



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS



JANAÍNE ROSSANE ARAÚJO SILVA CABRAL

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* EM ORQUÍDEAS NO BRASIL E
SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS

RIO LARGO – AL

2019

JANAÍNE ROSSANE ARAÚJO SILVA CABRAL

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* EM ORQUÍDEAS NO BRASIL E
SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Proteção de Plantas.

Orientadora: Profa. Dra. Iraildes Pereira Assunção

Coorientadora: Profa. Dra. Jaqueline Figueredo de Oliveira Costa

RIO LARGO – AL

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Bibliotecário: Erisson Rodrigues de Santana

C117i Cabral, Janaíne Rossane Araújo Silva

Identificação de espécies de *Colletotrichum* em orquídeas no Brasil e sensibilidade a fungicidas. Rio Largo-AL – 2019.
71 f.; il; 33 cm

Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) - Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2019.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Iraildes Pereira Assunção.
Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Jaqueline Figueredo de Oliveira Costa.

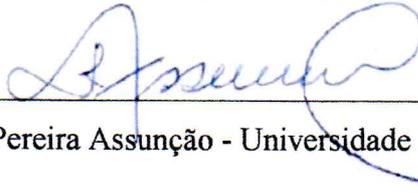
1. Antracnose. 2. Controle químico. 3. Filogenia multi-locus. 4. Orchidaceae. I. Título.

CDU: 632.9

JANAÍNE ROSSANE ARAÚJO SILVA CABRAL

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* EM ORQUÍDEAS NO BRASIL E
SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS

Tese submetida ao corpo docente do Programa de
Pós-Graduação em Proteção de Plantas, do Centro
de Ciências Agrárias da Universidade Federal de
Alagoas.



Profª. Dra. Iraildes Pereira Assunção - Universidade Federal de Alagoas (Orientadora)

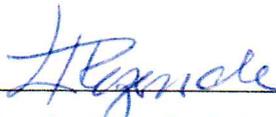
Banca Examinadora:



Dra. Joseani Castro da Silva – Instituto de Inovação para o Desenvolvimento Rural
Sustentável de Alagoas (Examinador Externo)



Profª. Dra. Edna Peixoto Da Rocha Amorim - Universidade Federal de Alagoas (Examinador
Interno)



Profª. Dra. Leila de Paula Rezende - Universidade Federal de Alagoas (Examinador Interno)

RIO LARGO – AL

2019

“Bendito és Tu, ó Senhor, Deus de nosso pai Israel, de eternidade em eternidade. Tua é, Senhor, a magnificência, e o poder, e a glória, e a vitória, e a majestade, porque Teu é tudo quanto há nos céus e na terra; Teu é, ó Senhor, o reino, e tu te exaltaste como chefe sobre todos. Tanto riquezas como honra vêm de ti, e tu dominas sobre tudo, e na tua mão há força e poder; e na tua mão está o engrandecer e o dar força a tudo. Agora, pois, ó Deus nosso, graças te damos, e louvamos o nome da tua glória. Porque quem sou eu, e quem é o meu povo, para que pudéssemos oferecer voluntariamente coisas semelhantes? Porque tudo vem de Ti, e do que é teu To damos.” 1 Crônicas 29:10-14.

AGRADECIMENTOS

A minha maior gratidão a Deus, meu consolo e fortaleza nos momentos de dificuldade.

Agradeço imensamente a minha família. Meus pais, Maria da Silva e José Araújo da Silva, uma das razões de eu não desistir de sonhar e lutar, pelo amor, apoio, incentivo, investimento, dedicação e esforços despendidos a mim para realização deste sonho. Aos meus irmãos Jamila Ranyelle Araújo Silva Frutuoso, Janiele Rayssa Araújo Silva Melo e Jamis Henri Araújo Silva e a minha sobrinha Maria Luiza Araújo Frutuoso pela amizade, cuidado e amor. Ao meu esposo, Marlisson Araújo Cabral, pelo amor, paciência, companhia e apoio em todos os momentos desta longa caminhada. Vocês são meu porto seguro! Não existe amor mais profundo e amizade mais sincera. A vocês todo meu amor e gratidão.

A Profa. Dra. Iraildes Pereira Assunção pela confiança e orientação na realização deste trabalho. Ao Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima pela confiança e apoio.

A Profa. Dra. Jaqueline Figueredo Oliveira Costa pela amizade e coorientação. Mais que uma coorientadora você foi um ombro amigo em muitas ocasiões. Nossa parceria nos trabalhos começou em 2012 e espero que perdure por muitos anos (rsrsrsrs...). Obrigada de coração!

A Profa. Dra. Sarah Jacqueline Cavalcanti Silva pela amizade, ajuda e colaboração em muitos momentos desta minha trajetória na pós-graduação. Valeu, Sarita! Você é um ser humano e uma profissional maravilhosa.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas do Centro de Ciências Agrárias pelos ensinamentos que contribuíram para minha formação.

Aos funcionários da pós-graduação pelo serviço prestado. Em especial a Michele Cristina Mela pela convivência e simpatia.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia Vegetal que tive a oportunidade de conhecer e conviver ao longo destes 7 anos. Foram muitas experiências, saberes e resenhas compartilhadas. Todo esse tempo foi de muito apredizado e crescimento para mim. Em especial a Élide Marins, Lauristela Hermógenes, Maria Érika Sales e Maria Jussara pela amizade e incentivo. Deus me deu a amizade de vocês de presente.

Aos colegas e amigos da pós-graduação pela convivência durante a realização do curso. Em especial a Caio Holanda, Luan Paz e Mayra Ferro. Levarei as boas lembranças das aulas, trabalhos e horas de estudo compartilhadas.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO GERAL

O gênero *Colletotrichum* é cosmopolita e tem sido considerado um dos patógenos fúngicos mais importantes do mundo. A antracnose é a principal doença causada pelas espécies deste gênero e ocorre sobre uma vasta gama de hospedeiros. Em espécies da família Orchidaceae a doença causa sérios problemas na produtividade, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Embora cerca de 43 espécies do gênero tenham sido relatadas causando antracnose em orquídeas em diferentes partes do mundo, pouco se sabe sobre a etiologia da doença no Brasil. O objetivo deste estudo foi identificar espécies do gênero *Colletotrichum* que estão associadas a plantas de orquídeas no nordeste do Brasil. Seis espécies de *Colletotrichum* foram identificadas neste estudo: *Colletotrichum fructicola*, *C. gloeosporioides sensu stricto*, *C. karstii*, *C. orchidophilum*, *C. siamense* e *C. tropicale*. Este é o primeiro relato das espécies *C. tropicale* e *C. fructicola* em orquídeas no mundo e de *C. orchidophilum* no Brasil. Estas espécies também foram avaliadas em relação a sensibilidade micelial *in vitro* a quatro fungicidas de diferentes princípios ativos. Os fungicidas tebuconazole, difenoconazole, tiofanato metílico e azoxistrobina+tebuconazole foram considerados eficientes no controle *in vitro* das seis espécies de *Colletotrichum*, mas a resposta de sensibilidade micelial das espécies variou de acordo com o fungicida e a concentração. Tebuconazole e difenoconazole apresentaram-se como os mais eficientes na inibição do crescimento micelial, enquanto que tiofanato metílico foi o menos eficiente. As espécies de *Colletotrichum* foram classificadas como alta e moderadamente sensíveis aos fungicidas baseado no cálculo da EC₅₀.

Palavras-chave: antracnose, controle químico, filogenia multi-locus, Orchidaceae.

GENERAL ABSTRACT

The genus *Colletotrichum* is cosmopolitan and has been considered one of the most important fungal pathogens in the world. Anthracnose is the main disease caused by the species of this genus and occurs on a wide range of hosts. In species of the family Orchidaceae the disease causes serious problems in productivity, mainly in tropical and subtropical regions. Although more than 40 species of the genus have been reported causing anthracnose in orchids in different parts of the world, little is known about the etiology of the disease in Brazil. The objective of this study was to identify species of the genus *Colletotrichum* associated to orchid plants in northeastern Brazil. Six species of *Colletotrichum* were identified in this study: *Colletotrichum fructicola*, *C. gloeosporioides sensu stricto*, *C. karstii*, *C. orchidophilum*, *C. siamense* and *C. tropicale*. This is first report of the species *C. tropicale* and *C. fructicola* on orchids in the world and of *C. orchidophilum* in Brazil. These species were also evaluated in relation to the mycelial sensitivity *in vitro* to four fungicides of different active principles. The fungicides tebuconazole, difenoconazole, thiophanate methyl and azoxystrobin+tebuconazole were considered efficient in the *in vitro* control of the six species of *Colletotrichum*, but the mycelial sensitivity of the species varied according to fungicide and concentration. Tebuconazole and difenoconazole were the most efficient in inhibiting mycelial growth, whereas methyl thiophanate was the least efficient. *Colletotrichum* species were classified as high and moderately sensitive to fungicides based on EC50 calculation.

Key words: anthracnose, chemical control, multi-locus phylogeny, Orchidaceae.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL.....	9
1.1 A Cultura da Orquídea.....	9
1.2 A Antracnose em Orquídeas.....	11
1.3 O Gênero <i>Colletotrichum</i>	13
1.4 O Controle da Antracnose em Orquídeas.....	15
Referências.....	18
CAPÍTULO 2 – IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE <i>Colletotrichum</i> EM ORQUÍDEAS NO NORDESTE DO BRASIL.....	26
RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	27
2.1 INTRODUÇÃO.....	28
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.3 RESULTADOS.....	32
2.4 DISCUSSÃO.....	34
2.5 CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS.....	38
CAPÍTULO 3 – SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS DE ESPÉCIES DE <i>Colletotrichum</i> EM ORQUÍDEAS.....	53
RESUMO.....	54
ABSTRACT.....	54
3.1 INTRODUÇÃO.....	55
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
3.4 RESULTADOS.....	57
3.5 DISCUSSÃO.....	60
3.6 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS.....	64

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A Cultura da Orquídea

As orquídeas são plantas herbáceas e perenes que pertencem a família botânica Orchidaceae, dividida em cinco subfamílias: Cypripedioideae, Apostasioideae, Vanilloideae, Orchidoideae e Epidendroideae (CHASE et al., 2003; ZHAI et al., 2013). Estima-se que existem cerca de 24 mil espécies de orquídeas, inseridas em cerca de 800 gêneros, e mais de 77.400 híbridos naturais e artificiais, distribuídos em todos os continentes, exceto na Antártida (CHANDANKUMAR, 2009; fay; chase, 2009). No entanto, sua maior diversidade está presente principalmente nas regiões tropicais das Américas do Sul e Central, da África e da Ásia Equatorial. O Brasil possui uma das maiores floras orquidáceas do mundo, representada por 235 gêneros e cerca de 2.419 espécies (BARROS et al., 2010; RODRIGUES, 2011).

A ampla distribuição geográfica das orquídeas se deve a sua adaptação a diferentes habitats. Desta forma, as orquídeas podem ser: terrestres - crescem sobre o solo; rupícolas - crescem sobre rochas; saprófitas - sobrevivem em matéria orgânica em decomposição; e epífitas - crescem sobre outras plantas ou suportes, mas sem parasitá-los, sendo este último o modo de crescimento mais comum da família, compreendendo cerca de 73% das espécies (TERAO; CARVALHO; BARROSO, 2005; RODRIGUES, 2011).

As espécies desta família têm sido consideradas um dos mais diversos e evoluídos grupos de plantas angiospermas. E apesar de apresentarem grande variabilidade das características botânicas, basicamente compartilham as seguintes estruturas: caules, composto por rizoma e pseudobulbo; raízes fasciculadas, envolvidas por uma ou mais camadas de células suberificadas e mortas constituindo o velame; folhas de formato e cor variadas com nervuras paralelas; inflorescência, podendo ter de uma a muitas flores; flores hermafroditas, raramente unissexuais, com uma estrutura básica de três sépalas e três pétalas, sendo a pétala oposta ao estame fértil, morfologicamente modificada, chamada labelo. O estigma e os estames são unidos formando o ginostêmio. Os grãos de pólen estão unidos em uma massa compacta, denominada polínia; e frutos capsulares, quase secos, com sementes minúsculas, embrião rudimentar e desprovidas de endosperma (TERAO; CARVALHO; BARROSO, 2005; RODRIGUES, 2011).

A imensa variabilidade de cores, tamanhos, formatos e fragrâncias das flores conferem extrema beleza as orquídeas e despertam o interesse de pesquisadores, orquidicultores e orquidófilos amadores em todo o mundo. Embora o interesse pelas orquídeas remonta a civilizações antigas, sua acessão no mercado da floricultura iniciou com as explorações das orquídeas tropicais após o descobrimento das américas e o aprimoramento das técnicas de cultivo pelos europeus. Com o passar do tempo, o cultivo de orquídeas cresceu e se tornou uma atividade mundial economicamente importante (TERAO; CARVALHO; BARROSO, 2005; FAY; CHASE, 2009).

Alguns dos principais gêneros cultivados no mundo são: *Arundia*, *Sobralia*, *Coelogyne*, *Dendrobium*, *Bulbophyllum*, *Pleurothallis*, *Epidendrum*, *Cattleya*, *Phalaenopsis*, *Vanda*, *Maxillaria*, *Bifrenaria*, *Cymbidium*, *Catasetum*, *Stanhopea*, *Oncidium* e *Ionopsis*. Estes pertencem a subfamília Epidendroideae, considerada a maior subfamília das orquidáceas. A maioria são plantas epífitas das regiões tropicais da América e sudeste da Ásia. Podemos destacar também o gênero *Vanilla*, da subfamília Vanilloideae, que é amplamente cultivado para extração da baunilha (SHIRAKI; DIAZ, 2012).

O comércio de orquídeas representa cerca de 8% do comércio de flores ornamentais, movimentando cerca de US\$ 20 bilhões a cada ano, e está baseado na importação e exportação de mudas, de flores de corte e plantas em vaso. Países como Holanda, Estados Unidos, Alemanha, Malásia, Tailândia, Inglaterra, Taiwan, Austrália, África do Sul, Colômbia, Peru e Equador merecem destaque no comércio internacional desta planta (STANCATO; BEMELMANS; VEGRO, 2001; REIS, 2011; MANTOVANI, 2013). No Brasil, a orquidicultura tem aumentado progressivamente, consolidando-se como importante atividade econômica em várias regiões do país (STANCATO; BEMELMANS; VEGRO, 2001; REIS, 2011) e contribuindo para o crescimento da floricultura que faturou R\$ 6,65 bilhões em 2016 (IBRAFLOR, 2017).

Além da beleza e diversidade, o fácil cultivo das orquidáceas é um dos fatores que contribui para o sucesso da sua comercialização. As orquídeas são consideradas plantas rústicas que conseguem sobreviver a condições adversas ao seu desenvolvimento por um longo tempo. Assim, o fornecimento de condições adequadas de temperatura, luz, umidade, aeração, substrato e nutrientes tem permitido o cultivo destas plantas dentro de casa, ripados, telados, estufas ou até mesmo ao ar livre (TERAO; CARVALHO; BARROSO, 2005; SHIRAKI; DIAZ, 2012).

O surgimento de técnicas para propagação e multiplicação *in vitro* destas plantas também é outro fator importante para a disseminação e comercialização de espécies e híbridos de orquídeas. Na natureza, a reprodução das orquídeas pode ocorrer de diversas formas, desde a apomixia até a polinização cruzada obrigatória (quase todas dependentes de insetos), e a germinação das sementes depende de uma relação simbiótica com fungos micorrízicos que fornecem nutrientes para o seu desenvolvimento até que a plântula possa realizar fotossíntese. Com a utilização de técnicas como a cultura de tecidos e a micropropagação, inúmeras mudas podem ser facilmente produzidas em um ambiente controlado e totalmente estéril. No mundo todo, centenas de laboratórios comerciais de cultura de tecidos, micropropagam orquídeas e ajudam a revolucionar a orquidicultura em vários países (STANCATO; BEMELMANS; VEGRO, 2001; TERAQ; CARVALHO; BARROSO, 2005; CHANDANKUMAR, 2009).

1.2 A Antracnose em Orquídeas

Na orquidicultura, problemas fitossanitários limitam significativamente a produtividade. Com o mercado de flores cada vez mais exigente, plantas ou flores com sinais de ataque de pragas ou sintomas de doenças se tornam depreciadas e ficam abaixo dos padrões de qualidade exigidos pelo setor (BUAINAIN; BATALHA, 2007; BARROS et al., 2009). As orquídeas são suscetíveis a um grande número de doenças, sendo um sério problema no cultivo, especialmente as de origem fúngicas que são de ocorrência comum (KLEIN, 2008).

A doença antracnose, causada por espécies do gênero *Colletotrichum*, é considerada uma das principais doenças fúngicas das orquidáceas. Presente em orquidários do mundo todo, é um grave problema para regiões tropicais e subtropicais. Os sintomas iniciam-se geralmente na face superior da folha, com o aparecimento de lesões escuras e de formato bem definido, circular ou elíptico. Estas aumentam rapidamente de tamanho e formam grandes manchas que podem ocupar todo o limbo foliar. O centro é deprimido e de coloração castanho-pardacenta, com inúmeros anéis concêntricos. É possível observar a presença de pequenos pontos escuros nas lesões, os acérvulos, de onde emerge uma massa de conídios envolta numa matriz mucilaginosa de coloração rosada ou alaranjada. Outras partes da planta podem apresentar sintomas, porém com menor frequência. Nas flores, os sintomas caracterizam-se pelo aparecimento de pontuações escuras nas pétalas (KIMATI et al., 1997; KLEIN, 2008; MANTOVANI, 2013).

A disseminação ocorre pelos respingos de água de chuva ou irrigação e a infecção é facilitada por ferimentos, injúrias mecânicas ou bióticas (incidência de raios solares e frio) que funcionam como porta aberta para entrada do patógeno. As condições favoráveis para o desenvolvimento da doença são alta umidade, períodos de dias nublados e temperatura em torno de 20 a 25 °C (KIMATI et al., 1997; KLEIN, 2008; MANTOVANI, 2013).

Até o momento, quarenta e três espécies de *Colletotrichum* foram associadas a antracnose em diferentes espécies de orquídeas ao redor do mundo: *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, *C. arxii* F. Liu, L. Cai, Crous & Damm, *C. bletiae* Halst., *C. bletillum* Tao, Liu, Liu, Gao & Cai, *C. boninense* Moriwaki, Toy. Sato & Tsuki, *C. cattleyicola* Damm & Toy. Sato, *C. caudasporum* Tao, Liu, Liu, Gao & Cai, *C. cereale* Manns, *C. cinctum* (Berk. & M.A. Curtis) Stoneman, *C. cirrhopetali* Sawada, *C. cliviae* Yan L. Yang, Zuo Y. Liu, K.D. Hyde & L. Cai, *C. cliviicola* Damm & Crous, *C. coelogyne* Damm, *C. crassipes* (Speg.) Arx, *C. crossandrae* Patel, Kamat & C.B. Pande, *C. cymbidiicola* Damm, P.F. Cannon, Crous, P.R. Johnst. & B. Weir, *C. dematium* (Pers.) Grove, *C. destructivum* O'Gara, *C. duyunensis* G. Tao, Zuo Y. Liu & L. Cai, *C. effiguratum* Sydow, *C. endophytum* G. Tao, Zuo Y. Liu & L. Cai, *C. excelsum-altitudinum* G. Tao et al., *C. gloeosporioides sensu stricto (s.s.)* (Penz.) Penz. & Sacc., *C. guizhouensis* G. Tao, Zuo Y. Liu & L. Cai, *C. kahawae* J.M Waller & Bridge, *C. karstii* Y.L. Yang, Zuo Y. Liu, K.D. Hyde & L. Cai, *C. liriopes* Damm, P.F. Cannon & Crous, *C. lujae* Verpl. & Clem., *C. macrosporum* Wheeler W. H.; *C. miscanthi* J.A. Crouch, B.B. Clarke, J.F. White & B.I. Hillman, *C. ochracea* Tao, Liu, Liu, Gao & Cai, *C. oncidii* Damm, P.F. Cannon & Crous, *C. orchidearum* Allesch., *C. orchidophilum* Damm, P.F. Cannon & Crous, *C. parsonsiae* Damm, P.F. Cannon, Crous, P.R. Johnst. & B. Weir, *C. phalaenopsidis* Sawada, K., *C. plurivorum* Damm, Alizadeh & Toy. Sato, *C. siamense* Phoulivong, L. Cai & K.D. Hyde, *C. sojae* Damm & Alizadeh, *C. stanhopeae* Henn., *C. tofieldiae* (Pat.) Damm, P.F. Cannon & Crous, *C. tropicicola* Phouliv. et al., *C. vanillae* Scalia (SACCARDO, 1896; PATEL; KAMAT; PANDE, 1953; MORIWAKI; SATO; TSUKIBOSHI, 2003; TALUBNAK; SOYTONG, 2010; CHEN et al., 2011; YANG et al., 2011; DAMM et al., 2012a; DAMM et al., 2012b; SATO et al., 2012; TAO et al., 2013; CHOWDAPPA et al., 2014; YAO et al., 2013; LIU et al., 2014; ALMANZA-ÁLVARES et al., 2017; FARR; ROSSMAN, 2018; DAMM et al., 2019).

