feijoa fruit production occurs mainly in the southern states (Santa Catarina and Rio Grande do Sul) (Figura 1), but its productivity on a commercial scale has been difficult due to the high occurrence of fruit anthracnose disease, among others fitossanitary problems. In orchards or underbrush areas, where the feijoa occurs naturally, the symptom of circular, necrotic and depressive spots, pink sporulation in the center of the fruit lesions and in the *seedling* tomb have led ANDRADE and DUCROQUET (1994) to called it anthracnose, supposedly caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. This disease is responsible for large losses in the orchards, many times up to 100 % of damage.

The identification of *C. gloeosporioides* by ANDRADE and DUCROQUET (1994), as a species that causes anthracnose lesions in feijoa, was based on morphological and cultural characteristics of the pathogen. Currently, however, the multilocus genetic characterization and greater information of the pathogen-host interaction are necessary to assign the species that cause disease in plants (ROJAS et al., 2010; WEIR et al., 2012). In addition, the economic importance of the anthracnose fungal agent can only be inferred by representative sampling in their area of occurrence with the host species, and by the confirmation between the causal agent and the damages to the crop. When both issues are solved, the development of management strategies and crop varieties resistant to anthracnose will be facilitated, regarding fruit production on a commercial scale (ANDRADE et al., 2007; DUCROQUET et al., 2000).

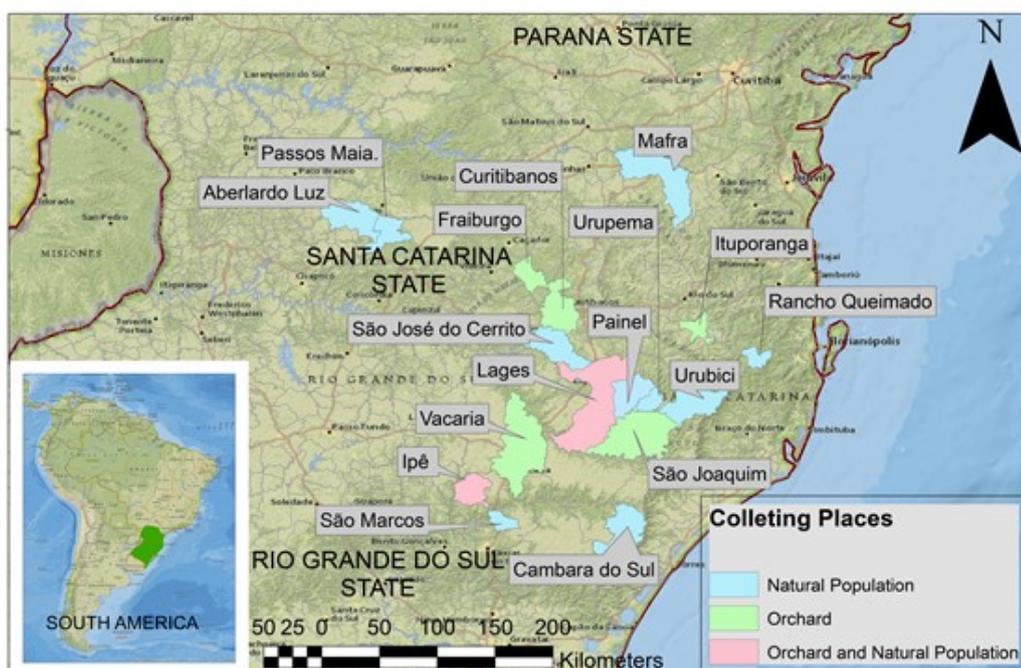
Thus, the present work aimed to identify and characterize *Colletotrichum* species that occurs in feijoa anthracnose lesion, in order to meet the demand of accurate information on this pathogen and help to design ways of laying out the orchards in order to reduce the losses caused by it. To accomplish that, we analyzed the pathogen morphological, and pathogenic characteristics, as well as the phylogenetic relationships using six loci molecular markers.

## 4.3 MATERIAL E METHODS

### 4.3.1 *Colletotrichum* isolates

Feijoa fruit with typical anthracnose symptoms were collected from distinct trees in 17 places from the states of Santa Catarina and Rio Grande do Sul (Figure 3), totaling 40 *Colletotrichum* samples (Supplementary material 1). The fruit underwent 70% alcohol asepsis for 1 min, sodium hypochlorite 1% for 3 min, triple washing with sterile distilled water and drying with absorbent paper. The inocula from infected tissue were removed with the section of a small region between the fruit bark and pulp, transferred to petri dishes containing 10 mL of sterile Potato Dextrose Agar (PDA - Kasvi K25-610102) medium and were kept at 25°C and 12 h of photoperiod for seven days. Pure cultures were obtained through monosporic isolates, by the serial dilution process (ALFENAS et al., 2007). Mycelial discs with 7 mm, from each of the 40 monosporic isolates, were subcultured into four petri dishes containing sterile PDA medium, one disc per plate being used, these were kept at B.O.D. under 25°C and 12 h photoperiod for 21 days. The isolates were preserved in filter paper at -20°C and in sterile water at 4°C, in the Laboratory of Developmental Physiology and Plant Genetics of the Federal University of Santa Catarina.

Figure 3 - Locations and isolates labelling where feijoa fruit were collected with anthracnose lesions at Rio Grande do Sul and Santa Catarina states.



### 4.3.2 Molecular characterization and phylogenetic analysis

The genomic DNA of the 40 monosporic isolates was extracted according to KURAMAE-IZIOKA (1997) method with the following modifications: the mycelium was scraped (100 to 150 mg of mycelium) in a laminar flow chamber, macerated with sterile sand, and 1 mL of SDS buffer (SDS 1%, Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 50 mM pH 8, 500 mM de NaCl and 10 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol). Polymerase Chain Reactions (PCR) were performed on a Veriti Thermal cycler (ThermoFisher Scientific) programmed for: 94°C for 3 min, followed by 29 cycles of 94°C for 30 s, primer annealing (forward and reverse) at 60°C for 30 s for  $\beta$ TUB, CHS and ACT, and 58°C for 30 s for ITS, GAPDH and CAL, 72°C for 30 s, and a final elongation step of 10 min at 72°C. PCR was performed within a microtube containing a final volume of 20  $\mu$ l and the amplicons were resolved on 1.5% agarose gel stained with GelRed™. The set of primers used in PCR reactions consisted of ITS-1F (GARDES & BRUNS 1993) and ITS-4 (WHITE et al., 1990) for ITS, GDF1 and GDR1 (TEMPLETON et al., 1992) for GAPDH, CLC1 and CLC2 (WEIR et al., 2012) for CAL, CHS-79F and CHS-354R (CARBONE & KOHN 1999) for CHS, ACT-512F and ACT-783R (CARBONE; KOHN 1999) for ACT, and T1 and T2 (O'DONNELL; CIGELNIK 1997) for TUB.

The PCR products were purified using polyethylene glycol (PEG 8000 – 20% and 2,5 M NaCl) precipitation and the quality of the amplicon was visualized on 1.5% agarose gel. Sequencing of the amplicons was performed using the BigDye v.3.1 terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA) and a DNA sequencer Ethanol, Acetate / EDTA. The samples were sequenced by the Sanger - ABI 3500XL Genetic Analyzer method. Sequencing reads were analyzed and assembled using CLC Genomics Workbench v9. All sequences obtained were deposited into the GenBank database (Supplementary material 1). Sequence data of additional isolates (Supplementary material 2) from the *Colletotrichum gloeosporioides* complex (WEIR et al., 2012) were downloaded from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). The gene sequences ACT, CAL, CHS, GAPDH, ITS and TUB were individually aligned using the MAFFT v7.271 (KATO & STANDLEY, 2013). The best substitution model for each molecular marker was selected using jModelTest v.2.1.7 (DARRIBA et al., 2012).

For ITS gene it was used the evolutionary model GTR + G; for GAPDH, the model HKY\_G, for CAL the GTR + I + G model, for ACT the HKY + G model, for TUB2 the GTR + I model, and for CHS the SYM+G model. Matrices were concatenated using a "Bio.Nexus"

tool in BioPython 1.70 (COCK et al., 2009) and used for a Markov chain Monte Carlo (MCMC) Bayesian analyses in MrBayes 3.1.2 (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003), via the Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research (CIPRES) Portal ([www.phylo.org](http://www.phylo.org)) for 10,000,000 generations. The interactions (25%) were discarded as burn-in. The tree was represented and edited using FigTree v1.3.1 software (RAMBAUT, 2009).

#### 4.3.3 Morphological characterization

The 40 *Colletotrichum* monosporic colonies were harvested and placed at 25°C and 12 h of photoperiod for 21 days, during that time colony diameters (mm) was measured daily in two perpendicular directions with a caliper rule. For each isolate four replicates were used, and the mean diameter was divided by the number of days to obtain the mycelial growth index (mm/day). Conidia and appressoria were analyzed according to their length (L), width (W), and ratio (L/W) and formats.

Five microscope slides were prepared from seven-day colonies and 20 conidia per isolate were measured per slide (n = 100 for each isolate). The appressoria were obtained on microscope slides (ROJAS et al., 2010) and 100 structures were measured per slide. Conidia were visualized shortly after the slide's preparation and appressoria were analyzed after 8 h, 12 h, 16 h and 20 h in incubation at 25 °C and 12 h photoperiod. The structures were visualized under a microscope (Olympus® BX-40) at 400 X magnitude with a coupled camera (Olympus® DP71). The ScopePhoto program was used to obtain the averages of length (µm) and width (µm). The data obtained were compared with those described in the literature and according to SUTTON (1992), FREEMAN et al. (1998), and ROJAS et al. (2010).

To calculate the Micellar Growth Index (MGI), 7 mm of mycelial disc from each of the 40 monosporic isolates was subcultured into four petri dishes containing PDA culture medium. All four replicates of each isolate were maintained under controlled conditions at 25°C and photoperiod of 12 h. Daily, after the second day of growth, and until the mycelium occupied the entire petri dish, the diameter (in mm) of the colonies was taken in two perpendicular directions. Growth in diameter was divided by the number of days to obtain the MGI from each of the 40 *Colletotrichum* isolates were subjected to analysis of variance and to the Scott-Knott test (SCOTT; KNOTT, 1974).

#### 4.3.4 Host-Pathogen relationship

Ripe and healthy feijoa fruit were collected from two different genotypes (BAG-85 and BAG-509) that were ripe at the same time, both from a commercial orchard in Fraiburgo, Santa Catarina state. The ripe point was standardized; the ripe stage was considered when the fruit was easily detached from the branch by a slight hand touch. Preferably, fruit of the same size or approximate size were chosen. The fruit underwent asepsis with 70% alcohol for 3 min, sodium hypochlorite 0.5% for 2 min, tripled washing with sterile distilled water and drying with sterile absorbent paper. The pathogenicity and aggressiveness of three, geographically distant isolates, were tested (Isolates IPÊ, FBR6 e SJQ6). For inoculation, the methodology described by BRAGANÇA et al. (2016), with some modifications, was followed. A spore suspension for each isolate at  $1 \times 10^6$  spores/mL<sup>-1</sup> was prepared from seven days old growth plates, 10 mL sterile distilled water was poured into each petri dish and with Drigalsky loop spores and water were homogenized. Finally, the solution was filtered and 20 µl were pipetted at two opposite points of the fruit (ALFENAS et al., 2007). Control fruit received sterile water without conidia.

The pathogen inoculation methods consisted of (a) perforated regions (5 perforations in the fruit made with a 5 x 0.3 mm needle), and (b) non-perforated regions. Sterile water was used in perforated and non-perforated regions of the fruit as a control. All treated fruit was placed in plastic trays with a lid containing moistened cotton to produce a humid chamber (BRAGANÇA et al., 2016). Treated and control fruits were placed in a randomized block design within trays that were kept in a controlled environment at 25°C, photoperiod of 12 h (DHINGRA; SINCLAIR, 1995). Ten fruits by genotype and by isolate were used. In each tray, replicated five times, it was allocated five fruits with perforations, five without perforations, and controls ones. Data of the lesion size were collected in all fruits at 4, 8, 12 and 16 days after the infection. Lesions were measured, with caliper rules, at this time interval in two perpendicular directions and at the two opposite inoculation points of each fruit.

Two morphological data analyzes were performed. First, statistical description was used to compare the groups formed by the treatments and the genotypes across time of evaluation. In the second analysis, we took the evaluation data of the lesions across time as pseudoreplications and models were tested to evaluate the interactions among factors. All analyzes and graphs were performed using the software R Development Core Team (2017).

## 4.4 RESULTS AND DISCUSSION

### 4.4.1 Molecular characterization and phylogenetic analysis

All primers utilized the present study (ITS, GAPDH, CAL, ACT, CHS-1, TUB2) successfully amplified fragments of the 40 isolates collected on feijoa fruit. The data set was analyzed and the phylogenetic relationships between the isolates were estimated (Figure 4). The multiloci Bayesian analysis resulted in a fully supported (PP = 1.0) monophyletic clade containing the 40 isolates evaluated in this study and the 10 *Colletotrichum theobromicola* isolates available on the GenBank database, which are inserted in the complex *C. gloeosporioides*, as described by Weir et al. (2012). The 40 isolates did not present a fully resolved phylogenetic relationship because of the low genetic variability among them. However, the FRB4 and PSM1 isolates formed a sister clade to the others *C. theobromicola* isolates (PP = 1.0), being the more evolutionary distant from the other 38 ones.

Between these two groups of isolates from southern Brazil there are other characterized isolates, such as the GenBank isolates MM317 of *C. theobromicola* from New Zealand cultivated plants. In addition, there are *C. theobromicola* isolates that are considered the causal agent of anthracnose in other plant species of different countries, such as: *Olea europaea* (isolated in Australia), *Limonium* sp. (Israel), *Annona diversifolia* (Mexico), *Teobroma cacao* (Panama), *Fragaria x ananassa* (United States), *F. vesca* (United States) and *Quercus* sp. (United States), as well as *C. theobromicola* syn. *C. fragariaea* isolated from *Fragaria x ananassa* (United States) and *C. theobromicola* syn. *C. gloeosporioides* f. *stylosanthes* isolated from *Stylosanthes viscosa* (Australia) (WEIR et al., 2012) are also in the same branch of *C. theobromicola* (PP = 1.0).

The species *C. theobromicola* was described by Rojas et al. (2010), characterizing diseases previously attributed to *C. gloeosporioides sensu stricto* species. According to Araújo et al. (2018), the causal agent of anthracnose in carnaúba fruit was first described as *C. gloeosporioides (sensu stricto)*, but with phylogenetic analysis the authors verified the presence of *C. theobromicola* and *C. tropicale* as the real causal agent as well. Other authors, such as MATOS et al. (2017) and OLIVEIRA et al. (2018) also confirmed the occurrence of *C. theobromicola* in Brazilian plant species, although the anthracnose lesions were initially attributed to *C. gloeosporioides (sensu stricto)* species.



(2007, 2008) successfully differentiated *C. fragariae* and *C. theobromicola* isolates from strawberry. In the differentiation of *C. fragariae* and *C. siamense* with the use of the ITS gene, the same genetic proximity was seen by Xie et al. (2010b). Based on ITS sequences, Weir et al. (2012) were able to differentiate the isolates in only 11 *Colletotrichum* species. However, when sequences of five to eight genes were used, it was possible to separate the isolates in 22 species of *Colletotrichum* in the *C. gloeosporioides* complex (WEIR et al., 2012).

These examples demonstrate the need of using a minimum number of molecular markers that gives robustness to the genetic characterization of the isolates. In this context, the present work it was used DNA sequences of six genes. Recently, *Colletotrichum* isolates from feijoa as well, collected in the municipality of São Pedro do Sul (RS), Brazil, were described as belonging to *C. siamense* species based on the blast for the genes ACT and TUB (FANTINEL et al., 2017). If this will be validated, we can raise the hypothesis of the occurrence of more than one species of *Colletotrichum* in feijoa fruit. However, since the authors of that article based they conclusions with the use of distinct molecular methodology comparatively to our work, further studies would be required to confirm the causal agent of the anthracnose in feijoa fruit.

#### 4.4.2 Morphological characterization

In the present study, it was found a significant variation between the average length (L) and width (W) of conidia and appressoria of the 40 *Colletotrichum* isolates, as well as for the L/W ratio (Table 1). The length of the conidia ranged from 13.8 to 19.4  $\mu\text{m}$ , bigger than those described for *C. theobromicola* (ROJAS et al., 2010), but within the overlap zone, from the values established for *C. gloeosporioides sensu stricto* (SUTTON, 1992). The conidia width varied from 4.0 to 5.6  $\mu\text{m}$  and the L / W ratio ranged from 2.5 to 4.2  $\mu\text{m}$ . These two parameters presented values within the intervals found by other authors as well, for the species *C. theobromicola* in *Theobroma cacao* (ROJAS, 2010), *Malpighia emarginata* (BRAGANÇA, 2014), *Allium fistulosum* (MATOS, 2017), and *Copernicia prunifera* (ARAÚJO, 2018). In the present study, the colonies showed hyaline, cylindrical or fusiform conidia. In addition, the appressoria dimensions ranged from 7.2  $\mu\text{m}$  to 10.8  $\mu\text{m}$  for length, 5.4 to 8.0  $\mu\text{m}$  for width and 1.1 to 1.5  $\mu\text{m}$  for L/W. All these appressoria values we found fit within those found for *C. theobromicola* by Rojas (2010). The colonies we developed showed appressoria with globules, nailed or irregular forms, sometimes these three formats occurred in the same isolate.

The mycelial growth index (MGI) of the colonies measured in the present study varied from 7.5 mm to 10.2 mm / day, values that also fit within those found by Rojas (2010) in *C. theobromicola*. The 40 isolates formed aerial mycelia ranging from light gray to dark and often with conidial salmon mass. These morphological results correspond as well with the species identification with the use of the phylogenetic analysis.

Table 1 - Means separation test for length (L), width (W), and length / width ratio (L/W) of appressoria and conidia, and Mycelial Growth Index (MGI), of 40 *Colletotrichum theobromicola* isolates from feijoa, collected in Santa Catarina and Rio Grande do Sul states, Brazil.

