

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS PATOGÊNICOS A ORQUÍDEAS

ELIANA MARIA ROCHA SOUSA

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
FEVEREIRO - 2013**

IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS PATOGÊNICOS A ORQUÍDEAS
AUTORA – ELIANA MARIA ROCHA SOUSA

Bacharel em Biologia na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2010.

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Dr. Jorge Teodoro de Souza

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
FEVEREIRO – 2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo concedido durante os dois anos do mestrado, mesmo quando minha fé foi pequena demais seu amor e proteção sempre estiveram comigo.

A minha família por sempre apoiar minhas decisões, pai, irmãos, madrasta, cunhada, tios, tias, primos, primas e avô, amo vocês.

As minhas amigas irmãs, Jackeline Pereira Andrade (Jack), Shirley Nascimento Costa (Shiu), Eliane Santos de Jesus (Verinha) e Juliana Leles Costa (Jú), meus eternos agradecimentos, vocês foram minha segunda família durante os últimos seis anos da minha vida. Sem vocês tudo seria mais difícil e menos divertido na vida profissional e pessoal. Aos amigos e colegas de curso, Cris, Lore, Jaque Maria, Milene, Tâmara, Tamires, Heliab, Valter, Almir, obrigada pelos momentos de diversão, estudos e conselhos.

Ao meu namorado, amigo e confidente Filipe, obrigada por todo carinho, cuidado e principalmente paciência (risos) na etapa final do mestrado, amo você.

Aos técnicos do laboratório de Microbiologia e Fitopatologia por ajudar na pesquisa e pelos conselhos, em especial Josilene (Lene), Patrícia e Carol.

Aos estudantes de iniciação científica e aos colegas de trabalho do laboratório que em algum momento ajudaram na pesquisa, muito obrigada, Maria Luíza, Pedro, Mariah, Camila, Darcilucia, Adriana, Adailson e Juan.

Ao produtor de orquídeas, professor e amigo Rogério Alves por toda a experiência passadas no período das coletas.

Ao professor José Luiz Bezerra, e a colega de curso Fenícia pela acessibilidade quando os procurei, obrigada.

Ao meu orientador, professor Jorge Teodoro de Souza obrigada pelos ensinamentos científicos durante os últimos seis anos, compreensão e paciência. O senhor é um exemplo a ser seguido.

A CAPES pela concessão da bolsa para que o trabalho fosse desenvolvido, a Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pelo espaço físico.

A todos, que intencionalmente e os que mesmo sem saber contribuíram com a concretização desse trabalho.

A todos vocês o meu muito obrigada...

*A Deus, fonte de vida e amor
inesgotável,
Ofereço*

*A minha família,
Meu pai Hélio, minha mãe em memória Helenita, minha madrasta Rita,
meus irmãos, Héliel, Hélio e Gabriel, minha cunhada Lene,
e as amigas Jack, Shiu, Jú e Verinha,*

DEDICO

ÍNDICE

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUÇÃO.....	9
REVISÃO DE LITERATURA.....	10
1.0 Floricultura no Brasil.....	10
2.0 Orquídeas.....	11
2.1 O ambiente de cultivo das orquídeas.....	12
3.0 Doenças fúngicas em orquídeas.....	12
3.1 O gênero <i>Colletotrichum</i>	14
3.2 Ordem <i>Pucciniales</i>	16
CAPÍTULO 1	
New rostr records for <i>Sphenospora kevorkiani</i> (<i>Raveneliaceae</i>).....	18
CAPÍTULO 2	
<i>Colletotrichum</i> associados a orquídeas.....	21
Resumo.....	22
Abstract.....	23
Introdução.....	24
Material e métodos.....	25
Resultados.....	30
Discussão.....	47
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
REFERÊNCIAS	41

RESUMO

Identificação de fungos patogênicos a orquídeas

Sousa, E. M. R.

No Brasil, a floricultura é um dos setores agrícolas que mais cresce, e as orquídeas se destacam na preferência dos produtores e consumidores. Uma das maiores limitações para o cultivo de orquídeas é a incidência de doenças causadas por fungos. Entretanto, poucas informações científicas existem sobre patógenos nessas plantas. Este trabalho tem como objetivo estudar a diversidade de fungos patogênicos a orquídeas. O trabalho está dividido em três partes: 1) uma revisão de literatura sobre floricultura no Brasil, orquídeas, seu cultivo e doenças; 2) um relato sobre novas espécies de orquídeas hospedeiras de *Sphenospora kevorkianii*, um fungo causador de ferrugem (capítulo 1); 3) um estudo sobre a diversidade de *Colletotrichum* patogênicos a orquídeas (capítulo 2). O fungo *S. kevorkianii* (Raveneliaceae) foi relatado pela primeira vez sobre *Cyrtopodium aliciae* e sobre o híbrido *Denfal muaug tai*. Os estudos com o gênero *Colletotrichum* permitiram a classificação de 41 isolados obtidos de 21 gêneros/espécies de orquídeas em quatro grupos filogenéticos: *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. orchidearum* e *C. orchidophilum*. Esses grupos não foram corroborados pelas análises morfológicas e também por análises com os marcadores BOX e REP. Os resultados desse trabalho adicionam novas informações sobre a diversidade de fungos patogênicos a orquídeas em condições naturais e de cultivo comercial.

Palavras-chave: Fungos; doenças; diversidade.

ABSTRACT

Identification of fungi pathogenic to orchids

Sousa, E. M. R.

In Brazil, flower cultivation is among the agricultural sectors that are experiencing fast growth and the orchids are preferred among producers and consumers. One of the limitations for orchid cultivation is the incidence of diseases caused by fungi. There is little scientific information on pathogens of these plants in general. The objective of this study is to explore the diversity of orchid pathogenic fungi. The study is divided in three parts: 1) a literature review on floriculture in Brazil, orchids, their cultivation and diseases; 2) a report on new hosts of the rust fungus *Sphenospora kevorkianii* (capítulo 1); and 3) a study on the diversity of *Colletotrichum* pathogenic to orchids (capítulo 2). The fungus *S. kevorkianii* (*Raveneliaceae*) was reported for the first time on *Cyrtopodium aliciae*, a native species and on the commercial hybrid *Denfal muaug tai*. Studies on *Colletotrichum* allowed the classification of 41 isolates obtained from 21 genera/species of orchids in four phylogenetic groups: *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. orchidearum* and *C. orchidophilum*. These groups did not corroborate the morphological and molecular analyses with the BOX and REP markers. The results of this study add new information on the diversity of fungi pathogenic to orchids in natural and commercial conditions of orchid cultivation.

Keywords: Fungi; disease; diversity.

INTRODUÇÃO

A família *Orchidaceae* esta entre as mais diversificadas do reino vegetal, distribuída em todos os biomas e continentes (SWARTS et al., 2009). No entanto, a maioria das espécies é encontrada nas regiões tropicais. Na América do Sul países como Colômbia, Equador e Brasil apresentam o maior número de espécies (SILVA & SCUDELLER, 2009).

A beleza, variedade e durabilidade das flores de orquídeas despertam admiração e estimulam o cultivo em diversos países do mundo (MORAES et al., 2011). De modo que, apresentam grande valor ornamental e econômico na indústria da floricultura (KASULO et al., 2009). Orquídeas são importantes também nas indústrias de cosméticos, fármacos e alimentos (FERNANDES et al., 2009; TSAI et al., 2010). No entanto, a produção de orquídea se torna ameaçada pelo aparecimento de pragas e principalmente doenças (GIORIA, 2002).

Os fungos são os principais causadores de doenças em orquídeas, atuam limitando a reprodução das espécies, afeta a qualidade das flores e em alguns casos podem impedir o cultivo de espécies raras. O gênero *Colletotrichum* (filo *Ascomycota*) e as ferrugens (filo *Basidiomycota*) são classificados entre os principais fungos causadores de doenças na família *Orchidaceae* (WATSON, 2008).

Mesmo com a grande importância ambiental e econômica das orquídeas, o panorama atual de controle das doenças é deficiente. Realizado na maioria das vezes de forma empírica, empregando-se indiscriminadamente fungicidas, sem conhecimento da espécie do fungo causador da doença (GIORIA, 2006). Consequência da falta de estudos científicos dedicados a identificação dos fitopatógenos nessas plantas.

Este trabalho teve como objetivo a identificação de fungos patogênicos a orquídeas. A primeira parte do trabalho dedica-se a uma revisão sobre as orquídeas e as doenças que incidem sobre essas plantas, seguida de 2 capítulos onde são apresentados relatos de ferrugens em dois novos hospedeiros (capítulo 1) e um estudo sobre a diversidade de *Colletotrichum* em orquídeas no Estado da Bahia (capítulo 2).

REVISÃO DE LITERATURA

1.0 Floricultura no Brasil

O cultivo comercial de plantas ornamentais no Brasil começou no final do século XIX. Os primeiros registros da floricultura são datados de 1870 com a produção de orquídeas por Binot em Petrópolis no Rio de Janeiro. Em 1893 os alemães Dierberger começaram a cultivar outras espécies de plantas ornamentais. Posteriormente, em 1929, surgiram os irmãos Bottcher que foram os pioneiros na produção de rosas e exposições de flores. No entanto, nesse período a comercialização de plantas ornamentais ainda era realizada de forma amadora (FRANÇA & MAIA, 2008).