Muitas destas espécies foram identificadas e nomeadas com base em características fenotípicas, gama de hospedeiros e análise de sequências da região ITS-rDNA. Segundo YANG et al. (2011) alguns destes nomes entraram em desuso, não sendo encontrados na

literatura científica atual, enquanto outros deveriam ser considerados ambíguos, uma vez que suas culturas ex-tipo não estão disponíveis para novos estudos, como: *C. bletiae*, *C. cinctum*, *C. cirrhopetali*, *C. effiguratum*, *C. lujae*, *C. macrosporum*, *C. phalaenopsidis*, *C. stanhopeae* e *C. vanillae*. Além disso, novas espécies foram relatadas e reclassificadas com o avanço da molecular, contribuindo para elevar o número de espécies associada a este hospedeiro (YANG et al., 2011; JADRANE et al., 2012; NOIREUNG et al., 2012; SATO et al., 2012; CHOWDAPPA et al., 2014; DAMM et al., 2019).

No Brasil, os estudos de identificação do gênero *Colletotrichum* em orquídeas ainda são escassos. Apenas levantamentos de gêneros fúngicos e identificações baseadas em morfologia e análise da região ITS-rDNA são encontrados, sendo *C. gloeosporioides* s.s. a única espécie relatada (MAFIA et al., 2005; KLEIN, 2008; BARROS et al., 2009; SOUZA, 2010; OLIVEIRA et al., 2011; SANTOS, 2012; OLIVEIRA et al., 2014).

1.3 O Gênero *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* Corda (1831) pertence ao grupo dos fungos anamórficos e está inserido na classe-forma Celomicetos (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011). A fase teleomórfica de suas espécies, quando conhecida, é atribuída ao gênero *Glomerella*, filo Ascomycota. Baseado em estudos filogenéticos, ambas as formas estão acomodadas na classe Sordariomycetes, ordem Glomerellales e família Glomerellaceae (ZHANG et al., 2006; RÉBLOVÁ et al., 2011;).

As principais características morfológicas de *Colletotrichum* são: micélio septado; conidioma acervular, frequentemente pouco desenvolvido e geralmente com setas escuras bem desenvolvidas; conidióforos pouco desenvolvidos, tendo pequenas células conidiogênicas aglomeradas em forma de frasco, que apresentam conidiogênese enteroblástica; e conídios cilíndricos, fusiformes ou semilunares, hialinos, de paredes finas e unicelulares que germinam para produzir apressórios marrom-escuros com formatos circulares a irregulares (PUTZKE, J.; PUTZKE, M., 2002; CANNON; KIRK, 2007; LINS; ABREU; ALVES, 2007).

As espécies deste gênero são amplamente estudadas devido sua importância econômica como patógenos de plantas, atuando como hemibiotróficos, saprofíticos e endofíticos (DEAN et al., 2012; GAN et al., 2013; JAYAWARDENA et al., 2016). A identificação precisa das espécies de *Colletotrichum* é essencial para compreender a etiologia

da doença e estabelecer um manejo adequado. No entanto, a taxonomia do gênero foi considerada confusa e várias revisões foram realizadas ao longo dos anos (VON ARX, 1957; SUTTON, 1980; HYDE et al., 2009; CANNON et al., 2012; JAYAWARDENA et al., 2016).

Após a introdução do gênero por Corda em 1831 até meados do século XX, cerca de 750 nomes foram incluídos em *Colletotrichum*, baseados na especificidade do hospedeiro (CANNON et al., 2012). Em 1957, o trabalho monográfico de Von Arx trouxe um grande impacto sobre a taxonomia de *Colletotrichum*. Em seu trabalho, o gênero foi reorganizado com base na morfologia das espécies e o número foi reduzido para 11. Além disso, espécies fúngicas dos gêneros *Colletotrichum*, *Vermicularia* e *Gloeosporium* foram consideradas pertencentes a um mesmo gênero, sendo conservado o nome *Colletotrichum*. No entanto, Von Arx identificou muitos destes táxons baseados em descrições da literatura e não na avaliação dos espécimes tipo. Sutton (1980) ao observar esta incoerência no trabalho de Von Arx, reconheceu no gênero 22 espécies, baseado na morfologia e características culturais. Estudos baseados nestas características continuou a elevar o número de espécies para 40 em Sutton (1992) e 60 no Dicionário de Fungos (KIRK et al., 2008).

Após o início da década de 1990, foram registradas as primeiras aplicações do DNA para distinguir espécies em *Colletotrichum* e o número de artigos utilizando métodos moleculares para elucidar as relações dentro do gênero aumentaram rapidamente (CANNON et al., 2012). Inicialmente, a maioria dos estudos estavam baseados em análises da região ITS-rDNA, mas outras regiões genômicas começaram a ser utilizadas em análises filogenéticas multi-locus (SREENIVASAPRASAD; BROWN; MILLS, 1992; SHERRIFF et al., 1994; JOHNSTON; JONES, 1997; TALHINHAS et al., 2002; GUERBER et al., 2003; DU et al., 2005).

Muitos trabalhos apresentaram as limitações das características morfoculturais e o uso de apenas uma região genômica na delimitação de espécies de *Colletotrichum*, principalmente da região ITS-rDNA (CAI et al., 2009; HYDE et al., 2009; DAMM et al., 2009; CANNON et al., 2012; SHARMA; PINNAKA; SHENOY, 2013). Hyde et al. (2009) enfatizaram a necessidade de epitificação das espécies e o uso de análises filogenéticas multi-locus, com genes mais informativos. Cai et al. (2009) indicaram o uso de uma abordagem polifásica que inclui a utilização de dados moleculares, morfológicos, fisiológicos e relacionados à patogenicidade para uma identificação mais precisa e confiável das espécies, visto que a antiga forma de classificação tornou os limites das espécies ambíguos e confusos.

A partir de então, as análises filogenéticas multi-locus passaram a ser norma e as principais regiões genômicas utilizadas são: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), actina (*ACT*), quitina sintetase (*CHS-1*), β -tubulina (*TUB2*), calmodulina (*CAL*), histona (*HIS3*), glutamina sintetase (*GS*), superóxido-dismutase de manganês (*SOD*) e a região do espaçador interno transcrito (ITS) (CANNON et al., 2012; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012). O gene *GAPDH* tem sido indicado como barcode secundário na identificação de espécies do gênero *Colletotrichum*, pois sua combinação com outros genes tem permitido distinguir de forma confiável a maioria dos táxons (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012) e vem sendo utilizado como medida inicial de diversidade em estudos de identificação de espécies do gênero associadas a um hospedeiro específico (LIMA et al., 2013; SHARMA; SHENOY, 2013; LIU et al., 2016; SILVA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018; WACULICZ-ANDRADE et al., 2018).

Com base nesta abordagem, iniciou-se uma revisão do gênero, ainda em curso, em que várias espécies foram revisadas e tipificadas ou recém-descritas e vários complexos de espécies foram detectados. Atualmente, 201 espécies são reconhecidas em *Colletotrichum*, sendo 18 espécies isoladas (*singleton*) e 183 espécies agrupadas em um dos 14 complexos reconhecidos: *C. gloeosporioides*, *C. gigasporum*, *C. boninense*, *C. acutatum*, *C. graminicola*, *C. caudatum*, *C. spaethianum*, *C. destructivum*, *C. dematium*, *C. truncatum*, *C. orbiculare*, *C. dracaenophilum*, *C. magnum* e *C. orchidearum* (CROUCH; INGUAGIATO, 2009; DAMM et al., 2009; CANNON et al., 2012; DAMM et al., 2012a; DAMM et al., 2012b; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; DAMM et al., 2013; CROUCH, 2014; DAMM et al., 2014; HYDE et al., 2014; LIU et al., 2014; LIU et al., 2015; HOU et al., 2016; JAYAWARDENA et al., 2016; DAMM et al., 2019).

1.4 Controle da Antracnose em Orquídeas

O controle de doenças de plantas é um princípio fundamental para minimizar as perdas e garantir o máximo na produtividade. No entanto, há uma escassez na literatura científica no que diz respeito ao controle da antracnose em orquídeas. A grande maioria do material produzido está disponível em sites, blogs, manuais e livros como resultado do esforço da comunidade orquidófila.

Dentre os métodos mais indicados estão práticas preventivas que integram controle cultural e físico, como: a utilização de material propagativo sadio; irrigação adequada com

água de boa qualidade, evitando o molhamento das folhas; adoção de medidas de sanitização, removendo e destruindo plantas invasoras, restos vegetais e partes doentes das plantas; adoção de práticas de desinfestação, mantendo bancadas, equipamentos e utensílios de corte limpos, principalmente quando usados em plantas diferentes; utilização de substrato esterilizado, através de solarização; disposição das plantas nos telados, ripados e estufas que devem ser mantidas a mais de um metro do solo, em locais ventilados e sem aglomeração, evitando baixadas, acúmulo de umidade e baixas temperaturas; adubação balanceada, evitando principalmente o excesso de nitrogênio; e em casos de ataques severos, isolar a planta doente até seu completo restabelecimento. Todas estas medidas visam a erradicação, exclusão, evasão e regulação da doença, evitando a disseminação, a formação de microclima favorável ao patógeno e minimizando a produção de inóculo (MAFIA et al., 2005; MANTOVANI, 2013; AGROFIT, 2018).

O controle químico também é utilizado de forma preventiva com os fungicidas mancozeb, oxiclureto de cobre e tiofanato metílico, assim como o uso de fumigantes para desinfestação de substrato (MANTOVANI, 2013; AGROFIT, 2018). Adicionalmente, os fungicidas sistêmicos a base de azoxistrobina, difenoconazole e bitertanol são usados para tratamento curativo da doença, principalmente em caso de ataque severo (ZAGER, 2018). Dentre estes químicos, apenas o mancozeb e o oxiclureto de cobre são recomendados para a cultura pelo Ministério da Agricultura (AGROFIT, 2018).

Alguns estudos, realizados com fungicidas no controle da antracnose em orquídeas, obtiveram resultados satisfatórios com o fosfonato de potássio, mancozeb, cimoxanil, carbendazim, iprodione e fenamidona contra *C. gloeosporioides s.s.* em *Phalaenopsis* (MEERA et al., 2016) e calda bordalesa, clorotalonil, rabcida e mancozeb contra *C. orchidearum* em orquídeas (FENGLI et al., 1990).

Podemos citar ainda o uso do controle biológico, recomendado como alternativa ao controle químico. Estudos com *Emericella nidulans* em *Vanilla planifolia* (TALUBNAK; SOYTONG, 2010), *Bacillus subtilis* B6 na orquídea Lady's Slipper (KUENPECH; AKARAPISAN, 2014), *B. subtilis* SSE 4 em *Dendrobium* (PRAPAGDEE et al., 2008) e *Streptomyces hygroscopicus* em orquídeas (PRAPAGDEE et al., 2012) apresentaram resultados significativos no combate à doença, utilizando isolados identificados como *C. gloeosporioides s.s.*

Embora exista um enorme número de espécies de *Colletotrichum* associadas a antracnose em orquídeas no mundo, apenas *C. gloeosporioides s.s.* e *C. orchidearum* têm sido

utilizados nos estudos de controle da doença. Já foi demonstrado que as espécies de *Colletotrichum* apresentam comportamento diferenciado frente aos diferentes fungicidas e que este conhecimento pode ser utilizado para auxiliar e direcionar a escolha dos ingredientes ativos mais adequados no controle da doença (LIMA et al., 2015). Portanto, estudos comparativos do efeito dos diferentes fungicidas sobre as diferentes espécies que ocorrem em orquídeas precisam ser desenvolvidos com o objetivo de evitar a resistência dos patógenos pelo uso indiscriminado destes químicos.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT/MAPA - SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 15 jun. 2018.
- ALMANZA-ÁLVAREZ, J. et al. Identification and control of pathogenic fungi in Neotropical valued orchids (*Laelia* spp.). **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n. 5, p. 339-351, oct. 2017.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 4 ed. v.1. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. 704p.
- BARROS, A. P. O. de et al. Manchas foliares em *Catasetum expansum* (Orchidaceae) incitadas por *Colletotrichum* sp. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 9, 2009, Recife. Disponível em: <<http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/listaresumos.htm>>. Acesso em 14 de Ago. 2018.
- BARROS F. de et al. Orchidaceae. In: FORZZA, R. C. et al. (Org.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. v. 2, 828 p.
- BUAINAIN, A. M.; BATALHA, M. O. (Coord.). **Cadeias Produtivas de Flores e Mel**. Brasília: IICA/MAPA/SPA, 2007. 140 p. (Série Agronegócios).
- CAI L. et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 183-204, dec. 2009.
- CANNON, P. F.; KIRK, P. M. (Ed.). **Fungal families of the world**. Cambridge, UK: CAB International, 2007. 456 p.
- CANNON, P.F. et al. *Colletotrichum*- current status and future directions. **Studies Mycology**, v.73, n. 1, p.181-213, sep. 2012.
- CHANDANKUMAR, G. H. **Business appraisal of orchid flower production in Karnataka**. Dissertação (Mestrado em MBA de Gestão Agroempresarial) – University of Agricultural Sciences, Bengaluru, 2009.

CHASE, M. W. et al. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon K.W. et al. (Ed.). **Orchid conservation**. Kota Kinabalu: Natural History Publications (Borneo), 2003, p. 69–89.

CHEN, J. et al. Endophytic fungi assemblages from 10 *Dendrobium* medicinal plants (Orchidaceae). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p.1009-1016, 2011.

CHOWDAPPA, P. et al. Multilocus gene phylogeny reveals occurrence of *Colletotrichum cymbidiicola* and *C. cliviae* on orchids in North East India. **Journal of Plant Pathology**, Bari, Itália, v. 96, n. 2, p. 327-334, jul.2014.

CROUCH J. A.; INGUAGIATO, J. C. First report of anthracnose disease of ornamental feather reed grass (*Calamagrostis*× *acutifolia* 'Karl Foerster') caused by *Colletotrichum cereale*. **Plant Disease**, v. 93, n. 2, p. 203, feb. 2009.

CROUCH, J. A. *Colletotrichum caudatum*s.l. is a species complex. **IMA Fungus**, v. 5, n. 1, p. 17-30, mar. 2014.

DAMM, U. et al. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 45-87, dec. 2009.

DAMM, U. et al. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p.37-113, sept. 2012a.

DAMM, U. et al. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p.1-36, sept. 2012b.

DAMM, U. et al. The *Colletotrichum destructivum* species complex – hemibiotrophic pathogens of forage and field crops. **Studies in Mycology**, v. 79, p. 49-84, sept. 2014.

DAMM, U. et al. The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. **Studies in Mycology**, v.92, p. 1-46, mar. 2019.

DAMM, U. et al. The *Colletotrichum orbiculare* species complex: Important pathogens of field crops and weeds. **Fungal Diversity**, v. 61, p. 29-59, jul. 2013.

DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**,v. 13, n. 4, p. 414–430, may. 2012.

DU, M. et al. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. **Mycologia**, v. 97, p. 641-658, may-jun. 2005.

FARR D.F.; ROSSMAN A.Y. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Disponível em: <<https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>>. Acesso em 15 de Ago. 2018.

FAY, M. F.; CHASE, M. W. Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century. **Annals of Botany**, UK, v. 104, n. 1, p. 359–364, jul. 2009.

FENGLI, J. et al. Disease Occurrence and Chemical Control of Orchid Anthracnose. **Journal of Zhejiang Forestry College**, n. 1, p. 43-48, 1990.

GAN, P. et al. Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. **New Phytologist**, v. 197, p. 1236–1249, 2013.

GUERBER, J. C. et al. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. **Mycologia**, v. 95, n. 5, p. 872-895, sept-oct. 2003.

HOU, L. W. et al. *Colletotrichum aracearum* and *C. camelliae-japonicae*, two holomorphic new species from China and Japan. **Mycosphere**, v. 7, n. 8, p. 1111-1123, dec. 2016.

HYDE, K. D. et al. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 147-182, dec. 2009.

HYDE, K. D. et al. One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic genera: I. **Fungal Diversity**, v. 67, n. 1, p. 21-125, jul. 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA – IBRAFLOR. Disponível em: <http://www.ibraflor.com/site/wp-content/uploads/2017/11/Mercado-de-flores-Vera-Longuini-19_08_2017.pdf>. Acesso em: 15 jul. de 2018.

JAYAWARDENA, R. S. et al. Notes on currently accepted species of *Colletotrichum*. **Mycosphere**, v. 7, n. 8, p. 1192-1260, dec. 2016.

JADRANE, I. et al. First Report of flower anthracnose caused by *Colletotrichum karstii* in white *Phalaenopsis* orchids in the United States. **Plant Disease**, v. 96, n. 8 p.1227, aug.2012.

JOHNSTON, P. R.; JONES, D. Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit-rots assessed using rDNA sequences. **Mycologia**, v. 9, n.3, p. 420-430. may-jun. 1997.

KIMATI, H. L et al. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. 705 p.

KIRK, P. M. et al. **Dictionary of the fungi**. 10. ed. Wallingford: CABI Europe - UK, 2008. 784 p.

KLEIN, E. H. S. **Levantamento e Desenvolvimento de Kit Diagnóstico de Patógenos e Propagação In Vitro de Orquídeas no Estado do Rio de Janeiro**, dissertação (Mestrado em Entomologia Aplicada) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.

KUENPECH, W.; AKARAPISAN, A. Biological control of anthracnose disease in Lady's Slipper using *Bacillus subtilis* isolate B6. **Science Journal of Microbiology**, v. 2014, p. 4, feb. 2014.

LIMA, N. B. et al. Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from mango in northeastern Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 141, n. 4, p. 679-688, apr. 2015.

LIMA, N.B. et al. Five *Colletotrichum* species are responsible for mangoanthracnose in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, v.61, n. 1, p. 75–88, jul. 2013.

LINS, S. R.O.; ABREU, M. S.; ALVES, E. Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 6, p. 488-495, 2007.

LIU, F. et al. Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in peppers from Sichuan Province, China. **Scientific Reports**, v. 6, n. 32761, sept. 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep32761>>. Acesso em: 02 ago. 2018.

LIU, F. et al. The *Colletotrichum gigasporum* species complex. **Persoonia**, v. 33, p. 83-97, dec. 2014.

LIU, F. et al. Unravelling *Colletotrichum* species associated with *Camellia*: employing ApMat and GS loci to resolve species in the *C. gloeosporioides* complex. **Persoonia**, v. 35, p. 63–86. dec. 2015.

MAFIA, R. G. et al. Antracnose em *Paphiopedilum insigne* (Orquidaceae) causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 436, jul-aug. 2005.

MANTOVANI, C. **Manual de identificação das doenças das orquídeas**. 2013. Disponível em:
<<http://www.orquideasmantovani.com.br/download?arquivo=Doen%C3%A7as%20das%20Orquid%C3%A9as.pdf>>. Acesso em: 09 ago. 2018.

MEERA, T. M.; LOUIS, V.; BEENA, S. Diseases of *Phalaenopsis*: Symptoms, Etiology and Management. **International Journal of Agriculture Innovations and Research**, v. 5, n. 2, p. 296-300, nov. 2016.

MORIWAKI, J.; SATO, T.; TSUKIBOSHI, T. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan. **Mycoscience**, v. 44, p. 47-53, feb. 2003.

NOIREUNG, P. et al. Novel species of *Colletotrichum* revealed by morphology and molecular analysis. **Criptogamie Mycology**, v. 33, n.3, p. 347-362, sept. 2012.

OLIVEIRA, M. Z. A. de et al. Patógenos associados a doenças de plantas ornamentais na região metropolitana de Salvador, Bahia. In: JORNADA CIENTÍFICA – EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA, 5, Cruz das Almas. 2011. Disponível em:
<<https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/busca-de-publicacoes/-/publicacao/918354/patogenos-associados-a-doencas-de-plantas-ornamentais-na-regiao-metropolitana-de-salvador-bahia>>. Acesso em: 25 de ago. 2011.

OLIVEIRA, S. F. et al. Endophytic and mycorrhizal fungi associated with roots of endangered native orchids from the Atlantic Forest, Brazil. **Mycorrhiza**, v. 24, n. 1, p. 55-64, jan.2014.

OLIVEIRA, L.F.M. et al. Identification of *Colletotrichum* species associated with brown spot of cactus prickly pear in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.43, n. 3, p.247–253, jun. 2018.

PATEL, M. K.; KAMAT, M. N.; PANDE, C. B. A new leaf blight of *Crossandra infundibuliformis* Nees. **Indian Phytopathology**, v. 5, p. 136, jan.1953.

PRAPAGDEE, B. et al. Efficacy of crude extract of antifungal compounds produced from *Bacillus subtilis* on prevention of anthracnose disease in *Dendrobium* orchid. **Environment Asia**, v.5, n. 1, p. 32-38, jan. 2012.

PRAPAGDEE, B.; AKRAPIKULCHART, U.; MONGKOLSUK, S. Potential of a soil-borne *Streptomyces hygroscopicus* for biocontrol of anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in orchid. **Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 7, p. 1187-1192, jul. 2008.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**. 2. ed. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2002. 491 p.

RÉBLOVÁ, M.; GAMS, W.; SEIFERT, K. A. Monilochaetes and allied genera of the Glomerellales, and a reconsideration of families in the Microascales. **Studies in Mycology**, v. 68, p. 163-191, mar. 2011.

REIS, J. N. P. Cultivo de orquídeas: uma opção à agricultura familiar? In: ENCONTRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DA ECONOMIA ECOLÓGICA, 9., 2011, Brasília. **Anais do IX encontro da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica – ECOECO2**. Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Economia Ecológica-ECOECO, 2011.

