

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

*Colletotrichum* spp.: IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR UTILIZANDO SEQUÊNCIAS  
MULTIGÊNICAS

Bolsista: Natália Sarmanho Monteiro Lima, FAPEAM

Manaus-AM

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-A/0152/2014

*Colletotrichum* spp.: IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR UTILIZANDO SEQUÊNCIAS  
MULTIGÊNICAS

Bolsista: Natália Sarmanho Monteiro Lima, FAPEAM

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto

Manaus-AM

2015

Todos os direitos deste Relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Núcleo de Biotecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e aos seus autores. Parte deste Relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Núcleo de Biotecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias.

## RESUMO

Conhecer os microrganismos que são albergados pelos hospedeiros tropicais bem como aqueles que podem causar doenças nas plantas torna-se necessário, pois aqueles que são isolados na condição de endófitos podem ser utilizados de na área da biotecnologia como agentes antagônicos aos fitopatógenos. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi identificar com ferramentas da biologia molecular isolados endófitos e fitopatógenos de hospedeiros tropicais. Foram investigados dez endófitos e dez fitopatógenos da mangueira, guaranazeiro e cajueiro. Esses fungos foram reativados da Coleção Micológica do Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana da Faculdade de Ciências Agrárias e tiveram seus DNAs extraídos, quantificados e diluídos a 10 ng/μL. Foram amplificados pela PCR sequências do rDNA com o par de oligonucleotídeos ITS1/ITS4, da calmodulina com Cal228F/Cal737R, e o gene da β-tubulina com Btub2FD/Btub4RD. Os oligonucleotídeos para os genes calmodulina e β-tubulina não amplificaram bandas com consistência; o sequenciamento dos amplicons de rDNA resultaram em somente seis identificações. Como *Colletotrichum gloeosporioides* (M3, M7, M9 e M10) e *C. asinaum* (M5) isolados da mangueira, e *C. gloeosporioides* (G5) isolado do guaranazeiro. Na condição de endófitos foram identificados os isolados M3, M5 e G5 enquanto como fitopatógenos M7, M9 e M10.

Palavras-chave: Fungos endofíticos, fungos patogênicos, multilocos.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>6</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>8</b>
<b>3.1</b>	<b>Obtenção dos isolados</b>	<b>8</b>
<b>3.2</b>	<b>Extração do DNA</b>	<b>8</b>
<b>3.3</b>	<b>Quantificação do DNA</b>	<b>9</b>
<b>3.4</b>	<b>Amplificação dos genes</b>	<b>9</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Purificação do produto amplificado</b>	<b>10</b>
<b>3.5</b>	<b>Reação de sequenciamento</b>	<b>11</b>
<b>3.6</b>	<b>Eletroforese de sequenciamento</b>	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>12</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>17</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>17</b>
<b>7</b>	<b>CRONOGRAMA</b>	<b>19</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Com o advento da Biotecnologia as pesquisas no Estado do Amazonas têm contribuído de modo efetivo na compreensão de muitas relações biológicas que antes permaneciam indefinidas. Nesse campo, as relações entre os fitopatógenos e seus hospedeiros se descortinam a partir do momento em que se conhece o agente causal de determinada doença.

Embora já exista a identificação do agente causal da doença conhecida como antracnose em vários hospedeiros tropicais, no presente trabalho, a proposta foi de realizar a identificação taxonômica molecular lançando mão de uma ferramenta que vem sendo aplicada no complexo de espécies do gênero *Colletotrichum*. Uma vez que o uso da identificação morfológica não tem sido suficiente.

Com essa ferramenta podemos alcançar de modo mais preciso o genoma do fitopatógeno ao ser amplificado alguns genes que vêm sendo utilizados de modo preciso na separação de espécies dos complexos desse gênero. Vale ressaltar que alcançando esse objetivo, poderemos em futuros projetos identificar medidas efetivas no controle desse(s) agente(s) causal(is).

O objetivo deste trabalho foi identificar *Colletotrichum* spp., associados à antracnose em guaranazeiro, mangueira e cajueiro, a partir da amplificação de parte dos genes rDNA,  $\beta$ -tubulina e calmodulina.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A antracnose é considerada uma das mais importantes doenças de plantas, causando consideráveis perdas econômicas para as espécies cultivadas, principalmente em áreas tropicais (REZENDE, 2004; BRAGANÇA, 2013). O agente causal da doença é o fungo *Colletotrichum* spp., e o sintoma típico é depressão necrótica no tecido da folha ou fruto (FREEMAN et al., 1998).