A ampliação do cultivo de plantas ornamentais como atividade econômica começou a ocorrer no final dos anos 60 devido ao crescimento de conjuntos habitacionais que inviabilizava a existência de grandes jardins para uma parte da população (VECANTO et al., 2006). Desde então, a floricultura brasileira foi se profissionalizando, seguindo a tendência mundial (COSTA, 2007). Atualmente é desenvolvida por grandes, médios e principalmente pequenos produtores cooperativados e proporciona alta taxa de emprego e renda (FRANÇA & MAIA, 2008).

No Brasil a região Sudeste se destaca como o principal centro produtor e consumidor, seguida da região Sul, ambas com cultivos principalmente de plantas de clima temperado. A produção de flores e plantas tropicais está concentrada na região Nordeste, Norte e Centro-oeste onde a atividade é mais recente. No entanto, em todas as regiões existe um aumento no consumo de plantas ornamentais (BUAINAIN & BATALHA, 2007).

Um crescimento econômico e em volume de produção no segmento da floricultura no país é observado desde 2006. O setor proporcionou para a atividade agrícola no ano de 2010 um faturamento de R\$ 3,8 bilhões, em 2011 R\$ 4,3 bilhões e para o ano de 2012 estima-se um crescimento de 12% (SCHOENMAKER, 2012).

Em relação à importação e exportação, a floricultura brasileira ganhou um maior estímulo do governo devido à criação em 2001 do Programa Brasileiro de Exportação de Flores e Plantas Ornamentais (FLORABRASILIS), e em 2010 o surgimento da Agenda Estratégica 2010 – 2015 de Flores e Plantas. Incentivo a abertura de linhas de créditos específicas para produtores foram criadas, com a intenção de melhorar o nível de capacitação técnica em todos os segmentos da cadeia produtiva (ANEFALOS, 2004).

Também foi formado um plano de trabalho que busca estabelecer a ação conjunta das Câmaras setoriais relacionadas à floricultura (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2011). Dessa forma, o país nos últimos anos tem exportado mais plantas ornamentais do que importado (IBRAFLOR, 2012). O setor que mais se destaca é a produção de mudas de plantas como orquídeas, bromélias e flores do cerrado (CLARO, 1998 citado por ANEFALOS, 2004).

Em relação às orquídeas, o Brasil em 2003 exportou aproximadamente 79 mil dólares para diferentes países. Apesar de existir um crescimento de 25% ao ano na produção de orquídeas no Brasil (NOGUEIRA, 2004), ainda existe uma carência de plantas para atender a demanda nacional e muitas orquídeas são importadas.

2.0 Orquídeas

A família *Orchidaceae* é a que possui o maior número de espécies dentro das angiospermas (SOUZA & LORENZI, 2005). Espécies dessa família são distribuídas em todo o planeta, podem ser encontradas como terrestres, epífitas e rupícolas (TAKANE et al., 2006). No entanto, são mais frequentes em regiões subtropicais e tropicais, onde são mais comumente encontradas como epífitas (KASULO et al., 2009).

Estima-se a existência de 800 gêneros e 35.000 espécies de orquídeas no mundo (SOUZA & LORENZI, 2005). O Brasil apresenta cerca de 10% da diversidade mundial, e em todos os Estados federativos há registros de orquídeas. De acordo com Barros et al., (2012) foram encontrados no país 236 gêneros onde 65 são endêmicos e 2.437 espécies das quais 1.627 são endêmicas. Vale ressaltar que, existem várias espécies nativas que ainda não foram descritas.

As orquídeas atraem admiradores em todo o mundo, devido à variedade de forma, tamanho, durabilidade e beleza de suas flores (MORAES et al., 2011). Essas características agregam alto valor econômico para o mercado mundial do agronegócio de flores (KASULO et al., 2009). Além disso, são utilizadas na indústria farmacêutica, de alimento e cosmético, por meio da extração em pseudobulbos de compostos bioativos que ajudam a combater tumores (TSAI et al., 2010), consumo de bulbos como alimento em países africanos (KASULO et al., 2009) e flores e capsulas como fonte de aromas (SANTOS, 2012).

Devido ao grande mercado consumidor de orquídeas, em diversos países, existe uma ilegal e desordenada exploração extrativista, o que contribui para o risco de extinção de várias espécies (SANTOS, 2012). No Estado de Minas Gerais 43 espécies foram

adicionadas na Lista Vermelha de espécies ameaçadas de extinção (NOGUEIRA, 2004). Além disso, outros fatores que também contribuem para a perda da biodiversidade dessas plantas são: a destruição do habitat natural devido ao desmatamento e a ocorrência de doenças (SWARTS, 2009). Assim, o cultivo realizado por colecionadores ou de forma comercial é uma alternativa para a preservação das orquídeas (SANTOS, 2012).

2.1 O ambiente de cultivo das orquídeas

A umidade, temperatura e luz são aspectos importantes para o estabelecimento de uma planta no estágio inicial, e para o seu posterior desenvolvimento (SANTOS JR., 2004).

Ambientes com umidade de aproximadamente 60 a 80% são os melhores para o cultivo de orquídeas, e temperatura entre 18 a 28°C são as melhores para a maioria das espécies. Em relação à incidência de luz ocorre uma variação de acordo com o modo de vida da orquídea. Existem plantas que necessitam de algumas horas de exposição completa ao sol, outras precisam de uma leve sombra, meia sombra ou sombra total o que corresponde respectivamente a cerca de 75%, 50% e 25% de luz (PAULA & SILVA, 2004).

Devido a essas condições ambientais, o Brasil se destaca em relação ao local propício para encontrar e cultivar espécies de orquídeas. O que acarreta durante todo ano o fornecimento de uma diversidade de plantas para o mercado interno e externo (PAULA & SILVA, 2004; BUAINAIN & BATALHA 2007).

No entanto, as condições de umidade, temperatura que beneficiam a produção de orquídeas, também ajuda a causar prejuízo quando associadas a cultivos incorretos e ao uso indevido de produtos fitossanitários. A ocorrência de um grande número de doenças, principalmente as fúngicas são favorecidas nessas condições (COSTA, 2007; GIORIA 2006).

3.0 Doenças fúngicas em orquídeas

As doenças causadas por fungos são consideradas como um dos fatores limitante para a produção de orquídeas no país (MORAES et al., 2011). Podem causar prejuízos diretos, pela queda na produção, alterando tanto a qualidade, quanto à quantidade do produto e prejuízos indiretos pelo custo das medidas de controle (KIMATI, 2005). De acordo com Coto & Moreira, (2007) as doenças podem ser classificadas como, letais,

degenerativas e de impacto reduzido. Para isso precisa ser considerada a virulência do patógeno, a suscetibilidade da planta hospedeira, as condições ambientais e a atuação humana (AGRIOS, 2004).

Geralmente as espécies de plantas que se desenvolvem em seu centro de endemismo sofrem menos com as doenças fúngicas, pois existe o controle biológico natural, devido às interações dos organismos no ambiente. Cultivos comerciais ou de colecionadores são comumente mais suscetíveis a doenças, por apresentar mais homogeneidade, existir uma maior manipulação genética e física (COTO & MOREIRA, 2007) e por importar plantas com sinais de fitopatógenos que não sofreram uma rigorosa inspeção fitossanitária (MORAES et al., 2011). Portanto, o controle de doenças é um dos fatores determinantes para o sucesso da produção.

A identificação rápida e correta do patógeno é fundamental para que sejam aplicadas estratégias de controle para uma doença fúngica. O desenvolvimento dessas estratégias requer conhecimentos sobre a etiologia do patógeno, sua forma de dispersão, modo e momento em que a infecção ocorre e os mecanismos de defesa da hospedeira (IMENES & ALEXANDRE, 2001). De acordo com o gênero do fungo a identificação pode ser realizada por meio de métodos morfológicas e moleculares (ALFENAS & MAFIA, 2007). A partir de uma correta identificação do patógeno pode-se controlar as doenças de forma mais efetiva (IMENES & ALEXANDRE, 2001).

Os fungos identificados na literatura como causadores de doenças em orquídeas no Brasil e no exterior são: *Fusarium oxysporium* que desenvolve murcha e *Fusarium solani* que causa amarelecimento das folhas, podridão basal e podridão em raiz (CHUNG et al., 2011). *Botrytis cinerea* que desenvolve pequenas manchas arredondadas em pétalas e sépalas, que posteriormente se torna cinza, doença conhecida como mofo cinzento. Mancha foliar também pode ser causada por *Cercospora odontoglossi*, *C. angraeci*, *C. dendrobii*, *C. epipactidis*, e *C. persisteriae*, *Phyllosticta capitalensis*, *Fusarium moniliforme* (KLEIN, 2008), *Phomopsis* spp., *Cladosporium cladosporioides*, *Nigrospora oryzae* (SANTOS, 2012), *Alternaria* spp. (SOUSA, 2010), *Aspergillus niger* (SOUSA, 2010; SANTOS, 2012), *Lasiodiplodia theobromae*, *Selenophoma* spp., *Diplodia laeliocattleyae*, *Diplodia* spp. e por diversas espécies de *Guignardia* (WATSON, 2008).