Isolates	Appressorium			Conidium			MGI
	L	W	L/W	L	W	L/W	
FRB1	8.2b	6.6c	1.2b	16.4c	4.4b	3.6e	7.8a
FRB2	8.8c	6.4b	1.3c	16.0c	4.4b	3.6e	8.0a
FRB3	8.6c	7.0c	1.2b	17.6e	5.0c	3.6e	7.7a
FRB4	10.8e	7.0c	1.5e	16.8d	4.4b	3.7e	7.8a
FRB5	9.2c	7.6d	1.3b	17.0d	4.2a	3.9f	8.9b
FRB6	9.8d	7.4d	1.3c	17.8e	5.0c	3.4d	9.0b
SJQ1	7.8b	6.2b	1.2b	16.0c	4.4b	3.5d	8.8b
SJQ2	9.6d	7.0c	1.3c	16.4c	4.4b	3.6e	9.2b
SJQ3	9.0c	7.4d	1.2b	17.6e	5.2c	3.3c	9.1b
SJQ4	8.4b	7.0c	1.2a	17.6e	5.0c	3.4d	8.6b
SJQ5	8.0b	6.0b	1.3c	14.2a	5.0c	3.1b	8.5a
SJQ6	10.8e	8.0d	1.4c	19.4g	5.0c	3.7e	8.3a
LGS1	9.0c	7.0c	1.3c	17.4e	4.4b	3.9f	8.4a
LGS2	7.6a	6.2b	1.2a	18.2f	5.0c	3.7e	8.3a
LGS3	8.4b	6.8c	1.3b	17.6e	4.6b	3.9f	8.2a
LGS4	8.6c	6.8c	1.3b	18.0e	5.0c	3.6e	8.2a
LGS5	8.0b	6.6c	1.2b	15.0b	4.2a	3.4d	8.2a
LAM	9.6d	7.4d	1.3b	17.2d	4.4b	3.8f	8.1a
PSM1	9.0c	7.2c	1.2b	18.4f	5.0c	3.7e	7.8a
PSM2	7.2a	6.0b	1.2a	18.4f	5.4c	3.4d	7.6a
PSM3	8.4b	6.6c	1.3b	17.8e	5.0c	3.7e	7.7a
PSM4	8.8c	6.8c	1.3c	17.6e	5.0c	3.8e	7.4a
CUT1	7.2a	5.4a	1.3c	16.6c	5.2c	3.3c	8.4a
CUT2	7.2a	5.4a	1.4d	16.8d	5.0c	3.3c	7.7a
IPE1	8.8c	7.0c	1.3b	17.4e	4.0a	4.0f	7.7a
IPE2	9.0c	7.0c	1.3b	17.8e	4.6b	3.9f	9.6b
URU1	9.0c	7.0c	1.3c	17.0d	4.0a	3.8f	10.2b

<b>URU2</b>	9.2c	7.0c	1.3c	18.0e	5.2c	3.4d	9.6b
<b>UPM</b>	10.4e	7.6d	1.4d	16.4c	4.0a	4.1g	9.3b
<b>SJC</b>	9.6d	7.8d	1.2b	17.8e	5.0c	3.4d	8.8b
<b>ITU</b>	10.0d	7.4d	1.3c	17.8e	4.6b	3.9f	9.4b
<b>RQM</b>	9.6d	8.0d	1.2b	19.2g	5.2c	3.6e	9.2b
<b>ALZ</b>	9.8d	7.6d	1.3c	17.6e	5.0c	3.7e	8.8b
<b>PNL</b>	10.8e	8.0d	1.4c	16.0c	5.0c	3.3c	7.8a
<b>VCR</b>	8.6c	7.0c	1.2a	13.8a	4.0a	3.2c	7.8a
<b>SND</b>	8.4b	6.8c	1.3b	17.8e	4.6b	3.9f	7.5a
<b>CMB</b>	7.2a	6.0b	1.2a	18.6f	5.0c	3.9f	8.1a
<b>SMC</b>	7.8b	6.8c	1.1a	14.2a	5.6c	2.5a	7.9a
<b>MFR</b>	8.0b	6.8c	1.2a	17.6e	5.0c	3.7e	8.2a
<b>VSG</b>	7.6a	6.4b	1.2a	18.2f	4.0a	4.2g	8.1a

Means followed by the same letter in a column do not differ at 5% level of probability by Scott Knott's range test.

#### 4.4.3 Host-Pathogen relationship

##### 4.4.3.1 Response of *C. theobromicola* isolates inoculated in different feijoa genotypes and with two inoculation strategy

The three isolates of *C. theobromicola* (IPÊ, FRB6 and SJQ6) were able to colonize and form typical anthracnose lesions around the place of inoculum application in the two feijoa genotypes tested (BAG-85 and BAG-509). This results demonstrated their pathogenicity in feijoa (Figure 6). Fruits with perforation in the skin showed higher susceptibility on the 4<sup>th</sup> day after inoculation. At this time, the lesions in perforated fruits were twice the size of the lesions in fruits without perforation. On the other hand, 29% fruits did not show symptoms at 4<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> day after the inoculation treatment without perforation. Based on the evaluation done on day 12, all the fruits with perforations and without perforation exhibited lesions; however, in the fruits with perforation, the lesions became more aggressive, covering all fruit up to the 16<sup>th</sup> day after inoculation (Figure 5). Since this is the first specific study of the pathogenicity of *C. theobromicola* on feijoa fruit in south of Brazil, there are no other related studies in the region to compare our results. However, Sharma (2017) found that *C. theobromicola* presented pathogenic after 7 days in avocado fruits, being a teleomorphes most aggressive.

Figure 5 - Box plots showing the variation in anthracnose lesions size (cm<sup>2</sup>) produced by the two treatments (With or Without perforations), from de 4<sup>th</sup> to 16<sup>th</sup> day after de inoculation.

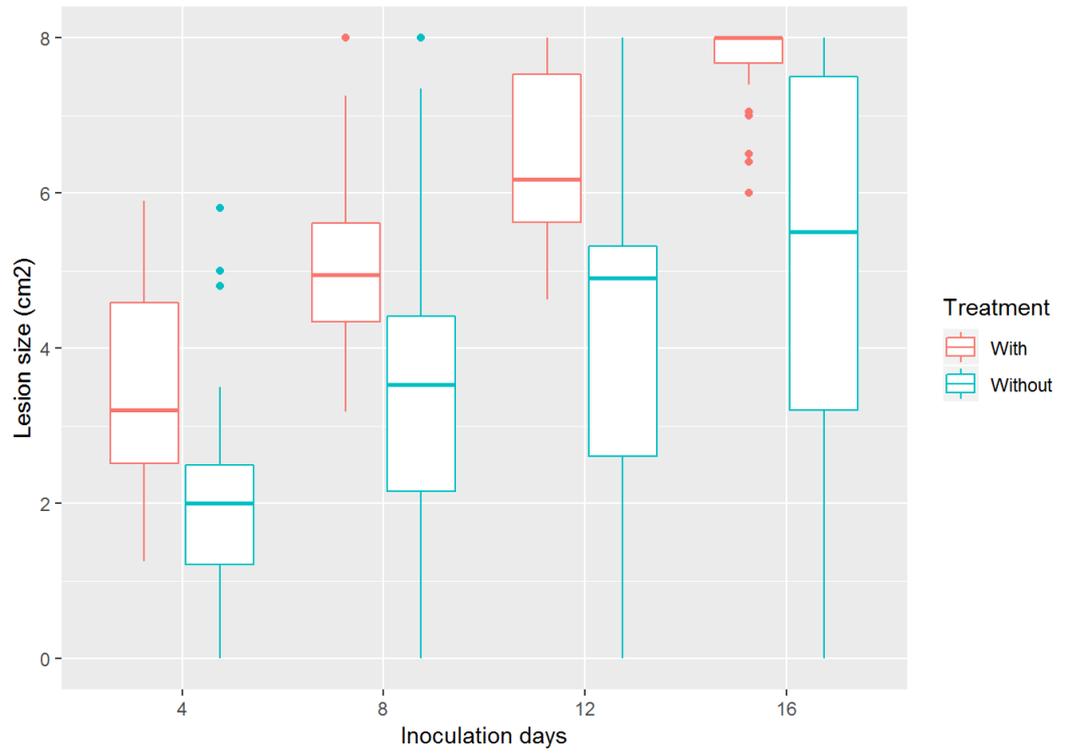
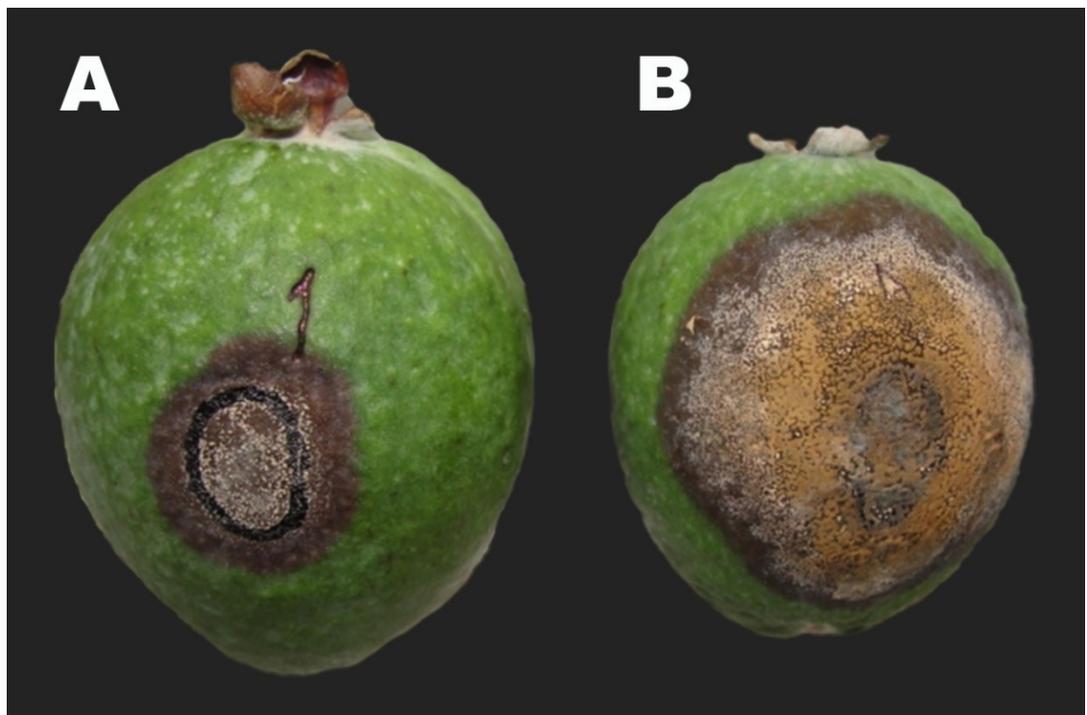


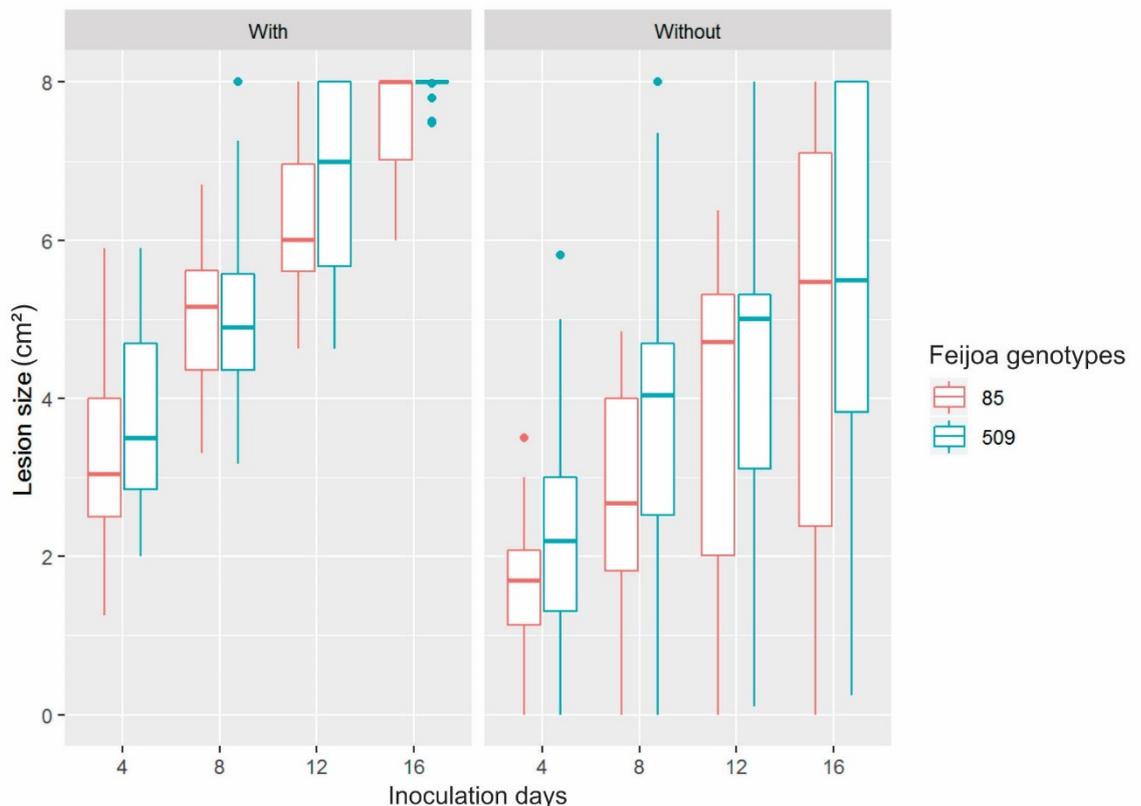
Figure 6 - Feijoa fruits with anthracnose lesions. A) Anthracnose lesion in feijoa fruit without perforation in the same timeframe B) Anthracnose lesion in feijoa fruit with perforation in the same timeframe.



The two feijoa genotypes tested were more susceptible to the pathogen in fruits with perforations. In addition, the results revealed that there was no significant difference in disease development in the two genotypes with the same inoculation method and time interval. In fruits without perforations, the increase rate in the lesions size was higher after 12 inoculation days, from this point on all fruits of genotype 85 presented the typical anthracnose lesions (Figure 7). Fruits of accession 509 when non-perforated showed more susceptibility in the evaluations at 4<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> day after inoculation, compared with the fruits of genotype 85. However, from day 12 after inoculation the means of growth of the lesions on fruits of both genotypes were similar.

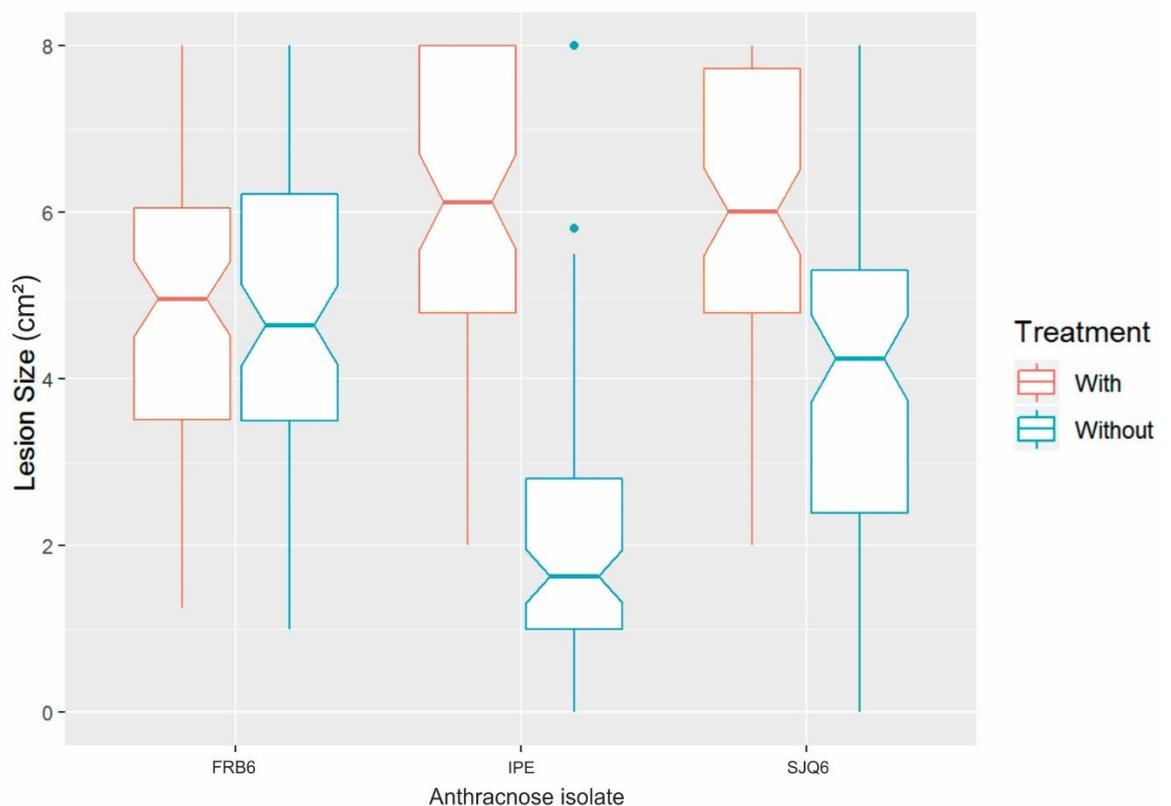
Already in the treatment with perforation, accesses 85 and 509 responded very similarly, in the evaluation of four days all the fruits presented a typical anthracnose lesion. As expected, in fruits with perforations, the periods of establishment of the fungus until the visible signs of sporulation in the fruits were faster and presented less variability.

Figure 7 - Box plots showing the variation in anthracnose lesions size (cm<sup>2</sup>) from de 4<sup>th</sup> to 16<sup>th</sup> day after de inoculation, in fruits from two feijoa genotypes (BAG-85 and BAG-509) exposed to two treatments (With or Without perforation).



The results of the treatments with perforation and without perforation showed that while fruits inoculated with the isolate FRB6 had similar lesions growth diameter (Figure 8), the fruit lesions caused by IPÊ and SJQ6 isolates varied according to the inoculation type. In later two cases, the aggressiveness from the two *C. theobromicola* isolates was considerably higher in perforated fruits than in non-perforated fruits, in the same timeframe.