RODRIGUES, V. T. **Orchidaceae Juss. aspectos morfológicos e taxonômicos**. 2011. Instituto de Botânica de São Paulo. Disponível em: <<https://pt.scribd.com/document/293970990/Orchidaceae-Juss-Aspectos-Morfologicos-e-Taxonomicos>>. Acesso em 19 de Ago. de 2018.

SACCARDO, P. A. Fungi aliquot Brasilienses phyllogeni. **Bulletin de la Société Royale de Botanique Belgique**, v. 35, p. 127–132, 1896.

SANTOS, C. D. dos. **Fungos e oomiceto associados a espécies nativas e cultivadas de orquídeas no sul da Bahia**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, 2012.

SATO, T. et al. Molecular phylogenetic analyses and morphological re-examination of strains belonging to three rare *Colletotrichum* species in Japan. **Microbiology and Culture Collections**, v. 28, n. 2, p. 121-134. 2012.

SHARMA, G.; PINNAKA, A. K.; SHENOY, B. D. ITS-based diversity of *Colletotrichum* from India. **Current Research in Environmental & Applied Mycology**. v. 3, n. 2, p. 194–220, oct. 2013.

SHARMA, G.; SHENOY, B. D. *Colletotrichum fruticola* and *C. siamense* are involved in chilli anthracnose in India. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 47, n. 10, p. 1179-1194, sept. 2013.

SHERIFF, C. et al. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. **Experimental Mycology**, v. 18, n. 2, p. 121-138, jun. 1994.

SHIRAKI, J. N.; DIAZ, E. M. **Orquídeas**. São Paulo: Secretaria do verde e do meio ambiente, 2012. 175 p.

SILVA, J. R. A. et al. Molecular and morpho-cultural characterization of *Colletotrichum* spp. associated with anthracnose on *Capsicum* spp. in northeastern Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n. 4, p. 315-319, aug. 2017.

SOUSA, E. M. R. **Fungos causadores de doenças em orquídeas**. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2010.

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

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes in vitro e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.7, n.1, p. 25-33, 2001.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (Ed.) *Colletotrichum—Biology, Pathology and Control*. Wallingford: CAB International, 1992. p. 1-26.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes: Fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980.696p.

TALHINHAS, P. et al. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. **Phytopathology**, v. 92, n. 9, p. 986-996, sept. 2002.

TALUBNAK, C.; SOYTONG, K. Biological control of vanilla anthracnose using *Emericella nidulans*. **Journal of Agricultural Technology**, v.6, n. 1, p. 47-55, jan.2010.

TAO, G. et al. Endophytic *Colletotrichum* species from *Bletilla ochracea* (Orchidaceae), with descriptions of seven new species. **Fungal Diversity**, v. 61, n. 1, p. 139-164, jul. 2013.

TERAO, D.; CARVALHO, A. C. P. P. de; BARROSO, T. C. da S. F. (Ed.); SOBRAL, S. del C. C. de T.; RIDD, M. D. (Trad.). **Flores tropicais – Tropical Flowers**. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 255p.

VON ARX, J. A. **Revision der zu *Gloeosporium* gestellten Pilze**. Amsterdam: N. V. Noord-Hollandsche Uitgevers Maatschappij, 1957. 157p.

WACULICZ-ANDRADE, C. E. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* sensu stricto: an endophytic species or citrus pathogen in Brazil? **Australasian Plant Pathology**, v. 46, n. 2, p. 191-203, mar. 2017.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p.115-180, sept. 2012.

YANG, Y. L. et al. *Colletotrichum* Species on Orchidaceae in Southwest China. **Cryptogamie Mycologie**, v. 32, n. 3, p. 229-253, sept. 2011.

YAO, J. A. et al. Sequence analysis of ITS and PCR rapid detection of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Cymbidium ensifolium*. **Acta Phytologica Sinica**, v. 40, n. 3, p. 249–254.2013.

ZAGER, M. Fungos e Bactérias nas Orquídeas. 2018. Disponível em: <<https://www.portaldoorquidofilo.com/fungos-e-bacterias>> Acesso em: 12 de ago. 2018.

ZHANG, N. et al. An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on four-gene phylogeny. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 1076-1087, nov. 2006.

ZHAI, J. W. et al. A new Orchid genus, *Danxiaorchis*, and phylogenetic analysis of the tribe Calypsoeae. **Plos One**, v. 8, n. 4, abr. 2013. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0060371>>. Acesso em: 02 de set. 2018.

CAPÍTULO 2

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* EM ORQUÍDEAS NO NORDESTE
DO BRASIL

1 **IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* EM ORQUÍDEAS NO**
2 **NORDESTE DO BRASIL**

3

4 Janaíne Rossane Araújo Silva-Cabral¹

5 ¹Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Br 104, Km 85 Norte, Rio
6 Largo, AL, 57100-000, Brasil, janaine_rossane@hotmail.com.

7

8 Resumo - As doenças fúngicas são de ocorrência comum sobre espécies da família
9 Orchidaceae. A antracnose é uma das doenças mais importantes da orquidoflora,
10 principalmente em regiões tropicais. Muitas espécies do gênero *Colletotrichum* são
11 responsáveis por causar esta doença em orquídeas no mundo todo, no entanto, pouco se sabe
12 sobre a etiologia da doença no Brasil. O objetivo deste estudo foi identificar espécies do
13 gênero *Colletotrichum* que infectam orquídeas no Nordeste do Brasil, utilizando análises
14 filogenéticas multi-locus associadas a características morfoculturais. Vinte e dois isolados,
15 obtidos de plantas de orquídeas com sintomas de antracnose, se agruparam com seis espécies
16 de *Colletotrichum*: *C. fructicola*, *C. gloeosporioides sensu stricto*, *C. karstii*, *C.*
17 *orchidophilum*, *C. siamense* e *C. tropicale*. Este é o primeiro relato de *C. tropicale* e *C.*
18 *fructicola* em orquídeas no mundo e de *C. orchidophilum* no Brasil.

19 **Palavras-chave:** antracnose, filogenia multi-locus, Orchidaceae.

20

21 Abstract - Fungal diseases are a common occurrence on species of the Orchidaceae family.
22 The anthracnose is one of the most important diseases of the orchid, mainly in tropical
23 regions. Many species of the genus *Colletotrichum* are responsible for causing this disease in
24 orchids worldwide, however, little is known about the etiology of the disease in Brazil. The
25 objective of this study was to identify species of the genus *Colletotrichum* that infect orchids
26 in the northeastern Brazil, using multi-locus phylogenetic analyzes associated with morpho-
27 cultural characteristics. Twenty-two isolates, obtained from orchid plants with symptoms of
28 anthracnose, gathered with six species of *Colletotrichum*: *C. fructicola*, *C. gloeosporioides*
29 *s.s.*, *C. karstii*, *C. orchidophilum*, *C. siamense* and *C. tropicale*. This is the first report of *C.*
30 *tropicale* and *C. fructicola* in orchids in the world and *C. orchidophilum* in Brazil.

31 **Keywords:** anthracnose, multi-locus phylogeny, Orchidaceae.

32

33

34 2.1 INTRODUÇÃO

35

36 As orquídeas pertencem a família Orchidaceae, uma das mais diversas e numerosas
 37 famílias botânicas do mundo (FAY; CHASE, 2009). Devido a beleza e extensa diversidade de
 38 suas flores são grande potencial econômico para floricultura nacional e internacional. O Brasil
 39 possui uma das maiores floras orquidáceas, por isso tem se inserido cada vez mais no
 40 mercado nacional e internacional de orquídeas, como centro exportador de plantas em vaso,
 41 flores cortadas e espécies para colecionadores (STANCATO; BEMELMANS; VEGRO,
 42 2001; TERAQ; CARVALHO; BARROSO, 2005). As doenças de origem fúngicas são um dos
 43 principais fatores limitantes para a produção comercial de orquídeas. A antracnose, doença
 44 causada por espécies fúngicas do gênero *Colletotrichum*, é de ocorrência comum em
 45 orquidáceas e causa lesões necróticas em folhas, flores e bulbos. As lesões depreciam
 46 esteticamente as plantas e flores, comprometendo sua comercialização (MAFIA et al., 2005;
 47 ALMANZA-ÁLVAREZ et al., 2017).

48 Até o momento, quarenta e três espécies do gênero *Colletotrichum* estão associadas a
 49 antracnose em orquídea no mundo: *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, *C. arxii* F. Liu,
 50 L. Cai, Crous & Damm, *C. bletiae* Halst., *C. bletillum* Tao, Liu, Liu, Gao & Cai, *C. boninense*
 51 Moriwaki, Toy. Sato & Tsuki, *C. cattleyicola* Damm & Toy. Sato, *C. caudasporum* Tao, Liu,
 52 Liu, Gao & Cai, *C. cereale* Manns, *C. cinctum* (Berk. & M.A. Curtis) Stoneman, *C.*
 53 *cirrhopetali* Sawada, *C. cliviae* Yan L. Yang, Zuo Y. Liu, K.D. Hyde & L. Cai, *C. cliviicola*
 54 Damm & Crous, *C. coelogyne* Damm, *C. crassipes* (Speg.) Arx, *C. crossandrae* Patel, Kamat
 55 & C.B. Pande, *C. cymbidiicola* Damm, P.F. Cannon, Crous, P.R. Johnst. & B. Weir, *C.*
 56 *dematium* (Pers.) Grove, *C. destructivum* O'Gara, *C. duyunensis* G. Tao, Zuo Y. Liu & L. Cai,
 57 *C. effiguratum* Sydow, *C. endophytum* G. Tao, Zuo Y. Liu & L. Cai, *C. excelsum-altitudinum*
 58 G. Tao et al., *C. gloeosporioides sensu stricto* (s.s.) (Penz.) Penz. & Sacc., *C. guizhouensis* G.
 59 Tao, Zuo Y. Liu & L. Cai, *C. kahawae* J.M Waller & Bridge, *C. karstii* Y.L. Yang, Zuo Y.
 60 Liu, K.D. Hyde & L. Cai, *C. liriopes* Damm, P.F. Cannon & Crous, *C. lujae* Verpl. & Clem.,
 61 *C. macrosporum* Wheeler W. H.; *C. miscanthi* J.A. Crouch, B.B. Clarke, J.F. White & B.I.
 62 Hillman, *C. ochracea* Tao, Liu, Liu, Gao & Cai, *C. oncidii* Damm, P.F. Cannon & Crous, *C.*
 63 *orchidearum* Allesch., *C. orchidophilum* Damm, P.F. Cannon & Crous, *C. parsonsi* Damm,
 64 P.F. Cannon, Crous, P.R. Johnst. & B. Weir, *C. phalaenopsidis* Sawada, K., *C. plurivorum*
 65 Damm, Alizadeh & Toy. Sato, *C. siamense* Phoulivong, L. Cai & K.D. Hyde, *C. sojiae* Damm
 66 & Alizadeh, *C. stanhopeae* Henn., *C. tofieldiae* (Pat.) Damm, P.F. Cannon & Crous, *C.*

67 *tropicicola* Phouliv. et al., *C. vanillae* Scalia (PATEL; KAMAT; PANDE, 1953;
68 MORIWAKI; SATO; TSUKIBOSHI, 2003; TALUBNAK; SOYTONG, 2010; CHEN et al.,
69 2011; YANG et al., 2011; DAMM et al., 2012a; DAMM et al., 2012b; SATO et al., 2012;
70 TAO et al., 2013, YAO et al., 2013; CHOWDAPPA et al., 2014; LIU et al., 2014;
71 ALMANZA-ÁLVARES et al., 2017; FARR; ROSSMAN, 2018; DAMM et al., 2019). No
72 Brasil, os trabalhos de identificação de *Colletotrichum* spp. em orquídeas ainda são escassos e
73 se baseiam apenas em morfologia e análise da região ITS-rDNA (MAFIA et al., 2005;
74 FREIRE; MOSCA, 2009; OLIVEIRA et al., 2014).

75 Atualmente, a identificação de espécies do gênero *Colletotrichum* está baseada em
76 uma abordagem polifásica que compreende a utilização de análises filogenéticas multi-locus
77 associadas a características morfoculturais. Esta nova abordagem tem contribuído
78 significativamente para o entendimento do gênero *Colletotrichum*, possibilitando uma
79 identificação mais precisa das espécies, resolvendo ambiguidades causadas pelos antigos
80 critérios de classificação e ampliando o registro de novas espécies em diferentes hospedeiros
81 ao redor do mundo (YANG et al., 2011; CANNON et al., 2012; DAMM et al., 2012b;
82 NOIREUNG et al., 2012; HOU et al., 2016; JAYAWARDENA et al., 2016; SILVA et al.,
83 2017; OLIVEIRA et al., 2018; VELOSO et al., 2018; WACULICZ-ANDRADE et al., 2018;
84 DAMM et al., 2019).

85 O objetivo deste estudo foi identificar espécies de *Colletotrichum* associadas a
86 antracnose em orquídeas no Nordeste do Brasil, utilizando análises filogenéticas multi-locus e
87 características morfoculturais.

88

89 **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

90

91 **2.2.1 Obtenção dos isolados de *Colletotrichum***

92

93 Para a obtenção dos isolados fúngicos de *Colletotrichum* foram realizadas coletas de
94 folhas, flores e bulbos de orquídeas com sintomas típicos de antracnose nos municípios de
95 Maceió, Bezerros e Paulo Afonso nos estados de Alagoas, Pernambuco e Bahia do nordeste
96 brasileiro, respectivamente. Os isolados foram obtidos de lesões individuais, normalmente, a
97 partir de duas lesões por folha/planta coletada. Fragmentos do tecido, obtidos da região de
98 transição entre o tecido doente e o sadio, foram desinfestados superficialmente, em álcool a
99 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio a 1% por 1 minuto, lavados duas vezes em água

100 destilada esterilizada (ADE), secos em papel filtro e transferidos para placas de Petri com
101 meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA). As placas foram mantidas sob temperatura de
102 25°C até o crescimento do micélio, a partir do qual foram retirados discos das bordas das
103 colônias e transferidos para novas placas de Petri contendo o meio de cultura BDA.

104 Culturas monospóricas foram obtidas dos isolados identificados como pertencentes
105 ao gênero *Colletotrichum* baseado na morfologia dos conídios (SUTTON, 1980). Os isolados
106 foram preservados pelo método de armazenamento por congelamento em tiras de papel-filtro
107 (ALFENAS; MAFIA, 2007) e em seguida depositados na Coleção de Culturas de Fungos
108 Fitopatogênicos da Universidade Federal de Alagoas (COUFAL). Análises moleculares e
109 morfoculturais foram realizadas a partir da obtenção das culturas monospóricas.

110

111 2.2.2 Caracterização molecular

112

113 Todos os isolados foram cultivados por 5 dias em meio Sacarose-Extrato de
114 levedura-Asparagina sem adição de ágar, mantidos em temperatura ambiente. O micélio foi
115 coletado e o DNA total foi extraído usando o protocolo de Doyle; Doyle (1987).

116 As sequências parciais do gene do gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (*GAPDH*)
117 foram amplificadas de todos os isolados para uma identificação preliminar das espécies
118 presentes em orquídeas. Para posicionamento taxonômico definitivo das espécies do gênero
119 *Colletotrichum*, isolados representativos de cada espécie identificada foram submetidos à
120 amplificação da região do espaçador interno transcrito ribossomal (ITS) e do gene β -tubulina
121 2 (*TUB2*). As reações foram realizadas com tampão 10X (3 μ L), $MgCl_2$ 50 mM (0,9 μ L), 10
122 mM DNTP's (2,4 μ L), 10 μ M de cada oligonucleotídeo (2 μ L), 1U Taq DNA polimerase (0,2
123 μ L) e DNA 1 μ L (25ng/ μ L). O volume final das reações foi ajustado para 30 μ L com água
124 desionizada esterilizada (Milli-Q). As condições de termociclagem e primers utilizados na
125 amplificação dos genes *GAPDH*, *TUB2* e da região ITS foram realizados como descritos por
126 Weir et al. (2012). Em seguida, os produtos de PCR foram purificados e sequenciados pela
127 Macrogen Inc., Seul, Coréia do Sul.

128

129 As sequências consenso de cada região genômica foram montadas e editadas usando
130 o Staden Package software (STADEN; BEAL; BONFIELD, 1998) e foram depositados no
131 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Estas sequências foram inicialmente analisadas com
132 o algoritmo BLASTn do banco de dados de nucleotídeos não-redundante GenBank para
determinar as espécies fúngicas com as quais elas compartilhavam maior identidade

133 nucleotídica. Posteriormente, alinhamentos múltiplos para cada região genômica foram
134 montados usando o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004) e manualmente ajustados usando o
135 MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Sequências de referência disponíveis
136 no GenBank para cada região genômica foram obtidas e incluídas nos alinhamentos
137 (Tabela1).

138 As árvores de inferência Bayesiana foram construídas utilizando os alinhamentos das
139 sequências parciais do gene *GAPDH* e dados concatenados (*GAPDH*, *TUB2* e ITS),
140 separadamente, empregando o método da cadeia de Markov Monte Carlo, no portal web
141 CIPRES (MILLER et al., 2010) usando MrBayes v. 3.2.3 (RONQUIST et al., 2012). O
142 melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi determinado para cada região genômica
143 usando MrModeltest 2.3 (POSADA; BUCKLEY, 2004) de acordo com o Akaike Information
144 Criterion (AIC). As árvores foram visualizadas e editadas no software FigTree v. 1.4
145 (ztree.bio.ed.ac.uk/software/figtree).

146

147 2.2.3 Estudos morfoculturais das espécies de *Colletotrichum*

148

149 A caracterização cultural consistiu na obtenção da taxa de crescimento micelial
150 (TCM) dos isolados. A partir de colônias cultivadas em meio BDA durante 7 dias, foram
151 retirados cinco discos (5mm) da borda da colônia e transferidos para o centro de cinco placas
152 de Petri contendo meio BDA sintético. As placas foram mantidas em incubadora a 25°C em
153 fotoperíodo de 12 horas, durante 7 dias. Para obtenção da TCM, o diâmetro das colônias foi
154 mensurado diariamente. Após os 7 dias, também foi observado a coloração das colônias.

155 A caracterização morfológica baseou-se na avaliação da forma e tamanho de 50
156 conídios e apressórios. As medidas de comprimento e largura destas estruturas foram obtidas
157 por meio de imagens capturadas por câmera digital Olympus SC30 acoplada ao microscópio
158 de luz (Olympus CKX41), utilizando o software Cellsenses Standard.

159 Para os estudos morfoculturais foram selecionados isolados de cada espécie
160 identificada nas análises filogenéticas multi-locus.

161

162 2.2.4 Teste de patogenicidade e gama de hospedeiros

163

164 Isolados das espécies de *Colletotrichum* identificadas no presente estudo foram
165 selecionados para realização dos testes de patogenicidade e gama de hospedeiros. Os isolados

166 foram inoculados em folhas destacadas de orquídeas para o teste de patogenicidade e em
167 frutos sadios para o teste de gama de hospedeiros.

168 As orquídeas foram selecionadas de acordo com a obtenção dos isolados, sendo cada
169 isolado testado na orquídea de onde foi obtido. E os frutos foram selecionadas de acordo com
170 o hospedeiro original das espécies, ou seja, o hospedeiro em que a espécie foi identificada
171 pela primeira vez.

172 Folhas assintomáticas dos gêneros *Cattleya*, *Oncidium*, *Phalaenopsis* e
173 *Schomburgkia* e frutos de goiaba (*Psidium guajava* L.), mamão (*Carica papaya* L.), manga
174 (*Mangifera indica* L.) e pera (*Pyrus communis* L.) foram lavadas em água corrente,
175 desinfestadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% por 3
176 minutos, lavados 3 vezes em ADE e secos com papel estéril. O inóculo consistiu de uma gota
177 de 10µL de suspensão de esporos com concentração de 10⁵ conídios/mL, para as folhas de
178 orquídeas, e para os frutos, discos de BDA (5mm) retirados das margens de colônias crescida
179 por sete dias. Os inóculos foram depositados sobre a superfície de cada órgão vegetal ferido
180 com auxílio de uma agulha estéril, com quatro repetições. Como testemunha foi utilizado
181 ADE e BDA. As folhas e os frutos foram acondicionadas em gerbox com papel filtro
182 esterilizado umedecido com ADE, cobertos com saco de polietileno e incubados em estufa
183 Biochemistry Oxygen Demand (BOD) a 25 °C e fotoperíodo de 12 h até o aparecimento dos
184 sintomas. O fungo foi reisolado para comprovar a patogenicidade das espécies e verificar as
185 características morfoculturais.

186

187 **2.3 RESULTADOS**

188

189 2.3.1 Obtenção dos isolados de *Colletotrichum*

190

191 Um total de vinte e dois isolados de *Colletotrichum* foram obtidos de sete diferentes
192 gêneros de orquídeas nativas e comerciais (Tabela 1). Doze isolados foram obtidos do gênero
193 *Cattleya*, seguido por *Oncidium* com 3 isolados e *Phalaenopsis* com 2 isolados. Os demais
194 gêneros foram representados por apenas um isolado. As folhas foram os órgãos vegetais mais
195 coletados e com o maior número de isolados. Apenas um isolado foi obtido de bulbo e
196 nenhum de flores.