Mycoleptodiscus indicus desenvolve a doença crosta negra em baunilha (*Vanilla fragans*) (BEZERRA & RAM, 1986). *Sclerotium rolfsii* foi encontrado causando podridão em pseudobulbos e posterior desfolha (BAG, 2003). *Schizothyrium perexiguum* e

Leptothyrium spp. nos Estados Unidos causam pequenos pontos pretos em folhas de orquídeas, posteriormente acompanhado por outro fungo, o *Gloeodes pomigena*, que produz um superficial filme preto nas folhas chamado de mancha da fuligem (WATSON, 2008). *Pestalotiopsis pauciseta*, *P. osyridis*, *P. algeriensis* e *P. neglecta* foram encontrados em lesões foliares irregulares, necróticas e extensas e *P. clavispora* encontrado em lesões de folhas e bulbos (SANTOS, 2012).

No entanto, dentre as doenças causadas por fungos do filo Ascomycota em orquídeas, a antracnose, o amarelecimento, manchas das folhas, muita e podridão em todas as partes da planta, acarretadas por fungos do gênero *Colletotrichum*, são classificadas como um dos defeitos mais graves, o que proporciona grandes perdas econômicas (COUTINHO et al., 1998; GIORIA, 2002). Assim como, no filo Basidiomycota os fungos que se destacam por causar doenças em orquídeas são os pertencentes à ordem *Pucciniales*, principalmente o gênero *Sphenospora* (WATSON, 2008). A ferrugem se manifesta nas folhas das plantas e representa um grande problema para os produtores de orquídeas (BURNETT, 1973). Vale ressaltar que, ainda existe uma carência de informações sobre a ocorrência de doenças fúngicas no Brasil para diversos gêneros de orquídeas, embora existam estudos em diversos outros países (MORAES et al., 2011).

3.1 O gênero *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* foi descrito por Corda em 1831, encontrado em uma haste de uma planta hospedeira não identificada na República Tcheca (DAMM et al., 2009). O estágio teliomorfo *Glomerella* foi descritos por Spauld & H. Spauld em 1903 (INDEX FUNGORUM).

As espécies de *Colletotrichum* apresentam distribuição mundial e diferentes estilos de vida. Podem ser endofíticas (PRIHASTUTI et al. 2009), saprófitas (DAMM et al., 2009) e patogênicas a humanos (CANO, 2004) e principalmente às plantas (PRIHASTUTI et al. 2009). Entretanto, é por meio da patogenicidade em plantas nas regiões tropicais e subtropicais que o gênero é mais conhecido no mundo (HYDE et al, 2009). Durante o período de 1981 a 2001 foi classificado como um dos fitopatogenos mais estudados, registrado em plantas de diversos países. Em número de publicações na área de fitopatologia foi superado apenas por *Fusarium*, *Phytophthora* e *Rhizoctonia* (LATUNDE, 2001 Citado por HYDE et al., 2009).

No Brasil, *Colletotrichum* foi encontrado em várias plantas hospedeiras, incluindo diversos gêneros de orquídeas (MENDES & URBEN, 2012), nessas plantas é considerado como um dos principais fatores de declínio e em alguns casos pode ocasionar a morte (KLEIN, 2008). De acordo com Santos (2012) *Colletotrichum* foi o mais encontrado dentre 21 gêneros de fungos causadores de doenças isolados de 31 gêneros de orquídeas no sul da Bahia. Sousa (2009) também encontrou em orquidários comerciais *Colletotrichum* spp. causando antracnose em folhas de *Oncidium* sp., *Vanda* sp., *Cyrtopodium* sp. e *Denfal* sp.. Mafia et al. (2005) relatou *Colletotrichum gloeosporioides* causando antracnose na espécie *Paphiopedilum insigne*, conhecida popularmente como sapatinho-de-vênus, que é uma das orquídeas de maior valor econômico. Na Argentina *Colletotrichum gloeosporioides* e a sua forma teliomórfica *Glomerella cingulata* causaram mancha foliar em *Cattleya intermédia* x *C. walkeriana*, *Dendrobium nobile* e *Miltonia flavescens* (CABRERA et al. 2003).

No entanto, vale ressaltar que, existem diversas espécies de *Colletotrichum* identificadas de forma errada. Em alguns casos espécies de fungo consideradas diferentes podem ser iguais, assim como as rotuladas iguais podem ser diferentes (HYDE et al., 2009).

A dificuldade na identificação ocorre principalmente quando os estudos são baseados apenas em características morfológicas (GONZÁLEZ, 2007). Isolados patogênicos de *Colletotrichum* são morfológicamente semelhantes, o que dificulta o trabalho dos taxonomistas para determinar uma espécie (CANNON et al., 2012).

Nesse aspecto, técnicas moleculares de classificação e identificação estão contribuindo para o entendimento das relações filogenéticas entre as diferentes espécies. Isolados de fungos que são classificados como diferentes por meio da morfologia, podem ser da mesma espécie de acordo com os estudos moleculares (CARLILE et al., 1994). Nesse sentido, métodos moleculares associado aos morfológicos proporcionam uma melhor resolução de problemas associados a correta identificação das espécies de *Colletotrichum* (PILEGGI et al., 2009; RAMPERSAD, 2011).

3.2 Ordem *Pucciniales*

Os fungos da ordem *Pucciniales* pertencem ao Filo Basidiomycota, Subfilo Pucciniomycotina e Classe Pucciniomycetes. Apresentam um ciclo de vida classificado como complexo, pois podem existir dois hospedeiros e cinco fases diferentes, que são: espermagonial, eical, uredinial, telial, basidial (BERGAMINI FILHO et al., 1995). Os

basídios e basidiósporos desses fungos surgem nos teliósporos (Figura 1), que são células que correspondem aos probasídios de outros fungos do mesmo filo (FRANÇA, 2007). Caracterizados como entre os mais importantes organismos fitopatogênicos, são parasitas obrigatórios, que apresentam uma alta especificidade em relação às plantas hospedeiras (YEPES & CARVALHO, 2010a).

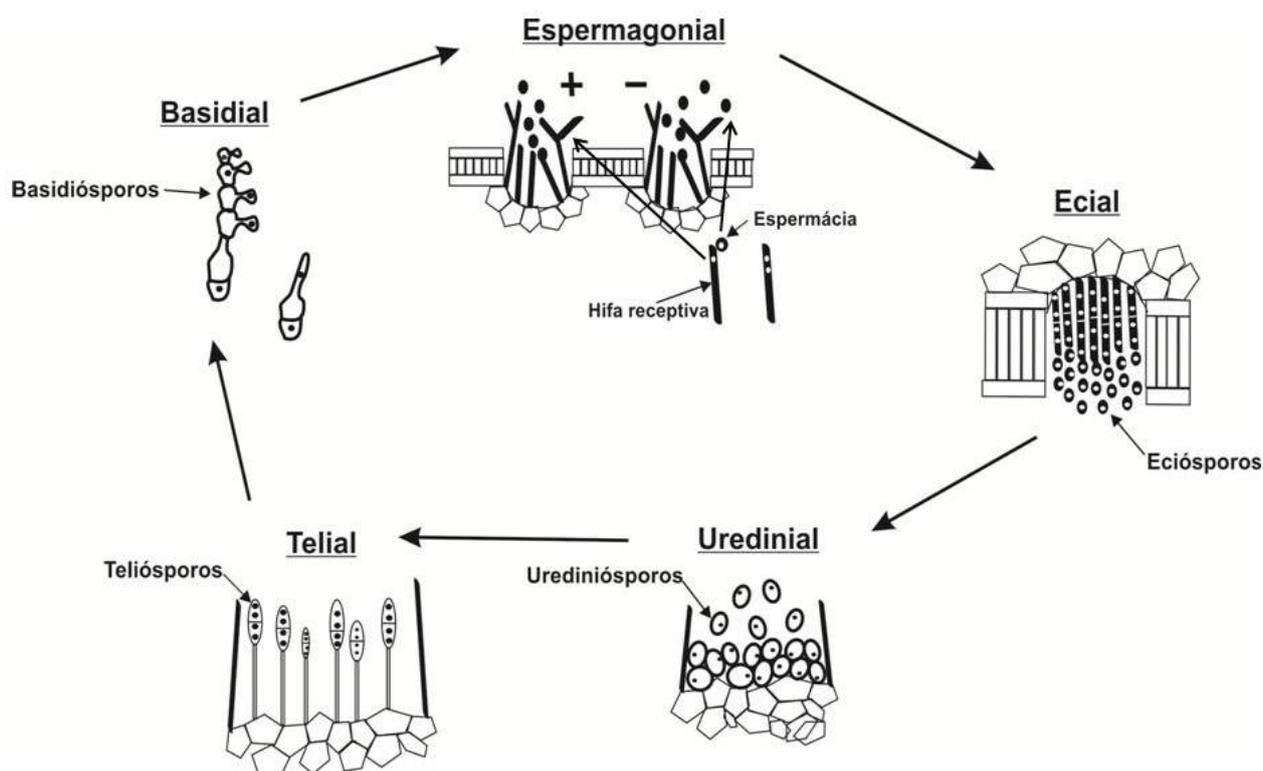


Figura 1. Ciclo de vida da Ordem *Pucciniales*. Fase espermagonial, ecial, uredinial, telial e basidial.

Compreendem um grupo de grande importância para a agricultura, plantações florestais e horticultura por desenvolver a doença conhecida como ferrugem. Diversas espécies formam nas folhas das plantas infectadas pústulas com coloração ferruginosa, que causam entre os principais sintomas desfolha, galha e má formação da planta (CUMMINS & HIRATSUKA, 2003).