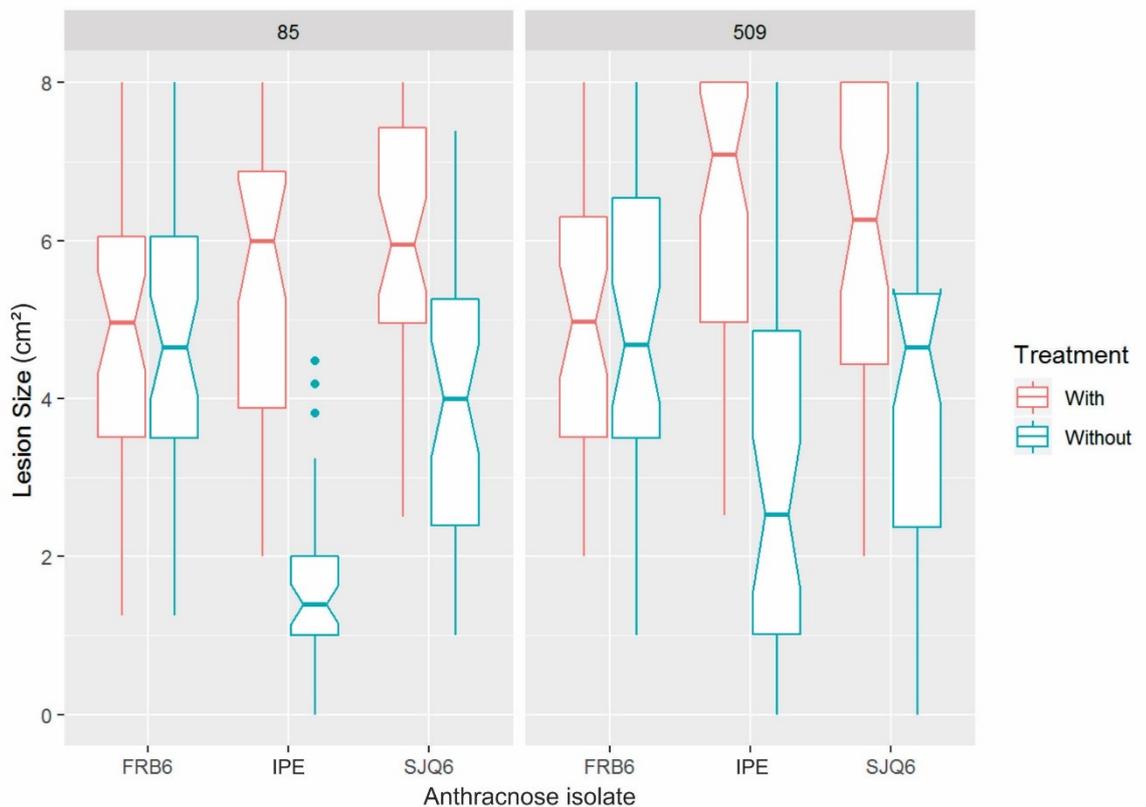
Figure 8 - Box plots showing the variation in anthracnose lesions size (cm<sup>2</sup>), with the two treatments (With or Without perforations) and by the three different *C. theobromicola* isolates (FRB6, IPÊ and SJQ6).



In the present study variation in aggressivity of distinct isolates was also verified. Fraiburgo isolate FRB6 showed no difference in fruit lesion development for both inoculation methods (with or without perforations) and feijoa genotypes (BAG-85 and BAG-509). Particularly, the Ipê isolate (IPÊ) had great growth difficulty to develop in non-perforated fruits of genotype 85. Thus, we can hypothesize that this genotype may have a higher degree of resistance to the pathogen in comparisons with others tested one (Figure 8). In addition, the IPÊ isolate was the lesser aggressive compared with the other two isolates tested (Figure 9). Moreover, this *C. theobromicola* isolate was extracted from fruit lesions of natural population

conditions and according to BRASIER (2001) and GIRAUD et al. (2010) pathogens under these conditions may be less aggressive, since isolates under agricultural conditions are able to do genetic recombination more frequently, which may lead to variation of the pathogen to a more aggressive strain.

Figure 9 - Box charts showing the variation in anthracnose lesions size (cm<sup>2</sup>), in the two treatments (With or Without perforation) by the three different *C. theobromicola* isolates (FRB6, IPE and SJQ6) and for the two feijoa genotypes (BAG-85 and BAG-509).



Statistically, the diameters of the lesions caused by the expansion of the fungus on the surface of the fruits showed significant differences, being that the inoculation treatment of the fungus in fruits with perforation allowed to expand lesions twice as large as the treatment without perforation. In contrast, it is specifically presented from the assessments on day 8, where the treatment remarkably accelerates the colonization of the fungus and consequently the formation of the germinative tubes, expansion, necrotization and sporulation.

Regarding the evaluation of the origin of the isolates in relation to the diameter of the lesion the analyzes revealed statistically significant differences among isolates. The isolates

from the Municipality of Ipê were less aggressive, and lesions were smaller and took more days to appear in comparison with the other two isolates. These results suggest the existence of some form of resistance of the feijoa genotypes. The isolates of Fraiburgo and São Joaquim had larger diameters in the lesions caused by the fungus, but this difference is marginal if the comparison is made with the means of the regression model. Overall, the results also suggest that the nature of resistance could be quantitative, which it is an information to breeders to adopt specific procedures to pursued the introduction of resistance genes in cultivated genotypes.

#### 4.5 CONCLUSION

The results obtained with the molecular and morphological analysis confirm that isolates from antracnose lesions of feijoa fruit, in the states of Santa Catarina and Rio Grande do Sul, belong to the *C. theobromicola* species, differently to the *C. gloeosporioides* which was previously described as the causative agent. The possible occurrence of *C. siamense* (FANTINEL et al., 2017) in feijoa fruit was not confirmed in the present study, probably because in the present study it was used a larger number of molecular markers (six) for species identification comparatively to two used in that previous one.

The Host-Pathogen relationship analysis showed that the isolates are more aggressive in fruit with holes or openings in the skin. In addition, the isolates from the State of Santa Catarina, which are mostly from commercial orchards, were more pathogenic and aggressive than those isolated from Rio Grande do Sul, showing that orchard management may favor the development of the pathogen aggressiveness.

The phytopathogenic fungi characterization advancement obtained in the present study could help the design and use of orchards management practices, and the genetic breeding programs, with the purpose to obtain selected varieties with high resistance to the antracnose pathogen. From our results it is also possible to carry out more advanced studies on the lifestyle of *C. theobromicola* in feijoa, and consequently the establishment of sustainable better phytosanitary practices.

## 5 CAPÍTULO 2. Inoculação cruzada, de espécies de *Colletotrichum*, em frutíferas de clima subtropical e temperado

### 5.1 RESUMO

Os fungos filamentosos do gênero *Colletotrichum* e seu teleomorfo *Glomerella* são considerados importantes fitopatógenos, amplamente disseminados, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais. Espécies de *Colletotrichum* podem causar doenças em diversos hospedeiros e a sua capacidade de infecção está ligada à diversas características, tais como, espécies do patógeno, hospedeiro, condições ambientais e práticas de manejo. O potencial de infecção cruzada desses patógenos, com uma ampla gama de hospedeiros, apresentam grandes implicações para o controle da doença e gerenciamento de riscos para biossegurança. Nesse contexto, este trabalho tem como objetivo realizar bioensaios de inoculações cruzadas, com o intuito de verificar a especificidade dos isolados de *C. theobromicola* de feijoa. Sendo assim, foram utilizadas quatro espécies frutíferas (feijoa, macieira das variedades Fuji e Gala, goiabeira comum e morangueiro) e seus respectivos isolados causadores de antracnose (*C. theobromicola*, *C. nymphaeae*, *C. fruticola* e *C. spp*). Os isolados foram inoculados nos seus hospedeiros, de onde foram retirados e também nas outras três espécies testadas. Utilizaram-se dois métodos de inoculação para verificar a patogenicidade dos isolados e também sua agressividade. Todos os isolados testados foram capazes de formar lesões características de antracnose, tanto nos seus hospedeiros principais como nos secundários. A velocidade de aparecimento e crescimento das lesões variou de acordo com o método de inoculação, espécie frutífera e isolados testados. Os resultados indicaram que o número de hospedeiros de *C. theobromicola* de feijoa pode ser muito maior do que o apresentado nessa pesquisa. Desta forma, este patógeno pode provocar, em algum momento, perdas de produtividade para mais de uma espécie vegetal.

**Palavras chave:** Especificidade. Antracnose. Biossegurança. Produtividade.

### 5.2 ABSTRACT

*Colletotrichum* filamentous fungi and its teleomorph *Glomerella* are considered important phytopathogens, widespread mainly in tropical and subtropical regions. *Colletotrichum* species can cause disease in several hosts and their pathogen infection capacity is linked to diverse characteristics such as pathogen species, host, environmental conditions and management practices, among others. The potential for cross-infection of these pathogens with a wide range of hosts has implications for disease control and risk management for biosafety. In this context, this work aims to carry out cross - inoculation bioassays in order to verify the *C. theobromicola* specificity of isolates from feijoa. Thus, four fruit species (feijoa, Fuji and Gala apple varieties, common guava and strawberry) and their respective anthracnose isolates (*C. theobromicola*, *C. nymphaeae*, *C. fruticola* and *Colletotrichum spp*) were used. The isolates were inoculated in their hosts, from where they were isolated, and also in the other three species tested. Two inoculation methods were used to verify the isolates pathogenicity and also their aggressiveness. All isolates tested were able to form anthracnose characteristic lesions in both their primary and secondary hosts. The speed of onset and growth of lesions varied according

to inoculation method, fruit species and isolates tested. Our results revealed that the host range of *C. theobromicola* feijoa may be much larger than that presented in this research. Therefore, this pathogen can provoke, at some point, productivity losses for more than one species.

**Keywords:** Specificity. Anthracnose. Biosecurity. Productivity.

### 5.3 INTRODUÇÃO

O gênero *Colletotrichum* engloba cerca de 190 espécies descritas. Estas podem ser saprófitas, endofíticas ou fitopatogênicas, sendo as últimas causadoras de doenças economicamente importantes, conhecidas como antracnose. As espécies de *Colletotrichum* apresentam complexos ciclos de vida, podendo ter fases biotróficas, necrotróficas e principalmente hemibiotróficas (MENEZES, 2006). A dinâmica do estilo de vida desse patógeno, faz com que um simples isolado possa ter uma vasta gama de hospedeiros e um hospedeiro possa ser atacado por diversas espécies de *Colletotrichum*.

Os ciclos de vida de muitas espécies desse gênero, está ligado ao seu potencial de infecção e número de hospedeiros em que podem se instalar, sendo assim a modificação de ecossistemas naturais para agrícolas, pode acarretar, também, na mudança do seu estilo de vida de fungos fitopatogênicos. Essas modificações criam grandes dificuldades na administração das doenças que ocorrem em lavouras e pomares (PHOULIVONG et al., 2012). E essas variações nos padrões de estilo de vida, desses fungos, precisam ser incorporadas aos processos de desenvolvimento de políticas de biossegurança (NEWTON et al., 2010; STRANGE; SCOTT, 2005).

Fungos fitopatogênicos, como os do gênero *Colletotrichum*, estão amplamente difundidos à nível vegetal e geográfico. Assim, para a sustentabilidade da produção agrícola é muito importante gerenciar a forma como se dá a interação entre patógenos, hospedeiros e outros componentes. Em ecossistemas naturais é possível verificar que a ocorrência de fungos fitopatogênicos não é dominante. Já em ecossistemas agrícolas, a capacidade de ocorrência e dispersão dos microrganismos é muito mais fácil, devido a condições favoráveis para a ocorrência de doenças (CROUS et al., 2016; McTAGGART et al., 2016; ZEILINGER et al., 2016).

A gama de espécies vegetais, para um patógeno, pode também ser maior devido à ocorrência de lesões assintomáticas, interações endofíticas, latentes e quiescentes. Nesses casos, as lesões não são vistas, mas podem servir como fonte de inóculo para a infecção de outras plantas (JAMES et al., 2014). A ocorrência de isolados de *Colletotrichum*, em sua fase

necrotrófica, podem também aumentar a ocorrência de doenças, devido a sua permanência em restos culturais. (FREEMAN et al., 2001; PERES et al., 2005; PHOULIVONG et al., 2012; UDAYANGA et al., 2013; YANG et al., 2009).

Nesse contexto é possível verificar que o conhecimento dos hospedeiros de um fungo fitopatogênico torna-se muito importante para a segurança alimentar, biodiversidade e biovigilância. Considerando que os patógenos são capazes de sofrer mutações e recombinação genética novos genótipos com maior patogenicidade surgem constantemente (BRASIER, 2011; FISHER et al., 2012; GIRAUD et al., 2010; WINGFIELD et al., 2001) dificultando o gerenciamento de risco e danos à produção de alimentos.

Assim, o presente trabalho se propõe a realizar infecções cruzadas para verificar a gama de hospedeiros de isolados de *C. theobromicola* de feijoa. A capacidade de colonização e produção de sintomas característicos de antracnose, de *C. theobromicola*, será testada em três espécies frutíferas que estejam em fase de produção no mesmo período do ano. Da mesma forma, isolados retirados de frutos de macieira, goiabeira comum e morangueiro, serão inoculados em frutos de feijoa e assim verificar se as espécies de *Colletotrichum* testadas são capazes de reproduzir sintomas em seu hospedeiro anfitrião e também nas outras espécies frutíferas. Com o estabelecimento das infecções cruzadas poderão ser feitas inferências sobre algumas características dos patógenos, como a capacidade do mesmo infectar mais de uma espécie.

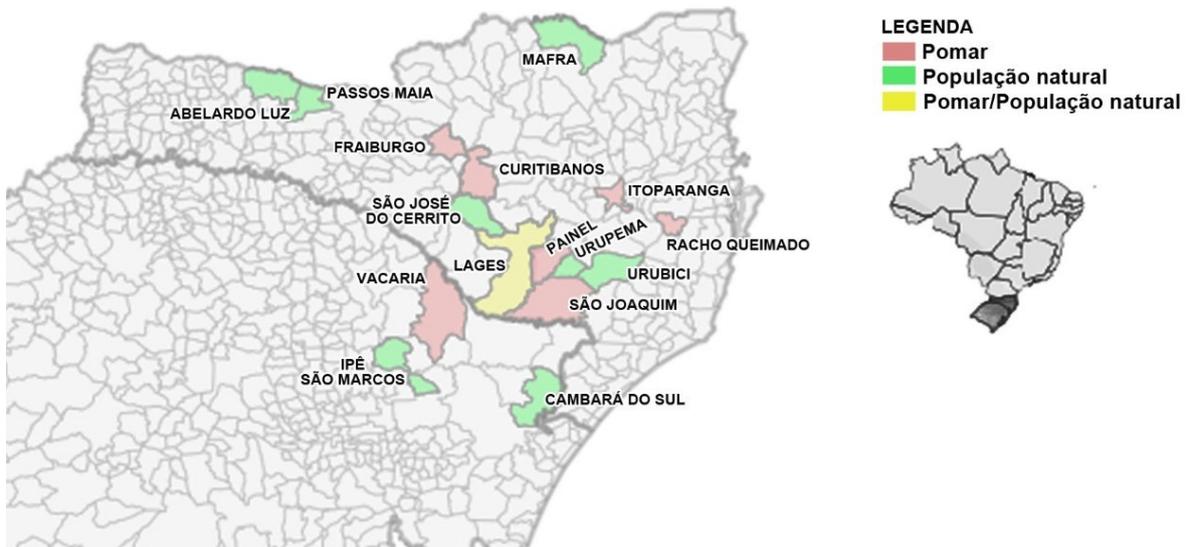
## 5.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.4.1 Obtenção e estabelecimento dos isolados de *C. theobromicola* de feijoa

Frutos maduros de feijoa, contendo lesões de antracnose foram coletados de plantas adultas nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, totalizando 40 isolados de 17 localidades Figura 10 e Tabela 2.

Em câmara de fluxo laminar, foram separados 5 frutos maduros (frutos colhidos facilmente) e com lesão de antracnose (Figura 11a) de cada um dos locais de coleta. Os frutos passaram por uma fase de assepsia, que consistiu na imersão dos mesmos por 5 min em hipoclorito 0,5 %, posteriormente lavados com água destilada por duas vezes e secos com papel toalha.

Figura 10 - Locais de coleta dos frutos de feijoa, nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.



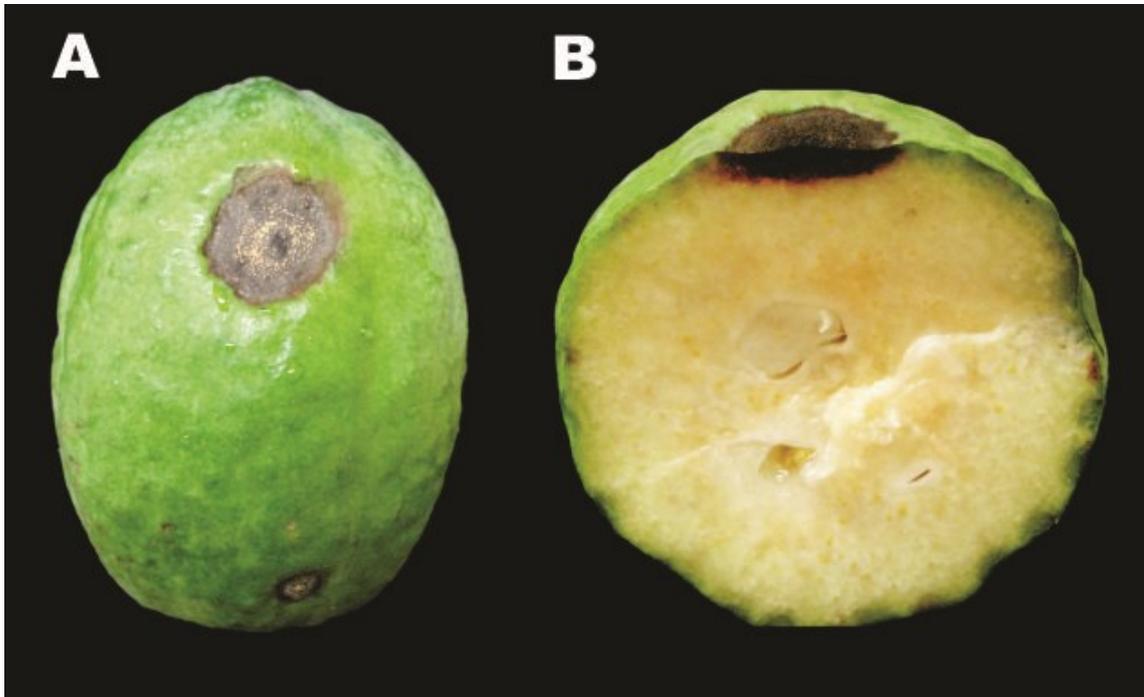
O inóculo, de área retangular, foi retirado da região de lesão entre a casca e a polpa, com o auxílio de bisturi e pinça autoclavada a 121°C e 1 atm por 30 min. Este foi imediatamente colocado em placa de petri contendo 10 mL de meio BDA (Batata Dextrose Agar - Kasvi K25-610102), o meio contido nas placas foi previamente autoclavado durante 15 min, após atingir a temperatura de 121°C, sob 1,0 atm de pressão.

A área do material seccionado, mais próxima à casca, foi colocada em contato com o meio de cultura. As placas foram mantidas à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 h. Após 7 dias de crescimento, regiões livres de contaminação foram repicadas para novas placas de Petri contendo 10 mL de meio BDA.

Tabela 2 - Identificação dos isolados, estado de procedência e em qual forma de produção o fruto coletado se encontrava.