197

198

199 2.3.2 Caracterização molecular

200

201 Baseado nos resultados de pesquisa BLAST do banco de dados GenBank e na análise
202 inicial realizada com as sequências parciais do gene *GAPDH*, dezenove isolados de
203 *Colletotrichum* spp. obtidos neste estudo foram alocados no complexo *C. gloeosporioides*,
204 dois isolados no complexo *C. boninense*, e um isolado foi relacionado a espécie *singleton*, *C.*
205 *orchidophilum*.

206 Para representar as espécies identificadas na análise com o gene *GAPDH*, doze
207 isolados de orquídeas foram selecionados e submetidos a análises filogenéticas multi-locus
208 (*GAPDH*, *TUB2* e ITS). A filogenia das espécies do complexo *C. gloeosporioides* incluiu
209 nove isolados representativos, que foram agrupados em 4 clados com alto suporte de
210 probabilidade posterior Bayesiana: O isolado COUFAL0213 foi atribuído ao clado da espécie
211 *C. gloeosporioides strictu sensu*, os isolados COUFAL0215 e COUFAL0225 foram
212 agrupados no clado da espécie *C. fructicola* Prihastuti, L. Cai & K.D. Hyde, COUFAL0209,
213 COUFAL0216 e COUFAL0223 ao clado de *C. siamense* e o clado de *C. tropicale* E.I. Rojas,
214 S.A. Rehner & Samuels agrupou os isolados COUFAL0205, COUFAL0214 e COUFAL0217
215 (Figura 1).

216 A identidade dos isolados de orquídeas que foram relacionados ao complexo *C.*
217 *boninense* e a espécie *C. orchidophilum* é apresentada na Figura 2. Os isolados
218 COUFAL0220 e COUFAL0221 foram atribuídos a espécie *C. karstii*, enquanto o isolado
219 COUFAL0219 a espécie *singleton C. orchidophilum*.

220 Os alinhamentos e árvores foram depositados no TreeBASE
221 (<http://www.treebase.org>; números de acesso: 20248; 20260).

222

223 2.3.3 Estudos morfoculturais das espécies de *Colletotrichum*

224

225 Os isolados representando as seis espécies de *Colletotrichum* encontradas neste
226 estudo foram identificados como pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, de acordo com seus
227 caracteres morfológicos e culturais (Figura 3). Embora a coloração predominante tenha sido o
228 branco e o laranja, os isolados se mostraram muito heterogêneos em relação as características
229 das colônias. Os valores médios do diâmetro das colônias, comprimento e largura de conídios
230 e apressórios apresentaram-se superiores ou inferiores aqueles observados para as espécies
231 identificadas, no entanto, os intervalos de tamanhos foram semelhantes as características das

232 espécies do complexo *Colletotrichum gloeosporioides* (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012),
233 complexo *C. boninense* (DAMM et al., 2012b) e a espécie *C. orchidophilum* (DAMM et al.,
234 2012a) (Tabela 2).

235

236 2.3.4 Teste de patogenicidade e gama de hospedeiros

237

238 Todos os isolados foram patogênicos as folhas de orquídeas e frutos sadios (Figura 4
239 e 5), que induziram sintomas entre cinco a dezoito dias após a inoculação, sendo o isolado
240 COUFAL0220, inoculado em orquídea, o mais tardio.

241 Em orquídeas, os isolados das espécies de *Colletotrichum* induziram lesões necróticas
242 deprimidas pequenas na superfície das folhas com ferimento. Nos frutos, as lesões foram
243 necróticas, deprimidas, enxarcadas e com diferentes tamanhos. As espécies *C.*
244 *gloeosporioides s.s.*, e *C. siamense* induziram as maiores lesões quando inoculadas em
245 mamão (2,0-1,5cm) e pera (2,7-2,5cm) , respectivamente. Nenhum sintoma foi observado na
246 testemunha (Tabela 2).

247

248 2.4 DISCUSSÃO

249

250 Neste estudo a filogenia multi-locus combinada aos dados morfoculturais revelou
251 uma alta diversidade de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose em orquídeas no
252 nordeste do Brasil. Seis espécies foram identificadas: *C. fructicola*, *C. gloeosporioides s.s.*, *C.*
253 *karstii*, *C. orchidophilum*, *C. siamense* e *C. tropicale*.

254 A vasta diversidade de espécies de *Colletotrichum* ocorrendo em orquídeas já era
255 esperada, uma vez que 43 espécies do gênero foram relatadas neste hospedeiro ao redor do
256 mundo (FARR; ROSSMAN, 2018). Dentre as espécies identificadas apenas *C. tropicale* e *C.*
257 *fructicola* nunca foram anteriormente relatadas em orquídeas.

258 A espécie *C. orchidophilum* forma um grupo basal ao complexo *C. acutatum* e é
259 classificada como uma espécie *singleton*, pois não pertence a nenhum complexo reconhecido
260 do gênero. O nome desta espécie advém de seu hospedeiro, já que é relatada somente em
261 espécies da família Orchidaceae, e não existem relatos de sua ocorrência em nenhum outro
262 hospedeiro. *Colletotrichum orchidophilum* já foi relatada em *Cycnoches aureum*, no Panamá,
263 *Ascocenda* sp. e *Dendrobium* sp. nos Estados Unidos, *Phalaenopsis* sp. no Reino Unido e *V.*
264 *planifolia* em Reunião (DAMM et al., 2012a; CHARRON et al., 2018). O isolado

265 COUFAL0219 correspondente a *C. orchidophilum* foi obtido somente de *Ca. labiata* Lindl.,
 266 espécie originária do nordeste brasileiro conhecida como rainha do Nordeste. Segundo nossos
 267 conhecimentos, este é o primeiro relato desta espécie em orquídeas no Brasil e em *Cattleya*
 268 sp. no mundo.

269 *Colletotrichum fructicola*, *C. gloeosporioides s.s.*, *C. siamense* e *C. tropicale*,
 270 membros do complexo *C. gloeosporioides* e *C. karstii*, membro do complexo *C. boninense*
 271 são espécies amplamente disseminadas que ocorrem sobre uma vasta gama de hospedeiros de
 272 importância econômica (DAMM et al., 2012b; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012;
 273 UDAYANGA et al., 2013; ALANIZ; HERNÁNDEZ; MONDINO, 2015; LIU et al., 2015;
 274 LIU et al., 2016; VELOSO et al., 2018).

275 *Colletotrichum gloeosporioides s.s.* é a segunda espécie mais relatada em orquídeas
 276 no mundo, sendo associada as seguintes espécies e gêneros da família Orchidaceae:
 277 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl., *Ca. gaskelliana* (N.E.Br.) Rehb.f., *Cattleya* sp.,
 278 *Cymbidium* sp., *Cy. insigne* Rolfe, *Cy. kanran* Makino, *Cy. sinense* [And.] Willd., *Cy. sp. var.*
 279 *wondrous*, *Coelogyne graminifolia* Rehb. f., *Dendrobium chrysotoxum* Lindl., *D. moschatum*
 280 (Buch.-Ham.) Sw., *D. nobile* Lindl., *D. officinale* Kimura & Migo, *Epidendrum* sp.,
 281 *Hoffmannseggella cinnabarina* (Batem. ex Lindl.) H.G.Jones, *Laeliocattleya* sp., *Oncidium*
 282 *altissimum* (Jacq.) Sw., *Oncidium* sp., *Phalaenopsis* sp., *Phaius tankervilleae* (Banks) Blume,
 283 *Saccolabium* sp., *Schomburgkia tibicinis* (Bateman ex Lindl.) Rolfe, *Spatiglotis* sp.,
 284 *Stanhopea* sp., *Vanda* sp., *V. planifolia*, em Austrália, África do Sul, Brasil, China, Coreia,
 285 Cuba, EUA, Ilhas Virgens, Índia, Indonésia, Maurícia, Porto Rico e Tailândia (FREIRE;
 286 MOSCA, 2009; YUAN et al., 2009; BOCOURT et al., 2011; YANG et al., 2011;
 287 CHOWDAPPA et al., 2012; HUANG et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014; LAN et al., 2016;
 288 FARR; ROSSMAN, 2018).

289 A maioria destes registros estão baseados em morfologia, gama de hospedeiro e
 290 análise da região ITS, com alguns poucos estudos utilizando análise filogenética multi-locus.
 291 A revisão destes relatos mais antigos seria oportuna, uma vez que o complexo *C.*
 292 *gloeosporioides* agrupa inúmeras espécies crípticas e muitos isolados foram erroneamente
 293 identificados como *C. gloeosporioides s.s.* com base nos antigos critérios de classificação. A
 294 espécie *C. gloeosporioides var. minor* (como *var. minus*), por exemplo, foi reclassificada
 295 como *C. queenslandicum* por Weir; Johnston; Damm (2012), e existem relatos de *C.*
 296 *gloeosporioides var. minor* em orquídeas (SIMMONDS, 1966), porém nenhum isolado deste
 297 hospedeiro foi avaliado nesta revisão.

298 Os resultados do presente estudo contrariam a abundância desta espécie em
 299 orquídeas, pois somente o isolado COUFAL0213 obtido de *Ca. alba* correspondeu a *C.*
 300 *gloeosporioides s.s.*, além disso, as outras espécies deste complexo relatadas aqui foram mais
 301 frequentes do que *C. gloeosporioides s.s.*. A espécie *C. tropicale* foi a mais prevalente,
 302 representada por 10 isolados, seguida por *C. siamense*, com 6 isolados e por *C. fructicola* com
 303 2 isolados. *Colletotrichum tropicale* e *C. fructicola* não foram relatadas em nenhuma orquídea
 304 no mundo, enquanto que a espécie *C. siamense* foi relatada apenas em *Arundina graminifolia*
 305 ((D.Don) Hochr.) na China (YANG et al., 2011). Concluimos, então, que este é o primeiro
 306 relato de *C. tropicale* em *Brassia longissima* [Rchb.f] Nash, *Cattleya* sp., *Ca. labiata*, *Ca.*
 307 *maikai*, *Maxilaria* sp., *Oncidium* sp. e *Phalaenopsis* sp.; de *C. fructicola* em *Cattleya* sp.
 308 (híbrida) e *Phalaenopsis* sp.; de *C. gloeosporioides s.s.* em *Ca. alba* e de *C. siamense* em
 309 *Cattleya* sp., *Ca. labiata*, *Ca. maikai*, *Harpophyllum giganteum* Hartweg ex Lindl. e *S. crispa*
 310 no mundo.

311 Interessante notar que as espécies *C. fructicola*, *C. tropicale* e *C. siamense* foram
 312 relacionados a infecções mistas em *Ca. labiata* e *Phalaenopsis* sp., sendo identificadas de
 313 isolados obtidos de lesões distintas da mesma folha/planta. Foi o caso dos isolados
 314 COUFAL0205 e COUFAL0206, obtidos de folhas de *Ca. labiata*, identificados como *C.*
 315 *tropicale* e *C. siamense*, respectivamente. E os isolados COUFAL0214 e COUFAL0215 que
 316 foram obtidos de folhas de *Phalaenopsis* sp., identificados como *C. tropicale* e *C. fructicola*,
 317 respectivamente.

318 A espécie *C. karstii* foi identificada pela primeira vez em orquídeas (*A. graminifolia*,
 319 *Calanthe argenteostriata* C.Z. Tang & S.J. Cheng, *Eria coronaria* (Lindl.) Rchb.f., *Pleione*
 320 *bulbocodioides* (Franchet) Rolfe e *Vanda* sp. na China (YANG et al., 2011). Posteriormente
 321 foi relatada em *Phalaenopsis* sp. (híbrido) nos EUA e *Bletilla ochracea* Schltr. na China
 322 (JADRANE et al., 2012; TAO et al., 2013). Porém, esta espécie não é restrita a orquídeas,
 323 sendo considerada a espécie mais comum e geograficamente diversificada do complexo *C.*
 324 *boninense*. Na revisão deste complexo, muitos isolados obtidos de *Dracaena* sp., *Passiflora*
 325 *edulis* Sims, *Cucumis melo* L., *Clivia miniata* (Stuefer) Engels, *Eucalyptus* sp. *Leucospermum*
 326 sp. e *Protea cynaroides* (L.) L. na África do Sul, Austrália, EUA, Japão e Zimbábue,
 327 anteriormente identificados como *C. boninense*, foram reclassificados como *C. karstii*
 328 (DAMM et al., 2012b). Alguns destes isolados revisados foram obtidos do estudo de
 329 Moriwaki; Sato; Tsukiboshi (2003), onde a espécie *C. boninense* foi identificada de isolados
 330 oriundos de *Cattleya* sp., *Cymbidium* sp. e *D. kingianum* Bidwill ex Lindl. no Japão, no

331 entanto estes isolados de orquídeas não foram incluídos na revisão de Damm et al. (2012b).
332 Talvez subestimando a abrangência desta espécie em gêneros de orquidáceas. No presente
333 estudo *C. karstii* é relatado pela primeira vez em *O. sherry baby* O’Flaherty e *Ca. labiata*.

334 Em relação a heterogeneidade observada nas características morfo culturais dos
335 isolados neste estudo, podemos notar que estas características são altamente variáveis. Outros
336 estudos mostraram a mesma variabilidade destas características. Weir; Johnston; Damm
337 (2012) concluíram que existem pequenas variações entre isolados de uma mesma espécie em
338 relação ao tamanho dos conídios e forma dos apressórios, e que os intervalos de tamanho dos
339 conídios entre as espécies são geralmente pequenos e se sobrepõem. Eles encontraram
340 também uma alta divergência na aparência macroscópica das culturas, provavelmente
341 refletindo diferentes históricos de armazenamento. Damm et al. (2012b) relataram uma alta
342 variabilidade na morfologia dos isolados da espécie *C. karstii* e Damm et al. (2012a)
343 observaram diferenças no tamanho de conídios e apressórios entre os isolados examinados da
344 espécie *C. orchidophilum* e também uma variação na coloração da colônia dependendo do
345 meio utilizado. Segundo Cai et al. (2009) as características fenotípicas podem variar
346 dependendo do meio de cultura, temperatura e das condições de cultivo. Todas estas
347 observações refletem a fragilidade da identificação de *Colletotrichum* spp. baseada apenas em
348 dados morfo culturais.

349 No teste de patogenicidade e gama de hospedeiro, as espécies de *Colletotrichum*
350 induziram lesões mais evidentes nos frutos do que nas folhas de orquídeas, hospedeiro
351 original dos isolados testados. Estes resultados corroboram com outros estudos de
352 patogenicidade cruzada deste gênero desenvolvidos em diferentes hospedeiros e regiões do
353 mundo que confirmam a inespecificidade das espécies de *Colletotrichum* em relação ao
354 hospedeiro. Este comportamento evidencia que a interação patógeno/hospedeiro deste gênero
355 precisa ser melhor explorada, uma vez que pode estar associado com particularidades do
356 isolado e/ou dos frutos inoculados, como por exemplo, níveis de suscetibilidade do
357 hospedeiro e densidade do inóculo (SILVA et al., 2006; LIMA et al. 2015; PHOULIVONG et
358 al., 2010; YANG et al., 2011).

359 O presente estudo demonstrou que a diversidade de espécies de *Colletotrichum*
360 associadas à antracnose de orquídeas no nordeste do Brasil tem sido subestimada. Seis
361 espécies foram identificadas como agentes causais da antracnose, sendo o primeiro relato da
362 maioria destas espécies em orquídeas no Brasil. A aplicação de estudos filogenéticos na
363 identificação de espécies de *Colletotrichum* é fundamental para conhecer a diversidade,

364 estrutura populacional, gama de hospedeiros e distribuição geográfica deste grupo de fungos.
 365 Este conhecimento contribui significativamente para o desenvolvimento de medidas de
 366 controle mais efetivas da doença.

367

368 **2.5 CONCLUSÕES**

369

370 As espécies *C. fructicola*, *C. gloeosporioides s.s.*, *C. karstii*, *C. orchidophilum*, *C.*
 371 *siamense* e *C. tropicale* são associadas à antracnose em orquídeas no Nordeste do Brasil.

372 Este é o primeiro relato de *C. fructicola* e *C. tropicale* em orquídeas no mundo e de
 373 *C. orchidophilum* no Brasil.

374 As espécies *C. gloeosporioides s.s.*, *C. karstii*, *C. siamense* e *C. orchidophilum* são
 375 relatadas pela primeira vez em pelo menos um dos gêneros de orquídeas aqui estudados.

376 *Colletotrichum tropicale* é a espécie mais prevalente entre os gêneros de orquídeas,
 377 ocorrendo em *Cattleya*, *Maxillaria*, *Brassia*, *Phalaenopsis* e *Oncidium*.

378 O gênero *Cattleya* apresenta maior diversidade de *Colletotrichum* spp. associadas à
 379 doença antracnose no Nordeste do Brasil.

380

381 **AGRADECIMENTOS**

382

383 O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
 384 de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradecemos também à
 385 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas - FAPEAL.

386

387 **REFERÊNCIAS**

388

389 ALANIZ, S.; HERNÁNDEZ, L.; MONDINO, P. *Colletotrichum fructicola* is the dominant
 390 and one of the most aggressive species causing bitter rot of apple in Uruguay. **Tropical Plant**
 391 **Pathology**, v. 40, p. 265–274, jul. 2015.

392

393 ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**, Viçosa: Editora UFV, 2007,
 394 382p.

395

396 ALMANZA-ÁLVAREZ, J. et al. Identification and control of pathogenic fungi in neotropical
 397 valued orchids (*Laelia* spp.). **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n. 5, p. 339-351, oct. 2017.

398

- 399 BOCOURT, Y. P. et al. Hongos Patógenos en plantas ornamentales de importancia para
400 Cuba. **Fitosanidad**, v. 15, n. 4, p. 205-214, dic. 2011.
401
- 402 CAI L. et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v. 39, p.
403 183-204, dec. 2009.
404
- 405 CANNON, P.F. et al. *Colletotrichum*- current status and future directions. **Studies Mycology**,
406 v.73, n. 1, p.181-213, sep. 2012.
407
- 408 CHARRON, C. et. al. Characterization of *Colletotrichum orchidophilum*, the agent of black
409 spot disease of vanilla. **Journal of Phytopathology**, v. 166, p. 525–531, 2018.
410
- 411 CHEN, J. et al. Endophytic fungi assemblages from 10 *Dendrobium* medicinal plants
412 (Orchidaceae). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p.1009-1016,
413 2011.
414
- 415 CHOWDAPPA, P. et al. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum*
416 *gloeosporioides* (Penz) Sac. isolates causinganthracnose of orchids in India. **Biotechnology**,
417 **Bioinformatics and Bioengineering**, v. 2, n. 1, p. 567-572, 2012.
418
- 419 CHOWDAPPA, P. et al. Multilocus gene phylogeny reveals occurrence of *Colletotrichum*
420 *cymbidiicola* and *C. cliviae* on orchids in North East India. **Journal of Plant Pathology**, Bari,
421 Italy, v. 96, n. 2, p. 327-334, jul. 2014.
422
- 423 DAMM, U. et al. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73,
424 p.37-113, sept. 2012a.
425
- 426 DAMM, U. et al. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, v.
427 73, p.1-36, sept. 2012b.
428
- 429 DAMM, U. et al. The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum*
430 species complexes. **Studies in Mycology**, v.92, p. 1-46, mar. 2019.
431
- 432 DOYLE J.J.; DOYLE J.L. A rapid DNA isolation procedure for smallquantities of fresh leaf
433 tissue. **Phytochem Bull**, v. 19, p.11–15, 1987.
434
- 435 EDGAR, R.C. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and
436 space complexity. **BMC Bioinformatics**, v.5, p.1-19, 2004.
437

- 438 FARR D.F.; ROSSMAN A.Y. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS,
439 USDA. Disponível em: <<https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>>. Acesso em: 15 de Ago.
440 2018.
441
- 442 FAY, M. F.; CHASE, M. W. Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century.
443 **Annals of Botany**, UK, v. 104, n. 1, p. 359–364, jul. 2009.
444
- 445 FREIRE, F. das C. O.; MOSCA, J. L. Patógenos associados a doenças de plantas ornamentais
446 no estado do Ceará. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 15, n. 1, p. 83-89,
447 2009.
448
- 449 HOU, L. W. et al. *Colletotrichum aracearum* and *C. camelliae-japonicae*, two holomorphic
450 new species from China and Japan. **Mycosphere**, v. 7, n. 8, p. 1111-1123, dec. 2016.
451
- 452 HUANG, J. H. et al. First Report of Anthracnose Caused by *Colletotrichum gloeosporioides*
453 on *Cymbidium sinense* in China. **Plant Disease**, v. 96, n. 6, p. 915, jun. 2012.
454
- 455 JADRANE, I. et al. First Report of flower anthracnose caused by *Colletotrichum karstii* in
456 white *Phalaenopsis* orchids in the United States. **Plant Disease**, v. 96, p.1227, 2012.
457
- 458 JAYAWARDENA, R. S. et al. Notes on currently accepted species of *Colletotrichum*.
459 **Mycosphere**, v. 7, n. 8, p. 1192-1260, dec. 2016.
460
- 461 LAN, C. Z. et al. First report of anthracnose on *Dendrobium officinale* Kimura et Migo
462 caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in China. **Plant Disease**, v. 100, n. 1, p. 226, jan.
463 2016.
464
- 465 LIMA, N. B. et al. Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from mango in
466 northeastern Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 141, n. 4, p. 679-688, apr.
467 2015.
468
- 469 LIU, F. et al. Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated
470 with anthracnose disease in peppers from Sichuan Province, China. **Scientific Reports**, v. 6,
471 n. 32761, sept. 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep32761>>. Acesso
472 em: 02 ago. 2018.
473
- 474 LIU, F. et al. The *Colletotrichum gigasporum* species complex. **Persoonia**, v. 33, p. 83-97,
475 dec. 2014.
476