As ferrugens são encontradas em todos continentes com exceção da Antártica, existindo cerca de 120 gêneros e 6000 espécies (YEPES et al., 2010). De acordo com Hennen et al.,(2005) e Yepes & Carvalho, (2010a) no Brasil foram encontrados 800 espécies em diversas famílias de planta, e o país se destaca por ter uma das maiores diversidade do mundo de ferrugens. Outros países como Argentina, Austrália, Japão e

Nova Zelândia, também apresentam um número significativo de ferrugens catalogadas. No entanto, nessas regiões tropicais e subtropicais ainda são esperados um número expressivo de novas espécies de ferrugens, alguns gêneros e de novos registros em plantas (CUMMINS & HIRATSUKA, 2003).

Na família Orchidaceae diferentes gêneros são hospedeiros de ferrugens. Segundo Ritschel et al., (2005), Hennen et al., (2005) e Watson, (2008) foi encontrado *Desmosorus oncidii* (sinônimo *Hemileia oncidii* (Griffor & Maubl), *Uredo behnickiana* (P. Hennings), *Hemileia americana* (Masse) e *Uredo americana* (Masse)) em *Cattleya*, *Epidendrum*, *Laelia*, *Laphiaris* e *Oncidium*; *Uredo lynchii* (Plowright) em *Spiranthes*; *Uredo neopustulata* (Cummins) em *Stenorrhynchus*; *Sphenospora mera* em *Catasetum*, *Oncidium*, *Pleurothallis* e *Rodriguezia*; *Sphenospora saphena* em *Epidendrum*, *Laelia*, *Oncidium*, *Rodriguezia* e *Sobralia* e registrado *Sphenospora kevorkianii* (Linder) e sua fase anamórfica *Uredo nigropunctata* (P. Hennings) (sinônimo *Uredo carnososa* (Spegazzini) e *Uredo epidendri* (P. Hennings)) em *Notylia*, *Prescottia*, *Stanhopea*, *Zygostalis*, *Epidendrum*, *Stenorrhynchus*, *Catasetum*; e *Cyrtopodium* (WATSON, 2008). A ferrugem causada por *Sphenospora* em grandes produções de orquídeas localizadas no Havaí é considerada como fator de grande declínio na produção. Assim, o controle químico é recomendado para combater a doença (CÚNDOM et al., 2009).

CAPÍTULO I

New host records for *Sphenospora kevorkianii* (Raveneliaceae)

Autores: Sousa, E.M.R., Nascimento, J.M.O., Anda-Rocabado, J. M., Souza, J.T.

Submetido a Summa Phytopathologica em versão modificada na categoria Comunicação Científica

The *Orchidaceae* family is one of the largest among the land plants with approximately 800 genera, 35,000 species and 120,000 hybrids. Brazil is one of the centers of orchid diversity and endemism (Barros *et al.* 2012. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000179>). During surveys conducted in 2011 and 2012 for fungi pathogenic to orchids in Bahia State, two samples were found with a rust fungus that was identified as *Sphenospora kevorkianii* Linder. There are six species in the genus *Sphenospora*, but only *S. mera*, *S. saphena* and *S. kevorkianii* were registered on orchids in Brazil. Twelve genera and 15 species of orchids are hosts of *S. kevorkianii* in Brazil (Carvalho Jr., A.A. 2012. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB094490>).

Leaf samples with symptoms and signs of rust fungi were collected from the native species *Cyrtopodium aliciae* at Igatu municipality (11°42'45.18"S - 40°37'32.95"O), Chapada Diamantina, Bahia State at July 10, 2011. Samples of the commercial hybrid *Denfal muaug tai* were collected in the commercial nursery Orquidário Orquilândia Tropical, located in Camaçari municipality (12°48'35.64"S- 38°15'23.02"O) in March 24, 2012. The samples were deposited in the RB herbarium of Rio de Janeiro Botanical Garden under collector numbers 71 and 72 for *D. muaug tai* and *C. aliciae*, respectively.

Pustules on leaves of *C. aliciae* were amphigynous, with a waxy aspect, following the leaf veins and in *D. muaug tai* pustules appeared on both sides, but were predominantly hypophyllous and had a flattened and pulverulent aspect. These pustules were orange to dark brown on both plants species. Spermagonia and aecia were not observed in these samples nor on any sample evaluated by other authors (Carvalho Jr., A.A. 2012. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB094490>). Uredinia were conspicuous, sori amphigynous in *C. aliciae*, predominantly hypophyllous in *D. muaug tai*, orange colored. Urediniospores were pale yellow, obovoid to ellipsoid, 20-32.5 x 17.5-24 µm with two equatorial germinative pores, yellow and equinulated walls 1-2 µm thick. Telia conspicuous, round and dark brown to black in color. Teliospore with 2 cells and a vertical

septum, hyaline, ellipsoid 19-28 x 12-15 μm , no germinative pores observed, smooth walls 1 μm thick, pedicel hyaline, persistent up to 50 μm long (Figure 1). Spores showed the same dimensions on both samples. The characters that allowed the separation of *S. kevorkianii* from the other *Sphenospora* species were number of germinative pores on urediniospores, wall thickness, and size of the urediniospores, absence of paraphyses, size and thickness of the teliospore pedicel and thickness of the teliospore walls. Rust lesions may be invaded by *Colletotrichum* spp. and other fungal species, causing anthracnose that further contributes to plant decline (Figure 1).

Sphenospora kevorkianii is the rust species most frequently found on orchids, however, this is its first report on *C. aliciae* and on the hybrid *D. muaug tai*, as it is the first time this rust species is found in Bahia State.

ACKNOWLEDGEMENT

JTS acknowledges CNPq for the productivity scholarship.

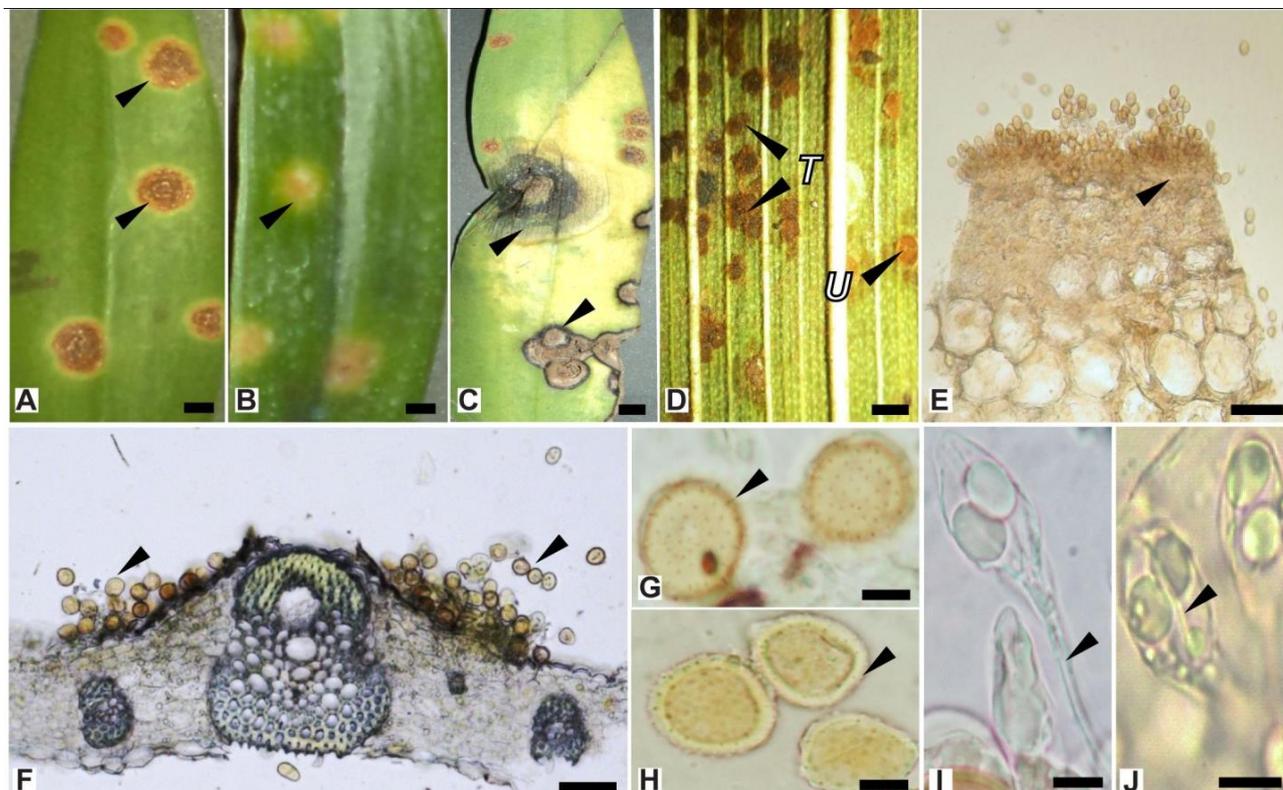


Figure 1. A–J. *Sphenospora kevorkianii* Linder. A–B. Rust symptoms in leaves of *Denfal muaug tai*. A. Adaxial leaf side with pustules (arrow) (Bar = 10 mm). B. Abaxial leaf side

showing chlorosis (Bar = 10 mm). C. Rust and anthracnose (arrow) symptoms in a leaf of *D. muaug tai* (Bar = 10 mm). D. Telial (T) and Uredinial (U) sori (arrows) in a *Cyrtopodium aliciae* leaf (Bar = 5 mm). E-F. Tissue section showing Uredinia and Urediniospores. E. Section through a *D. muaug tai* leaf with an Uredinia (arrow) and Urediniospores (Bar = 50 μm). F. *C. aliciae* leaf showing Urediniospores (arrows) (Bar = 10 μm). F-G. Urediniospores. G. Surface view showing spicules (arrow) (Bar = 10 μm). H. Median view showing wall thickness (arrow) (Bar = 10 μm). I-J. Teliospores I. Teliospore pedicel (arrow) (Bar = 10 μm). J. Vertical septum (arrow) (Bar = 10 μm).