Mesmo que o gênero *Colletotrichum* seja um entre os mais estudados e importantes patógenos para plantas (LATUNDE-DADA, 2001; DEAN et al., 2012), existem muitos recursos que possibilitam a compreensão sobre a sua biologia e sistemática (CANNON et al., 2012).

Tradicionalmente, a taxonomia de espécies de *Colletotrichum* tem sido baseada em caracteres morfológicos e culturais, tais como tamanho e forma dos conídios e apressórios, presença ou ausência de setas, cor da colônia e taxa de crescimento (SUTTON, 1992; THAUNG, 2008; HYDE et al., 2009). Entretanto, tais características nem sempre são confiáveis para diferenciá-las devido às variações na morfologia e fenótipo que estão sob influências ambientais (HYDE et al., 2009).

Considerando análises moleculares, a filogenia baseada em seqüenciamento de parte de genes tem obtido sucesso em diferenciar espécies desse gênero (PRIHASTUTI et al., 2009; SHIVAS e TAN, 2009). Nessas análises, muitos genes foram utilizados, por exemplo, ITS, calmodulina, glutamina-sintetase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, actina e  $\beta$ -tubulina (PRIHASTUTI et al., 2009).

Os complexos *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* foram recentemente investigados e mostraram-se altamente variáveis genética e geograficamente. No complexo de espécies de *C. gloeosporioides*, a maioria das 22 espécies morfológicamente semelhantes a esta espécie foram geneticamente definidas com base em análise multilocus (WEIR et al., 2012). O complexo *acutatum* é definido como um coletivo de *C. acutatum* compreendendo 29 espécies estreitamente relacionadas (DAMM et al., 2012).

Mesmo que possa haver infecção cruzada de espécies de *Colletotrichum* (PERES et al., 2002; LAKSHMI et al., 2011; PHOULIVONG et al., 2012; de

SOUZA et al., 2013; PENG et al., 2013); E considerando também que essas espécies, em muitos casos, são capazes de infectar diferentes hospedeiros ou espécies diferentes podem estar associadas com uma espécie de hospedeiro (FREEMAN et al., 1998); Por meio da análise molecular fica mais fácil a identificação correta de um patógeno ou patógenos relacionados a um hospedeiro.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Obtenção dos isolados**

Os isolados que foram utilizados fazem parte da Coleção Micológica do Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas. Foram reativados em meio BDA (Batata-dextrose-ágar). Foram investigados dez isolados patogênicos e dez endofíticos de cada um dos hospedeiros guaranazeiro, mangueira e cajueiro.

#### **3.2 Extração do DNA**

Para extração do DNA, os isolados reativados foram inoculados em meio BD (Batata-dextrose), e mantidos em temperatura ambiente, por sete dias, para crescimento miceliano. O micélio obtido com esporos será coletado com papel-filtro esterilizado. Após a retirada do líquido em excesso, 150 mg do micélio foi macerado em tampão CTAB 2% e transferido para tubo de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 700  $\mu$ L de tampão de extração.

Em seguida foi homogeneizado suavemente e incubado em banho-maria/60 °C por 60 minutos, homogeneizando a cada 15 minutos. Depois foi adicionado igual volume de fenol hidratado e homogeneizado por cinco minutos manualmente e levado para centrífuga por 15 minutos a 10.000 x g.

Após a centrifugação, a parte líquida foi retirada passando-o para um novo tubo e adicionando o mesmo volume de clorofil, homogeneizando por cinco minutos manualmente e centrifugando por 15 minutos a 10.000 x g. A parte superior foi recuperada para novo tubo e adicionado o mesmo volume de clorofane, homogeneiza-se por cinco minutos manualmente e depois centrifugado por 15 minutos a 10.000 x g.

A parte superior foi recuperada para novo tubo e o DNA foi precipitado com 10% de NaCl 5 M e acrescentado dois volumes de etanol 95% (-20 °C). Deixado para precipitar por uma noite a -20 °C e depois centrifugado por 15 minutos a 14.000 x g. O precipitado foi lavado por três vezes com etanol 70% e

os tubos foram colocados invertidos em fluxo laminar para evaporação total do etanol. O precipitado foi ressuspenso com 30  $\mu\text{L}$  do tampão TE.