<b>Nº</b>	<b>Código</b>	<b>Localização</b>	<b>Ecossistema</b>
1	FRB1	Fraiburgo/SC	Pomar
2	FRB2	Fraiburgo/SC	Pomar
3	FRB3	Fraiburgo/SC	Pomar
4	FRB4	Fraiburgo/SC	Pomar
5	FRB5	Fraiburgo/SC	Pomar
6	FRB6	Fraiburgo/SC	Pomar
7	LGS1	Lages/SC	Pomar
8	LGS2	Lages/SC	Pomar
9	LGS3	Lages/SC	Pomar
10	LGS4	Lages/SC	Pomar
11	LGS5	Lages/SC	Pomar
12	LAM	Lages/SC	População Natural
13	SJQ1	São Joaquim/SC	Pomar
14	SJQ2	São Joaquim/SC	Pomar
15	SJQ3	São Joaquim/SC	Pomar
16	SJQ4	São Joaquim/SC	Pomar
17	SJQ5	São Joaquim/SC	Pomar
18	SJQ6	São Joaquim/SC	Pomar
19	CUT1	Curitibanos/SC	Pomar
20	CUT2	Curitibanos/SC	Pomar
21	URU1	Urubici/SC	População Natural
22	URU2	Urubici/SC	População Natural
23	UPM	Urupema/SC	População Natural
24	PSM1	Passos Maia/SC	População Natural
25	PSM2	Passos Maia/SC	População Natural
26	PSM3	Passos Maia/SC	População Natural
27	PSM4	Passos Maia/SC	População Natural
28	CMB	Cambara do Sul/SC	População Natural
29	SMC	São Marcos/SC	População Natural
30	MFR	Mafra/SC	População Natural
31	ITU	Ituporanga/SC	Pomar
32	SJC	São José do Cerrito/SC	População Natural
33	ALZ	Abelardo Luz/SC	População Natural
34	SND	Ipê/RS	Pomar
35	IPE1	Ipe/RS	População Natural
36	IPE2	Ipe/RS	População Natural
37	VSG	Ipê/RS	Pomar
38	PNL	Painel/RS	População Natural
39	RQM	Rancho Queimado/SC	População Natural
40	VCR	Vacaria/RS	Pomar

Figura 11 - Frutos de feijoa com ataque natural de antracnose. A) Lesão de antracnose em feijoa apresentado tamanho e esporulação para fins de caracterização. B) Secção do fruto cortado no meio da lesão para facilitar o isolamento.



#### 5.4.2 Isolamento monospórico

Uma pequena região da borda de cada uma das 40 colônias foi colocada em microtubos, juntamente com 1,0 mL de água estéril e estes foram agitados em agitador vórtex por 20 s. Com o auxílio de uma micropipeta 1 mL de solução foi retirada e pipetada em câmara de Neubauer para estimar a concentração de conídios. Posteriormente, as soluções, quando necessário, foram diluídas para a concentração de  $1 \times 10^5$  conídios/ml (ALFENAS et al., 2007). Realizada a diluição foram pipetados 10  $\mu$ l das soluções em 4 placas de petri contendo meio de cultura Ágar-água (AA), sendo o volume espalhado pela placa com o auxílio de uma alça de Drigalsky, previamente esterilizada. As placas de Petri foram então vedadas e colocadas em incubadora (B.O.D) por 24 h à uma temperatura de 25°C e 12 h de fotoperíodo.

Encerrado o período de incubação, as placas de petri foram abertas em câmara de fluxo e os conídios presentes foram visualizados com microscópio ótico e “pescados” com o auxílio de uma agulha de 12,7 x 0,3 mm. Os conídios retirados um a um foram transferidos para placas de petri contendo meio de cultura BDA. Estas foram novamente incubadas, nas mesmas condições anteriores, para o crescimento das colônias monospóricas. Para a realização de

isolamento monospórico, seguiu-se a metodologia descrita por DHINGRA and SINCLAIR (1994).

#### **5.4.3 Obtenção dos frutos para ensaios de inoculação**

Os testes de infecção foram realizados em frutos sadios de feijoa (*Acca sellowiana*), das variedades Fuji e Gala de macieira (*Malus domestica*), de goiabeira comum (*Psidium guajava*) e de morangueiro (*Fragraria ananassa*). Os frutos, sadios, de feijoa foram coletados do pomar comercial na propriedade do senhor Shu Otani, na cidade de São Joaquim/SC. Os frutos de macieira das variedades Fuji e Gala, foram adquiridos da empresa Sanjo Cooperativa Agrícola, na cidade de São Joaquim, SC. Os frutos de goiabeira comum e de moranguinho foram adquiridos na Central de Abastecimento - CEASA da cidade de São José, SC. Todos os frutos passaram por um processo de assepsia, que consistiu na imersão dos mesmos por 5 min em hipoclorito 0,5%, lavagem com água destilada por duas vezes, secos com papel toalha e agrupados.

#### **5.4.4 Isolados de *Colletotrichum* de feijoa e das outras espécies frutíferas, utilizados nas inoculações cruzadas**

Nas inoculações cruzadas foram utilizados os seguintes isolados de *C. theobromicola* de feijoa (Capítulo 1): VCR, proveniente da cidade de Vacaria, RS, SJC da cidade de São José do Cerrito, SC, e LGS 2, da cidade de Lages, SC. De goiabeira comum (*Psidium guajava*) colônias de *C. nymphaeae* (BRAGANÇA et al., 2013), da cidade de Cândido Rodrigues, SP, foram cedidas pelo professor Nelson Massola Júnior ESALQ/USP, isolado que foi caracterizado e identificado como Col 9 (CPC 20893- NCBI). Os isolados de macieira MANE 137 e MANE 147, da espécie *C. nymphaeae* e *C. fructicola*, respectivamente (VELHO et al., 2015), coletados em São Joaquim, foram cedidos pelo professor Marciel Stadnick, UFSC. O isolado de moranguinho coletado em Rancho queimado e cedido pela Dra. Caroline Luiz Pimenta. Todas as colônias de *Colletotrichum* cedidas foram retiradas de culturas monospóricas e após recebidos foram crescidos em meio de cultura BDA por 7 dias, sob condições controladas de temperatura e fotoperíodo, para então serem utilizadas.

## 5.4.5 Inoculações

### 5.4.5.1 Isolados de feijoa e delineamento experimental

Foram realizadas inoculações dos isolados de feijoa (VCR, LGS2 e SJQ2) em frutos de cada uma das espécies estudadas: goiabeira comum, macieira (variedades Fuji e Gala), morangueiro e a própria feijoa, totalizando cinco ensaios. Utilizaram-se 60 frutos de cada espécie ou variedade para cada isolado testado. Nos ensaios, foram testados tratamentos (com e sem perfurações) em cinco parcelas de 5 frutos. Além disso, para cada ensaio foram estabelecidas duas parcelas de cinco frutos cada, como testemunha, os quais foram inoculados com água estéril. Assim, o delineamento de tratamentos foi um fatorial com os fatores isolados e métodos de inoculação, e no caso da macieira, um terceiro fator, as variedades. As parcelas foram arranjadas de forma completamente casualizada.

### 5.4.5.2 Ensaios de infecção cruzada

Para a realização da infecção cruzada os isolados Col 9, MANE 137, MANE147 e CLP1, foram inoculados simultaneamente em frutos de feijoa e frutos das espécies hospedeiras das quais os respectivos isolados foram coletados, neste caso goiabeira comum, nas variedades Fuji e Gala, de macieira, e morangueiro, respectivamente. A inoculação, dos isolados, nos seus hospedeiros foi realizado com o intuito de verificar se os mesmos eram mais agressivos em frutos da própria espécie ou em frutos de feijoa.

Da mesma forma, um isolado de feijoa foi inoculado em frutos de goiabeira comum, nas variedades Fuji e Gala, de macieira, e de morangueiro, com os mesmos tratamentos e delineamento experimental.

## 5.4.6 Métodos de Inoculação

Foram testados dois métodos de inoculação: frutos com perfurações (método 1 - **M1**), as perfurações foram feitas agulha de 12 x 0,3 mm, sendo esta cortada para 5 mm de comprimento com o intuito da perfuração não ser muito profunda; frutos sem perfurações (método 2 - **M2**). O controle foi realizado com água estéril nas mesmas condições e presença ou ausência de perfurações (**H<sub>2</sub>O**). Para a preparação da suspensão de esporos, de cada isolado, foram vertidos 10 mL de água estéril sobre cada colônia, sendo esta posteriormente raspada e

homogeneizada com o auxílio de alça de Drigalsky autoclavada. A concentração de conídios de cada isolado foi estabelecida em câmara de Neubauer, alcançando-se no final uma concentração de  $1 \times 10^5$  conídios/mL<sup>-1</sup> para a realização das inoculações (ALFENAS et al., 2007).

Em dois pontos opostos dos frutos, pipetaram-se 20 µl da suspensão de conídios. Os frutos foram acondicionados em bandejas plásticas, com tampa e algodão molhado para a realização de câmara úmida. As bandejas permaneceram em um ambiente com temperatura controlada (25°C) e fotoperíodo (12 h), sendo os frutos observados diariamente durante 25 dias após a inoculação, ou até pelo menos um fruto ser totalmente tomado pela doença.

Com o surgimento das primeiras lesões, estas começaram a ser medidas em duas direções perpendiculares. Foram obtidas cinco medidas em intervalos de dois dias e com o auxílio de uma régua centimetrada. Juntamente com a obtenção das medidas das lesões realizou-se a observação do índice de ocorrência de lesões em frutos com perfuração e nos frutos não perfurados, bem como a velocidade de desenvolvimento das lesões e nível de esporulação.

Para o conhecimento de diferentes níveis de agressividade dos isolados utilizados, a média dos diâmetros obtidos por lesão foi comparado com os obtidos nas diferentes espécies frutíferas ou variedades (no caso dos frutos de macieira), nas diferentes formas de inoculação (para frutos de macieira, goiaba comum, morangueiro e a própria feijoa) e também os diferentes isolados.

Após o término da coleta de dados, cinco frutos de cada uma das variedades de macieira, de goiabeira comum, morangueiro e de feijoa, que apresentaram lesão de antracnose foram selecionados e uma pequena região foi introduzida em meio de cultura BDA. Esse processo final foi realizado para fechar os postulados de Koch.

Com a obtenção das médias das lesões foi possível calcular a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD).

$$\mathbf{AACPD} = \sum \left[ \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \times (t_{i+1} - t_i) \right]$$

Onde ,  $y_i$  é o diâmetro de uma lesão no tempo  $t_i$ , em dias, e  $y_{i+1}$  é o diâmetro no tempo  $t_{i+1}$  (DE CAPDEVILLE et al., 2002).

Após o cálculo da AACPD, para os fatores progresso da doença com e sem perfurações, as médias encontradas do progresso da doença dos diferentes isolados nos frutos de diferentes espécies foram submetidas a Análise de Variância. Quando o F-teste foi estatisticamente significativo, as médias foram agrupadas pelo teste de SCOTT and KNOTT (1974) com o auxílio do software ASSISTAT (SILVA, 2009). Os gráficos para a representação das AACPD foram realizados no programa R (R Development Core Team, 2017).

## 5.5 RESULTADOS

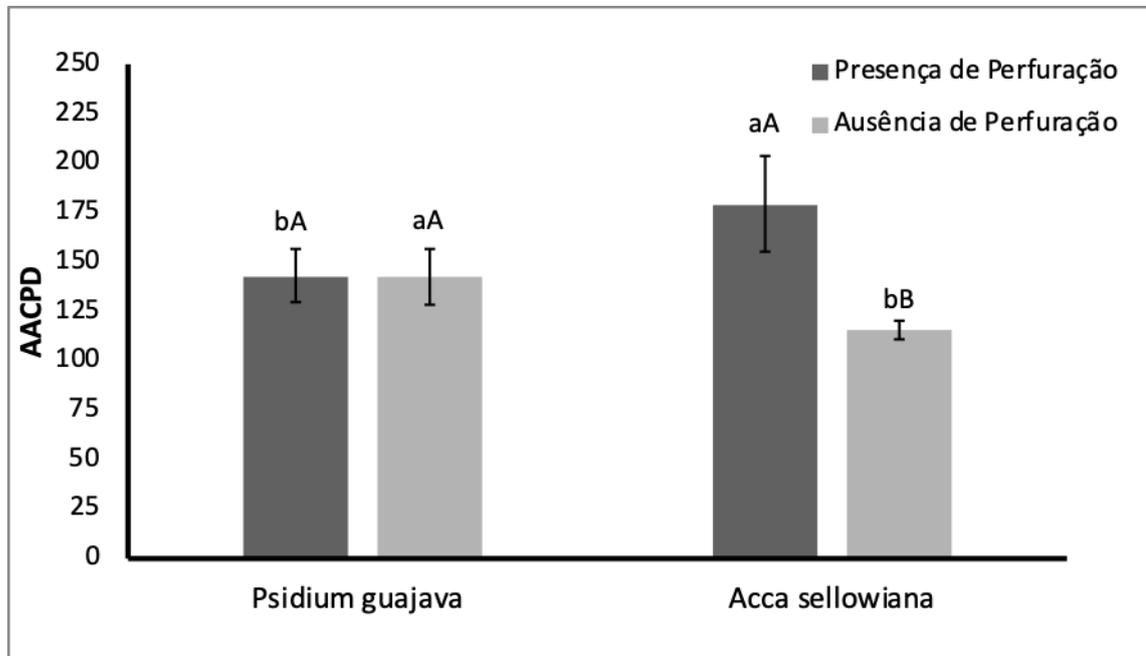
### 5.5.1 Resposta da infecção de isolados de *Colletotrichum theobromicola* de feijoa em frutos de outras espécies

#### 5.5.1.1 Goiabeira comum:

Em goiabeira comum (*Psidium guajava*), houve diferença significativa entre os frutos inoculados com os isolados de feijoa VCR, LGS2 e SJC, e também entre os dois métodos de inoculação (com e sem perfuração dos frutos). Verificou-se que nos frutos em que foram feitas perfurações o desenvolvimento da doença se deu de forma mais agressiva. Os frutos não perfurados demoraram o dobro do tempo (8 dias) para começarem a apresentar lesões de antracnose, quando isso ocorreu, uma vez que em 60% dos frutos não se verificou formação de lesões. Os frutos inoculados com água estéril (controle) não apresentaram crescimento da doença.

Os frutos perfurados, inoculados com o isolado VCR, apresentaram o desenvolvimento mais agressivo da doença quando comparado aos frutos perfurados e inoculados com os isolados SJC e LGS 2 (Figura 12). Os isolados SJC e LGS2 não diferiram estatisticamente entre si, porém ambos foram mais agressivos em frutos perfurados. Estes resultados demonstram que a presença de lesões mecânicas ou causadas por insetos, por exemplo, podem estar ligadas a agressividade de *C. theobromicola* em frutos. É importante mencionar que o F-teste da Anova foi estatisticamente significativo tanto para isolados quanto para métodos de inoculação. Entretanto, o quadrado médio do segundo fator foi 36 vezes superior ao do primeiro fator. Isto significa dizer, que em havendo lesões nos frutos de outras espécies, o inóculo de feijoa pode se desenvolver normalmente.

Figura 12 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), ilustrando a interação entre os fatores métodos de inoculação (presença ou ausência de perfurações) e diferentes isolados de feijoa. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não diferem para o fator métodos de inoculação para o mesmo isolado.



Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem para a resposta dos três isolados à presença ou ausência de perfurações, em frutos de goiabeira comum (*Psidium guajava*).

#### 5.5.1.2 Macieira:

A Análise da Variância revelou que houve significância estatística para todos os fatores e interações na inoculação de *C. theobromicola*, em frutos de macieira. Os isolados VCR e LGS2 foram mais agressivos em frutos perfurados da variedade gala. O isolados SJC foi mais agressivo em frutos perfurados da variedade Fuji (Figura 13) (Figura 15). Nos frutos não perfurados, todos os isolados foram mais agressivos quando inoculados também na variedade Fuji (Figura 13) (Figura 14).

Em frutos de macieira, sem perfurações, os três isolados apresentaram, estatisticamente, o mesmo grau de agressividade. Já em frutos perfurados das duas variedades, o desenvolvimento dos três isolados se mostrou estatisticamente diferente. Nenhuma variedade de macieira apresentou resistência à *C. theobromicola* proveniente de isolados de feijoa (Figura 15).

Figura 13 - Frutos das variedades Fuji (A) e Gala (B) inoculados com o isolado SJC de feijoa, na presença de perfurações, 14 dias após a inoculação.

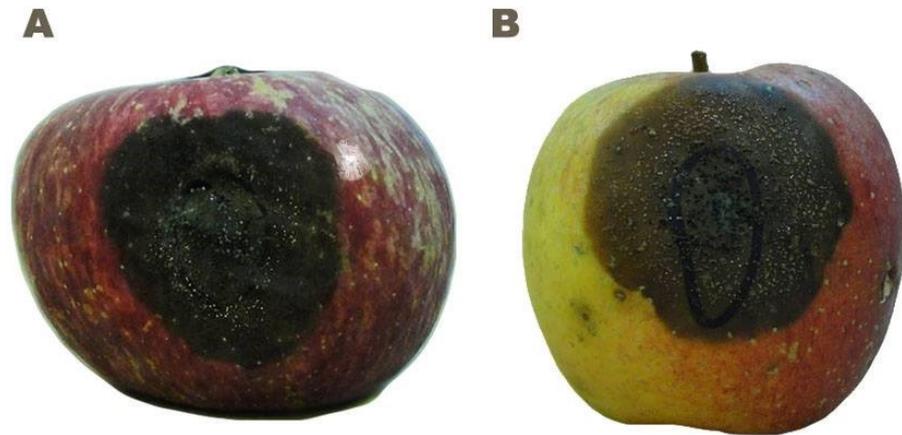


Figura 14 - Frutos de macieira inoculados com o isolado SJC, sem a existência de perfurações (A e B) e inoculados com o mesmo isolado na presença de perfurações (C e D), 14 dias após a incubação.