CAPÍTULO 2

Espécies de *Colletotrichum* associados a orquídeas na Bahia

RESUMO**Espécies de *Colletotrichum* associados a orquídeas na Bahia**

Sousa, E. M. R.

As orquídeas sofrem o ataque de múltiplos patógenos e os fungos do gênero *Colletotrichum* estão entre os mais comuns. Existem poucas informações sobre as espécies de *Colletotrichum* patogênicos a orquídeas. O objetivo do trabalho foi estudar por meio de técnicas morfológicas e moleculares a diversidade de *Colletotrichum* spp. patogênicos a orquídeas. Critérios como tamanho dos conídios, coloração e taxa crescimento das colônias em dois meios de cultura foram usados para a caracterização morfológica. Análise molecular foi realizada com o uso de *primers* específicos para *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, marcadores BOX e REP e o sequenciamento de fragmentos do gene β -tubulina e EF1- α . O estudo envolveu um total de 41 isolados obtidos de 21 gêneros /espécie de orquídeas. Os agrupamentos encontrados nas análises morfológicas e nas moleculares por BOX/REP não foram correspondentes aos agrupamentos filogenéticos encontrados, que corresponderam a *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. orchidearum* e *C. orchidophilum*. Os resultados desse trabalho acrescentam novas informações sobre a diversidade de *Colletotrichum* patogênicos a orquídeas.

Palavras-chave: Doenças; diversidade; fungos.

ABSTRACT**Species of *Colletotrichum* associated with orchids in Bahia**

Sousa, E. M. R.

The orchids are attacked by several pathogens and fungi of genus *Colletotrichum* are among the most common. There is little information on *Colletotrichum* species pathogenic to orchids. The objectives of this work is to study the diversity of *Colletotrichum* spp. from orchids by morphological and molecular analyses. Criteria such as size of conidia, colour and colony growth rate on two agar media were used to characterize the isolates morphologically. Analysis of the isolates with species-specific *primers*, BOX and REP markers and sequencing of fragments of the β -tubulin and RNA polymerase elongation and transcription factor (EF1- α) genes. The study involved 41 isolates obtained from 21 genera/species of orchids. The groupings found in morphological and by BOX/REP did not correspond to the ones found in the phylogenetic analyses, where the isolates were clustered into four phylogenetic groups: *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. orchidearum* and *C. orchidophilum*. These results add new information on the diversity of *Colletotrichum* pathogenic to orchids.

Keywords: Diseases; diversity; fungus.

INTRODUÇÃO

O gênero *Colletotrichum* de acordo com dados científicos e econômicos é classificado entre os oito mais importantes fungos patogênicos de plantas (DEAN et al., 2012). É também citado como pertencente ao grupo dos endofíticos de folhas mais comumente encontrados (ROJAS et al., 2010). De acordo com Prusky, (1996) quase todas as culturas de plantas cultivadas no planeta são suscetíveis a espécies do gênero *Colletotrichum*, com destaque para as plantas leguminosas, frutíferas e ornamentais.

Dentre as plantas ornamentais, as espécies da família *Orchidaceae*, que é a mais diversificada do reino vegetal, com alto valor comercial são muito afetadas por doenças causadas por *Colletotrichum* (SOUZA, 2005 e BARROS et al., 2009). O ataque do fungo causa riscos para o cultivo, de modo que as plantas ficam prejudicadas esteticamente e em alguns casos pode ocorrer a morte (BARROS et al., 2009). As doenças ocasionadas por *Colletotrichum* são classificadas como das mais importantes em orquídeas (MAFIA et al., 2005).

Apesar de haver diversos estudos sobre espécies de *Colletotrichum* em várias plantas hospedeiras (FERREIRA et al., 2005), poucas informações científicas são apresentadas sobre a diversidade de espécies associadas à família *Orchidaceae* (CABRERA et al., 2003), principalmente no Brasil. Dessa forma, existe a necessidade de identificar *Colletotrichum* em nível de espécie para que estratégias eficientes e mais específicas de controle possam ser adotadas em relação aos danos causados (ATKINS & CLARK, 2004 e HYDE et al., 2009).

Nesse sentido, o estudo de características morfológicas associadas a técnicas moleculares são importantes ferramentas para caracterizar espécies do gênero *Colletotrichum* (PILEGGI et al., 2009 e CAI et al., 2009). Este trabalho tem como objetivos estudar por meio de técnicas morfológicas e moleculares a diversidade de *Colletotrichum* associados a orquídeas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem, isolamento e preservação

Foram realizadas coletas em cultivos de orquídeas nos municípios de Lençóis (Chapada Diamantina), Cruz das Almas e Camaçari (Orquilândia tropical), todos no Estado da Bahia, no período de julho de 2011 a março de 2012. Plantas com sintomas aparentes de doenças foram coletadas, fotografadas e prensadas.

Os isolamentos foram feitos por meio de dois procedimentos: 1) Indireto: Fragmentos de aproximadamente 2 cm da interseção entre as áreas lesionadas e sadias foram retirados, desinfestados superficialmente durante 2 min em álcool 70% e hipoclorito de sódio 1%, posteriormente foram realizadas duas lavagens em água destilada esterilizada. Os fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA – Batata Dextrose Agar. Após 10 dias de cultivo, lâminas foram preparadas e observadas ao microscópio de luz. Isolados de *Colletotrichum* foram separados para futuros estudos; 2) Direto: esporos de *Colletotrichum* previamente observados em lesões sobre as folhas foram transferidos para meio BDA. As culturas foram incubadas à temperatura ambiente e a purificação dos isolados contaminados foi feita quando necessário. A preservação dos isolados ocorreu de duas formas: método de Castellani e em óleo mineral.

Caracterização morfológica

A caracterização morfológica foi baseada no tamanho dos conídios, crescimento e coloração da colônia em dois meios de cultura. Lâminas foram preparadas por raspagem da placa de Petri e por microcultivo para a análise do tamanho dos conídios em meio BDA. Para o microcultivo, uma lamínula foi transferida para a superfície do meio de cultura BDA para que o fungo crescesse sobre a lamínula. Após 10 a 15 dias a lamínula foi retirada e transferida para uma lâmina contendo lactofenol e azul de metileno ou azul de algodão para facilitar a observação dos esporos. Foi medido o comprimento e a largura de cinquenta conídios de cada isolado em microscópio óptico em objetiva de 40X.

A taxa de crescimento foi determinada em meio BDA e em meio cenoura, dextrose ágar (CDA). Discos de micélio de 7 mm de diâmetro foram retirados das extremidades de culturas de seis dias de crescimento em BDA e transferidos para o centro de novas placas contendo BDA e CDA e incubadas a 25°C. Três repetições foram utilizadas para cada combinação isolado e meio. O diâmetro das colônias foi medido a cada 24 h por 7 dias.

No décimo dia de cultivo foi observada e fotografada a coloração de cada isolado na parte superior das placas de Petri nos meios de cultura BDA e CDA.

Extração do DNA

Os isolados de *Colletotrichum* foram cultivados em placa de Petri com meio de cultura batata – dextrose (BD) e incubados a 25°C durante 5 dias. Posteriormente, o micélio foi coletado, transferido para papel filtro estéril para que o excesso do meio de cultura fosse eliminado e o DNA foi extraído de acordo com o método de Doyle e Doyle (1990) adaptado. Aproximadamente 100 mg de micélio foram macerados em nitrogênio líquido no cadinho com almofariz, e transferidos para microtubos de 1,5 mL. Posteriormente, foi adicionado 650 µL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8,0; 1,4 M NaCl; 2 % CTAB; 1 % PVP; 0,2 % β - Mercaptoetanol; 50 µg.mL⁻¹ proteinase K). O conteúdo dos tubos foi misturado em um aparelho agitador e incubados a 55°C por 1 h em banho-maria, com agitação a cada 10 min. Em seguida, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente, e foi adicionado 650 µL de clorofórmio:álcool isoamílico - CIA (24:1). A mistura foi agitada manualmente por suaves inversões por 7 min e em seguida centrifugada a 12.000 rpm por 5 min. A fase aquosa superior foi transferida para um novo microtubo e 200 µL de tampão de extração (sem β - Mercaptoetanol e proteinase K) mais 650 µL de CIA (24:1) foi adicionado, agitado e centrifugado como citado anteriormente. A fase aquosa novamente foi transferida para um novo microtubo, e um volume igual de isopropanol gelado (cerca de 500 µL) foi acrescentado. A solução foi incubada a -80 °C por 15 min. Posteriormente foi realizada a centrifugação a 12.000 rpm por 5 min, a fase líquida foi descartada. O DNA neste momento se encontrava aderido ao fundo do tubo, foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70% e centrifugando a 12000 rpm por 3 min e secos em temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuscitado em 50 µL de TE (10mM Tris HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA), contendo 10 µg/mL RNase e colocado em banho-maria a 37°C durante 30 min. O DNA foi visualizado em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio 1 µg/mL.