### 3.3 Quantificação do DNA

Para estimar a concentração do DNA, foi utilizado 2  $\mu\text{L}$  do DNA genômico de cada amostra mais 3  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra (5X). Esses DNAs foram analisados por eletroforese em gel de agarose, 0,8% e comparados com High DNA Ladder (Invitrogen) de concentração conhecida.

O gel foi corado com 0,5  $\mu\text{g/mL}$  de brometo de etídio. A leitura da quantificação do DNA foi realizada pela intensidade de fluorescência num fotodocumentador de imagem (Biotech Image Master VDS modelo FTI-500, da Amersham Pharmacia Biotech) com luz ultravioleta.

### 3.4 Amplificação dos genes

A reação de amplificação para os isolados foi realizada para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ : 1  $\mu\text{L}$  de DNA genômico (10  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), 2,5  $\mu\text{L}$  Tampão de amplificação (10X), 3  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 2,5  $\mu\text{L}$  de dNTPs (2,5 mM), 1  $\mu\text{L}$  do iniciador ITS1 (5' – TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3' (anverso)) (20 mM), 1  $\mu\text{L}$  do iniciador ITS4 (5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3' (reverso)) (20 mM), 0,3  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ) e 13,7  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q.

Como citado para o gene rDNA, a amplificação para os genes  $\beta$ -tubulina (1  $\mu\text{L}$  do iniciador BTUB2FD (5' - GTB CAC CTY CAR ACC GGY CAR TG - 3' (anverso)) e 1  $\mu\text{L}$  do iniciador BTUB4RD (5' - CCR GAY TGR CCR AAR ACR AAG TTG TC - 3' (reverso)) e para calmodulina (1  $\mu\text{L}$  do iniciador CAL228F (5' - GAG TTC AAG GAG GCC TTC TCC C - 3' (anverso)) e 1  $\mu\text{L}$  do iniciador CAL737R (5' - CAT CTT TCT GGC CAT CAT GG - 3' (reverso)) foi realizada com igual volume, reagentes e concentrações mudando apenas o par de oligonucleotídeos.

O perfil de amplificação para os conjuntos de iniciadores consistiu de uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por dois minutos e 35 ciclos, sendo

94 °C por um minuto – desnaturação, 50 °C por um minuto – anelamento, 72 °C por dois minutos – extensão, e uma extensão final a 72 °C por cinco minutos. A temperatura de anelamento para calmodulina foi de 55 °C por 30 segundos e em outro perfil foi alterado somente o tempo para um minuto; para  $\beta$ -tubulina 52 °C por um minuto, e em outro perfil por 30 segundos, e uma terceira reação a 55 °C por um minuto. As reações foram realizadas em termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9.600.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,0%, por 60 minutos e corados com brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). O DNA amplificado foi observado em fotodocumentador de imagem (Biotech Image Master VDS modelo FTI-500, da Amersham Pharmacia Biotech) com luz ultravioleta. Foi utilizado DNA Ladder de 1 Kb (Invitrogen Life Technologies) como marcador molecular de pares de bases.

#### **3.4.1 Purificação do produto amplificado**

A purificação dos produtos amplificados via PCR das regiões do rDNA composta por ITS1-5,8S-ITS2, parte do gene da  $\beta$ -tubulina e calmodulina foi realizada com o Kit GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences) de acordo com o seguinte protocolo:

Ao produto da amplificação por PCR foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  da solução de captura, homogeneizado e transferido para a coluna. Foi centrifugado a 13.000 x g por 90 segundos e o líquido no tubo coletor foi descartado.

O DNA aderido à coluna foi lavado com 200  $\mu\text{L}$  do tampão de lavagem e centrifugado a 13.000 x g por 90 segundos. O líquido no tubo coletor foi descartado. A coluna foi transferida para novo microtubo coletor de 1,5 mL e adicionado 30  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q.