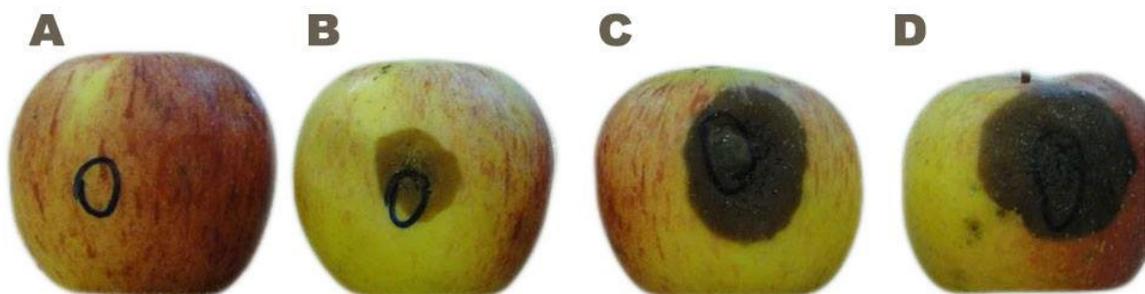
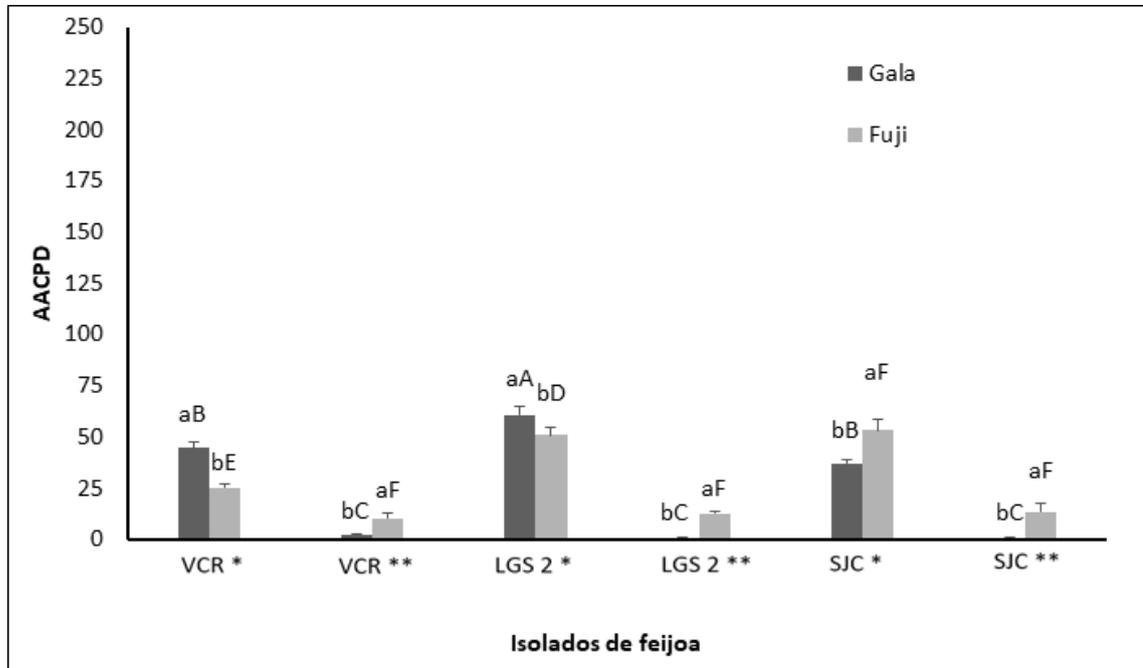


Figura 15 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de frutos de macieira inoculados com isolados de feijoa, ilustrando a interação entre os fatores variedades Fuji e Gala, presença ou ausência de lesão e isolados de *Colletotrichum*.



Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem para o fator variedades de macieira para a mesma condição de inoculação. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula não diferem para a resposta de cada variedade de macieira (*Malus domestica*) aos três isolados e aos métodos de inoculação. (\*) - Com a presença de perfuração nos frutos; (\*\*) - Sem a presença de perfuração nos frutos.

A significância da interação tríplice, decorre do fato de que na ausência de perfurações, a variedade Fuji foi mais atacada do que a Gala. No entanto, na presença de perfurações a variedade Fuji foi menos atacada por dois (VCR e LGS) dos três isolados, enquanto a variedade Gala apresentou lesões maiores em frutos perfurados e inoculados com o isolado SJC (Figura 15). Além disso, a variedade Gala sempre apresentou desenvolvimento mais lento da doença em frutos não perfurados, do que em frutos perfurados. Estas diferenças, no progresso da doença na variedade Gala, não foram na mesma proporção para a variedade Fuji.

#### 5.5.1.3 Morangueiro:

Os isolados de *C. theobromicola* de feijoa (VCR, SJC e LGS 2) foram patogênicos quando inoculados em frutos de morangueiro (*Fragaria ananassa*), porém muito mais agressivos que em frutos de goiabeira comum e macieira. No entanto, não houve diferença

significativa no que diz respeito a agressividade dos três isolados inoculados em frutos de morangueiro, nem em relação a presença ou ausência de perfurações e nem mesmo para a interação entre os dois fatores.

De forma geral, foi possível verificar que em frutos de macieira e goiabeira comum com perfurações, os isolados de *C. theobromicola* de feijoa se mostraram mais agressivos. Nos frutos de morangueiro, porém, os isolados foram igualmente agressivos em ambas as formas de inoculação.

### **5.5.2 Resposta da inoculação de isolados de *Colletotrichum* em frutos das suas espécies hospedeiras e em frutos de feijoa**

#### *5.5.2.1 Goiabeira comum:*

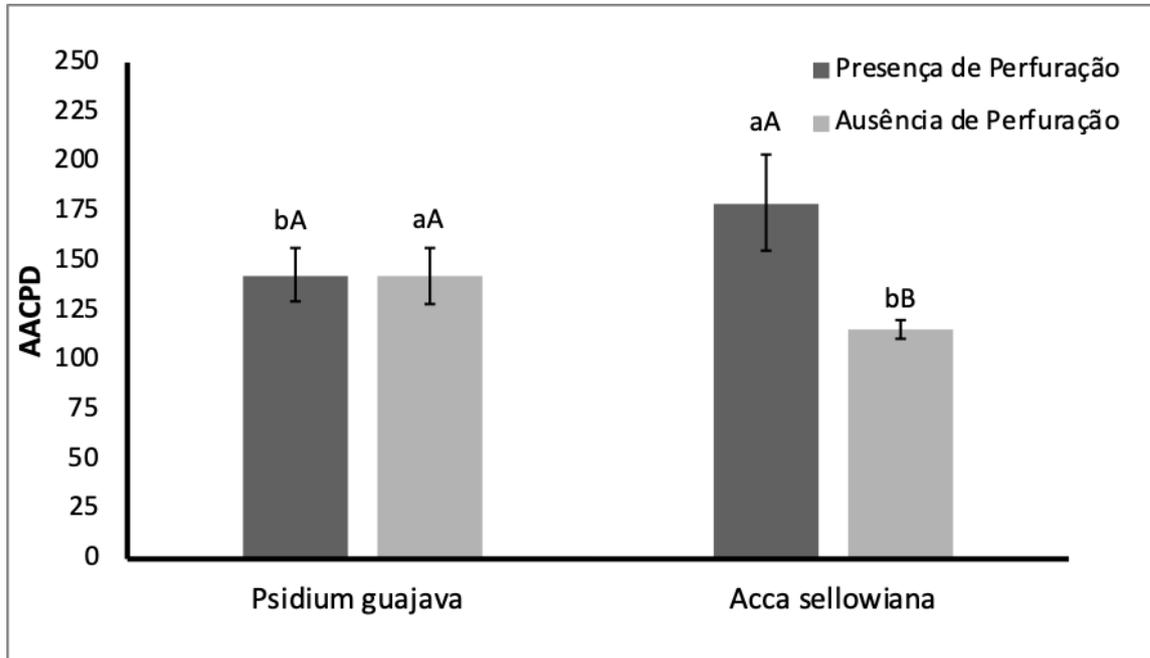
Frutos de goiabeira comum e de feijoa foram suscetíveis ao isolado *C. fructicola* (Coll38) proveniente de goiabeira comum (*Psidium guajava*). Nos frutos de goiabeira comum não houve diferença estatística para o fator método de inoculação (Figura 16), já que o fungo ocupou a mesma área no mesmo espaço de tempo, tanto nos frutos perfurados quanto não perfurados. Nos frutos de feijoa, entretanto, o isolado Coll 38 se desenvolveu mais rapidamente nos frutos com perfuração quando comparado com os frutos sem perfuração (Figura 16).

Embora o isolado tenha tido sucesso na infecção e colonização de ambas as espécies frutíferas verificou-se que nos frutos perfurados a agressividade do isolado foi maior em frutos de feijoa. Já nos frutos não perfurados o desenvolvimento do patógeno foi mais severo nos frutos da goiabeira comum (Figura 16). Este comportamento levou à significância estatística da interação entre métodos de inoculação e espécies.

Comparativamente, o isolado de Coll28 foi mais eficiente em infectar os frutos de feijoa do que os isolados de feijoa em infectar frutos de goiabeira comum. Isto decorre do fato que, isolados de feijoa produziram lesões menores em frutos perfurados de goiabeira comum e produziram também lesões menores ou não produziram lesões em frutos não perfurados dessa mesma espécie. Enquanto o isolado Coll28 apresentou crescimento e maior agressividade em frutos de feijoa perfurados ou não perfurados, no mesmo intervalo de tempo, sendo apenas mais agressivo nos frutos com perfurações.

O isolado Coll28 também apresentou crescimento e alta agressividade na inoculação de frutos da própria espécie de onde foi isolado (goiabeira comum), para frutos perfurados e não perfurados.

Figura 16 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), ilustrando a interação entre os fatores métodos de inoculação (presença ou ausência de perfurações) e diferentes espécies frutíferas (*Acca sellowiana* e *Psidium guajava*).



Médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula não diferem para o fator presença ou ausência de perfurações, para a mesma espécie frutífera, e médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem para a resposta entre as duas espécies frutíferas quanto ao método de inoculação.

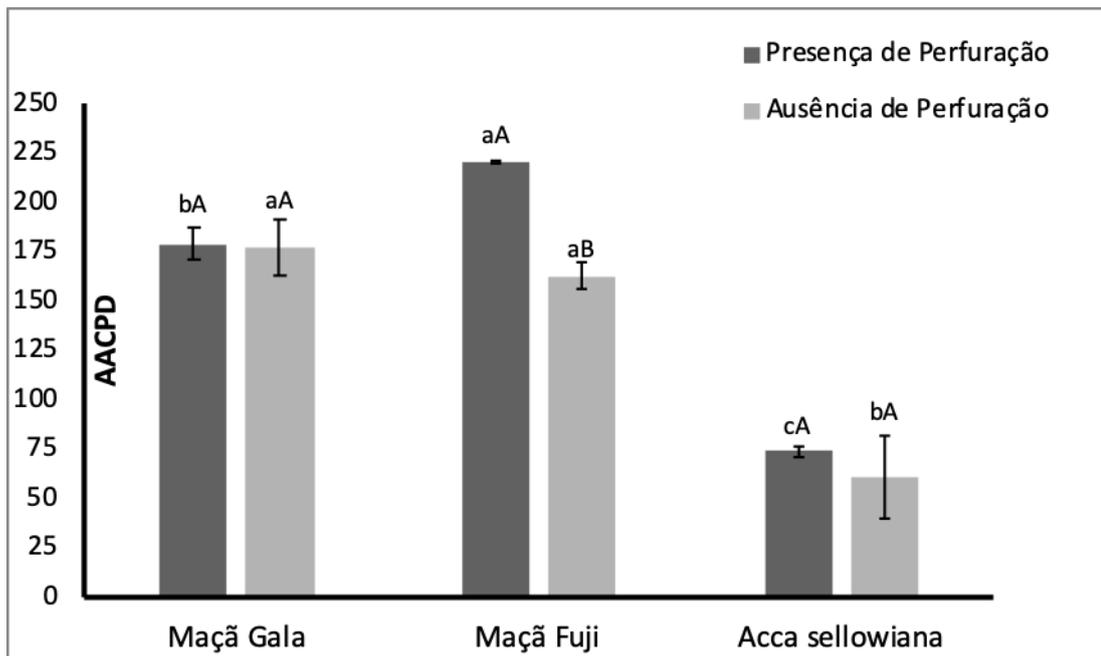
#### 5.5.2.2 Macieira:

O isolado de *C. nymphaeae* (MANE 137) apresentou crescimento e características de antracnose nos frutos de macieira (cv. Fuji e Gala), do qual foi isolado, e de feijoa. De maneira geral o isolado demonstrou ser mais agressivo em frutos de macieira do que de feijoa. Com o cálculo da AACPD não é possível visualizar diferença na agressividade do isolado MANE 137, quando inoculado em frutos de macieira da variedade Gala e nas duas formas de inoculação. O mesmo ocorrendo para os frutos de feijoa (Figura 17). Este mesmo isolado, entretanto, quando inoculado em frutos de macieira da variedade Fuji apresentou maior AACPD em frutos perfurados quando comparados com frutos não perfurados (Figura 17).

Frutos perfurados, da variedade Gala, foram mais suscetíveis ao ataque do isolado MANE 137, seguidos pelos frutos de macieira da variedade Fuji. Comparativamente aos frutos de macieira, os frutos de feijoa apresentaram as menores lesões no mesmo espaço de tempo

para esse isolado nos frutos perfurados. Nos frutos não perfurados, porém, o isolado foi mais agressivo em frutos da variedade Gala, quando comparados com os da variedade Fuji. Os frutos de feijoa, para o método de inoculação sem perfuração, foram novamente os menos suscetíveis (Figura 17).

Figura 17 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), ilustrando a interação entre os fatores métodos de inoculação (presença ou ausência de perfurações) e diferentes espécies frutíferas (*Malus domestica*, variedades Fuji e Gala, e *Acca sellowiana*).

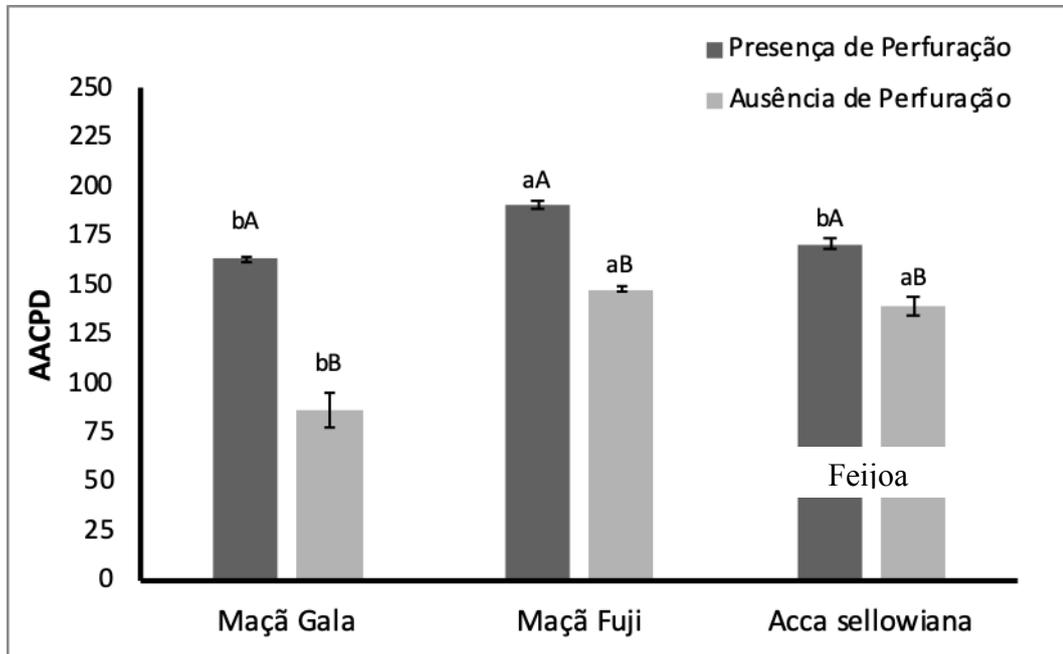


Médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula não diferem para o fator presença ou ausência de perfurações, para a mesma espécie frutífera, e médias seguidas pelas mesmas letras minúscula não diferem para a resposta entre as duas espécies frutíferas quanto à presença ou ausência de perfurações.

O isolado de *Colletotrichum fructicola* (MANE 147) de macieira, também apresentou crescimento em frutos de macieira (cv. Fuji e Gala) e em frutos de feijoa. Para as duas espécies é possível verificar que o desenvolvimento do patógeno foi maior em frutos perfurados. Entre as duas espécies, o isolado se mostrou mais agressivo nos frutos, com perfurações, da variedade Fuji. Os frutos de macieira da variedade Gala e de feijoa não apresentaram diferenças entre si, mas foram diferentes e de menor AACPD quando comparado com os frutos de macieira da variedade Fuji (Figura 18).

Nos frutos não perfurados, os de macieira da variedade Fuji e os frutos de feijoa não apresentaram diferença entre si, mas foram diferentes dos frutos da variedade Gala, sendo que nessa o isolado se mostrou menos agressivo.

Figura 18 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), ilustrando a interação entre os fatores métodos de inoculação (presença ou ausência de perfurações) e diferentes espécies/variedades frutíferas (*Malus domestica*, variedades, Fuji e Gala e *Acca sellowiana*).



Médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula não diferem para o fator presença ou ausência de perfurações, para a mesma espécie frutífera, e médias seguidas pelas mesmas letras minúscula não diferem para a resposta entre as espécies/variedades frutíferas quanto à presença ou ausência de perfurações.

#### 5.5.2.3 Morangueiro:

Os frutos de morangueiro e de feijoa inoculados com o isolado CLP1 de morangueiro não apresentaram maior ou menor AACPD em frutos perfurados quando comparados com os não perfurados. Desta forma, não houve diferenças estatísticas entre os métodos de inoculação. A interação entre frutos de diferentes espécies e presença ou ausência de perfuração também não foi significativa.

A realização das medidas de diâmetro das lesões nos frutos de morangueiro foi muito dificultada pela alta agressividade do isolado nessa espécie. Em apenas quatro dias após inoculação os frutos já estavam totalmente tomados e deteriorados, não permitindo mais a tomada de medida das lesões.

Comparando-se a resposta das duas espécies frutíferas ao isolado e as formas de inoculação é possível afirmar que o isolado CLP1 foi muito mais agressivo em frutos de

morangueiro do que em frutos de feijoa, tanto em frutos perfurados como em frutos não perfurados.

O isolado MANE 137 quando inoculado em feijoa e o isolado CLP1 quando inoculado no próprio hospedeiro (frutos de morangueiro), foram os isolados que começaram a mostrar lesões mais rapidamente (4 dias). Todos os isolados em frutos com perfuração iniciaram a formação de lesão mais rapidamente que os frutos não perfurados, exceto a inoculação em frutos de morangueiro que teve a mesma velocidade de início de lesão para os dois métodos de inoculação.

Segundo Souza (2011) a patogenicidade de um fungo está ligada a sua capacidade de se fixar na superfície da estrutura a ser infectada e de formar apressórios, como no caso no gênero *Colletotrichum*, bem como de colonizar os tecidos e se reproduzir. Sendo assim, um isolado pode ter mais sucesso na infecção de frutos de uma espécie que em outra, uma vez que os isolados podem apresentar diferentes formas de pré penetração, penetração e colonização.

Os frutos de goiabeira comum e macieira, utilizados nas inoculações, já estavam maduros e segundo Pereira (2005) frutos nesse estágio apresentam maior cerosidade, o que pode dificultar o processo de pré-penetração e penetração do patógeno. Nos frutos com perfuração, entretanto, essa barreira está rompida, o que acaba facilitando a infecção. Esta barreira promovida pela cerosidade na casca do fruto poderia ser uma das explicações para o baixo acometimento da doença em frutos de macieira e goiabeira comum sem perfuração.

Além disso, a estrutura da cutícula das duas variedades de macieira, aqui utilizadas, são diferentes. Segundo Montero (2010) maçãs da variedade Gala apresentam cutícula mais uniforme e com menos rachaduras naturais que os frutos da variedade Fuji, podendo essa ser uma hipótese para o fato da variedade Gala ter tido menor acometimento da doença em frutos não perfurados, comparativamente aos perfurados, e a variedade Fuji ter tido um alto acometimento nas duas formas de inoculação.