BOX e REP - PCR

O elemento BOXA foi amplificado através do *primer* BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG - 3'). A reação total de 25µL foi a seguinte: 5 µL de tampão 5X, 6µL de MgCl₂, 7,1µL de dNTPs, 0,4 µL de Taq DNA polimerase, 5µL de *primer* e 1,5µL de DNA. A amplificação iniciou com uma desnaturação de 95°C por 5 min,

seguida por dez ciclos de um 1 min a 94°C, 30 s a 40°C, 72°C por 1 min, 30 ciclos de 1 min a 90°C, 30 s a 48°C, 1 min a 72°C e uma extensão final de 10 min a 72°C.

Utilizou-se para a análise do REP – PCR os *primers* REP 1R (5' IIIICGICGICATCIGGC - 3') and REP 2R (5'- ICGICTTATCIGGCCTAC -3'). A reação total de 25 µL foi composta por 5 µL de tampão 5X , 4µL de MgCl₂, 8µL de dNTPs, 0,4 µL de Taq DNA polimerase, 3µL de cada *primer*, 1,5µL de DNA e 0,1 de água. As condições do PCR foram: uma inicial desnaturação de 5 min a 95°C, seguida por 10 ciclos de 1 min a 72°C, 30 ciclos de 1 min a 90°C, 48°C a 30 s, 1 min a 72°C e uma extensão final de 10 min a 72°C.

As duas reações ocorreram em um termociclador (peqSTAR 96 universal gradiente). Os fragmentos amplificados por BOX e REP – PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio 1 µg/mL, com a velocidade de corrida de 50 V em tampão TAE, durante 7 h. O marcador de 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen) foi utilizado. Os géis foram fotografados em um fotodocumentador (Loccus biotechnology).

A análise do perfil das bandas visualizadas no gel gerou uma matriz de presença e ausência, a existência de banda é representada por 1 e ausência representada por 0. A análise de agrupamento foi feita com o programa FREE TREE (HAMPL et al., 2001), foi usado o método UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

Reações de PCR espécie-específicas

Os isolados de *Colletotrichum* foram submetidos à reação de PCR com *primers* espécie-específicos para amplificação da região ITS. O *primer* CgInt (5'-GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG - 3') de aproximadamente 450pb, descrito por Mills et al., (1992) foi usado para *Colletotrichum gloeosporioides* e o *primer* Calnt2 (5'-GGGAAGCCTCTCGCGG - 3') descrito por Sreenivasaprasad et al., (1996) para *Colletotrichum acutatum*, ambos combinados com o *primer* universal ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') descrito por White e Morrow, (1990). As reações foram preparadas em um total de 25µL composta por 5µL de tampão 5x, 2,0µL de dNTPs, 2,0µL de MgCl₂, 0,75µL de cada *primer*, 0,4µL de Taq DNA polimerase, 2,0µL de DNA e 12,1µL de água miliQ autoclavada. A reação de PCR foi realizada segundo Freeman *et al.* (2001), em um termociclador (peqSTAR 96 universal gradiente). O programa usado apresentou as seguintes fases: uma desnaturação inicial de 95°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de 30 s em 95°C, 30 s em 50°C, 1 min e 30 s em 72°C e extensão final de 5 min

em 72°C. Após a amplificação os produtos do PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio 1 µg/mL, em tampão TAE, a 80V durante 2 h junto com o marcador de 100pb DNA Ladder (Invitrogen). O gel foi fotografado em fotodocumentador (Loccus biotechnology).

Amplificação e sequenciamento

O DNA genômico dos isolados de *Colletotrichum* foram submetidos a amplificação de duas regiões, um fragmento do gene β -tubulinae outro fragmento do gene EF1- α (*translation elongation factor 1* alfa da RNA polimerase). Os *primers* utilizados foram respectivamente T1(5' - AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT – 3') descrito por O' Donnell e Cigelnik, (1997) combinado com Bt2b (5' - ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC – 3') descrito por Glass e Donaldson, (1995) e EF1-728F (5'- CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG – 3') descrito por Carbone e Kohn, (1999) combinado com EF2T (5'- GGA RGT ACC AGT SAT CAT GTT – 3') descrito por O' Donnell e Cigelnik, (1997). As reações de PCR foram preparadas em um volume total de 25µL composta por, 5µL de tampão 5x , 2,0µL de dNTPs, 2,0µL de MgCl₂, 0,75µL de cada *primer*, 0,4µL de Taq DNA polimerase, 2,0µL de DNA e 12,1µL de água miliQ autoclavada. A reação de PCR foi realizada em um termociclador (peqSTAR 96 universal gradiente) programado para um ciclo inicial de 94°C por 2 min, seguido de 15 ciclos de 94°C por 2 min, 65°C por 30 s, 72°C por 1 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 48°C por 30 s, 72°C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 10 min. Posteriormente, as amostras foram submetidas à reação de sequenciamento.

O sequenciamento das amostras ocorreu de acordo com o método de Sanger et al., (1977) e os *primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos do gene β -tubulina e do gene EF1- α foram os citados anteriormente. Foram preparadas as reações em um volume final de 10 µL, composto por, 4,1 µL de água ultrapura, 2,0 µl do tampão de seqüenciamento 5X (Applied biosystems), 0,4 µL de *primer* (10 pM/µL), 2,5 µL de DNA da amostra e 1,0 µL de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems). As amplificações ocorreram em um termociclador (peqSTAR 96 universal gradiente), de acordo com o seguinte programa: desnaturação inicial a 96 °C por 1 min, seguida de 35 ciclos de três etapas: desnaturação (96 °C, 10 s), anelamento (50 °C, 5 s) e extensão (65 °C, 4 min). As etapas seguintes foram: a precipitação com a adição de 40 µl de isopropanol 65 %, centrifugando a 4.000 rpm por 40 min. Em seguida o DNA foi lavado com 200 µl de etanol 60 %, após a lavagem o DNA foi ressuscendido em 10 µL de formamida e aquecido a 93 °C por 3 min, resfriado rapidamente em freezer -20°C.

Posteriormente, as mostras foram submetidas à eletroforese em seqüenciador do tipo ABI prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystem).

Análise filogenética

A edição e montagem das sequências foi realizada com o programa Sequencher 5.1 (Gene Code Corporation). O programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) foi usado para comparar as sequências de cada isolado com aquelas encontradas em bancos de dados públicos, que foram incluídas nas análises para fins de comparação. O programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011), foi usado para alinhar as sequências e para gerar as árvores filogenéticas. O método Neighbor-Joining (NJ) com análises de *bootstrap* com 1.000 e o modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros foram usados na construção dos dendogramas.

RESULTADOS

Amostragem, caracterização morfológica e molecular

Foram obtidos 41 isolados de *Colletotrichum* em associação com 21 diferentes gêneros de orquídeas. Desses, 23 foram isolados de amostras do município de Lençóis (Chapada Diamantina), 17 de um orquidário comercial em Camaçari, e 1 do município de Cruz das Almas, todos localizados no Estado da Bahia (Tabela 1).

Na caracterização morfológica, a coloração cinza foi predominante nas colônias com variações entre cinza clara a escura. No meio de cultura BDA foi possível observar sete variações de cinza. Da mesma forma, em CDA, as mesmas cores foram observadas, com mais uma variação, cinza esverdeada (Figura 1). Não houve correspondência entre as cores observadas para parte dos isolados nos dois meios de cultura (Tabela 1). Dos 41 isolados estudados, 22 apresentaram a mesma cor nos dois meios, enquanto que, nos outros 19 não houve correspondência.

Os conídios de todos os isolados apresentaram-se hialinos, unicelulares, cilíndricos ou retos com o comprimento variando de 7,5 a 27,5 e largura de 2,0 a 6,2 μm . A taxa de crescimento em meio BDA variou de 9,2 a 15,7mm/dia e em CDA de 9,3 a 13,5 mm/dia (Tabela 1).

A análise da diversidade por meio dos marcadores BOX e REP, resultou respectivamente em 31 e 37 bandas. A análise conjunta desses marcadores gerou um dendrograma com 11 grupos. A similaridade entre esses grupos variou de 0 a 0,41%, no entanto, os isolados dentro de um determinado grupo apresentaram 100% de similaridade (Figura 2). Foi comum a ocorrência de isolados do mesmo grupo BOX/REP em diversos gêneros de orquídeas, assim como isolados de diferentes grupos no mesmo gênero. Por exemplo, os 11 isolados do grupo 1 foram patogênicos a oito gêneros de hospedeiras, enquanto que os isolados 8 e 49, pertencentes aos grupos 1 e 4 respectivamente, foram patogênicos a mesma espécie, *Cyrtopodium gigas* (Figura 2).