- 477 LIU, F. et al. Unravelling *Colletotrichum* species associated with *Camellia*: employing
478 ApMat and GS loci to resolve species in the *C. gloeosporioides* complex. **Persoonia**, v. 35, p.
479 63–86. dec. 2015.
480
- 481 MAFIA, R. G. et al. Antracnose em *Paphiopedilum insigne* (Orquidaceae) causada por
482 *Colletotrichum gloeosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 436, jul-aug. 2005.
483
- 484 MILLER, M. A. et al. The CIPRES Portals. Website. Disponível em:
485 <http://www.phylo.org/sub_sections/portal>. Acesso em: 6 de jun. 2018.
486
- 487 MORIWAKI, J.; SATO, T.; TSUKIBOSHI, T. Morphological and molecular characterization
488 of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan. **Mycoscience**, v. 44, p. 47-53, feb. 2003.
489
- 490 NOIREUNG, P. et al. Novel species of *Colletotrichum* revealed by morphology and
491 molecular analysis. **Criptogamie Mycology**, v. 33, n.3, p. 347-362, sept. 2012.
492
- 493 OLIVEIRA, L.F.M. et al. Identification of *Colletotrichum* species associated with brown
494 spot of cactus prickly pear in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.43, n. 3, p.247–253, jun.
495 2018.
496
- 497 OLIVEIRA, S. F. et al. Endophytic and mycorrhizal fungi associated with roots of
498 endangered native orchids from the Atlantic Forest, Brazil. **Mycorrhiza**, v. 24, n. 1, p. 55-64,
499 jan. 2014.
500
- 501 PATEL, M. K.; KAMAT, M. N.; PANDE, C. B. A new leaf blight of *Crossandra*
502 *infundibuliformis* Nees. **Indian Phytopathology**, v. 5, p. 136, jan.1953.
503
- 504 PHOULIVONG, S. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on
505 tropical fruits. **Fungal Diversity**, v. 44, p. 33–43, 2010.
506
- 507 POSADA, D.; BUCKLEY, T.R. Model selection and model averaging in phylogenetics:
508 advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio
509 tests. **Systematic Biology**, v.53, n. 5, p.793-808, 2004.
510
- 511 RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model
512 Choice across a Large Model Space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539-42, 2012.
513

- 514 SATO, T. et al. Molecular phylogenetic analyses and morphological re-examination of strains
515 belonging to three rare *Colletotrichum* species in Japan. **Microbiology and Culture**
516 **Collections**, v. 28, n. 2, p. 121-134.2012.
517
- 518 SILVA, J. R. A. et al. Molecular and morpho-cultural characterization of *Colletotrichum* spp.
519 Associated with anthracnose on *Capsicum* spp. in northeastern Brazil. **Tropical Plant**
520 **Pathology**, v. 42, n. 4, p. 315-319, aug. 2017.
521
- 522 SILVA, K. S.. et al. Patogenicidade causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*
523 (Penz) em diferentes espécies frutíferas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p.
524 131-133, 2006.
525
- 526 SIMMONDS, J.H. **Host index of plant diseases in Queensland**. Brisbane: Queensland
527 Department of Primary Industries, 1966. 111p.
528
- 529 STADEN, R.; BEAL, K.F.; BONFIELD, J.K. The Staden package. In: MISENER, S.,
530 KRAWETZ S.A. (Eds) Bioinformatics methods and protocols. New York, USA: Humana,
531 1998. p.115–130.
532
- 533 STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de
534 orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista**
535 **Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.7, n.1, p. 25-33, 2001.
536
- 537 SUTTON, B.C. **The Coelomycetes: Fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata**.
538 Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980.696p.
539
- 540 TALUBNAK, C.; SOYTONG, K. Biological control of vanilla anthracnose using *Emericella*
541 *nidulans*. **Journal of Agricultural Technology**, v.6, n. 1, p. 47-55, jan.2010.
542
- 543 TAMURA, K. et al. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum
544 likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and**
545 **Evolution**, v.28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.
546
- 547 TAO, G. et al. Endophytic *Colletotrichum* species from *Bletilla ochracea* (Orchidaceae), with
548 descriptions of seven new species. **Fungal Diversity**, v. 61, n. 1, p. 139-164, jul. 2013.
549
- 550 TERAO, D.; CARVALHO, A. C. P. P. de; BARROSO, T. C. da S. F. (Ed.); SOBRAL, S. del
551 C. C. de T.; RIDD, M. D. (Trad.). **Flores tropicais – Tropical Flowers**. 1. ed. Brasília, DF:
552 Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 255p.
553

- 554 UDAYANGA, D. et al. What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits?
555 **Fungal Diversity**, v. 61, n.1, p. 165–179, 2013.
556
- 557 VELOSO, J. S. et al. Why species delimitation matters for fungal ecology: *Colletotrichum*
558 diversity on wild and cultivated cashew in Brazil. **Fungal Biology**, v. 122, p. 677-691, 2018.
559
- 560 WACULICZ-ANDRADE, C. E. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* sensu stricto: an
561 endophytic species or citrus pathogen in Brazil? **Australasian Plant Pathology**, v. 46, n. 2, p.
562 191-203, mar. 2017.
563
- 564 WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species
565 complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p.115-180, sept. 2012.
566
- 567 YANG, Y. L. et al. *Colletotrichum* Species on Orchidaceae in Southwest China.
568 **Cryptogamie Mycologie**, v. 32, n. 3, p. 229-253, sept. 2011.
569
- 570 YAO, J. A. et al. Sequence analysis of ITS and PCR rapid detection of *Colletotrichum*
571 *gloeosporioides* from *Cymbidium ensifolium*. **Acta Phytolacica Sinica**, v. 40, n. 3, p.
572 249–254. 2013.
573
- 574 YUAN, Z.; CHEN, Y.; YANG, Y. Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an
575 epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and characterization. **World**
576 **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 295–303, 2009.
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590

591 Tabela 1. Espécies de *Colletotrichum* com detalhes do hospedeiro, localização e número de acesso das culturas e do GenBank utilizados para a análise filogenética neste
592 estudo.

Espécies	Código da cultura	Hospedeiro	Localização	Número de acesso do GenBank		
				ITS	GAPDH	TUB2
<i>C. aenigma</i>	ICMP 18608*	<i>Persea americana</i>	Israel	JX010244	JX010044	JX010389
	ICMP18686	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Japão	JX010243	JX009913	JX010390
<i>C. aeshynomenes</i>	ICMP 17673*	<i>Aeshynomene virginica</i>	EUA	JX010176	JX009930	JX010392
<i>C. alatae</i>	ICMP17919*	<i>Dioscore alata</i>	Índia	JX010190	JX009990	JX010383
	ICMP18122	<i>Dioscore alata</i>	Nigéria	JX010191	JX010011	JX010449
<i>C. alienum</i>	ICMP 12071*	<i>Malus domestica</i>	Nova Zelândia	JX010251	JX010028	JX010411
	ICMP18621	<i>Persea americana</i>	Nova Zelândia	JX010246	JX009959	JX010386
<i>C. annellatum</i>	CBS129826*	<i>Hevea brasiliensis</i>	Colômbia	JQ005222	JQ005309	JQ005656
<i>C. asianum</i>	ICMP18580*	<i>Coffea arabica</i>	Tailândia	FJ972612	JX010053	JX010406
	MTCC11680	<i>Mangifera indica</i>	Índia	JQ894679	JQ894623	JA894601
<i>C. boninense</i>	CBS123755*	<i>Crinum asiaticum</i> var. <i>Sinicum</i>	Japão	JQ005153	JQ005240	JQ005588
	CBS128547	<i>Camellia</i> sp.	Nova Zelândia	JQ005159	JQ005246	JQ005333
<i>C. camelliae-japonicae</i>	CGMCC3.18118*	<i>Camellia japonica</i>	Japão	KX853165	KX893584	KX893580
	CGMCC3.18117	<i>Camellia japonica</i>	Japão	KX853164	KX893583	KX893579
<i>C. citricola</i>	CGMCC3.15227*	<i>Citrus unshiu</i>	China	KC293576	KC293736	KC293656
<i>C. conoides</i>	CAUG17*	<i>Capsicum annuum</i>	China	KP890168	KP890162	KP890174
<i>C. endophytica</i>	LC0324*	<i>Pennisetum purpureum</i>	Tailândia	KC633854	KC832854	-
	LC0327	<i>Pennisetum purpureum</i>	Tailândia	KC633855	KC832846	-
<i>C. fructicola</i>	ICMP18581*	<i>Coffea Arabica</i>	Tailândia	JX010165	JX010033	JX010405
	ICMP17921	<i>Ficus edulis</i>	Alemanha	JX010181	JX009923	JX010400
<i>C. gloeosporioides</i>	COUFAL0215	<i>Phalaenopsis</i> sp.	Brasil	MH939970	MH939936	MH939958
	COUFAL0225	<i>Cattleya</i> sp. (híbrida)	Brasil	MH939969	MH939937	MH939959
	IMI356878*	<i>Citrus sinensis</i>	Itália	JX010152	JX010056	JX010445
	LF318	<i>Camellia sinensis</i>	China	KJ955127	KJ954828	KJ955275
	COUFAL0213	<i>Cattleya alba</i>	Brasil	MH939971	MH939938	MH939960
	JZB330028*	<i>Vitis vinifera</i>	China	KF156863	KF377495	KF288975
<i>C. hebeiense</i>	CBS128500	<i>Annona cherimola</i>	Nova Zelândia	JQ005202	JQ005289	JQ005636
<i>C. karstii</i>	CBS128550	<i>Annona cherimola</i>	México	JQ005219	JQ005306	JQ005653
	COUFAL0220	<i>Oncidium sherry baby</i>	Brasil	MH939979	MH939957	MH939967
<i>C. musae</i>	COUFAL0221	<i>Cattleya labiata</i>	Brasil	MH939978	MH939956	MH939966
	ICMP 19119*	<i>Musa</i> sp.	EUA	JX010146	JX010050	HQ596280
	ICMP17817	<i>Musa sapientum</i>	Quênia	JX010142	JX010015	JX010395
<i>C. novae-zelandiae</i>	ICMP 12944*	<i>Capsicum annum</i>	Nova Zelândia	JQ005228	JQ005315	JQ005662
	ICMP 12064	<i>Citrus grapefruit</i>	Nova Zelândia	JQ005228	JQ005316	JQ005663
<i>C. nupharicola</i>	ICMP18187*	<i>Nuphar lutea</i> subsp. <i>polysepala</i>	EUA	JX010187	JX009972	JX010398
	ICMP17940	<i>Nymphaea odorata</i>	EUA	JX010188	JX010031	JX010399
<i>C. orchidophilum</i>	CBS 632.80*	<i>Dendrobium</i> sp.	EUA	JQ948151	JQ948481	JQ949802
	COUFAL0219	<i>Cattleya labiata</i>	Brasil	MH939980	MH939955	MH939968

<i>C. petchii</i>	CBS378.94*	<i>Dracaena marginata</i>	Itália	JQ005223	JQ005310	JQ005657
	CBS379.94	<i>Dracaena marginata</i>	Itália	JQ005224	JQ005311	JQ005658
<i>C. phyllanthi</i>	CBS175.67*	<i>Phyllanthus acidus</i>	Índia	JQ005221	JQ005308	JQ005655
<i>C. proteae</i>	CBS132882*	<i>Protea</i> sp.	África do Sul	KC297079	KC297009	KC297101
	CBS134301	<i>Protea</i> sp.	África do Sul	KC842385	KC842379	KC842387
<i>C. pseudoacutatum</i>	CBS 436.77*	<i>Pinus radiata</i>	Chile	JQ948480	JQ948811	JQ950131
<i>C. queenslandicum</i>	ICMP1778*	<i>Carica papaya</i>	Austrália	JX010276	JX009934	JX010414
	ICMP18705	<i>Coffea</i> sp.	Fiji	JX010185	JX010036	JX010412
<i>C. salsolae</i>	ICMP19051*	<i>Salsola tragus</i>	Hungria	JX010242	JX009916	JX010403
<i>C. siamense</i>	ICMP18578*	<i>Coffea arabica</i>	Tailândia	JX010171	JX009924	JX010404
	ICMP18121	<i>Dioscorea rotundata</i>	Nigéria	JX010245	JX009942	JX010402
	COUFAL0206	<i>Cattleya labiata</i>	Brasil	-	MH939939	-
	COUFAL0209	<i>Harpophyllum giganteum</i>	Brasil	MH939973	MH939940	-
	COUFAL0212	<i>Cattleya</i> sp.	Brasil	-	MH939942	-
	COUFAL0216	<i>Cattleya maikai</i>	Brasil	MH939974	MH939941	MH939962
	COUFAL0218	Orchidaceae	Brasil	-	MH939943	-
	COUFAL0223	<i>Schomburgkia crispa</i>	Brasil	MH939972	MH939944	MH939961
<i>C. tropicale</i>	ICMP18653*	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá	JX010264	JX010007	JX010407
	ICMP18672	<i>Litchi chinensis</i>	Japão	JX010275	JX010020	JX010396
	COUFAL0205	<i>Cattleya labiata</i>	Brasil	MH939975	MH939945	MH939964
	COUFAL0207	<i>Cattleya labiata</i>	Brasil	-	MH939946	-
	COUFAL0208	<i>Maxillaria</i> sp.	Brasil	-	MH939947	-
	COUFAL0210	<i>Brassia longissima</i>	Brasil	-	MH939948	-
	COUFAL0211	<i>Cattleya maikai</i>	Brasil	-	MH939952	-
	COUFAL0214	<i>Phalaenopsis</i>	Brasil	MH939976	MH939949	MH939965
	COUFAL0217	<i>Cattleya maikai</i>	Brasil	MH939977	MH939953	MH939963
	COUFAL0222	<i>Oncidium sherry baby</i>	Brasil	-	MH939954	-
	COUFAL0226	<i>Cattleya</i> sp.	Brasil	-	MH939950	-
	COUFAL0224	<i>Oncidium</i> sp.	Brasil	-	MH939951	-
<i>C. viniferum</i>	GZAAS 5.08601*	<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>shuijing</i>	China	JN412804	JN412798	JN412813
	GZAAS 5.08608	<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>hongti</i>	China	JN412802	JN412800	-

*ex-holotype or ex-epitypecultures. Os isolados obtidos neste estudo estão destacados em negrito.

595 Tabela 2. Resumo das características morfológicas e culturais das espécies de *Colletotrichum*.

Espécies	Conídios (µm)			Apressórios (µm)		TCM (cm/dia)	Colônias	Teste de patogenicidade	
	Comprimento	Largura	Formato	Comprimento	Largura			Orquídeas	Frutos
<i>C. fructicola</i> COUFAL0215 COUFAL0225	15.50 (10.63-26.36)	5.21 (3,62-6.94)	Cilíndrico	11.91 (8.08-20.29)	8.01 (4.20-14.89)	0.85	Branca	0.4-0.3	0.8-0.6
<i>C. gloeosporioides</i> COUFAL0213	15.31 (11.03-18.09)	5.31 (3.54-7.09)	Cilíndrico	9.8 (3.8-16.0)	7.7 (2.9-12.4)	1.02	Cinza rosado com bordas brancas	0.3-0.3	2.0-1.5
<i>C. orchidophilum</i> COUFAL0219	17.51 (15.70-19.83)	4.21 (3.11-5.44)	Cilíndrico	9.03 (5.68-13.51)	5.81 (4.31-8.63)	0.81	Branca	0.2-0.4	-
<i>C. siamense</i> COUFAL0223 COUFAL0216	16.26 (11.78-22.18)	5.14 (4.0-6.36)	Cilíndrico	11.61 (6.40-19.62)	8.51 (4.32-11.81)	0.66	Branco a alaranjado com bordas cinza e brancas	0.2-0.3	2.7-2.5
<i>C. tropicale</i> COUFAL0205 COUFAL0217	14.53 (10.62-18.11)	5.17 (2,04-6.26)	Cilíndrico	9.13 (4.69-15.23)	7.34 (3.97-11.05)	1.06	Branco a alaranjado com bordas cinza e brancas	0.1-0.2	0.6-0.7
<i>C. karstii</i> COUFAL0220 COUFAL0221*	16.17 (13.4-18.37)	7.85 (6.89-8.93)	Cilíndrico	11.13 (7.84-22.09)	9.43 (6.71-13.72)	0.88	Branco a alaranjado com bordas beges	0.3-0.4	0.5-0.5

596 *Este isolado não produziu apressórios.