Foi incubado a temperatura ambiente por cinco minutos. Após esse tempo, foi centrifugado a 13.000 x g por 90 segundos. O resultado da purificação foi observado a partir de 3  $\mu\text{L}$  do DNA amplificado e purificado mais 2  $\mu\text{L}$  do tampão de amostra (5X) em gel de agarose 1,0% e marcador molecular DNA Ladder de 1 Kb (Invitrogen Life Technologies) para se estimar sua concentração e qualidade.

### **3.5 Reação de sequenciamento**

O sequenciamento do DNA foi realizado no Laboratório de Biotecnologia/CAM/UFAM. A reação de sequência foi realizada pela técnica de PCR (sequenciamento cíclico) com volume final de 10  $\mu$ L para cada amostra (Kit da DYEnamic - Amersham Biosciences – Pharmacia), com: 3  $\mu$ L de água Milli-Q autoclavada, 2  $\mu$ L do DNA purificado, 1  $\mu$ L do oligonucleotídeo (de cada um dos genes - iniciador anverso e reverso) e 4  $\mu$ L da solução de sequenciamento (pré-mix).

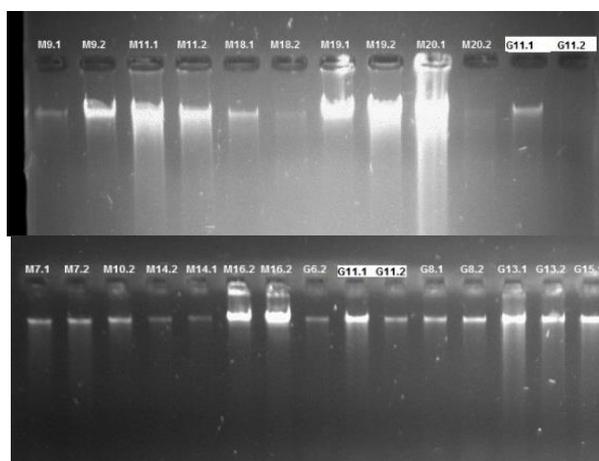
O programa teve o seguinte perfil de temperatura: etapa inicial de desnaturação com 95 °C por 25 segundos, e 30 ciclos, sendo 95 °C por 15 segundos (desnaturação), 50 °C por 20 segundos (anelamento) e 60 °C por um minuto (extensão).

### **3.6 Eletroforese de sequenciamento**

A decodificação nucleotídica dos fragmentos amplificados com os oligonucleotídeos ITS1/ITS4, BTUB2FD/BTUB4RD e CAL228F/CAL737R foram realizadas no analisador genético de DNA modelo 3500XL da Applied BioSystems. A eletroforese capilar em gel de poliacrilamida foi realizada com base na metodologia padrão do fabricante. Para condições de injeção: 3 kV por 80 segundos; condições de corrida: 6 kV por 200 minutos; sob uma temperatura de 44 °C. A incorporação de cada dideoxynucleotídeo marcado com um cromóforo na reação de sequenciamento cíclico foi lida no seqüenciador automático pela captação da fosforilação.

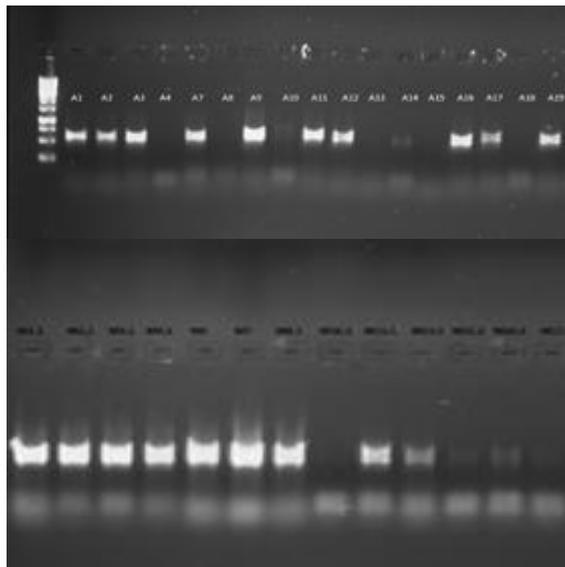
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os *Colletotrichum* spp. isolados de cada hospedeiro tropical foram devidamente reativados, purificados e novamente armazenados no método Castellani. As extrações do DNA genômico foram realizadas conforme o protocolo descrito na metodologia e o resultado pode ser observado na Figura 01. Quando necessário, foi diluído até a concentração de 10 ng/μL. Foram quantificados em gel de agarose a 1%.