GUINDARELLI (2011) mostrou que frutos maduros de morango são altamente suscetíveis à *Colletotrichum acutatum*, sendo os frutos totalmente tomados após sete dias de inoculação. No presente estudo, no entanto, os frutos de morangueiro inoculados com os isolados provenientes de feijoa foram totalmente tomados em quatro dias após a inoculação. Frutos verdes de morangueiro apresentam maiores componentes antifúngicos e de defesa a penetração do patógeno. Frutos verdes, porém, não apresentam as mesmas barreiras e acabam por ser também facilmente atacados e tomados pelas lesões do patógeno (GUINDARELLI,

2011). Os frutos utilizados no presente estudo já estavam maduros e foram altamente suscetíveis.

As reações dos diferentes estágios de maturação do fruto na infecção por *Colletotrichum* foi também estudada por SANDERS (2002). Neste caso o autor verificou que isolados *C. gloeosporioides* quando retirados de frutos maduros de abacate e manga, produziram lesões significativamente maiores do que os isolados a partir de frutos em outros estágios de maturação (SANDERS, 2002). No presente trabalho os frutos de onde os isolados foram retirados apresentavam estágios similares de maturação, uma vez que os frutos foram coletados no ponto de colheita. Contudo, este aspecto deve ser levado em consideração em futuros estudos, no que diz respeito a patogenicidade e agressividade dos isolados.

Com relação a infecção cruzada e a inoculação dos patógenos em seus hospedeiros, percebe-se que o isolado de *Psidium guajava* testado foi muito mais eficiente em infectar os frutos de feijoa e os frutos do próprio hospedeiro do que o inverso. Isto decorre do fato que, isolados de feijoa produziram lesões menores em frutos perfurados ou não produziram lesões em frutos não perfurados de *Psidium guajava*, enquanto o isolado Col 9 de *Psidium guajava* apresentou crescimento e alta patogenicidade em todos os frutos testados, perfurados ou não, no mesmo intervalo de tempo, sendo apenas mais patogênico nos frutos com perfurações.

Os resultados, para as três espécies frutíferas que não a feijoa, também revelaram que os isolados que se mostraram mais agressivos nos frutos perfurados foram os menos agressivos nos frutos não perfurados. No entanto, não é possível inferir, com precisão, sobre as propriedades dos isolados e também dos frutos ligados à esses resultados. Isolados de *Colletotrichum* de feijoa podem possuir uma estratégia de penetração que não apresenta sucesso na ausência de lesões, hipótese essa que pode ser comprovada ou refutada com base em análises microscópicas e histopatológicas. A realização dessas análises, são propostas relevantes para estudos futuros na interação *Colletotrichum* x feijoa.

Após a realização desses bioensaios e com relação a especificidade patogênica e agressividade dos isolados de *Colletotrichum* de feijoa, pode-se afirmar que os mesmos não são específicos da espécie; assim, os mesmos não são *formae specialis*. A probabilidade do fungo isolado de frutos de feijoa ser capaz de infectar uma gama ainda maior de espécies frutífera é bastante grande, o que o caracterizaria como patógeno de ampla gama de hospedeiros. Entretanto, a amplitude desta elevada não especificidade ainda depende de estudos complementares com outras espécies.

A ampla gama de hospedeiros de um patógeno o caracteriza como um problema de sanidade de plantas ainda maior, uma vez que isso acarreta em necessidade de manejo e programa de controle de doenças. De acordo com Muniz et al. (1998) a grande variabilidade do gênero *Colletotrichum*, sugere a existência de grupos especializados. Assim, espécies desse gênero estariam associadas à um único hospedeiro. Em testes de inoculação, contudo, percebeu-se que a capacidade de infecção de isolados de *Colletotrichum* é mais abrangente do que a literatura indica.

Segundo LAKSHMI (2011), quando espécies patogênicas possuem uma vasta gama de hospedeiros que podem ser cultivados em áreas próximas, isto acaba por dificultar o emprego de algum sistema de controle ou manejo. Em seu trabalho LAKSHMI (2011) realizou inoculações cruzadas com isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutíferas como manga (*Mangifera indica* L.), limão comum (*Citrus aurantifolia*) e fruta do conde (*Annona squamosa*), entre outras. Este autor, assim como no presente trabalho, verificou a capacidade de *C. gloeosporioides* em infectar uma vasta gama de hospedeiros.

FREEMAN et al. (1998), também cita os problemas na produção de diferentes espécies frutíferas, suscetíveis à antracnose, próximas umas das outras. Este descreve que a ocorrência de pequenas zonas climáticas adequadas para o cultivo de alguns grupos de frutíferas, que acabaram sendo hospedeiras dos patógenos umas das outras, faz com que as mesmas sirvam de inóculo e, assim, o patógeno sempre consiga se manter na área de produção. O mesmo ocorre com as espécies avaliadas no presente trabalho, uma vez que estas são produzidas, preferencialmente, em regiões que apresentam condições climáticas semelhantes.

Segundo ALAHAKOON et al. (1992) o agente patogênico de uma espécie ao infectar outra, pode adaptar-se à nova espécie hospedeira e acabar, em um curto espaço de tempo, sendo capaz de causar no novo hospedeiro, o mesmo nível de dano que causava em sua espécie frutífera de origem. Outra adaptação que patógenos podem sofrer em um novo hospedeiro, é que se este for menos suscetível a doença que a espécie de origem, o patógeno pode então tornar-se mais virulento por desenvolver mecanismos que superem as defesas do hospedeiro (ALAHAKOON et al., 1994).

Além de possuir uma vasta gama de frutíferas como hospedeiras, FREEMAN (2001) relata que isolados de *Colletotrichum* que atacam frutos de morangueiro, por exemplo, podem ter origem a partir de plantas daninhas. Em seu trabalho ele relata que *C. fragariae* foi encontrado em *Cassia obtusifolia* L. Isso mostra que é possível que além dos isolados serem capaz de se manterem no pomar por serem patógenos de outras espécies frutíferas cultivadas

próximas, estes podem também se manter em plantas invasoras, ou em outras espécies cultivadas que não sejam frutíferas, mas são hospedeiras.

## 5.6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos é possível afirmar que os isolados de *C. theobromicola*, provenientes de feijoa são capazes de colonizar e produzir sintomas em mais de uma espécie frutífera. Os isolados podem, inclusive, possuir uma gama muito maior de hospedeiros, de outros grupos vegetais e sintomatologia. Hospedeiros secundários podem dificultar o controle de doenças nos pomares e levar a modificações no manejo dos mesmos. Sendo assim, devido as condições de cultivo de feijoa nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, é visível a necessidade de estudos adicionais relacionados a epidemiologia e histopatologia dos seus isolados de *C. theobromicola*.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ocorrência de espécies fitopatogênicas podem tornar a produção em culturas agrícolas muito difícil e, muitas vezes, economicamente inviável. Frutíferas ainda pouco conhecidas, como o caso da feijoa, faz com que espécies de microrganismos, causadores de doenças ou não, também sejam pouco estudados. Levando em conta, porém, os potenciais produtivo, comercial e organoléptico é que diversas pesquisas com feijoa têm sido desenvolvidas, tanto no Brasil como em diversas partes do mundo.

A identificação da espécie *C. theobromicola*, como causadora de antracnose em frutos de feijoa no sul do Brasil, abre um leque de possibilidades para novas pesquisas na área. Estudos de histopatologia e testes com um maior número de possíveis hospedeiros, mostram-se bastante promissor. Uma vez que o conhecimento do ciclo de vida, capacidade de colonização, enzimas envolvidas nos processos de pré penetração, penetração e colonização, bem como, o estudo de genes ligados à estas atividades, mostram-se de grande importância para o progresso no controle dessa doença.

Com o avanço na produção e comercialização de frutos de feijoa, a capacidade de saber os estágios infecciosos do patógeno, melhores métodos de manejo, armazenamento, conservação e controle, possibilitarão que se produza um fruto de maior qualidade e mais atrativo ao consumidor. Este trabalho e outros trabalhos com feijoa, deram início, então, a uma promissora e competitiva entrada dessa espécie frutífera no mercado nacional.

## 7 REFERÊNCIAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5 ed. [s.1.]: Elsevier Academic Press, 2004.

ALAHAKOON, P. W.; BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S. Cross-infection potential of genetic groups of *Colletotrichum gloeosporioides* on tropical fruits. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, [s.1.], v. 44. n. 2. p. 93-103, 1994. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0885576505801043>>. Acesso em: 8 out 2019.

ALAHAKOON, P. W. SREENIVASAPRASAD, S. BROWN, A.E. Selection of a genetic variant within *Colletotrichum gloeosporioides* isolates pathogenic on mango by passaging through wounded tomato fruits. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, [s.1], v. 41, n. 4, p. 227-240, 1992. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0885576592900230?imgSel=Y>>. Acesso em: 8 out 2019.

ALFENAS, A.C.; et al. **Métodos em fitopatologia**. v.2. [s.1.]: Universidade Federal de Viçosa - UFV, 2007.

ANDRADE, E.M.; UESUGI, C.H.; UENO, B.; FERREIRA, M.A.S.V. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, [s.1], v.32, n.1, p.21-31, 2007. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0100-41582007000100003&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0100-41582007000100003&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 22 out 2018.

ANDRADE, E.R.; DUCROQUET, J.P.H.J. **Antracnose em goiabeira serrana: caracterização, danos e perspectivas de controle**. v.3. [s.1.]: HortiSul,, 1994.

ARAÚJO, M.B.M.; LIMA, C.S.; RABELO FILHO, F. DE A.C.; OOTANI, M.A., BEZERRA, A.M.E., CARDOSO, J.E. First Report of *Colletotrichum theobromicola* and *C. tropicale* causing anthracnose on fruits of carnauba palm in Brazil. **Plant Disease**, [s.1.], v. 102, n.1, p. 244-245, 2018. Disponível em: < <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20183035443>>. Acesso em: 12 set 2019.

ARX, J.A. von. Revision der zu *Gloeosporium* gestellten Pilze. Verhandligen (1957a).

ARX JA von. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. Phytopathologische (1957b).

AYOUB, N. A.; HUSSEIN, S.A.; HEGAZI, N.M.; LINSCHIED, M.; HARMS, M.; WENDE, K.; LINDEQUIST, U.; NAWWAR, M.A. Bone mineralization enhancing activity of a methoxyellagic acid glucoside from a *Feijoa sellowiana* leaf extract. **Pharmazie**, [s.1.], v.64, n.2, p.137–141. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19320288>>. Acesso em: 10 ago 2017.

BASILE, A.; VUOTTO, M.L.; VIOLANTE, U.; SORBO, S.; MARTONE, G.; CASTALDO-COBIANCHI, R. Antibacterial activity in *Actinidia chinensis*, *Feijoa sellowiana* and *Aberia*

*caffra*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s.1.], v.8, n.3, p.199–203, 1997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18611802>>. Acesso em: 22 out 2018.

BASILE, A.; CONTE, B.; RIGANO, D.; SENATORE, F.; SORBO, S. Antibacterial and antifungal properties of acetonic extract of *Feijoa sellowiana* fruits and its effect on *Helicobacter pylori* growth. **Journal of Medical Food**, [s.1.], v. 13, n. 1, p. 189–195, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20136454>>. Acesso em: 21 out 2018.

BAXTER, A. P. VAN WESTHUIZEN, G.C.A. EICKER, A. A review of literature on the taxonomy, morphology and biology of the fungal genus *Colletotrichum*. **Phytophylactica**, [s.1], v. 17, p. 15-18, 1985. Disponível em: < [https://journals.co.za/content/phyto/17/1/AJA03701263\\_889](https://journals.co.za/content/phyto/17/1/AJA03701263_889)>. Acesso em: 21 ago 2017.

BEYHAN, Ö.; ELMASTAŞ, M.; GEDIKLI, F. Total phenolic compounds and antioxidant capacity of leaf, dry fruit and fresh fruit of feijoa (*Acca sellowiana*, Myrtaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, [s.1], v. 4, p. 1065–1072, 2010. Disponível em: < <https://academicjournals.org/journal/JMPR/article-abstract/15D630B22529>>. Acesso em: 21 out 2018.

BOGALE, M.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J.; STEENKAMP, E.T. Simple sequence repeat markers for species in the *Fusarium oxysporum* complex. **Molecular Ecology Resources**, [s.1.], v. 5, n. 3, p. 622-624. 2005. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1471-8286.2005.01015.x>>. Acesso em: 18 jul 2018.

BONTEMPO, P.; MITA, L.; MICELI, M.; DOTO, A.; NEBBIOSO, A.; DE BELLIS, F.; CONTE, M.; MINICHELLO, A.; MANZO, F.; CARAFA, V.; BASILE, A.; RIGANO, D.; SORBO, S.; CASTALDO COBIANCHI, R.; SCHIAVONE, E.M.; FERRARA, F.; DE SIMONE, M.; VIETRI, M.; CIOFFI, M.; SICA, V.; BRESCIANI, F.; DE LERA, A.R.; ALTUCCI, L.; MOLINARI, A.M. *Feijoa sellowiana*, derived natural Flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s.1], v. 39, p. 1902–1914. 2007. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272507001665>>. Acesso em 21 ago 2018.

BRAGANÇA, C.A.D. Molecular characterization of *Colletotrichum* spp. associated with fruits in Brazil. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - ESALQ/USP, São Paulo, p. 69. 2013.

BRAGANÇA, C.A.D.; DAMM, U.; BARONCELLI, R.; MASSOLA JÚNIOR, N.S.; CROUS, P.W. Species of the *Colletotrichum acutatum* complex associated with anthracnose diseases of fruit in Brazil. **Fungal Biology**, [s.1.], v. 120, n. 4, p. 547–561, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27020156>>. Acesso em: 21 ago 2018.

BRAGANÇA, C.A.D.; JUNIOR, A.F.N.; ROGÉRIO, F.; MASSOLA, N.S. First report of anthracnose caused by *Colletotrichum theobromicola* on Barbados Cherry (*Malpighia emarginata*) in Brazil. **Plant Disease**, [s.1.], v. 98, m. 9., p. 1272–1272, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30699624>>. Acesso em: 21 jul 2019.

BRAUN, A; PETRY, C; Biometria e plasticidade ornamental de Goiabeira Serrana em paisagismo ecológico. **Revista Brasileira de Biociências**, [s.1.], v. 5, supl. 1, p. 552-554. 2007.

CACIOPPO, O. **La feijoa**. Madri: Mundi-Prensa, 1988.

CAMACHO, G; Procesamiento de la feijoa. In: FISCHER, G.; MIRANDA, D.; CAYÓN, G.; MAZORRA, M. (eds). **Cultivo, poscosecha y exportación de la feijoa** (*Acca sellowiana* Berg). Bogotá: Universidad nacional de Colombia, Produmedios. p. 151. 2003.

CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S. *Colletotrichum* – Current status and future directions. **Studies in Mycology**, [s.1.], v. 73, n. 1, p. 181–213, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3458418/>>. Acesso em: 21 set 2018.

CARBONE, I.; KOHN, L.M. A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes. **Mycologia**, [s.1.], v. 91, n.3, p. 553–556, 1999. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00275514.1999.12061051>>. Acesso: 22 ago 2018.

CARLIER, J.; LEBRUN, M. H.; ZAPATER, M. F.; DUBOIS, C.; MOURICHON, X. Genetic structure of the global population of banana black leaf streak fungus, *Mycosphaerella fijiensis*. **Molecular Ecology**, [s.1.], v. 5, p. 499–510. 1996.

CIAMPI, M. B.; BALDAUF, C.; VIGNA, B.B.Z.; SOUZA, A.P.; SPÓSITO, M.B.; AMORIM, A. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Colletotrichum acutatum*, the causal agent of postbloom fruit drop on citrus. **Conservation Genetics Resources**, [s.1.], v. 3, n. 4, p. 651-654. 2011. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s12686-011-9425-4>>. Acesso em: 22 ago 2018.

COCK, P.J.A.; ANTAO, T.; CHANG, J.T.; CHAPMAN, B.A.; COX, C.J.; DALKE, A.; FRIEDBERG, I.; HAMELRYCK, T.; KAUFF, F.; WILCZYNSKI, B.; DE HOON, M.J.L. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. **Bioinformatics**, [s.1.], v. 25, n. 11, p. 1422–1423, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19304878>>. Acesso: 20 ago 2018.

CORDA, A.C.I. Die Pilze Deutschlands. In: **Deutschlands Flora in Abbildungen nach der Natur mit Beschreibungen** (Sturm, J, ed.). 3 ed. [s.1]: Sturm, Nürnberg, 1831.

CORDEIRO, Z.L.M. et al. Doenças da bananeira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (eds). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4 ed. [s.1]: Agronômica Ceres, 2005.

DAMM, U.; CANNON, P.F.; WOUNDENBERG, J.H.; CROUS, P.W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in mycology**, [s.1.], v. 73, p. 37-113. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23136458>>. Acesso 20 jul 2018.

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, [s.1.], v. 9, n. 772, 2012. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/nmeth.2109>>. Acesso em 21 ago 2017.

DE AQUINO, R.S.; DAFRE, A.L.; TORRES, A.R.; OLIVEIRA, J.; BERTOLDI, F.C.; NUNES, M.R.; DE LIMA VEECK, A.P.; SANTOS, A.R.S. P-92 - Anti-scratching effect and related antioxidant responses of aqueous crude extract from *Acca sellowiana* in the dry skin model. **Free Radical Biology and Medicine**, [s.1.], v. 120, s.1, p.72, 2018. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584918304040>>. Acesso 21 ago 2018.

DE CAPDEVILLE, G.; WILSON, C.L.; BEER, S.V.; AIST, J.R. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvest 'Red Delicious' apple fruit. **Phytopathology**, [s.1.], v.92, p.900-908, 2002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18942970>>. Acesso 21 ago 2018.

DENOYES, B.; BAUDRY A, A. Species identification and pathogenicity study of French *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characteristics. **Phytopathology**, [s.1.], v. 85, n. 1, p. 53-57. 1995.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. Establishment of Disease and Testing for Resistance In: **Basic Plant Pathology Methods**. 2. ed. [s.1.], Boca Raton: Lewis Publishers, Cap. 5, 1995.

DOYLE, V.P.; OUDEMANS, P.V.; REHNER, S.A.; LITT, A. Habitat and host indicate lineage identity in *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. from wild and agricultural landscapes in North America. **PLoS One**, [s.1], v. 8, n. 5, e62394, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23671594>>. Acesso 22 set 2018.

DUCROQUET, J.P.H.J., SANTOS, K.L. dos; ANDRADE, E.R. de; BONETI, J.I. da S.; BONIN, V.; NODARI, R.O. As primeiras cultivares brasileiras de goiabeira serrana: SCS 411 Alcântara e SCS 412 Helena. **Agropecuária Catarinense**, v. 20. p. 77-80. 2007.

DUCROQUET, J.P.H.J.; HICKEL, E.R.; NODARI, R.O. **Goiabeira-Serrana (Feijoa sellowiana)**. Série Frutas nativas 5 ed. [s.1]: Funep, 2000.