597

598

599

600

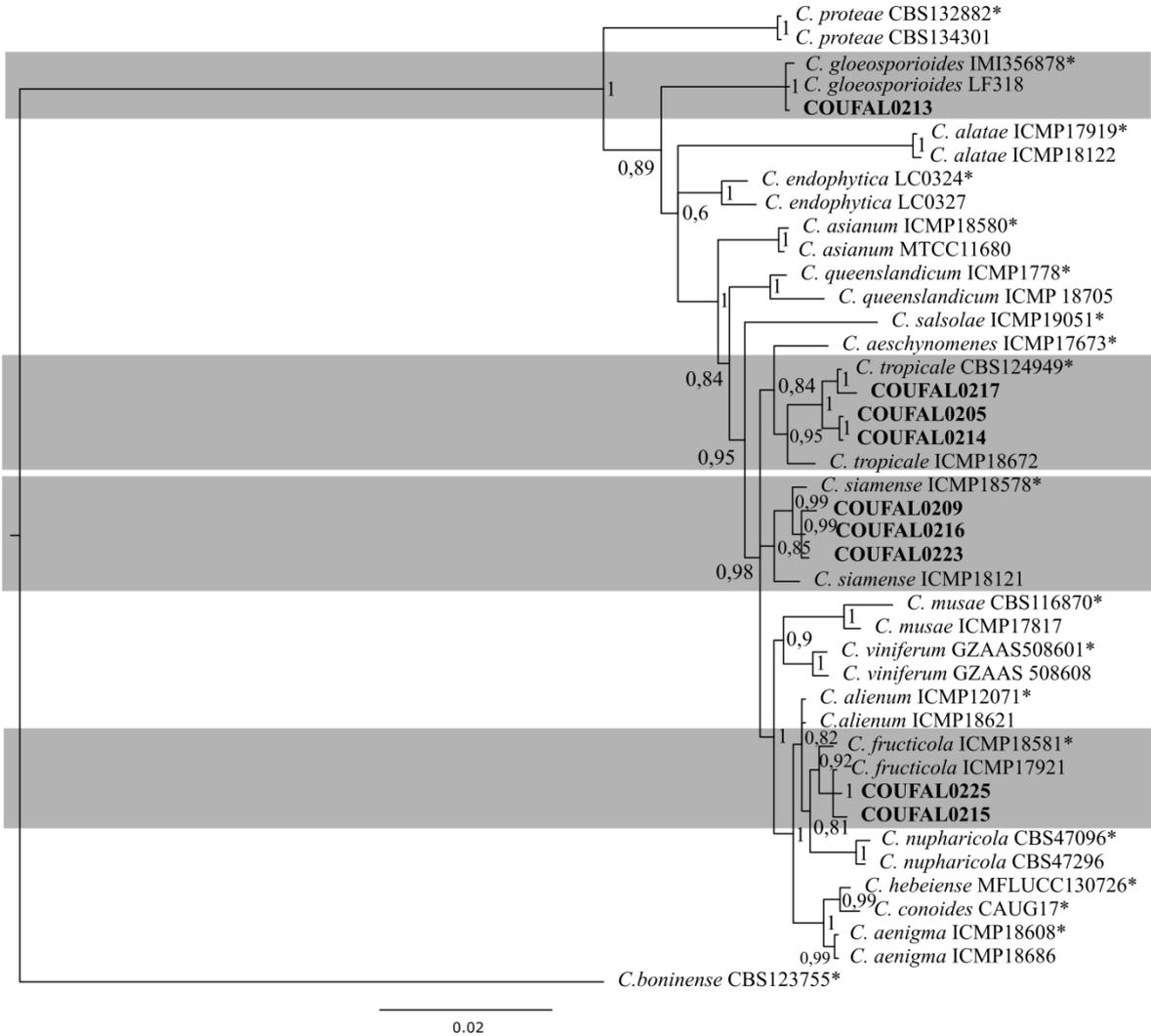
601

602

603

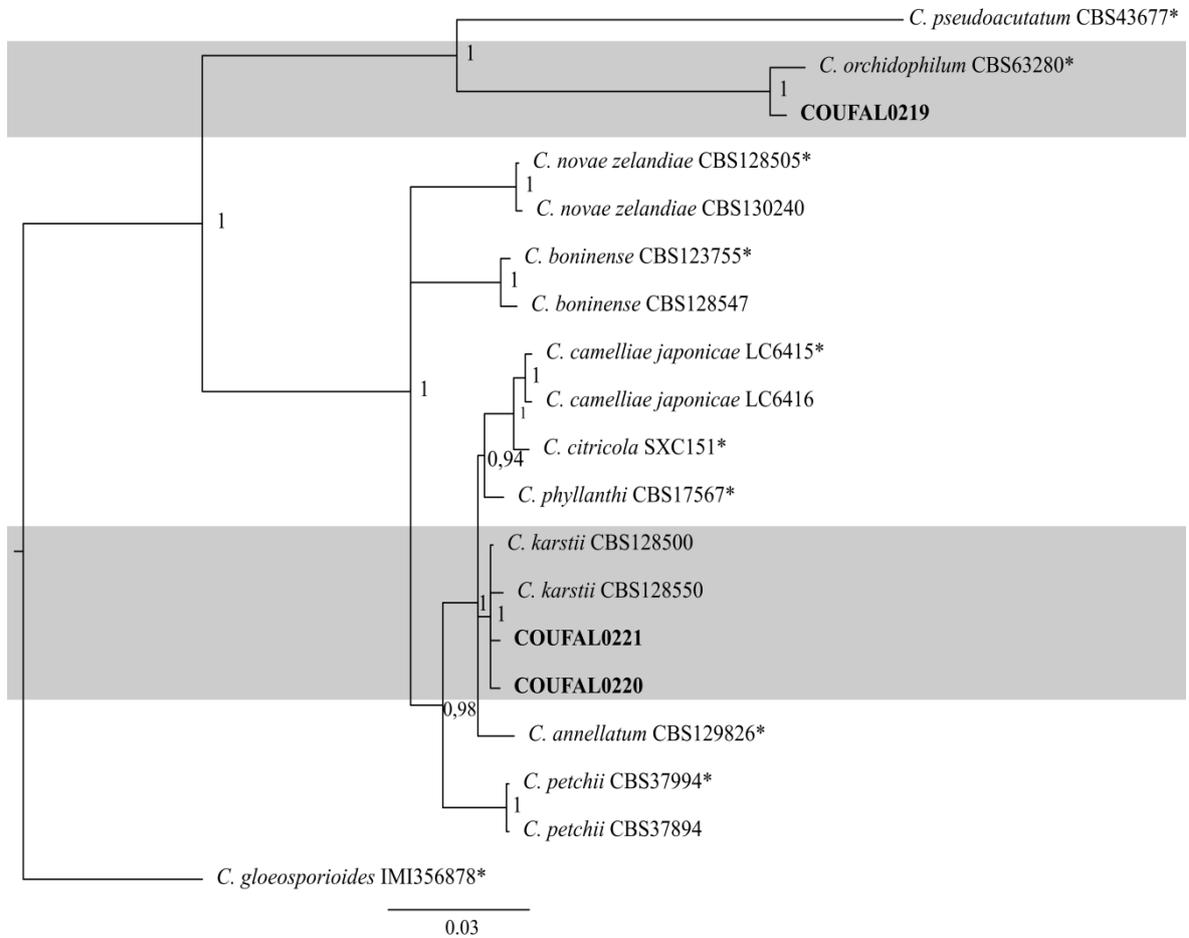
604

605 Figura 1. Árvore filogenética de inferência Bayesiana do complexo *Colletotrichum gloeosporioides* baseada em
 606 sequências concatenadas dos genes *GAPDH*, *TUB2* e ITS. Valores de probabilidade posteriores Bayesianos
 607 >0,60 são indicados nos nós. *Colletotrichum boninense* foi utilizado como grupo externo. Os isolados obtidos
 608 neste estudo estão destacados em negrito. As culturas ex-tipo estão marcadas com um asterisco. A barra de
 609 escala (0,02) representa substituições de nucleotídeos por sítio.



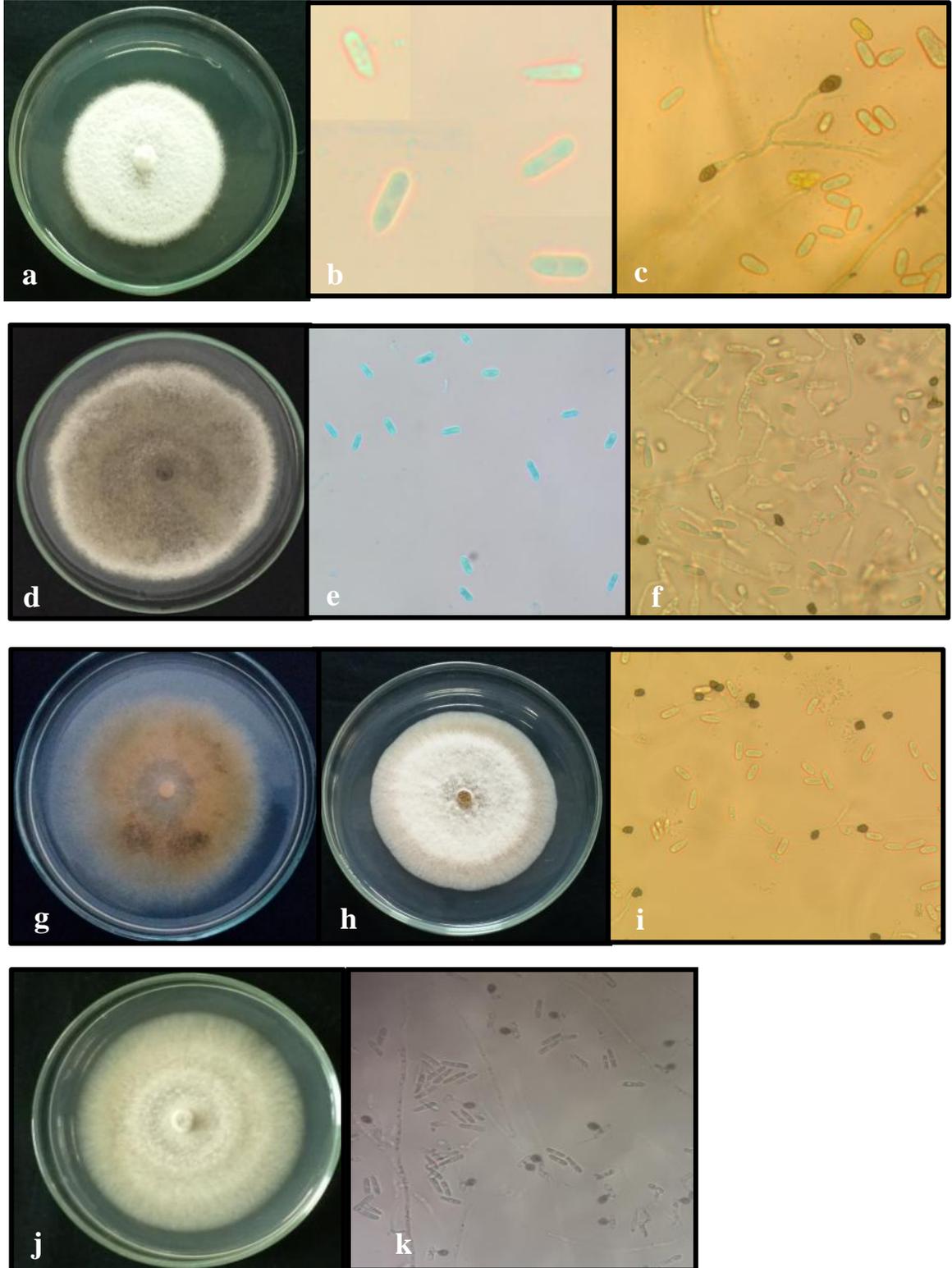
610
 611
 612
 613
 614
 615
 616
 617
 618
 619
 620
 621
 622
 623
 624

625 Figura 2. Árvore filogenética de inferência Bayesiana do complexo *Colletotrichum boninense* baseada em
 626 sequências concatenadas dos genes GAPDH, TUB2 e ITS. Valores de probabilidade posteriores Bayesianos
 627 >0,94 são indicados nos nós. *Colletotrichum gloeosporioides* foi utilizado como grupo externo. Os isolados
 628 obtidos neste estudo estão destacados em negrito. As culturas ex-tipo estão marcadas com um asterisco. A barra
 629 de escala (0,03) representa substituições de nucleotídeos por sítio.



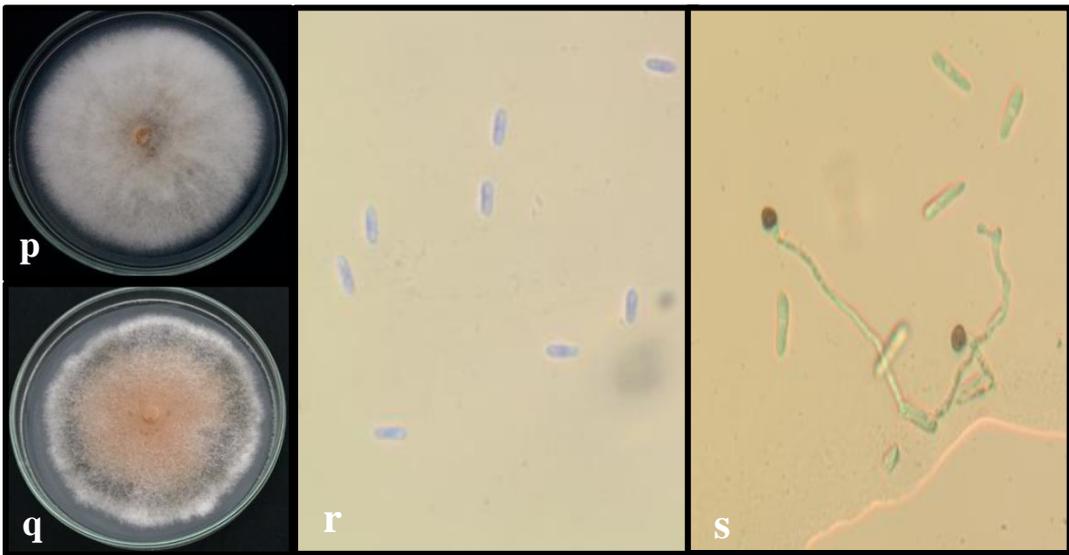
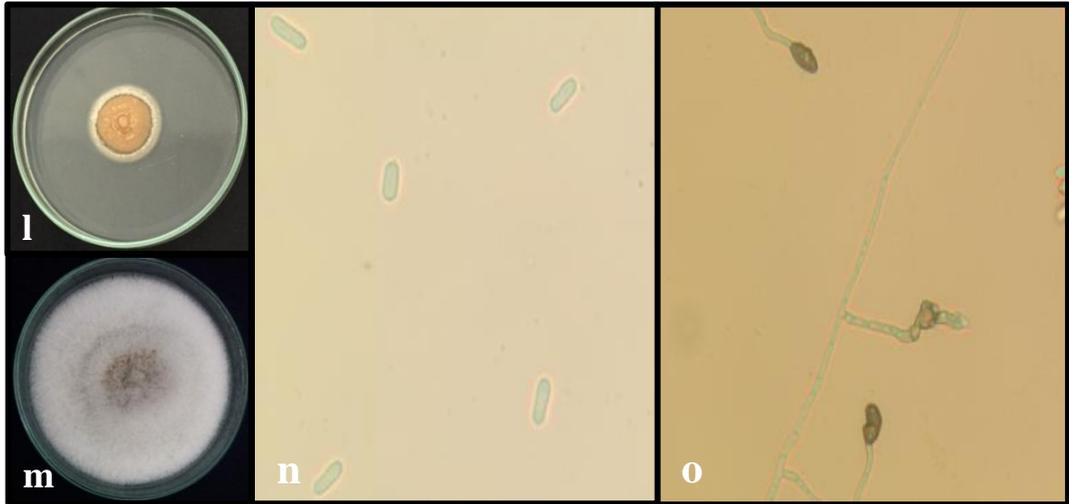
630
 631
 632
 633
 634
 635
 636
 637
 638
 639
 640
 641
 642

643 Figura 3. Características morfo-culturais das espécies de *Colletotrichum*: a. colônia, b. conídios e c. apressórios de *C. fructicola*;
 644 d. colônia, e. conídios e f. apressórios de *C. gloeosporioides*; g e h. colônias, i. conídios e
 645 apressórios de *C. karstii*; j. colônia, k. conídios e apressórios de *C. orchidophilum*; l e m. colônias, n. conídios e
 646 o. apressórios de *C. siamense*; p e q. colônias, r. conídios e s. apressórios de *C. tropicale*.



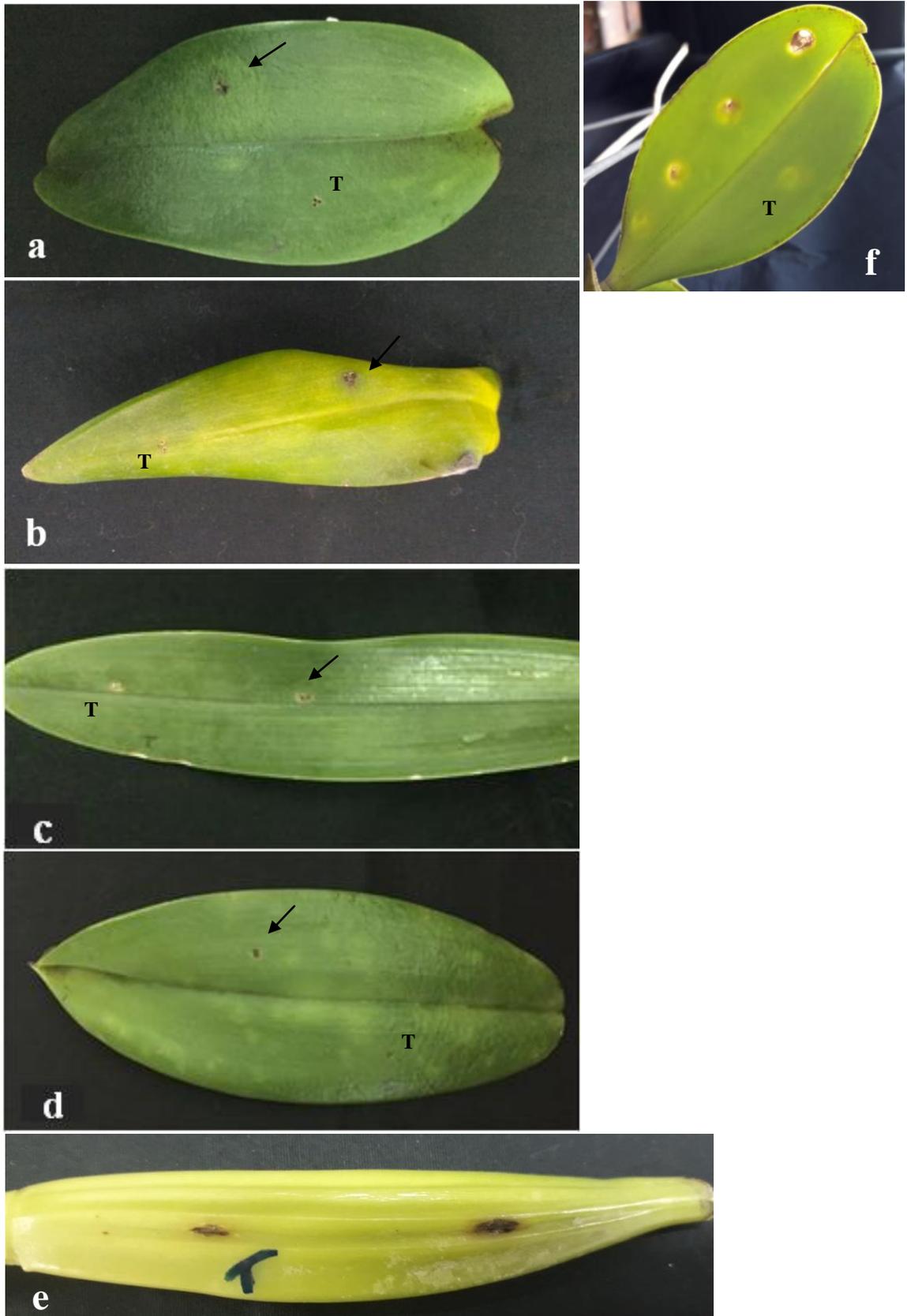
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702

703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761



762 Figura 4. Teste de patogenicidade em folhas de orquídeas: a. *Colletotrichum gloeosporioides* (COUFAL0213)
763 em *Cattleya alba*; b. *C. karstii* (COUFAL0220) em *Oncidium sherry baby*; c. *C. siamense* (COUFAL0223) em
764 *Schomburgkia crispera*; d. *C. tropicale* (COUFAL0205) em *Ca. labiata*; e. *C. orchidophilum* (COUFAL0219) em
765 *Ca. labiata*; f. *C. fructicola* (COUFAL0215) em *Phalaeonopsis*.

766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796



797 Figura 5. Teste de gama de hospedeiros em frutos de goiaba, mamão, manga e pera: a. *Colletotrichum*
798 *gloeosporioides* (COUFAL0213) em mamão; b. *C. karstii* (COUFAL0220) em mamão; c. *C. siamense*
799 (COUFAL0223) em pera; d. *C. tropicale* (COUFAL0205) em manga; e. *C. fructicola* (COUFAL0205) em
800 goiaba; f. Testemunha da goiaba.



832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864

CAPÍTULO 3

SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* EM ORQUÍDEAS

865 **SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* EM**
866 **ORQUÍDEAS**

867

868 Janaíne Rossane Araújo Silva-Cabral¹;

869 ¹Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Br 104, Km 85 Norte, Rio
870 Largo, AL, 57100-000, Brasil, janaine_rossane@hotmail.com.

871

872 Resumo – A antracnose em orquídeas é causada por várias espécies do gênero
873 *Colletotrichum*. O desenvolvimento de estratégias de controle mais eficientes para esta
874 doença deve levar em consideração os níveis de resistência apresentados pelas espécies de
875 *Colletotrichum* a fungicidas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes
876 fungicidas sobre o crescimento micelial de seis espécies de *Colletotrichum* obtidos de
877 orquídeas. Testes *in vitro* com os fungicidas tiofanato metílico, difenoconazole, tebuconazole
878 e azoxistrobina+difeconazole foram realizados pelo método de incorporação de fungicidas ao
879 meio de cultura BDA. Todos os fungicidas foram eficientes no controle *in vitro* das seis
880 espécies de *Colletotrichum*, mas a resposta de sensibilidade micelial das espécies variou de
881 acordo com o fungicida e a concentração. Tebuconazole e difenoconazole apresentaram-se
882 como os mais eficientes na inibição do crescimento micelial, enquanto que tiofanato metílico
883 foi o menos eficiente. A concentração de 10 µg/ml⁻¹ do ingrediente ativo induziu os menores
884 índices de crescimento micelial para todos os fungicidas. As espécies de *Colletotrichum*
885 foram classificadas como alta e moderadamente sensíveis aos fungicidas baseado no cálculo
886 da EC50.

887 **Palavras-chave:** antracnose, benzimidazóis, estrobilurinas, Orchidaceae, triazóis.

888

889 Abstract - Anthracnose in orchids is caused by several species of the genus *Colletotrichum*.
890 The development of more efficient control strategies for this disease should take into account
891 the resistance levels presented by *Colletotrichum* species to fungicides. The objective of this
892 study was to evaluate the effect of different fungicides on mycelial growth of six
893 *Colletotrichum* species obtained from orchids. *In vitro* tests with the fungicides methyl
894 thiophanate, difenoconazole, tebuconazole and azoxitrobin+difeconazole were carried out by
895 the method of incorporation of fungicides into the BDA culture medium. All fungicides were
896 efficient in the *in vitro* control of the six *Colletotrichum* species, but the mycelial sensitivity
897 response of the species varied according to fungicide and concentration. Tebuconazole and

898 difenoconazole were the most efficient in inhibiting mycelial growth, whereas methyl
899 thiophanate was the least efficient. The concentration of $10 \mu\text{g/ml}^{-1}$ of the active ingredient
900 induced the lowest mycelial growth rates for all fungicides. *Colletotrichum* species were
901 classified as high and moderately sensitive to fungicides based on EC50 calculation.

902 **Keywords:** anthracnose, benzimidazoles, strobilurins, Orchidaceae, triazoles.

903

904 3.1 INTRODUÇÃO

905

906 A antracnose é uma das principais doenças fúngicas associadas a orquídeas no
907 mundo, ocorrendo principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. O controle da doença
908 está baseado em medidas culturais, físicas e químicas aplicadas de maneira preventiva (Mafia
909 et al., 2005; Agrofite, 2018). Em caso de ataques severos, fungicidas sistêmicos são indicados
910 para o controle curativo. Somente os fungicidas mancozeb e oxiclreto de cobre são
911 recomendados para o controle químico das orquídeas no Brasil (Agrofite, 2018). No entanto,
912 estudos com os fungicidas carbendazin, cimoxanil, iprodione, fenamidona e clorotalonil
913 mostraram resultados positivos no controle de isolados obtidos de orquídeas (Fengli et al.,
914 1990; Meera et al., 2016). Adicionalmente, os fungicidas tiofanato metílico, azoxistrobina,
915 difenoconazole e bitertanol são aplicados em casos severos da doença pela comunidade
916 orquidófila (Zanger, 2018).

917 Embora um número considerável de espécies do gênero *Colletotrichum* tenha sido
918 associado a antracnose em orquídeas em diferentes países do mundo, no Brasil, a doença foi
919 atribuída exclusivamente a *C. gloeosporioides* (Mafia et al., 2005; Oliveira et al., 2014; Farr;
920 Rossman, 2018; Damm et al., 2019). No entanto, um estudo filogenético multi-locus realizado
921 com isolados obtidos de orquídeas no Nordeste do Brasil revelou que seis espécies de
922 *Colletotrichum* (*C. fructicola*, *C. gloeosporioides*s.s., *C. karstii*, *C. orchidophilum*, *C.*
923 *siamense* e *C. tropicale*) são responsáveis por causar antracnose neste hospedeiro (dados não
924 publicados).