Alguns dos grupos BOX/REP foram compostos por isolados obtidos em apenas um local de coleta, enquanto que outros grupos apresentam isolados coletados em diferentes locais. Por exemplo, os isolados dos grupos 1 e 2 foram obtidos exclusivamente de Lençóis (Chapada Diamantina) e os isolados dos grupos 5 e 6 de Camaçari (orquidário comercial). Por outro lado, os isolados do grupo 4 foram encontrados em Lençóis e em

Tabela 1. Hospedeiras, local de origem e características morfológicas dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Is. ⁺	Hospedeiras	Nativa /cultivada	Local de origem	Conídios (µm)		Coloração da colônia		Taxa de cresc. ⁺⁺⁺ (mm/dia)	
				Com. ⁺⁺	Largura	BDA	CDA	BDA	CDA
1	<i>Oncidium</i> sp.	Cultivada	Camaçari	12,5-25	2,5-5,0	Cinza	Cinza	15,2 ± 3,4	13,5 ± 1,4
2	<i>Sobralia liliastrum</i>	Nativa	Lençóis	10-17,5	5,0-5,0	Cinza clara	Cinza clara/ massa conidial laranja	11,0 ± 1,5	10,6 ± 1,9
3	<i>Brassia</i> sp.	Cultivada	Camaçari	10-17,5	2,5-5,0	Cinza	Cinza esverdeada	15,3 ± 1,7	12,3 ± 0,9
4	<i>Bulbophyllum ipanemense</i>	Nativa	Lençóis	7,5-12,5	2,5-2,5	Cinza clara	Cinza clara	13,8 ± 1,7	10, ± 0,9
5	<i>Zygopetalum</i> sp.	Nativa	Lençóis	10-15	2,5-5,0	Cinza clara	Cinza clara	13,6 ± 1,5	10,8 ± 1,4
6	<i>Cattleya</i> sp.	Cultivada	Cruz das Almas	10-27,5	3,8-5,0	Cinza	Cinza escura	14,8 ± 3,4	11,8 ± 1,4
7	<i>Zygopetalum</i> sp.	Nativa	Lençóis	7,5-12,5	2,5-2,5	Cinza clara	Cinza clara	14,9 ± 1,5	10,7 ± 1,3
8	<i>Cyrtopodium gigas</i>	Nativa	Lençóis	7,5-20	2,5-2,5	Cinza clara	Cinza clara	13,5 ± 1,8	11,5 ± 1,9
9	<i>Cyrtopodium</i> sp.	Cultivada	Camaçari	10-20	2,5-5,0	Cinza	Cinza	13,3 ± 3,6	10,7 ± 2,4
10	<i>Brassia</i> sp.	Cultivada	Camaçari	10-27,5	2,5-5,0	Cinza clara	Cinza esverdeada	14,9 ± 3,0	11,0 ± 1,5
11	<i>Arundina</i> sp.	Cultivada	Lençóis	7,5-15	2,5-2,5	Cinza/ centro claro	Cinza clara	12,6 ± 1,0	11,6 ± 0,4
12	<i>Paradisanthus</i> sp.	Nativa	Lençóis	7,5-12,5	2,5-2,5	Cinza	Cinza	13,2 ± 1,2	13,1 ± 1,7
13	<i>Dendrobium palpebrae</i>	Cultivada	Camaçari	10-22,5	3,8-5,0	Cinza escuro	Cinza esverdeada	14,9 ± 4,6	10,9 ± 1,2
16	<i>Oncidium barbatum</i>	Cultivada	Lençóis	7,5-20	2,5-2,5	Cinza	Cinza	14,9 ± 1,1	11,1 ± 0,7
17	<i>Brassia</i> sp.	Cultivada	Camaçari	10-20	2,5-5,0	Cinza	Cinza	12,9 ± 1,6	12,1 ± 0,8
18	<i>Maxillaria</i> sp.	Nativa	Lençóis	8,8-17,5	2,5-3,8	Cinza	Cinza	15,2 ± 1,9	12,4 ± 1,7
20	<i>Bulbophyllum</i> sp.	Cultivada	Camaçari	10-15	2,5-5,0	Cinza	Cinza	14,4 ± 3,7	12,5 ± 1,0
21	<i>Cattleya elongata</i>	Cultivada	Lençóis	10-17,5	2,5-5,0	Cinza clara/ centro escuro	Cinza	12,8 ± 1,2	13,1 ± 1,7
22	<i>Bifrenaria</i> sp.	Nativa	Lençóis	7,5-15	3,8-6,2	Cinza clara	Cinza clara	9,9 ± 2,1	11,2 ± 0,5
23	<i>Maxillaria marginata</i>	Cultivada	Lençóis	7,5-17,5	2,5-2,5	Cinza	Cinza	13,8 ± 1,3	10,6 ± 1,3
24	<i>Stelis</i> sp.	Nativa	Lençóis	10-15	2,5-3,8	Cinza clara/ massa conidial laranja	Cinza escura	13,9 ± 2,2	12,0 ± 1,4
25	<i>Stelis</i> sp.	Nativa	Lençóis	7,5-15	2,5-2,5	Cinza/ centro claro	Cinza/ centro claro	14,1 ± 2,0	11,1 ± 0,9
26	<i>Paphiopedilum</i> sp.	Cultivada	Lençóis	10-17,5	2,5-2,5	Cinza	Cinza	14,3 ± 1,2	10,3 ± 2,4
27	<i>Arundina</i> sp.	Cultivada	Lençóis	7,5-12,5	2,5-2,5	Cinza clara	Cinza clara	9,2 ± 1,4	9,4 ± 2,2
28	<i>Maxillaria marginata</i>	Cultivada	Lençóis	10-15	2,5-3,8	Cinza clara	Cinza clara/ centro escuro	13,3 ± 1,8	10,6 ± 0,3
29	<i>Denfal</i> sp.	Cultivada	Lençóis	7,5-12,5	2,5-2,5	Cinza clara	Cinza	13,0 ± 0,8	10,7 ± 3,0
30	<i>Stelis</i> sp.	Nativa	Lençóis	7,5-12,5	2,5-2,5	Cinza clara	Cinza clara	14,2 ± 1,3	11,4 ± 0,7
31	<i>Stelis</i> sp.	Nativa	Lençóis	7,5-17,5	2,5-2,5	Cinza/ centro claro	Cinza	15,0 ± 1,5	10,2 ± 1,5
34	<i>Miltonia</i> sp.	Nativa	Lençóis	7,5-15	2,5-2,5	Cinza clara	Cinza clara	13,5 ± 1,6	12,2 ± 1,3
37	<i>Bulbophyllum</i> sp.	Cultivada	Camaçari	9-13	2,0-4,0	Cinza	Cinza	14,7 ± 1,7	12,5 ± 0,8
38	<i>Brassia</i> sp.	Cultivada	Camaçari	10-15	2,5-5,0	Cinza	Cinza	14,9 ± 2,9	12,0 ± 2,1
39	<i>Brassia</i> sp.	Cultivada	Camaçari	10-17,5	3,7-5,0	Cinza	Cinza	14,3 ± 1,8	10,7 ± 1,2
40	<i>Dendrobium forbesii</i>	Cultivada	Camaçari	10-15	2,5-5,0	Cinza clara/ massa conidial laranja	Cinza clara	15,4 ± 0,9	11,9 ± 1,4
41	<i>Oncidium</i> sp.	Cultivada	Camaçari	12,5-25	2,5-5,0	Cinza	Cinza esverdeada	16,4 ± 1,4	12,2 ± 2,0
45	<i>Denfal</i> sp.	Cultivada	Camaçari	10-15	2,5-5,0	Cinza clara/ centro escuro	Cinza/ centro claro	12,5 ± 1,2	11,4 ± 0,7
46	<i>Epidendrum</i> sp.	Cultivada	Camaçari	10-15	2,5-5,0	Cinza clara	Cinza clara	12,5 ± 1,4	11,0 ± 0,8
47	<i>Bulbophyllum</i> sp.	Cultivada	Camaçari	10-20	2,5-5,0	Cinza	Cinza	14,7 ± 2,5	11,7 ± 1,8
48	<i>Spatoglossum</i> sp.	Nativa	Camaçari	12,5-35	2,5-5,0	Cinza	Cinza esverdeada	15,7 ± 1,4	13,3 ± 3,2
49	<i>Cyrtopodium gigas</i>	Nativa	Lençóis	7,5-12,5	3,8-5,0	Cinza escura/ massa conidial laranja	Cinza	13,2 ± 3,8	11,3 ± 0,8
50	<i>Vanda</i> sp.	Cultivada	Camaçari	10-17,5	2,5-5,0	Cinza	Cinza esverdeada	15,3 ± 2,5	11,0 ± 1,8
51	<i>Maxillaria</i> sp.	Nativa	Lençóis	10-25	2,5-5,0	Cinza claro	Cinza	14,4 ± 2,4	9,3 ± 2,1