DUCROQUET, J.P.H.J.; NUNES, E. da C.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Novas cultivares brasileiras de goiabeira serrana: SCS 414-Mattos e SCS 415-Nonante. **Agropecuária Catarinense**, [a.1.], v.21. p.79-82. 2008.

DUCROQUET, J.P.H.J.; RIBEIRO, P. A Goiabeira-Serrana: velha conhecida, nova alternativa; **Agropecuária Catarinense**, [s.1.], v.4, n.3, p. 27-29. 1991.

FANTINEL, V.S.; MUNIZ, M.F.B.; BLUME, E.; ARAÚJO, M.M.; POLETTO, T.; DA SILVA, T.T.; DUTRA, A.F.; MACIEL, C.G.; HARAKAVA, R. First Report of *Colletotrichum siamense* Causing Anthracnose on *Acca sellowiana* Fruits in Brazil. *Plant Disease*, [s.1], v. 101, p. 1035–1035, 2017. Disponível em: < <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-01-17-0096-PDN>>. Acesso 22 ago 2018.

FINATTO, T. et al. Late-acting self-incompatibility in *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, v. 59, p. 53-60. 2011.

FISCHER, G; Ecofisiologia, Crecimiento y Desarrollo de la Feijoa. In FISCHER, G.; MIRANDA, D.; CAYÓN, G.; MAZORRA, M. (eds). **Cultivo, poscosecha y exportación de la feijoa (Acca sellowiana Berg)**: Universidad Nacional de Colombia, Produmedios. 2003.

FOO, L.Y., WATSON, R.R., Feijoa fruit extract. US Patent. 20150157678:A1. 2015.

FREEMAN, S.; HOROWITZ, S.; SHARON, A. Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. **Phytopathology**, [s.1.], v. 91, n. 10, p. 986-992. 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18944126>>. Acesso 21 mar 2017.

FREEMAN, S. KATAN, T., SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose Diseases of Various Fruits. **Plant Disease**, [s.1.], v. 82 p.596-605, 1998. Disponível em: < <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS.1998.82.6.596>>. Acesso 22 mar 2018.

FREEMAN, S.; NIZANI, Y. Control of *Colletotrichum acutatum* in strawberry under laboratory, greenhouse, and field conditions. **Plant Disease**, [s.1.], v. 81, n. 7, p. 749-752. 1997.

FURTADO, E.L. et al. Caracterização morfológica, patogênica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de seringueira. **Summa Phytopathologica**, [s.1.], v.25, p.222-227. 1999.

GARDES, M.; BRUNS, T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, [s.1.], v.2 , n. 2, p.113-8, 1993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8180733>>. Acesso 22 mar 2018.

GUINDARELLI M.; CARBONE, F.; MOURGUES, F.; PERROTTA, G.; ROSATI, C.; BERTOLINI, P.; BARALDI, E. *Colletotrichum acutatum* interactions with unripe and ripe strawberry fruits and differential responses at histological and transcriptional levels. **Plant Pathology**, [s.1.], v.60, p. 685–697, 2011. Disponível em: < <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3059.2010.02423.x>>. Acesso 21 jun 2018.

GUZMÁN, P.; GEPTS, P.; TEMPLE, S.; MKANDAWIRE, A.B.C.; GILBERTSON, R.L. Detection and differentiation of *Phaeoisariopsis griseola* isolates with the polymerase chain reaction and group-specific primers. **Plant Disease**, [s.1.], v. 83, p. 37- 42. 1999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30845436>>. Acesso 21 jan 2019.

IELPO, M.T.L.; BASILE, A.; MIRANDA, D.; MOSCATIELLO, V.; NAPPO, C.; LAGHI, E.; RICCIARDI, M.M.; RICCIARDI, L.; VUOTTO, M.L. Immunopharmacological properties of flavonoids. **Fitoterapia**, [s.1.], v. 71, p. S101-S109, 2000. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X00001842>>. Acesso 21 mar 2018.

KATO, K.; STANDLEY, D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, [s.1.], v. 30, p. 772–780, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23329690>>. Acesso 22 mar 2018.

KELES, H.; INCE, S.; KÜÇÜKKURT, L.; TATILI, LL.; AKKOL, E.K.; KAHRAMAN, C.; DEMIREL, H.H. The effects of *Feijoa sellowiana* fruits on the antioxidant defense system, lipid peroxidation, and tissue morphology in rats. **Pharmaceutical Biology**, [s.1], v. 50, n.3, p. 318-325. 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22133107>>. Acesso 21 jan 2018.

KINUPP, V. F.; BARROS, I.B.I; Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.4, p.846-857. 2008.

KOCH, R. Zur Untersuchung von pathogenen Organismen. Mittheil kais Gesundheitsamte 1, 1881.

KURAMAE-IZIOKA, E.E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Revista Unimar**, [s.1], v. 19, p. 683–689, 1997.

KUROZAWA, C. & PAVAN, M.A. Doenças das solanáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3.ed, [s.1]: Agronômica Ceres, v.2., cap. 62, p.665-675. 1997.

LAKSHMI, B.; REDDY, P.N.; PRASAD, R.D. Cross-infection potential of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolates causing anthracnose in subtropical fruit crops. **Tropical Agricultural Research**, [s.1], v. 22. p.183–193. 2011.

LAPCIK, O.; KLEJDUS, B.; KOKOSKA, L.; DAVIDOVÁ, M.; AFANDI, K.; KUBÁN, V.; HAMPL, R. Identification of isoflavones in *Acca sellowiana* and two *Psidium* species (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, [s.1.], v. 33, p 983-992. 2005. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305197805001134>>. Acesso 20 mar 2019.

LEGRAND, C.D.; KLEIN, R.M. Mirtáceas. In: REITZ, P.R. **Flora ilustrada catarinense-Herbário “Barbosa Rodrigues”**, p. 623-629. 1997.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, [s.1], v. 44, p. 397- 401. 1989. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2563634>>. Acesso 22 mar 2018.

LIU, D.; VAN HEESWIJCK, R.; LATCH, G.; LEONFORTE, T.; PANACCIO, M.; LANGFORD, C.; CUNIGHAM, P.; REED, K. Rapid identification of 99 *Acremonium lolii* and *Acremonium coenophialum* endophytes trough arbitrarily primed PCR. **FEMS Microbiology Letters**, [s.1], v. 133, p.95-98. 1995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8566719>>. Acesso 21 mar 2018.

LOPEZ, A.M.Q.; PEREIRA, D.S.T. Interação entre *Colletotrichum gloeosporioides* e ecótipos de pinha. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n.1, p.105-114, 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0006-87052010000100015&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0006-87052010000100015&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso 21 fev 2018.

MACKENZIE, S.J.; MERTELY, J.C.; SEIJO, T.E.; PERES, N.A. *Colletotrichum fragariae* is a pathogen on hosts other than strawberry. **Plant Disease**, [s.1], v. 92, p. 1432–1438, 2008.

MACKENZIE, S.J.; SEIJO, T.E.; LEGARD, D.E.; TIMMER, L.W.; PERES, N.A. Selection for pathogenicity to strawberry in populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from native plants. **Phytopathology**, [s.1], v. 97, p. 1130–1140, 2007.

MAGALHÃES, W.C.S. et al. Diversidade de fungos endofítico em Candeia *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish; *Cerne*, Lavras, v. 14, n. 3, p. 267-273. 2008.

MAHUKU, G.S.; RIASCOS, J.J. Virulence and molecular diversity within *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Andean and Mesoamerican bean varieties and regions. **European Journal of Plant Pathology**, [s.1], v.110, p. 253- 263. 2004.

MANANDHAR, J.B. et al. Conidial germination and appressorial formation of *Colletotrichum capsici* and *C. gloeosporioides* isolates from pepper. **Plant Disease**, [s.1], v. 79, n. 4, p. 361-366. 1995.

MATOS, K.S.; SANTANA, K.F.A.; CATARINO, A.M.; HANADA, R.E.; SILVA, G.F. First report of anthracnose on welsh onion (*Allium fistulosum*) in Brazil caused by *Colletotrichum theobromicola* and *C. truncatum*. **Plant Disease**, [s.1], v. 101, p. 1055, 2017.

MATTOS, J.R. **A goiabeira serrana**. 2. Ed. [s.1], : Instituto de Pesquisa de Recursos Naturais Renováveis, 84p. 1986.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Fitopatologia Brasileira**, [s.1], v. 27, p.523-524. 2002.

MONFORTE, M.T.; FIMIANI, V.; LAUZZA, F.; NACCARI, C.; RESTUCCIA, S.; GALATI, E.M. *Feijoa sellowiana* Berg fruit juice: anti-inflammatory effect and activity on superoxide anion generation. **Journal of Medicine Food**, [s.1], v. 17, n. 4, p. 455-461. 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24433073>>. Acesso 19 mar 2018.

MONTERO, C.R.S. et al., Influência do dano mecânico de impacto e compressão sobre a respiração de maçãs cultivares Fuji Suprema e Royal Gala. **Ciências Agrárias**, [s.1], v. 31. n. 4. p. 967-974. 2010.

MORAES S.R.G. Infecção e colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em goiaba e infecção de *Colletotrichum acutatum* em folhas de citros. São Paulo: USP. Tese. p.114. 2009.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellite as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, [s.1], v.3, p.175-182. 1993.

MORTON, J. Feijoa. In: **Fruits os warm climates**. Miami. p.367-370. 1987.

MUÑIZ, A.; GARCIA, A.H.; PÉREZ, R.M.; GARCÍA, E.V.; GONZÁLEZ, D.E. In vitro inhibitory activity of *Acca sellowiana* fruit extract on end products of advanced glycation. **Diabetes Therapy**, [s.1.], v. 9, p. 67–74, 2018.

MUNIZ, M. de F.S. et al., Patogenicidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre algumas plantas frutíferas. **Summa Phytopathologica**, [s.1], v.24. p. 177-179. 1998.

O'CONNELL, R. J. et al., Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (eds). *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN., p. 57-76. 2000.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [s.1], v. 7, p. 103-116, 1997.

O'DONNELL, K.; NIRENBERG, H.I.; AOKI, T.; CIGELNIK, E. A Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**, [s.1], v. 41, p.61-78, 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1340354000708333>>. Acesso 22 mar 2017.

OLIVEIRA, S.A.S.; SILVA, L.L.; DIAMANTINO, M.S.A.S.; FERREIRA, C.F. First report of *Colletotrichum theobromicola* and *C. siamense* causing anthracnose on cultivated and wild cassava species in Brazil. **Plant Disease**, [s.1], v. 102, p. 819-819, 2018. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-09-17-1502-PDN>>. Acesso em 10 ago 2017.

PENG, Y.; BISHOP, K.S.; FERGUSON, L.R.; QUEK, S.Y. Screening of cytotoxicity and anti-inflammatory properties of Feijoa extracts using genetically modified cell models targeting TLR2, TLR4 and NOD2 pathways, and the implication for inflammatory bowel disease. **Nutrients**, [s.1], v. 10, n. 9, p.E1188, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30200338>>. Acesso 28 mar 2017.

PEREIRA, I.S. et al., Estudos histoplásticos da interação *Colletotrichum gloeosporioides* – cafeeiro. **Bragantia**, [s.1], v. 68, n.1, p.117-123, 2009.

PEREIRA, M.J.Z.; MASSOLA JUNIOR, N.S.; SUSSEL, A.A.B.; SALA, F.C.; COSTA, C.P. da; BOITEUX, L.S. Reação de acessos de *Capsicum* e de progênies de cruzamentos interespecíficos a isolados de *Colletotrichum acutatum*. **Horticultura Brasileira**, [s.1], v. 29, n. 4, p.569-576, 2011. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/hb/v29n4/a21v29n4>>. Acesso 22 mar 2018.

PERES N. A, et al., Postbloom fruit drop of citrus and key lime anthracnose are caused by distinct phylogenetic lineages of *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, [s.1], v.98, n.1, p.345-352. 2008.

PERES, N.A.R. et al., Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, [s.1], v. 150, p. 128-134. 2002.

PILEGGE, A.A.V.; VIEIRA DE OLIVEIRA, S.F.; ANDRADE, C.W.; VICENTE, V.A.; DALZOTO, P. do R.; KNIPHOFF da CRUZ, G.; GABARDO, J.; MASSOLA, N.S.; TOZZE, H.J.; PILEGGI, M.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L.V.; PIMENTEL, I.C.;

STRINGARI, D.; GLIENKE, C. Molecular and morphological markers for rapid distinction between 2 *Colletotrichum* species. **Canadian Journal of Microbiology**, [s.1], v. 55, p. 1076–1088, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19898550>>. Acesso 29 mar 2018.

R Development Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/> (accessed 11 Apr. 2017).

ROJAS, E.I.; REHNER, S.A.; SAMUELS, G.J.; VAN BAELE, S.A.; HERRE, E.A.; CANNON, P.; CHEN, R.; PANG, J.; WANG, R.; ZHANG, Y.; PENG, Y.-Q.; SHA, T. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with Theobroma cacao and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. **Mycologia**, [s.1], v. 102, p. 1318–1338, 2010.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, [s.1], v. 19, p. 1572–1574, 2003.

ROSSI, A.; RIGANO, D.; PERGOLA, C.; FORMISANO, C.; BASILE, A.; BRAMANTI, P.; SENATORE, F.; SAUTEBIN, L. Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by an acetic extract from *Feijoa sellowiana* Berg. fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.1], v. 55, p.5053–5061, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17550270>>. Acesso 18 mar 2019.

SÁNCHEZ-MORA, F.D., L. SAIFERT, M.N. CIOTTA, H.N. RIBEIRO, V.S. PETRY, A.M. ROJAS-MOLINA, M.E. LOPES, G.G. LOMBARDI, K.L. SANTOS, G.P.H.J. DUCROQUET, AND R.O. NODARI. Characterization of phenotypic diversity of Feijoa fruits of germplasm accessions in Brazil. **Agrosystems, Geosciences & Environment**, [s.1], v. 2, p. 1-11. 2019. Disponível em: <<https://dl.sciencesocieties.org/publications/age/abstracts/2/1/190005>>. Acesso 12 jan 2019.

SANDERS, G. M.; KORSTEN, L. Comparison of cross inoculation potential of South African avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Microbiological research**, [s.1], v. 158, n. 2. p. 143-150. 2003.

SANSAVINI, S. Biotecnologie frutticole: le nuove frontiere delle ricerche per il miglioramento genetico e la propagazione delle piante da frutto. **Frutticoltura**, [s.1], n.5, p.75-81, 1998.

SAZIMA, I.; SAZIMA, M. Petiscos florais: pétalas de *Acca sellowiana* (Myrtaceae) como fonte alimentar para aves em área urbana no Sul do Brasil. **Biota Neotropica**, [s.1], v.7, n.2, p.307-312, 2007.

SCOTT, A.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, [s.1], v. 30, p. 507-12, 1974.

SHARMA G.; PINNAKA, A.K.; SHENOY, B.D. Resolving the *Colletotrichum siamense* species complex using ApMat marker. **Fungal Diversity**, [s.1], v.71, n.1, p. 247–264, 2014.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. In: world congress on computers in agriculture, Reno. v. 7., 2009.

SKIPP, R.A. et al., *Colletotrichum*. In: Singh, U.S.; SINGH, R.P.; KOHMOTO, K. **Pathogenesis and host specificity in plant diseases**. Oxford: Pergamon/Elsevier, 1995.

SOUZA A. Caracterização molecular e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados a sintomas de antracnose em mangueiras. Dissertação. São Paulo -UNESP. p.91. 2011.

SOUZA, V. C. et al., Estudos sobre fungos micorrízicos, **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [s.1], v.10, n.3, p.612–618. 2006.

SUTTON, B. C. The Genus *Glomerella* and its Anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford: British Society for Plant Pathology. cap.1, 1992.

SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*, in: Bailey, J.A., Jeger, M.J. (Eds.), *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International, Wallingford, 1992.

TAPIA-TUSSELL, R.; QUIJANO-RAMAYO, A.; CORTES-VELAZQUEZ, A.; LAPPE, P.; LARQUE-SAAVEDRA, A.; PEREZ-BRITO, D. PCR-based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the yucatan peninsula. **Molecular Biotechnoly**, [s.1], v. 40, p. 293–298. 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18670909>>. Acesso em 22 mar 2018.

TEMPLETON, M.D.; RIKKERINK, E.H.; SOLON, S.L.; CROWHURST, R.N. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. **Gene**, [s.1], v. 122, p. 225–230, 1992.

THORP, G.; BIELESKI, R. **Feijoa: Origins, cultivation and uses**. Auckland: Ed. David Bateman, 2002.

TOZZE JÚNIOR H.J. Espécies de *Colletotrichum* causando antracnose em pimentão no Brasil. Dissertação. São Paulo - ESALq USP, p.81. 2007.

TUNCEL, N.B., YILMAZ, N., Optimizing the extraction of phenolics and antioxidants from feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae). **Journal of Food Science and Technology**, [s.1], v. 52, p. 141–150, 2015.

TURCO, F., PALUMBO, I., ANDREOZZI, P., SARNELLI, G., DE RUBERTO, F., ESPOSITO, G., BASILE, A., CUOMO, R., Acetonic Extract from the *Feijoa sellowiana* Berg. Fruit Exerts Antioxidant Properties and Modulates Disaccharidases Activities in Human Intestinal Epithelial Cells. **Phytotherapy Research**, [s.1], v. 30, p. 1308–1315, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27166598>>. Acesso 22 mar 2018.

VELHO, A. C.; ALANIZ, S.; CASANIVA, L.; MONDINO, P.; STADNIK, M.J. New insights into the characterization of *Colletotrichum* species associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay. **Fungal Biology**, [s.1], v. 119. p. 229-244. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25813510>>. Acesso 22 mar 2018.

VIDA, J. B. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* causando antracnose em frutos de pupunheira nos estados de Minas Gerais e Paraná. **Summa Phytopathologica**, [s.1], v.32, n.4, p.379-380, 2006.

WEBER, J.L.; WONG, C. Mutation of human short tandem repeats. **Human Molecular Genetics**, [s.1], v.2, p.1123-1128. 1993.

WEIR, B.S., JOHNSTON, P.R., DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, [s.1], v.15, n.73, p.115–180. 2012.

WESTON, R.J. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review. **Food Chemistry**, [s.1], v. 121, p. 923–926, 2010.

WHITE, T.J., BRUNS, T.D., LEE, S.B., TAYLOR, J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics, in: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Academic Press, pp. 315–322, 1990.

XIE, L.; ZHANG, J.-Z.; WAN, Y.; HU, D.W. Identification of *Colletotrichum* spp. isolated from strawberry in Zhejiang Province and Shanghai City, China. **Journal of Zhejiang University Science B**, [s.1], v.11, 61–70, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20043353>>. Acesso 18 mar 2019.