925 O conhecimento de espécies que ocorrem sobre um determinado hospedeiro e o
926 efeito de fungicidas é importante para auxiliar e direcionar a escolha dos ingredientes ativos
927 mais adequados para seu controle e otimizar o manejo da doença (Lima et al., 2015). O uso
928 intensivo e indiscriminado dos fungicidas aumenta o risco de resistência adquirida pelo
929 patógeno, assim como diminui a eficiência dos mesmos (Parreira et al., 2009; Prapagdee et al,
930 2012).

931 O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* o efeito de fungicidas sobre o crescimento
932 micelial das seis espécies de *Colletotrichum* associadas a orquídeas no Nordeste do Brasil.

933

934 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

935

936 3.2.1 Obtenção dos isolados fúngicos

937

938 Dez isolados representativos de seis espécies de *Colletotrichum* obtidos de orquídeas
939 no nordeste do Brasil foram adquiridos da Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos da
940 Universidade Federal de Alagoas (COUFAL) e utilizados nos experimentos (Tabela 1). Estes
941 isolados foram identificados por meio de análise filogenética multi-locus baseada em
942 Inferência Bayesiana utilizando a região do espaçador interno transcrito ribossomal (ITS) e as
943 sequências parciais dos genes gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e β -tubulina
944 (*TUB2*).

945

946 3.2.2 Teste de sensibilidade micelial das espécies de *Colletotrichum* a fungicidas

947

948 Para determinar a sensibilidade das seis espécies de *Colletotrichum* aos fungicidas
949 foi avaliado o crescimento micelial em meio de cultura suplementado com fungicida. As
950 formulações comerciais dos fungicidas tiofanato metílico (Cercobin 700 WP, 700 g kg⁻¹ de
951 ingrediente ativo (i.a.), Iharabras, São Paulo, Brasil), difenoconazole (Score EC, 250 g l⁻¹ i.a.,
952 Syngenta, São Paulo, Brasil), tebuconazole (Folicur 200EC, 200g l⁻¹ i.a., BAYER, São Paulo,
953 Brasil) e azoxistrobina (Amistar 500 WG, 500 g kg⁻¹ i.a., Syngenta, São Paulo, Brasil) foram
954 utilizadas nos testes *in vitro*. Cada fungicida foi testado individualmente, com exceção de
955 azoxistrobina que foi testado juntamente com tebuconazole, pois estudos tem demonstrado a
956 baixa eficiência deste fungicida no controle *in vitro* de espécies de *Colletotrichum* quando
957 usado isoladamente (Lima et al., 2015; Oliveira, 2018). Os fungicidas foram dissolvidos em
958 dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionados ao meio de cultura sintético de batata dextrose ágar
959 (BDA) fundente (45°C), para alcançar as concentrações de 0.5, 1.0, 5.0 e 10.0 $\mu\text{g/ml}^{-1}$ de i.a. A
960 concentração final do DMSO no meio de cultura foi de 0.1% (v/v).

961

962 Em seguida, 20 mL do meio BDA sintético suplementado com fungicida foram
963 vertidos em placas de Petri. Placas de Petri contendo BDA sintético sem fungicidas foram
964 utilizadas como testemunhas. Discos de micélio (5 mm diâmetro) de cada isolado foram

964 removidos da margem de colônias com 7 dias de crescimento em meio BDA e transferidos
965 para o centro das placas de Petri contendo meio BDA sintético suplementado com os
966 fungicidas. As placas foram incubadas a 25 °C no escuro durante 7 dias. O delineamento
967 experimental foi inteiramente casualizado, com 96 tratamentos e cinco repetições em arranjo
968 fatorial triplo (6 espécies-isolado x 4 fungicidas x 4 concentrações).

969 Diariamente, o crescimento micelial de cada colônia foi mensurado em dois sentidos
970 perpendiculares para se obter o índice de crescimento micelial (ICM). O ICM foi determinado
971 pela fórmula $ICM = [(C1/N1) + (C2/N2) + \dots + (Cn/Nn)]$, sendo C1, C2 e Cn o crescimento
972 micelial do fungo na primeira, segunda e última avaliação, respectivamente; e N1, N2, Nn é o
973 número de dias após a inoculação. Os dados foram submetidos à análise de variância
974 (ANOVA) ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey e, quando significativos, à análise de regressão
975 utilizando o programa ASSISTAT 7.6 beta (Santos; Silva, 2013).

976 A EC_{50} , concentração de ingrediente ativo capaz de inibir 50% do crescimento
977 micelial, também foi calculada. Após o cálculo da EC_{50} , as espécies de *Colletotrichum* foram
978 classificadas em quatro categorias de sensibilidade, de acordo com a escala de Edgington et
979 al. (1971), em que: EC_{50} : $< 1 \mu\text{g/ml}^{-1}$: alta sensibilidade (AS); EC_{50} : $1-10 \mu\text{g/ml}^{-1}$: moderada
980 sensibilidade (MS); EC_{50} : $> 10-50 \mu\text{g/ml}^{-1}$: baixa sensibilidade (I); EC_{50} : $> 50 \mu\text{g/ml}^{-1}$:
981 insensibilidade (I).

982

983 3.3 RESULTADOS

984

985 3.3.1 Avaliação da sensibilidade micelial das espécies de *Colletotrichum* a fungicidas

986

987 Os resultados da análise da variância dos dados de índice de crescimento micelial
988 (ICM) indicaram que existe diferença significativa entre as interações dos três fatores:
989 fungicidas, concentrações e espécies de *Colletotrichum*.

990 Todos os fungicidas foram eficientes no controle *in vitro* das seis espécies de
991 *Colletotrichum* quando comparados à testemunha, com ICM's: 6.99 cm (*C. tropicale*), 7.76
992 cm (*C. siamense*), 8.03 cm (*C. fructicola*), 6.93 cm (*C. karstii*), 7.40 (*C. gloeosporioides*) e
993 6.59 (*C. orchidophilum*), no entanto, induziram diferentes níveis de controle sobre as mesmas.
994 Os quatro fungicidas diferiram significativamente entre si para as espécies *C. siamense*, *C.*
995 *gloeosporioides* e *C. karstii*, enquanto que difenoconazole e tebuconazole não diferiram entre

996 si para *C. fructicola* e *C. orchidophilum*, sendo os mais eficientes no controle destas espécies
 997 (Figura 1).

998 Difenconazole e tebuconazole foram os mais eficientes no controle de todas as
 999 espécies, porém, difenoconazole diferiu significativamente dos demais fungicidas para as
 1000 espécies *C. siamense*, *C. gloeosporioides* e *C. tropicale*, induzindo as menores médias de
 1001 ICM (2.58, 1.69 e 1.89, respectivamente) e tebuconazole para *C. karstii*, com ICM de 1.71
 1002 cm. Para todas as espécies o fungicida tiofanato metílico foi o menos eficiente na inibição do
 1003 crescimento micelial, seguido por azoxistrobina+tebuconazole que não diferiu
 1004 estatisticamente de tiofanato metílico apenas para a espécie *C. tropicale*.

1005 A espécie *C. siamense* apresentou as maiores médias de ICM (2.58 – 4.33 cm),
 1006 diferindo significativamente das demais espécies para todos os fungicidas. *Colletotrichum*
 1007 *orchidophilum* foi a espécie com maior inibição micelial para os fungicidas difenoconazole e
 1008 tebuconazole, seguida por *C. karstii* para os fungicidas azoxistrobina+tebuconazole e
 1009 tiofanato metílico. No entanto, *C. karstii* não diferiu de *C. gloeosporioides* para tiofanato
 1010 metílico, que por sua vez não diferiu de *C. fructicola*.

1011 A interação entre fungicidas e concentrações evidenciou uma relação inversamente
 1012 proporcional entre as médias de ICM e as concentrações, onde a medida que a concentração
 1013 aumentava, diminuía-se o ICM. Assim, todos os fungicidas foram mais eficientes no controle
 1014 *in vitro* das espécies de *Colletotrichum* na concentração de 10.0 µg/ml⁻¹ do ingrediente ativo.
 1015 As concentrações, 0.5 e 1.0 µg/ml⁻¹ foram as que mais induziram variabilidade na
 1016 sensibilidade micelial das espécies para todos os fungicidas. Na concentração 5.0 µg/ml⁻¹ não
 1017 houve diferença estatística significativa entre os fungicidas difenoconazole e tebuconazole,
 1018 que foram mais eficientes no controle das espécies nesta concentração, apresentando uma
 1019 média de ICM de 1.58 e 1.49 cm, respectivamente. Estes mesmos fungicidas diferiram
 1020 estatisticamente dos fungicidas tiofanato metílico e azoxistrobina+tebuconazole, que por sua
 1021 vez não diferiram entre si. Na concentração 10.0µg/ml⁻¹ os fungicidas foram mais
 1022 homogêneos no controle das espécies, com exceção de azoxistrobina+tebuconazole que foi
 1023 menos eficiente na redução do ICM (Figura 2).

1024 A interação dos três fatores confirmou o mesmo padrão observado anteriormente,
 1025 onde os menores ICM's foram encontrados na concentração de 10.0 µg/ml⁻¹ e os maiores
 1026 ICM's na concentração de 0.5 µg/ml⁻¹ para todos os fungicidas. Adicionalmente, a resposta de
 1027 sensibilidade micelial variou de acordo com o fungicida, a concentração e a espécie de
 1028 *Colletotrichum* (Tabela 2). A espécie *C. siamense* apresentou os maiores valores de ICM para

1029 todos os fungicidas e concentrações, diferindo significativamente de todas as demais
1030 espécies, exceto de *C. orchidophilum* e *C. tropicale* na concentração 10.0 µg/ml⁻¹ de tiofanato
1031 metílico e *C. tropicale* nas concentrações 0.5, 1.0, 5.0 e 10.0 µg/ml⁻¹ em
1032 azoxistrobina+tebuconazole. Apenas na concentração 5.0 µg/ml⁻¹ de tiofanato metílico, a
1033 espécie *C. orchidophilum* apresentou ICM maior (3.19 cm) que as demais espécies. Os
1034 menores ICM (1.70 e 1.65 cm) da espécie *C. siamense* foram induzidos pelos fungicidas
1035 tebuconazole e tiofanato metílico, respectivamente, na concentração de 10 µg/ml⁻¹.

1036 *Colletotrichum orchidophilum* apresentou valores de ICM menor que as demais
1037 espécies nas concentrações 0.5 e 1.0 µg/ml⁻¹ para os fungicidas difenoconazole e
1038 tebuconazole. O mesmo comportamento foi observado na espécie *C. karstii* para os fungicidas
1039 azoxistrobina+tebuconazole nas mesmas concentrações e tiofanato metílico na concentração
1040 0.5 µg/ml⁻¹. O melhor controle para *C. orchidophilum* ocorreu a 10.0 µg/ml⁻¹ com os
1041 fungicidas tebuconazole e difenoconazole, que induziram a inibição total do crescimento
1042 micelial. Já para *C. karstii* o melhor controle ocorreu na concentração 5.0 e 10.0 µg/ml⁻¹ de
1043 tebuconazole e 10.0 µg/ml⁻¹ de tiofanato metílico.

1044 Na concentração mais efetiva do ingrediente ativo (10.0 µg/ml⁻¹) no controle das
1045 espécies de *Colletotrichum*, os menores valores de ICM para a espécie *C. tropicale* foram
1046 encontrados nos fungicidas difenoconazole (1.32 cm) e tebuconazole (1.34 cm). Para a
1047 espécie *C. fructicola*, os menores valores de ICM foram obtidos com
1048 azoxistrobina+tebuconazole (1.39 cm), tebuconazole (1.32 cm) e tiofanato metílico (1.31 cm)
1049 na mesma concentração e em difenoconazole (1.35 e 1.30 cm) nas concentrações de 5.0 e 10.0
1050 µg/ml⁻¹.

1051 *Colletotrichum gloeosporioides* obteve menores valores de ICM com difenoconazole
1052 (1.37 cm) na concentração de 10.0 µg/ml⁻¹, tebuconazole (1.31 e 1.30 cm) e tiofanato metílico
1053 (1.30 cm) nas concentrações de 5.0 e 10.0 µg/ml⁻¹. Nas concentrações 5.0 e 10.0 µg/ml⁻¹ do
1054 fungicida tebuconazole, as espécies não diferiram entre si estatisticamente, onde apenas *C.*
1055 *siamense* diferiu significativamente das demais espécies. O mesmo comportamento foi
1056 observado na concentração 5.0 µg/ml⁻¹ de azoxistrobina+tebuconazole, onde *C. siamense* e
1057 *C. tropicale* diferiram das demais espécies, mas não diferiram entre si.

1058 Todas as espécies foram classificadas como altamente sensíveis (AS) aos fungicidas
1059 difenoconazole e tebuconazole, apresentando EC50 <1 µg/ml⁻¹, variando de 0.000 a 0.885
1060 µg/ml⁻¹ (Tabela 3). Moderada sensibilidade foi observada nas espécies *C. orchidophilum* e *C.*

1061 *siamense* ao fungicida tiofanato metílico, e em *C. tropicale* aos fungicidas tiofanato metílico e
1062 azoxistrobina+tebuconazole, com EC50 entre 1,203 e 3,777 µg/ml⁻¹.

1063

1064 **3.4 DISCUSSÃO**

1065

1066 Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que as espécies de *Colletotrichum*
1067 oriundas de orquídeas no Nordeste do Brasil exibem diferentes respostas em relação a
1068 fungicidas. O fungicida azoxistrobina+tebuconazole seria mais eficiente no controle da
1069 antracnose se o agente causal fosse a espécie *C. karstii* e menos efetivo se a espécie fosse *C.*
1070 *siamense*. Este comportamento tem sido observado em estudos realizados com as espécies *C.*
1071 *asianum*, *C. fioriniae*, *C. fructicola*, *C. karstii*, *C. nymphaeae*, *C. siamense*, *C. tropicale* e *C.*
1072 *truncatum* obtidas de manga e pêssgo no Brasil e EUA, onde os autores sugerem que a
1073 escolha do fungicida adequado para um controle efetivo da antracnose deve levar em
1074 consideração a espécie prevalente na área. É importante considerar também a aplicação de
1075 fungicidas em mistura, uma vez que, em condições de campo, mais de uma espécie está
1076 associada a doença (Lima et al., 2015; Chen et al., 2016).

1077 Esta variabilidade na sensibilidade pode ser observada até mesmo em isolados
1078 diferentes de uma mesma espécie como relatado por Lopes et al. (2015) e Ferreira et al.
1079 (2009) para a espécie *C. gloeosporioides* obtida de café (*Coffea arabica* L.), pera, caqui
1080 (*Diospyrus kaki* L.), soja (*Glycine max* (L.) Merr.), iuca (*Yucca* sp. L.), mandioca (*Manihot*
1081 *esculenta* Crantz.), antúrio (*Anthurium andraeanum* Linden.), dracena (*Dracaena* sp. L.), uva
1082 (*Vitis vinifera* L.) e tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e por Gao et al. (2017) para *C.*
1083 *acutatum* obtida de pimenta (*Capsicum* sp. L.).

1084 Em seu estudo, Lopes et al. (2015) observaram que os isolados de caqui e iuca
1085 foram mais sensíveis aos fungicidas aplicados quando comparados com isolados obtidos de
1086 culturas com maior expressão econômica, como a soja. Segundo os autores este
1087 comportamento deve-se a menor pressão de seleção sobre populações resistentes de
1088 *Colletotrichum*, dado a menor quantidade de moléculas químicas registradas e de uso para
1089 controle da antracnose nestas culturas. Esta hipótese parece se aplicar aos isolados de
1090 *Colletotrichum* obtidos de orquídeas, que embora variaram na resposta aos fungicidas foram
1091 considerados alta e moderadamente sensíveis pelo cálculo da EC₅₀, provavelmente pelo fato de
1092 terem sido obtidos de coleções particulares onde aplicações de fungicidas são escassas ou
1093 nulas.

1094 Além da sensibilidade das espécies, as características dos fungicidas e seu modo de
1095 ação devem ser considerados. De modo geral, os fungicidas sistêmicos são mais eficientes que
1096 fungicidas protetores, ainda assim devem ser bem selecionados pois apresentam maiores
1097 chances de promover resistência devido sua especificidade (Amorim; Rezende; Bergamin
1098 Filho, 2011). Os principais fungicidas sistêmicos utilizados e avaliados no controle da
1099 antracnose em orquídeas pertencem aos seguintes grupos: Benzimidazois (tiofanato metílico e
1100 carbendazim); Inibidores da quinona oxidase - QoI (azoxistrobina, fenamidona); Inibidores de
1101 biossíntese de esteróis (bitertanol, difenoconazole e tebuconazole); Inibidores de oomicetos
1102 (cimoxanil) e Dicarboximidas (iprodione) (Fengli et al., 1990; Meera et al., 2016; Zanger,
1103 2018).

1104 Dentre estes fungicidas, os benzimidazois são os que apresentam alto risco de falhas,
1105 enquanto que os triazois apresentam baixo risco (Amorim; Rezende; Bergamin Filho, 2011).
1106 O fungicida tiofanato metílico foi o menos eficiente no controle das espécies de
1107 *Colletotrichum* neste estudo, principalmente para as espécies *C. siamense* e *C. orchidophilum*.
1108 Resultados semelhantes foram relatados por Lopes et al. (2015) para a espécie *C.*
1109 *gloeosporioides*, que apresentou valores altos de ICM na presença de tiofanato metílico, como
1110 também por Tavares; Souza (2005) que indicaram resistência cruzada para os isolados desta
1111 mesma espécie devido ao uso contínuo dos fungicidas tiofanato metílico e thiabendazol pelos
1112 produtores.

1113 Já os fungicidas do grupo químico dos triazois (difeconazole e tebuconazole) foram
1114 os mais eficientes na inibição do crescimento micelial *in vitro* das espécies avaliadas. A
1115 eficiência de fungicidas do grupo químico dos triazóis na inibição do crescimento micelial *in*
1116 *vitro* de *Colletotrichum* tem sido comprovada em outros estudos: testes com difeconazole
1117 induziram valores de EC₅₀ abaixo de 1 µg/mL para *C. acutatum* (Gao et al., 2017); o
1118 crescimento micelial de *C. gloeosporioides* do mamão foi inibido em 100% a partir da
1119 concentração 10ppm dos fungicidas propiconazole e tebuconazole, sendo considerados
1120 altamente eficientes no controle desta espécie (Tavares; Souza, 2005); e dentre seis
1121 fungicidas do grupo químico dos triazóis testados sobre as espécies *C. siamense*, *C.*
1122 *fructicola*, *C. fioriniae*, *C. nymphaeae* e *C. truncatum* obtidas de pêssego, os fungicidas
1123 propiconazole e difeconazole apresentaram melhor eficiência no controle das mesmas, como
1124 também tebuconazole e metconazole, exceto para *C. truncatum* (Chen et al., 2016).

1125 A mistura de azoxistrobina+tebuconazole apresentou os maiores valores de ICM para
1126 todas as espécies depois de tiofanato metílico, exceto para espécie *C. karstii*. Provavelmente,

1127 esta eficiência sobre a espécie *C. karstii* seja atribuída ao fungicida tebuconazole, que
1128 diferente do observado para as outras espécies testadas, foi mais eficiente que o fungicida
1129 difeconazole. O fungicida azoxistrobina pertence ao grupo químico das estrobilurinas e desde
1130 seu lançamento no mercado foi amplamente utilizado por apresentar um amplo espectro de
1131 ação, atuando sobre vários patógenos, e por seus efeitos positivos na produtividade de
1132 algumas culturas, levando ao surgimento de muitos patógenos fúngicos resistentes. Estudos
1133 evidenciaram que mecanismos bioquímicos e genéticos estão envolvidos na resistência de
1134 fungos a fungicidas inibidores de quinona, como: alterações nos mecanismos de respiração
1135 dos fungos e a troca de aminoácidos, sendo a mutação no sítio G143A do citocromo-b a causa
1136 mais comum de resistência (Parreira; Neves; Zambolim, 2009; Amorim; Rezende; Bergamin
1137 Filho, 2011).

1138 Embora uma grande parte dos defensivos consumidos no mundo em diferentes
1139 culturas sejam de produtos formulados em misturas de estrobilurinas com triazóis, neste
1140 trabalho a mistura de azoxistrobina+tebuconazole não pareceu otimizar a eficiência dos
1141 fungicidas contra a maioria das espécies testadas. A baixa eficiência de azoxistrobina no
1142 controle de espécies de *Colletotrichum* foi também demonstrada por Oliveira (2018) e Lima et
1143 al. (2015), onde azoxistrobina apresentou os menores valores de % de inibição micelial para a
1144 maioria das espécies, corroborando com nossos resultados e levantando indícios de uma
1145 resistência adquirida pelo patógeno para este fungicida. No entanto, *C. karstii* foi
1146 satisfatoriamente inibido por azoxistrobina no estudo de Oliveira (2018), reforçando a
1147 necessidade de se conhecer as espécies presentes em uma determinada área e suas interações
1148 com os fungicidas para auxiliar na tomada de decisão.