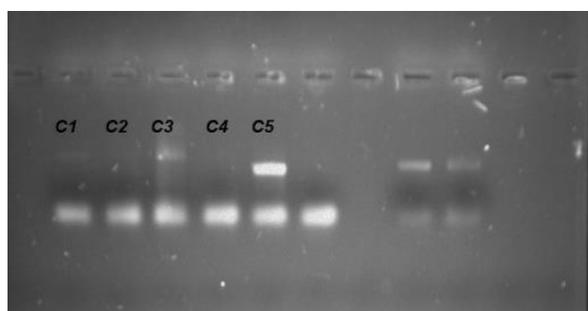
**Figura 01** - DNA genômico extraído de *Colletotrichum* spp. isolados de hospedeiros tropicais

Foram realizadas reações de PCR com os pares de oligonucleotídeos ITS1/ITS4 que flanqueiam parte do gene ribossomal compreendendo as regiões ITS1-5,8S-ITS2, região ortóloga e responsável pelos ribossomos, organela citoplasmática que participa ativamente na tradução dos transcritos em moléculas de RNA mensageiro. Os amplicons ficaram aproximadamente com 600 pares de bases conforme a Figura 02.



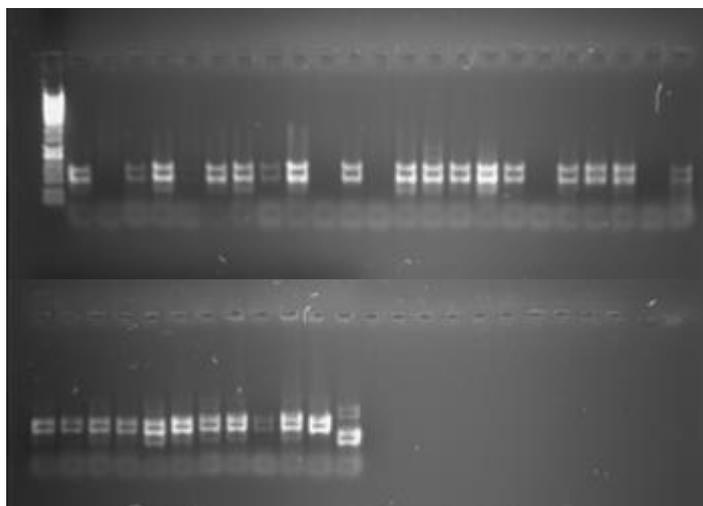
**Figura 02** – Amplicons do gene ribossomal flanqueados pela combinação do par de oligonucleotídeos ITS1/ITS4 compreendendo as regiões ITS1-5,8S-ITS2 de *Colletotrichum* spp. isolados de hospedeiros tropicais. Gel de agarose a 1%

Para amplificação de parte do gene da calmodulina foi utilizada a combinação de oligonucleotídeos Cal228F-Cal737R. Foram realizadas várias reações testando dois tempos para a temperatura de anelamento, vários resultados foram observados (Figura 03). Os perfis das reações testados e já descritos na literatura não foram eficientes como o obtido por Udayanga et al. (2014), novas reações serão testadas posteriormente.



**Figura 03** – Amplicons do gene calmodulina flanqueados pela combinação do par de oligonucleotídeos Cal228F/Cal737R de *Colletotrichum* spp. isolados de hospedeiros tropicais. Gel de agarose a 1%

Para amplificação de parte do gene da  $\beta$ -tubulina foi utilizada a combinação de oligonucleotídeos BTUB2FD/BTUB4RD. Foram realizadas várias reações testando diferentes temperaturas e tempos para o anelamento, vários resultados foram observados (Figura 04). Os perfis das reações testados não foram eficientes como os obtidos por Woudenberg et al. (2009). Provavelmente pelos oligonucleotídeos apresentarem bases degeneradas não se tenha observado um perfil de bandas eficiente, novas temperaturas de anelamento serão testadas posteriormente.