YUAN, G. F.; LIU, C.S.; CHEN, C.C. Differentiation on *Aspergillus parasiticus* from *Aspergillus sojae* by random amplification of polymorphic DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.1], v. 61, p. 2384-2387, 1995. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7793959>>. Acesso 22 mar 2018.

ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.P.V.; PINHEIRO, J.B.; BRONDANI, C.; VENCOSKY, R. Transferability of microsatellite markers from Eucalyptus spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology Resources**, [s.1], v.2, n. 4, p. 512-513, 2002. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1471-8286.2002.00297.x>>. Acesso 18 mar 2018.

ZURITA, J. Mercado Nacional e Internacional de la Feijoa. In: FISCHER, G.; MIRANDA, D.; CAYON, G.; MAZORRA, M (eds). **Cultivo, poscosecha y exportación de la feijoa** (*Acca sellowiana* Berg). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Produmedios, p. 152. 2003.

## MATERIAL SUPPLEMENTAR

Supplement 1 - GenBank accessions numbers for the 40 *Colletotrichum theobromicola*'s isolates from *Acca sellowiana*

Isolate Code	City/State	Country	Species	Host	ITS	GAPDH	CAL	ACT	CHS	TUB
<b>FRB1</b>	Fraiburgo/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557157	MK052834	MK052874	MK052754	MK052794	MK052715
<b>FRB2</b>	Fraiburgo/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557158	MK052835	MK052875	MK052755	MK052795	MK052716
<b>FRB3</b>	Fraiburgo/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557159	MK052836	MK052876	MK052756	MK052796	MK052717
<b>FRB4</b>	Fraiburgo/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557160	MK052837	MK052877	MK052757	MK052797	MK052718
<b>FRB5</b>	Fraiburgo/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557161	MK052838	MK052878	MK052758	MK052798	MK052719
<b>FRB6</b>	Fraiburgo/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557162	MK052839	MK052879	MK052759	MK052799	MK052720
<b>LGS1</b>	Lages/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557163	MK052840	MK052880	MK052760	MK052800	MK052721
<b>LGS2</b>	Lages/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557164	MK052841	MK052881	MK052761	MK052801	MK052722
<b>LGS3</b>	Lages/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557165	MK052842	MK052882	MK052762	MK052802	MK052723
<b>LGS4</b>	Lages/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557166	MK052843	MK052883	MK052763	MK052803	MK052724
<b>LGS5</b>	Lages/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557167	MK052844	MK052884	MK052764	MK052804	MK052725
<b>LAM</b>	Lages/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557168	MK052845	MK052885	MK052765	MK052805	MK052726
<b>SJQ1</b>	São Joaquim/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557169	MK052846	MK052886	MK052766	MK052806	MK052727
<b>SJQ2</b>	São Joaquim/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557170	MK052847	MK052887	MK052767	MK052807	MK052728
<b>SJQ3</b>	São Joaquim/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557171	MK052848	MK052888	MK052768	MK052808	MK052729
<b>SJQ4</b>	São Joaquim/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557172	MK052849	MK052889	MK052769	MK052809	MK052730
<b>SJQ5</b>	São Joaquim/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557173	MK052850	MK052890	MK052770	MK052810	MK052731
<b>SJQ6</b>	São Joaquim/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557174	MK052851	MK052891	MK052771	MK052811	MK052732
<b>CUT1</b>	Curitiba/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557175	MK052852	MK052892	MK052772	MK052812	MK052733
<b>CUT2</b>	Curitiba/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557176	MK052853	MK052893	MK052773	MK052813	MK052734
<b>URU1</b>	Urubici/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557177	MK052854	MK052894	MK052774	MK052814	MK052735

<b>URU2</b>	Urubici/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557178	MK052855	MK052895	MK052775	MK052815	MK052736
<b>UPM</b>	Urupema/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557179	MK052856	MK052896	MK052776	MK052816	MK052737
<b>PSM1</b>	Passos Maia/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557180	MK052857	MK052897	MK052777	MK052817	MK052738
<b>PSM2</b>	Passos Maia/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557181	MK052858	MK052898	MK052778	MK052818	MK052739
<b>PSM3</b>	Passos Maia/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557182	MK052859	MK052899	MK052779	MK052819	MK052740
<b>PSM4</b>	Passos Maia/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557183	MK052860	MK052900	MK052780	MK052820	MK052741
<b>CMB</b>	Cambara do Sul/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557184	MK052861	MK052901	MK052781	MK052821	MK052742
<b>SMC</b>	São Marcos/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557185	MK052862	MK052902	MK052782	MK052822	MK052743
<b>MFR</b>	Mafra/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557186	MK052863	MK052903	MK052783	MK052823	MK052744
<b>ITU</b>	Ituporanga/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557187	MK052864	MK052904	MK052784	MK052824	MK052745
<b>SJC</b>	São José do Cerrito/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557188	MK052865	MK052905	MK052785	MK052825	MK052746
<b>ALZ</b>	Abelardo Luz/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557189	MK052866	MK052906	MK052786	MK052826	MK052747
<b>SND</b>	Ipê/RS	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557190	MK052867	MK052907	MK052787	MK052827	MK052748
<b>IPE1</b>	Ipe/RS	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557191	MK052868	MK052908	MK052788	MK052828	MK052749
<b>IPE2</b>	Ipe/RS	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557192	MK052869	MK052909	MK052789	MK052829	MK052750
<b>VSG</b>	Ipê/RS	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557193	MK052870	MK052910	MK052790	MK052830	MK052751
<b>PNL</b>	Painel/RS	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557194	MK052871	MK052911	MK052791	MK052831	MK052752
<b>RQM</b>	Rancho Queimado/SC	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557195	MK052872	MK052912	MK052792	MK052832	MK052753
<b>VCR</b>	Vacaria/RS	Brazil	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	MN557196	MK052873	MK052913	MK052793	MK052833	

Supplement 2 - GenBank accessions numbers to isolates of the *Colletotrichum gloesporioides* complex

Isolate Code	Country	Species	Host	ITS	GenBank Accession Number				
					GAPDH	CAL	ACT	CHS	TUB
ICMP18608	Israel	<i>C.aenigma</i>	<i>Persea americana</i>	JX010244	JX010044	JX009683	JX009443	JX009774	JX010389
ICMP18686	Japan	<i>C.aenigma</i>	<i>Pyrus pyrifolia</i>	JX010243	JX009913	JX009684	JX009519	JX009789	JX010390
ICMP17673	USA	<i>C. aeschynomenes</i>	<i>Aeschynomenes virginica</i>	JX010176	JX009930	JX009721	JX009483	JX009799	JX010392
ICMP17919	India	<i>C. alatae</i>	<i>Dioscorea alata</i>	JX010190	JX009990	JX009738	JX009471	JX009837	JX010383
ICMP18122	Nigeria	<i>C. alatae</i>	<i>Dioscorea alata</i>	JX010191	JX010011	JX009739	JX009470	JX009846	JX010449
ICMP 18691	Australia	<i>C. alienum</i>	<i>Persea americana</i>	JX010217	JX010018	JX009664	JX009580	JX009754	JX010385
ICMP 18703	New Zealand	<i>C. alienum</i>	<i>Persea americana</i>	JX010252	JX010030	JX009656	JX009528	JX009885	
ICMP 12071	New Zealand	<i>C. alienum</i>	<i>Malus domestica</i>	JX010251	JX010028	JX009654	JX009572	JX009882	JX010411
ICMP 17972	New Zealand	<i>C. alienum</i>	<i>Diospyros kaki</i>	JX010247	JX009944	JX009655	JX009497	JX009750	
ICMP 18532	New Zealand	<i>C. aotearoa</i>	<i>Vitex lucens</i>	JX010220	JX009906	JX009614	JX009544	JX009764	JX010421
ICMP 18734	New Zealand	<i>C. aotearoa</i>	<i>Agathis australis</i>	JX010211	JX010004	JX009627	JX009569	JX009878	
ICMP 18548	New Zealand	<i>C. aotearoa</i>	<i>Coprosma</i> sp.	JX010206	JX009961	JX009609	JX009854	JX009445	JX010425
ICMP 18543	New Zealand	<i>C. aotearoa</i>	<i>Melicytus ramiflorus</i>	JX010156	JX009983	JX009621	JX009524	JX009859	
ICMP 18696	Australia	<i>C. asianum</i>	<i>Mangifera indica</i>	JX010192	JX009915	JX009723	JX009576	JX009753	JX010384
ICMP 18603	Philippines	<i>C. asianum</i>	<i>Mangifera indica</i>	JX010195	JX009938	JX009725	JX009579	JX009825	
ICMP 18605	Thailand	<i>C. asianum</i>	<i>Mangifera indica</i>	JX010194	JX010021	JX009726	JX009465	JX009787	
ICMP 18648	Panama	<i>C. asianum</i>	<i>Mangifera indica</i>	JX010193	JX010017	JX009724	JX009546	JX009871	
ICMP 18706	USA	<i>C. clidemiae</i>	<i>Vitis</i> sp.	JX010274	JX009909	JX009639	JX009476	JX009777	JX010439
ICMP 18658	USA, Hawaii	<i>C. clidemiae</i>	<i>Clidemia hirta</i>	JX010265	JX009989	JX009645	JX009537	JX009877	JX010438
ICMP 18579	Thailand	<i>C. cordylinicola</i>	<i>Cordyline fruticosa</i>	JX010226	JX009975	HM470238	HM470235	JX009864	JX010440
ICMP 12568	Australia	<i>C. fructicola</i>	<i>Persea americana</i>	JX010166	JX009946	JX009680	JX009529	JX009762	
ICMP 18613	Israel	<i>C. fructicola</i>	<i>Limonium sinuatum</i>	JX010167	JX009998	JX009675	JX009491	JX009772	JX010388
ICMP 17819	Canada	<i>C. fructicola</i>	<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>	JX010180	JX009997	JX009668	JX009469	JX009820	

<b>ICMP 18120</b>	Nigeria	<i>C. fruticicola</i>	<i>Dioscorea alata</i>	JX010182	JX010041	JX009670	JX009436	JX009844	JX010401
<b>ICMP 18738</b>	Australia	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Carya illinoensis</i>	JX010151	JX009976	JX009730	JX009542	JX009797	
<b>ICMP 17821</b>	Italy	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Citrus sinensis</i>	JX010181	JX009923	JX009671	JX009495	JX009839	JX010400
<b>ICMP 18730</b>	New Zealand	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Citrus</i> sp.	JX010157	JX009981	JX009737	JX009548	JX009861	
<b>ICMP 19121</b>	Italy	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Citrus limon</i>	JX010148	JX010054	JX009745	JX009558	JX009903	
<b>ICMP 12942</b>	New Zealand	<i>C. horii</i>	<i>Diospyros kaki</i>	GQ329687	GQ329685	JX009603	JX009533	JX009748	JX010375
<b>ICMP 12951</b>	New Zealand	<i>C. horii</i>	<i>Diospyros kaki</i>	GQ329689	GQ329683	JX009602	JX009466	JX009751	
<b>ICMP 17968</b>	China	<i>C. horii</i>	<i>Diospyros kaki</i>	JX010212	GQ329682	JX009605	JX009547	JX009811	JX010378
<b>ICMP 17970</b>	Japan	<i>C. horii</i>	<i>Diospyros kaki</i>	JX010213	GQ329686	JX009606	JX009467	JX009824	
<b>ICMP 18539</b>	Australia	<i>C. kahawae</i>	<i>Olea europaea</i>	JX010230	JX009966	JX009635	JX009523	JX009800	JX010434
<b>ICMP18728</b>	Brazil	<i>C. kahawae</i>	<i>Miconia</i> sp.	JX010239	JX010048	JX009643	JX009525	JX009850	
<b>CBS124.22</b>	USA	<i>C. kahawae</i>	<i>Vaccinium</i> sp.	JX010228	JX009950	JX009744	JX009536	JX009902	JX010433
<b>ICM17915</b>	Angola	<i>C. kahawae</i>	<i>Coffea arabica</i>	JX010234	JX010040	JX009638	JX009474	JX009829	JX010435
<b>ICMP 12931</b>	New Zealand	<i>C. musae</i>	<i>Musa</i> sp.	JX010140	JX009995	JX009688	JX009442	JX009756	
<b>ICMP 12930</b>	New Zealand	<i>C. musae</i>	<i>Musa</i> sp.	JX010141	JX009986	JX009685	JX009566	JX009881	
<b>ICMP 18701</b>	Philippines	<i>C. musae</i>	<i>Musa</i> sp.	JX010145	JX010047	JX009687	JX009551	JX009849	
<b>ICMP 19119</b>	USA	<i>C. musae</i>	<i>Musa</i> sp.	JX010146	JX010050	JX009742	JX009433	JX009896	HQ596280
<b>ICMP 17938</b>	USA	<i>C. nupharicola</i>	<i>Nuphar lutea subsp.polysepala</i>	JX010189	JX009936	JX009661	JX009486	JX009834	JX010397
<b>ICMP 18187</b>	USA	<i>C. nupharicola</i>	<i>Nuphar lutea subsp.polysepala</i>	JX010187	JX009972	JX009663	JX009437	JX009835	JX010398
<b>ICMP 17940</b>	USA	<i>C. nupharicola</i>	<i>Nymphaea odorata</i>	JX010188	JX010031	JX009662	JX009582	JX009836	JX010399
<b>ICMP 19120</b>	Italy	<i>C. psidii</i>	<i>Psidium</i> sp.	JX010219	JX009967	JX009743	JX009515	JX009901	JX010443
<b>ICMP 1778</b>	Australia	<i>C. queenslandicum</i>	<i>Carica</i> sp.	JX010276	JX009934	JX009691	JX009447	JX009899	JX010414
<b>ICMP 1780</b>	Australia	<i>C. queenslandicum</i>	<i>Carica papaya</i>	JX010186	JX010010	JX009693	JX009504	JX009900	
<b>ICMP 12564</b>	Australia	<i>C. queenslandicum</i>	<i>Persea americana</i>	JX010184	JX009919	JX009692	JX009573	JX009759	
<b>ICMP 18705</b>	Fiji	<i>C. queenslandicum</i>	<i>Coffea</i> sp.	JX010185	JX010036	JX009694	JX009490	JX009890	JX010412
<b>ICMP 19051</b>	Hungary	<i>C. salsolae</i>	<i>Salsola tragus</i>	JX010242	JX009916	JX009696	JX009562	JX009863	JX010403
<b>ICMP 18693</b>	Hungary	<i>C. salsolae</i>	<i>Glycine max</i>	Hungary	JX010241	JX009917	JX009695	JX009559	
<b>ICMP 12567</b>	Australia	<i>C. siamense</i>	<i>Persea americana</i>	JX010250	JX009940	JX009697	JX009541	JX009761	JX010387

<b>ICMP 18574</b>	Australia	<i>C. siamense</i>	<i>Pistacia vera</i>	JX010270	JX010002	JX009707	JX009535	JX009798	JX010391
<b>ICMP 18578</b>	Thailand	<i>C. siamense</i>	<i>Coffea arabica</i>	JX010171	JX009924	FJ917505	FJ907423	JX009865	JX010404
<b>ICMP 19118</b>	Vietnam	<i>C. siamense</i>	<i>Jasminum sambac</i>	HM131511	HM131497	JX009713	HM131507	JX009895	JX010415
<b>SMVF1*</b>	Brazil	<i>C. siamense</i>	<i>Acca sellowiana</i>				KX858807		KX858806
<b>ICMP 15445</b>	New Zealand	<i>C. theobromicola</i>	<i>Acca sellowiana</i>	JX010290	JX010027	JX009601	JX009509	JX009893	
<b>ICMP 17958</b>	Australia	<i>C. theobromicola</i>	<i>Stylosanthes guianensis</i>	JX010291	JX009948	JX009598	JX009498	JX009822	JX01038
<b>ICMP 17895</b>	Mexico	<i>C. theobromicola</i>	<i>Annona diversifolia</i>	JX010284	JX010057	JX009600	JX009568	JX009828	JX010382
<b>ICMP 17957</b>	Australia	<i>C. theobromicola</i>	<i>Stylosanthes viscosa</i>	JX010289	JX009962	JX009597	JX009575	JX009821	JX010380
<b>ICMP 18566</b>	Australia	<i>C. theobromicola</i>	<i>Olea europaea</i>	JX010282	JX009953	JX009593	JX009496	JX009801	JX010376
<b>ICMP 18576</b>	Israel	<i>C. theobromicola</i>	<i>Limonium</i> sp.	JX010279	JX010022	JX009595	JX009532	JX009771	
<b>ICMP 18650</b>	Panama	<i>C. theobromicola</i>	<i>Theobroma cacao</i>	JX010280	JX009982	JX009590	JX009503	JX009872	
<b>ICMP 18649</b>	Panama	<i>C. theobromicola</i>	<i>Theobroma cacao</i>	JX010294	JX010006	JX009591	JX009444	JX009869	JX010447
<b>ICMP 17814</b>	USA	<i>C. theobromicola</i>	<i>Fragaria vesca</i>	JX010288	JX010003	JX009589	JX009448	JX009819	JX010379
<b>ICMP 17100</b>	USA	<i>C. theobromicola</i>	<i>Quercus</i> sp.	JX010281	JX009947	JX009596	JX009507	JX009781	JX010442
<b>ICMP 5285</b>	New Zealand	<i>C. ti</i>	<i>Cordyline australis</i>	JX010267	JX009910	JX009650	JX009553	JX009897	JX010396
<b>ICMP 4832</b>	New Zealand	<i>C. ti</i>	<i>Cordyline</i> sp.	JX010269	JX009952	JX009649	JX009520	JX009898	JX010407
<b>ICMP 18672</b>	Japan	<i>C. tropicale</i>	<i>Litchi chinensis</i>	JX010275	JX010020	JX009722	JX009480	JX009826	
<b>ICMP 18653</b>	Panama	<i>C. tropicale</i>	<i>Theobroma cacao</i>	JX010264	JX010007	JX009719	JX009489	JX009870	JX010448
<b>ICMP 18651</b>	Panama	<i>C. tropicale</i>	<i>Annona muricata</i>	JX010277	JX010014	JX009720	JX009570	JX009868	
<b>ICMP 17903</b>	Australia	<i>C. xanthorrhoeae</i>	<i>Xanthorrhoea preissii</i>	JX010261	JX009927	JX009653	JX009478	JX009823	JX010436
<b>ICMP 17820</b>	Australia	<i>C. xanthorrhoeae</i>	<i>Xanthorrhoea</i> sp.	JX010293	JX009932	JX009740	JX009485	JX009838	JX010429
<b>ICMP 10643</b>	UK	<i>Glomerella cingulata</i>	<i>Camellia</i> × <i>williamsii</i>	JX010224	JX009908	JX009630	JX009540	JX009891	JX010437
<b>ICMP 18542</b>	USA	<i>Glomerella cingulata</i>	<i>Camellia sasanqua</i>	JX010223	JX009994	JX009628	JX009488	JX009857	

\*Isolate from *Acca sellowiana* – Brazil (FANTINEL, 2017)