1149 Segundo os resultados de Hu et al. (2015), onde avaliaram a resistência de isolados
1150 de *C. siamense* e *C. fructicola* obtidos de pêssego, morango (*Fragaria vesca* L.) e mirtilo
1151 (*Vaccinium myrtillus* L.) para azoxistrobina e tiofanato metílico, *C. fructicola* foi sensível a
1152 ambos os fungicidas, enquanto que *C. siamense* apresentou isolados com diferentes níveis de
1153 resistência. Neste trabalho, as espécies *C. siamense* e *C. tropicale* apresentaram moderada
1154 sensibilidade a fungicidas. Estas espécies são frequentemente relatadas em culturas de
1155 importância econômica no nordeste do Brasil (LIMA et al., 2013; SILVA et al., 2017;
1156 SOUSA et al. 2018; VELOSO et al. 2018; VIEIRA et al., 2017), nas quais aplicações de
1157 fungicidas são utilizadas para o controle da antracnose. Isto sugere que a aplicação destes
1158 fungicidas em campo esteja favorecendo o estabelecimento de isolados resistentes destas
1159 espécies devido uma constante pressão de seleção.

1160 Ainda sobre a insensibilidade das espécies de *Colletotrichum* a azoxistrobina, estudos
1161 apontam que esta resistência se deve pela alteração na rota de respiração do fungo, uma vez
1162 que após a adição do ácido salicilhidroxâmico (SHAM), conhecido como inibidor da enzima
1163 oxidase alternativa, o controle *in vitro* das espécies torna-se efetivo. Segundo os resultados de
1164 Oliveira (2018), onde avaliou os efeitos de azoxistrobina com e sem adição de SHAM sobre
1165 espécies de *Colletotrichum* de pinha e graiola, os tratamentos com adição de SHAM foram
1166 altamente eficientes no controle de todas as espécies testadas. Adicionalmente, Gao et al.
1167 (2017) ao avaliar o efeito dos fungicidas picoxistrobina, piraclostrobina, azoxistrobina,
1168 difenoconazole, tiofanato metílico e mancozeb no controle de *C. acutatum* em pimenta,
1169 mostraram que os fungicidas do grupo das estrobilurinas, piraclostrobina e azoxistrobina, com
1170 adição de SHAM, foram mais eficientes na inibição do crescimento micelial e a germinação
1171 de conídios dos isolados, do que os fungicidas do grupo dos triazóis.

1172 O uso destes fungicidas em programas de manejo da doença antracnose em orquídeas
1173 poderá ser recomendado, porém mais estudos devem ser realizados. Contudo, o presente
1174 estudo aponta para importância de observar as espécies prevalentes na área, o efeitos dos
1175 fungicidas sobre elas, as alterações de sensibilidade dos isolados no campo, a dose do produto
1176 recomendada e a aplicação alternada ou em mistura de fungicidas com diferentes modos de
1177 ação no controle da doença, sem esquecer do uso de técnicas integradas de manejo para evitar
1178 o desenvolvimento de resistência e garantir um controle mais efetivo (Parreira; Neves;
1179 Zambolim, 2009; Gao et al., 2017).

1180

1181 3.5 CONCLUSÕES

1182

1183 Os fungicidas azoxistrobina+ tebuconazole, difenoconazole, tebuconazole e tiofanato
1184 metílico são eficientes no controle *in vitro* das seis espécies de *Colletotrichum* associadas à
1185 antracnose em orquídeas.

1186 A sensibilidade micelial de *Colletotrichum* spp. difere em relação ao ingrediente
1187 ativo e suas concentrações.

1188 Difenoconazole e tebuconazole são os fungicidas mais eficientes no controle das
1189 espécies de *Colletotrichum*.

1190 As espécies são altamente sensíveis a todos os fungicidas, exceto *C. siamense*, *C.*
1191 *tropicale* e *C. orchidophilum* que são moderadamente sensíveis ao fungicida tiofanato
1192 metílico e *C. tropicale* ao fungicida Azoxistrobina+Tebuconazole.

1193 **AGRADECIMENTOS**

1194

1195 O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
1196 de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradecemos também à
1197 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas - FAPEAL.

1198

1199 **REFERÊNCIAS**

1200

1201 AGROFIT/MAPA - SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS – Disponível em:
1202 <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 15 jun.
1203 2018.

1204

1205 AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia:**
1206 **Princípios e Conceitos**. 4 ed. v.1. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. 704p.

1207

1208 CHEN, S. N. et al. Sensitivity of *Colletotrichum* species, including *C. fioriniae* and *C.*
1209 *nymphaeae*, from Peach to demethylation inhibitor fungicides. **Plant Disease**, v. 100, n. 12, p.
1210 2434-2441, 2016.

1211

1212 DAMM, U. et al. The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum*
1213 species complexes. **Studies in Mycology**, v.92, p. 1-46, mar. 2019.

1214 FARR D.F.; ROSSMAN A.Y. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS,
1215 USDA. Disponível em: <<https://nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES/>>. Acesso em: 15 de Ago.
1216 2018.

1217

1218 FENGLI, J. et al. Disease Occurrence and Chemical Control of Orchid Anthracnose. **Journal**
1219 **of Zhejiang Forestry College**, n. 1, p. 43-48, 1990.

1220

1221 FERREIRA, J. B. et al. Sensibilidade de *Colletotrichum gloeosporioides* (mancha manteigosa
1222 do cafeeiro) a diferentes concentrações de fungicidas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p.
1223 2052-2058, 2009.

1224

1225 GAO, Y.Y. et al. Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* to six fungicides and reduction in
1226 incidence and severity of chili anthracnose using pyraclostrobin. **Australasian Plant**
1227 **Pathology**, v. 46, n. 6, p. 521–528, 2017.

1228 HU, M.J. et al. Resistance in *Colletotrichum siamense* from peach and blueberry to
1229 thiophanate-methyl and azoxistrobin. **Plant Disease**, v. 99, n. 6, p. 806-814, 2015.

1230

- 1231 LIMA, N. B. et al. Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from mango in
 1232 northeastern Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 141, n. 4, p. 679-688, apr.
 1233 2015.
 1234
- 1235 LIMA, N.B. et al. Five *Colletotrichum* species are responsible for mangoanthracnose in
 1236 northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, v.61, n. 1, p. 75–88, jul. 2013.
 1237
- 1238 LOPES, L. N. da S. et al. Sensibilidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* a
 1239 fungicidas. **Multi-Science Journal**, v. 1, n. 1, p. 106-114, 2015.
 1240
- 1241 MAFIA, R. G. et al. Antracnose em *Paphiopedilum insigne* (Orquidaceae) causada por
 1242 *Colletotrichum gloeosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 436, jul-aug. 2005.
 1243
- 1244 MEERA, T. M.;LOUIS, V.; BEENA, S. Diseases of *Phalaenopsis*: Symptoms, Etiology and
 1245 Management. **International Journal of Agriculture Innovations and Research**, v. 5, n. 2,
 1246 p. 296-300, nov. 2016.
 1247
- 1248 OLIVEIRA, S. F. et al. Endophytic and mycorrhizal fungi associated with roots of
 1249 endangered native orchids from the Atlantic Forest, Brazil. **Mycorrhiza**, v. 24, n. 1, p. 55-64,
 1250 jan. 2014.
 1251
- 1252 OLIVEIRA, M. E. F. de S. Sensibilidade de espécies de *Colletotrichum* a fungicidas e
 1253 influência de períodos de permanência em câmara úmida sobre a severidade da antracnose em
 1254 anonáceas. Tese (Pós-Graduação em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas,
 1255 Rio Largo, AL, 2018.
 1256
- 1257 PARREIRA, D. F.; NEVES, W. DOS S.; ZAMBOLIM, L. Resistência de Fungos a
 1258 Fungicidas Inibidores de Quinona. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**,
 1259 v. 3, n. 2, p. 24, 2009.
 1260
- 1261 PRAPAGDEE, B. et al. Efficacy of crude extract of antifungal compounds produced from
 1262 *Bacillus subtilis* on prevention of anthracnose disease in *Dendrobium* orchid. **Environment**
 1263 **Asia**, v.5, n. 1, p. 32-38, jan. 2012.
 1264
- 1265 SANTOS e SILVA, F. A. ASSISTAT 7.6 beta (pt). Departamento de Engenharia Agrícola do
 1266 CTRN – UFCG, Campina Grande, 2013.
 1267
- 1268 SILVA, J. R. A. et al. Molecular and morpho-cultural characterization of *Colletotrichum* spp.
 1269 associated with anthracnose on *Capsicum* spp. in northeastern Brazil. **Tropical Plant**
 1270 **Pathology**, v. 42, n. 4, p. 315-319, aug. 2017.

1271

1272 SOUSA, E. S. et al. *Colletotrichum* species causing anthracnose on lima bean in
1273 Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n.1, p. 78-84, 2018.

1274

1275 TAVARES, G. M.; SOUZA, P. E. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum*
1276 *gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Ciência e**
1277 **Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 52-59, 2005.

1278

1279 VELOSO, J. S. et al. Why species delimitation matters for fungal ecology: *Colletotrichum*
1280 diversity on wild and cultivated cashew in Brazil. **Fungal Biology**, v. 122, p. 677-691, 2018.

1281

1282 VIEIRA, W.A. et al. The impact of phenotypic and molecular data on the inference of
1283 *Colletotrichum* diversity associated with Musa. **Mycologia**, v. 109, n. 6, p. 912-934, 2017.

1284

1285 ZAGER, M. Fungos e Bactérias nas Orquídeas. 2018. Disponível em:

1286 <<https://www.portaldoorquidofilo.com/fungos-e-bacterias>> Acesso em: 12 de ago. 2018.

1287 Tabela 1. Isolados de *Colletotrichum* obtidos de orquídeas no Nordeste do Brasil.
1288

Código do isolado	Espécies	Localização
COUFAL0223	<i>Colletotrichum siamense</i>	Bezerros – PE
COUFAL0209	<i>C. siamense</i>	Maceió – AL
COUFAL0205	<i>Colletotrichum tropicale</i>	Maceió – AL
COUFAL0217	<i>C. tropicale</i>	Maceió – AL
COUFAL0225	<i>Colletotrichum fructicola</i>	Maceió – AL
COUFAL0215	<i>C. fructicola</i>	Maceió – AL
COUFAL0213	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Maceió – AL
COUFAL0220	<i>Colletotrichum karstii</i>	Paulo Afonso – BA
COUFAL0221	<i>C. karstii</i>	Maceió – AL
COUFAL0219	<i>Colletotrichum orchidophilum</i>	Maceió – AL

1289

1290

1291

1292

1293

1294

1295

1296

1297

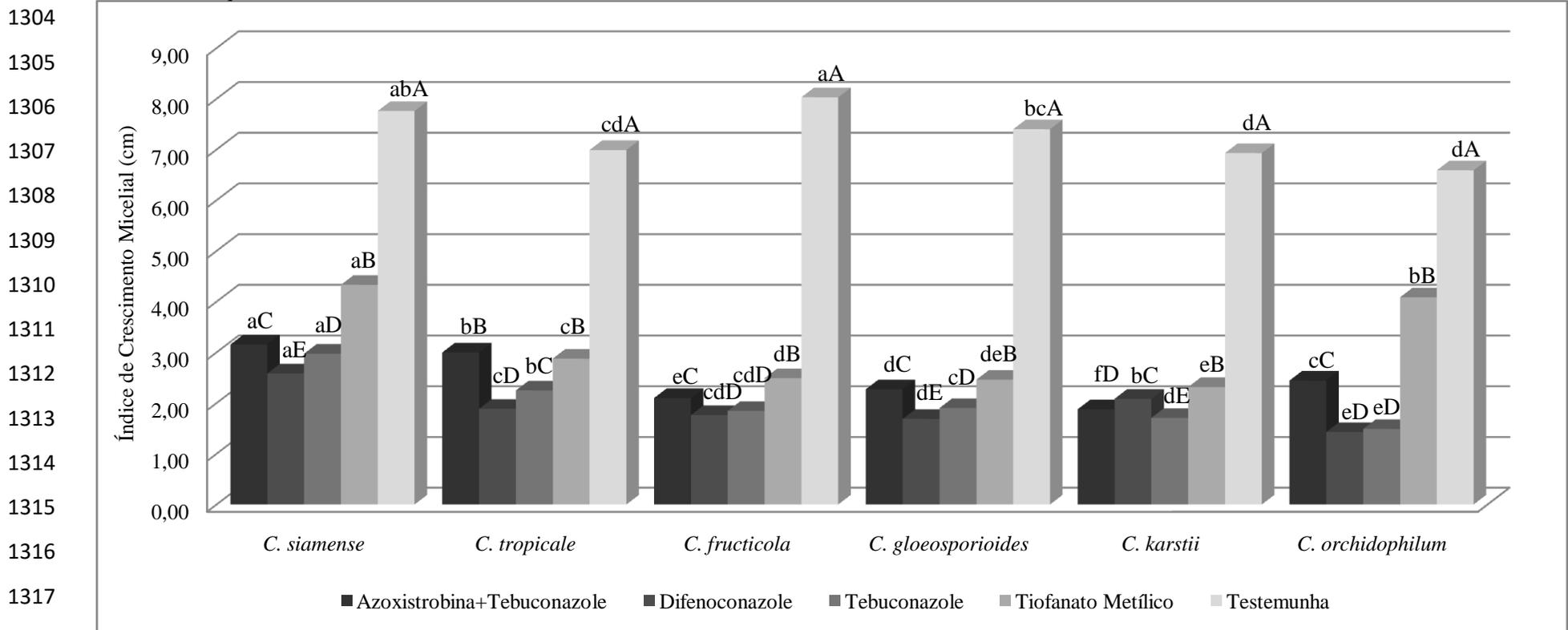
1298

1299

1300

1301

1302 Figura 1. Relação de interação entre os fungicidas azoxistrobina+tebuconazole, difenoconazole, tebuconazole e tiofanato metílico sobre as espécies de *Colletotrichum*
 1303 associadas a orquídeas.



1319 Médias seguidas pelas letras minúsculas iguais não diferem entre si para as diferentes espécies de *Colletotrichum* sob um mesmo fungicida, e letras maiúsculas iguais não
 1320 diferem entre si para a mesma espécie de *Colletotrichum* sob os diferentes fungicidas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

1321

1322

1323

1324

1325 Figura 2. Relação de interação entre os fungicidas azoxistrobina+tebuconazole, difenoconazole, tebuconazole e tiofanato metílico e as concentrações testadas.

1326

1327

1328

1329

1330

1331

1332

1333

1334

1335

1336

1337

1338

1339

1340

1341

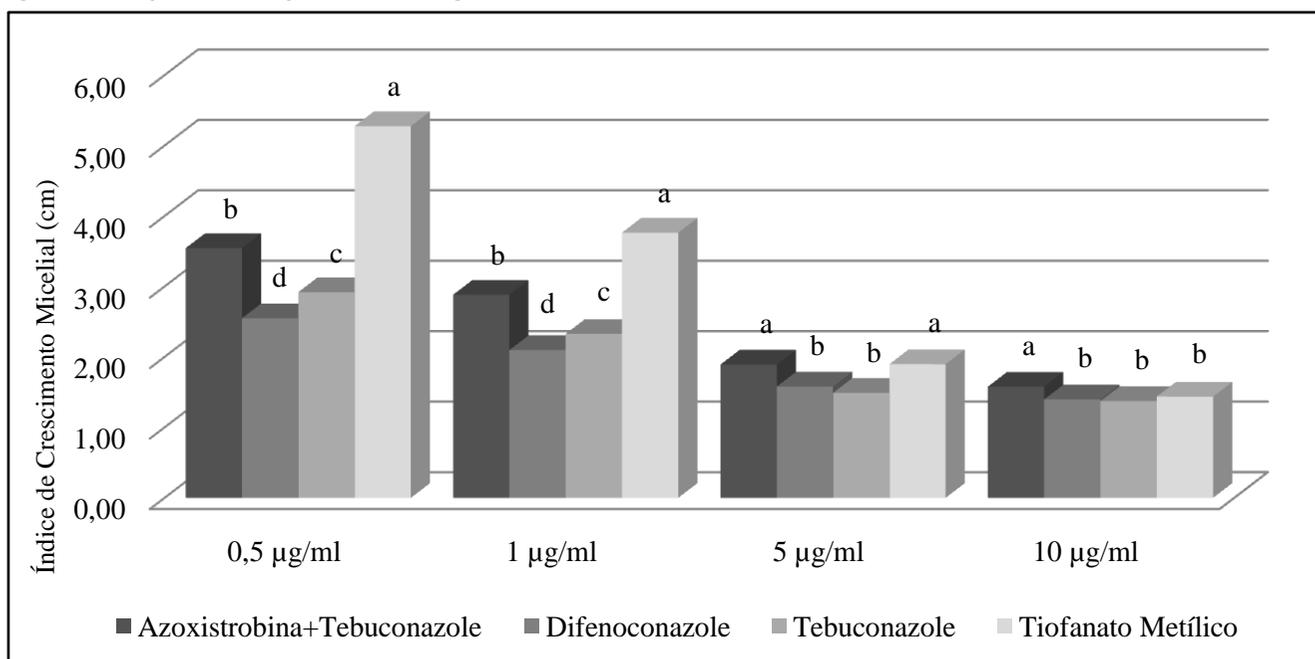
1342

1343

1344

1345

1346



Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

1347 Tabela 2. Efeitos das diferentes concentrações dos fungicidas azoxistrobina+tebuconazole, difenoconazole, tebuconazole e tiofanato metílico sobre o índice de crescimento
 1348 micelial (cm) das espécies de *Colletotrichum* obtidas de orquídeas.
 1349

Espécies	Azoxistrobina+Tebuconazole				Difenoconazole			
	0.5 µg/mL ⁻¹	1.0 µg/mL ⁻¹	5.0 µg/mL ⁻¹	10.0 µg/mL ⁻¹	0.5 µg/mL ⁻¹	1.0 µg/mL ⁻¹	5.0 µg/mL ⁻¹	10.0 µg/mL ⁻¹
<i>C. siamense</i>	4.40a	3.71a	2.53a	1.99a	3.50a	2.96a	2.07a	1.81a
<i>C. tropicale</i>	4.21a	3.63a	2.35a	1.80ab	2.54bc	2.16b	1.54bc	1.32bc
<i>C. fructicola</i>	3.13c	2.37c	1.50b	1.39c	2.40cd	1.99bc	1.35c	1.30c
<i>C. gloeosporioides</i>	3.24c	2.48c	1.79b	1.58bc	2.22d	1.74cd	1.43c	1.37bc
<i>C. karstii</i>	2.51d	2.02d	1.62b	1.37c	2.79b	2.19b	1.74b	1.61ab
<i>C. orchidophilum</i>	3.78b	3.09b	1.57b	1.34c	1.85e	1.55d	1.35c	1.30c

1350

1351

Espécies	Tebuconazole				Tiofanato Metílico			
	0.5 µg/mL ⁻¹	1.0 µg/mL ⁻¹	5.0 µg/mL ⁻¹	10.0 µg/mL ⁻¹	0.5 µg/mL ⁻¹	1.0 µg/mL ⁻¹	5.0 µg/mL ⁻¹	10.0 µg/mL ⁻¹
<i>C. siamense</i>	4.42a	3.74a	2.04a	1.70a	7.29a	6.18a	2.21b	1.65a
<i>C. tropicale</i>	3.52b	2.61b	1.52b	1.34b	4.84c	3.59c	1.58cd	1.50ab
<i>C. fructicola</i>	2.64c	1.99c	1.44b	1.32b	4.95c	2.02e	1.68c	1.31b
<i>C. gloeosporioides</i>	2.85c	2.15c	1.31b	1.30b	4.72c	2.53d	1.30d	1.30b
<i>C. karstii</i>	2.29d	1.94c	1.30b	1.30b	3.73d	2.80d	1.43cd	1.31b
<i>C. orchidophilum</i>	1.79e	1.54d	1.33b	1.30b	6.13b	5.46b	3.19a	1.55ab
CV%								7.01

1352

1353

1354

1355

1356

1357

1358

1359

1360

Médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

1361 Tabela 3. Classificação da sensibilidade das espécies de *Colletotrichum* em relação aos fungicidas baseada nos valores da EC₅₀.

Espécies	EC ₅₀ (µg/ml ⁻¹)				Sensibilidade
	Azoxistrobina+Tebuconazole	Difenoconazole	Tebuconazole	Tiofanato Metílico	
<i>C. siamense</i>	0.885	0.217	0.855	2.800*	AS/MS*
<i>C. tropicale</i>	1.203*	0.041	0.393	1.301*	AS/MS*
<i>C. fructicola</i>	0.079	0.005	0.013	0.479	AS
<i>C. gloeosporioides</i>	0.148	0.001	0.070	0.694	AS
<i>C. karstii</i>	0.023	0.052	0.014	0.549	AS
<i>C. orchidophilum</i>	0.816	0.002	0.000	3.777*	AS/MS*

1362 Classificação em função da EC₅₀, onde EC₅₀ <1µg/ml⁻¹: alta sensibilidade (AS); EC₅₀= 1-10µg/ml⁻¹: moderada sensibilidade (MS); EC₅₀= >10-50µg/ml⁻¹: baixa

1363 sensibilidade (BS); EC₅₀= >50mg/ ml⁻¹: insensibilidade (IS).