**Figura 04** – Amplicons inespecíficos observados para o par de oligonucleotídeos BTUB2FD/BTUB4RD do gene da  $\beta$ -tubulina de *Colletotrichum* spp. isolados de hospedeiros tropicais. Gel de agarose a 1%

Os *Colletotrichum* spp. isolados de hospedeiros tropicais que foram acessados com os oligonucleotídeos ITS1/ITS4 foram submetidos ao sequenciamento. Somente seis apresentaram sequências que puderam ser eficientes na identificação molecular: da mangueira foram identificados *Colletotrichum gloeosporioides* (M3, M7, M9 e M10), *C. asianum* (M5), e o isolado do guaranazeiro *C. gloeosporioides* (G5).

O *C. gloeosporioides* M3 foi isolado na condição de endófito enquanto os outros três (M7, M9 e M10) como fitopatógenos da mangueira; o *C. gloeosporioides* G5 foi isolado como endófito de guaranazeiro. O *C. asianum*

M5 isolado de mangueira como endófito foi observado como epifítico em frutos de café (*Coffea arabica*), na Tailândia (PRIHASTUTI et al., 2009).

## **5 Conclusão**

Somente a combinação de oligonucleotídeos ITS1/ITS4 foi eficiente na identificação de seis isolados, sendo cinco da mangueira e um do guaranazeiro.

## 6 REFERÊNCIAS

BRAGANÇA, C. A. D. Molecular characterization of *Colletotricum* spp. Associated with fruits in Brazil. 2013. 69 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

CANNON, P.F. et al. *Colletotrichum* status and future directions. *Studies in Mycology*, Utrecht, v. 73, p. 181-213, setembro, 2012.

CARBONE, I. and Kohn, L.M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous *ascomyces*. *Mycologia* 91, p.553-556, 1999.

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

DAMM, U.; WOUDEBERG, J.H.C.; CANNON, P.F.; CROUS, P.W. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity*, Yunnan, v. 39, p. 45-87, 2009.

de SOUZA, A. et al. Lack of host specificity of *Colletotrichum* spp. isolates associated with anthracnose symptoms on mango in Brazil. *Plant Pathology*, v. 62, p. 1038-1047, 2013.

DEAN, R. et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, Malden, v. 13, p. 414-430, 2012.

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

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

LAKSHMI, B.K.M. et al. Cross-infection potential of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolates causing anthracnose in subtropical fruit crops. *Tropical Agricultural Research*, Peradeniya, v. 22, p. 183-193, 2011.

LATUNDE-DADA, A.O. *Colletotrichum*: Tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Molecular Plant Pathology*. Malden, v. 2, p. 187-198, 2011.

PENG, L.J. et al. *Colletotrichum* species on grape in Guizhou and Yunnan provinces, China. *Mycoscience*, Tokyo, v. 54, p. 29-41, 2013.

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

PHOULIVONG, S. et al. Cross infection of *Colletotrichum* species; A case study with tropical fruits. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, Chiang Rai, v. 2, p. 99-111, 2012.

PRIHASTUTI, H. et al. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries on Northern Thailand. *Fungal Diversity, Yunnan*, v. 39, p. 89-109, 2009.

REZENDE, V. F. Mixed inheritance model for resistance to anthracnose leaf blight in maize. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* v.4, p. 115-122, 2004

SHIVAS, R.G.; TAN, Y.P. A taxonomic re-assessment of *Colletotrichum acutatum*, introducing *C. fiorinae* comb. et stat. nov. and *C. Simmondsii* sp. nov. *Fungal Diversity, Yunnan*, v. 39, p. 111-122, 2009.

SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A. e JEGER, M.J. (Ed.). *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. Oxon: CAB International, p. 1-26, 1992.

THAUNG, M.M. Coelomycete systematics with special reference to *Colletotrichum*. *Mycoscience, Tokyo*, v. 49, p. 345-350, 2008.

UDAYANGA, D. et al. Species limits in *Diaporthe*: Molecular re-assessment of *D. citri*, *D. cytospora*, *D. foeniculina* and *D. rudis*. *Persoonia*, v. 32, p. 83-101, 2014.

WEIR, B.S. et al. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology, Utrecht*, v. 73, p. 115-180, 2012.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; J.W. TAYLOR. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. Academic Press, Inc., New York, p. 315-322, 1990.

WOUDEBERG, J.H.C. et al. Multiple *Didymella* teleomorphs are linked to the *Phoma clematidina* morphotype. *Persoonia*, v. 22, p. 56–62, 2009.