Is.⁺ - Isolado; Com.⁺⁺ - Comprimento. Cresc.⁺⁺⁺ - Crescimento

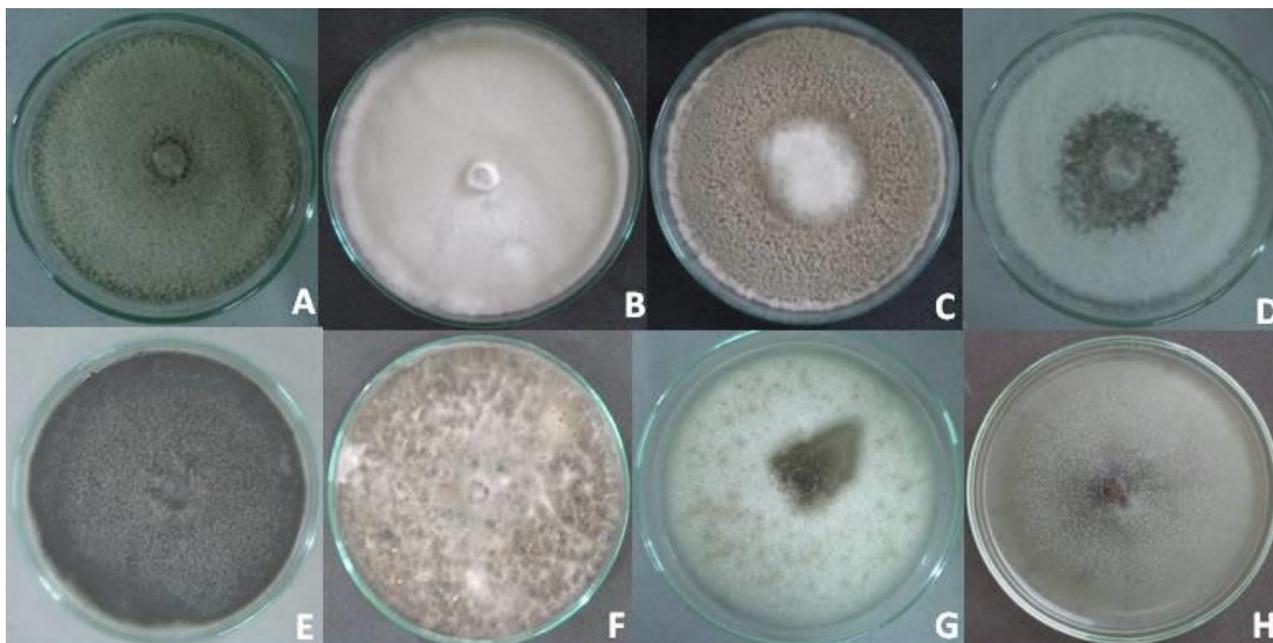


Figura 1. A-H. Colônias com variações entre cinza clara a escura em meio de cultura BDA e CDA. A. Cinza. B. Cinza clara. C. Cinza com o centro claro. D. Cinza com o centro escuro. E. Cinza escura. F. Cinza escura com massa conidial laranja. G. Cinza clara com massa conidial laranja. H. Cinza esverdeada.

Camaçari (Figura 2). Não houve correspondência entre isolados obtidos de orquídeas classificadas como nativas ou cultivadas e o agrupamento BOX/REP (Tabela 1, Figura 2).

A PCR com *primers* específicos para *C. acutatum* não amplificou o DNA de nenhum dos isolados estudados. De modo contrário, o par de *primers* específico para *C. gloeosporioides* foi positivo para 24 isolados. No entanto, esses isolados apresentaram-se distribuídos ao acaso nos grupos BOX/REP (Figura 2). Os 17 isolados que não apresentaram amplificação do DNA com os *primers* específicos para *C. gloeosporioides* exibiram um fragmento de aproximadamente 600 pb quando submetidos a PCR com *primers* universais (ITS1/ITS4), demonstrando que o DNA encontrava-se em boas condições (Figura 3).

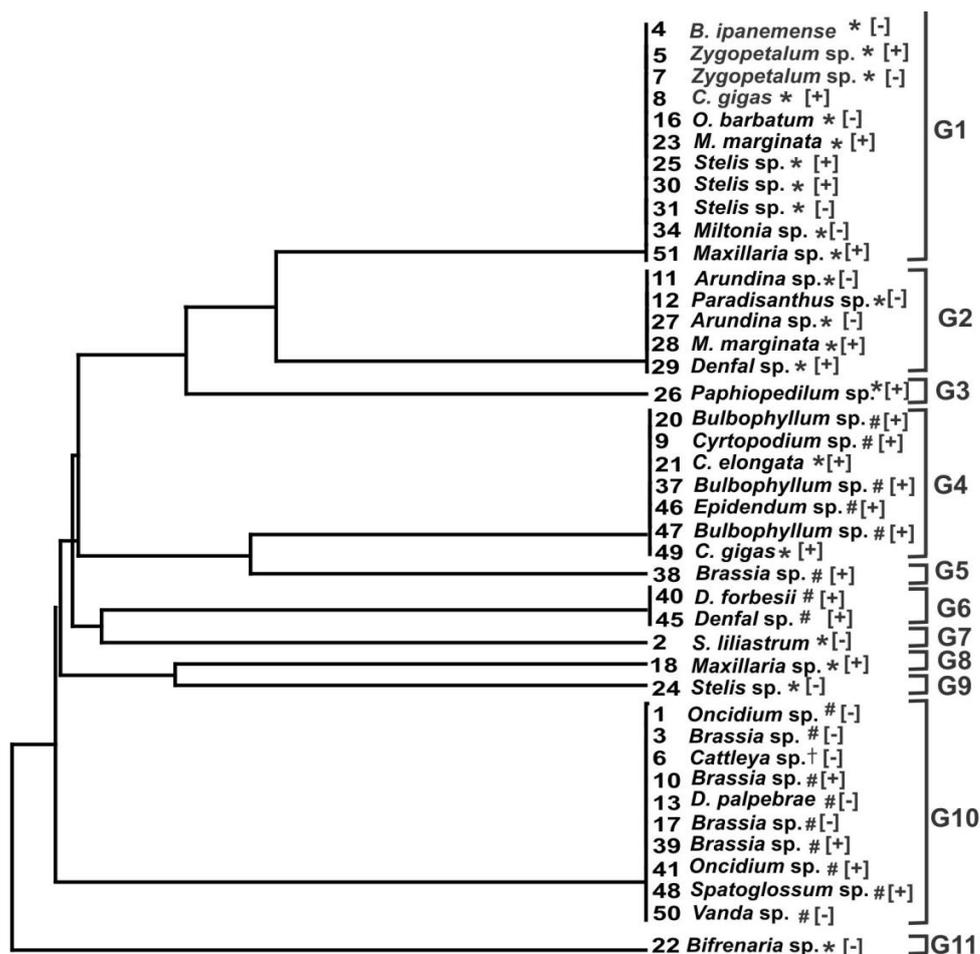


Figura 2. Dendrograma dos isolados de *Colletotrichum* spp. de orquídeas por meio da análise dos elementos BOX e REP - PCR. O agrupamento foi feito pelo método UPGMA e com o coeficiente de Jaccard. Locais de coleta: * - Lençóis (Chapada Diamantina); # - Camaçari (orquidário comercial); † - Cruz das Almas. Símbolos + ou - entre colchetes indicam amplificação positiva e negativa respectivamente por PCR utilizando *primers* específicos para a espécie *C. gloeosporioides*. Os grupos de isolados definidos com base em 100% de similaridade são indicados na frente dos colchetes que os delimitam.

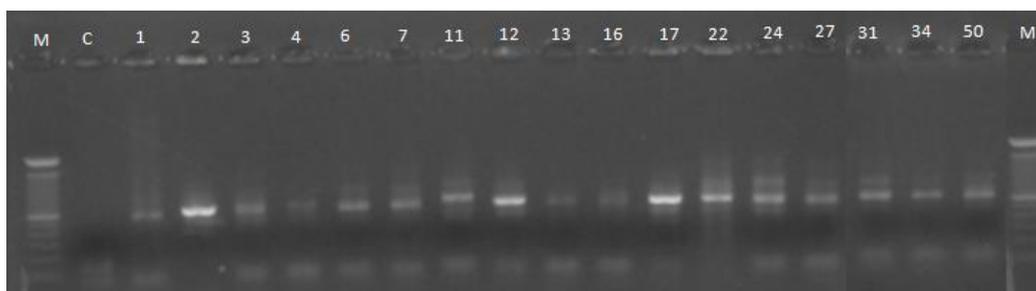


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR de 17 isolados de *Colletotrichum* com o uso dos *primers* ITS1/ITS4. M: marcador molecular ladder 100pb. 1 a 51: DNA dos isolados. C: controle.

Análise de sequências das regiões β -tubulina e fator de alongação

Um total de 26 isolados representando todos os grupos BOX/REP foram selecionados e tiveram fragmentos dos genes β -tubulina e fator de transcrição e alongação da RNA polimerase (EF1- α) sequenciados. Uma árvore filogenética foi gerada para cada fragmento dos genes citados anteriormente. Em Ambas, observou-se a formação de quatro grandes grupos do gênero *Colletotrichum* de acordo com as sequências dos bancos de dados públicos.

Esses agrupamentos apresentaram-se geralmente bem suportados pela análise de bootstrap e englobaram todos os grupos BOX/REP (Figuras 4 e 5). No entanto, não houve uma boa correspondência entre os grupos BOX/REP e os formados pela análise filogenética (Figuras 2, 4 e 5).

As árvores apresentaram basicamente os mesmos grupos de *Colletotrichum*, no entanto, existiram algumas diferenças: 1) Os grupos 6 e 9 foram classificados como *C. orchidearum* com base em sequências de EF1- α , e como *C. gloeosporioides* e *C. boninense* respectivamente, de acordo com β -tubulina; 2) O isolado 16 foi classificado como *C. orchidearum* de acordo com β -tubulina e como *C. orchidophilum*/*C. panacicola?* segundo sequências de EF1- α .

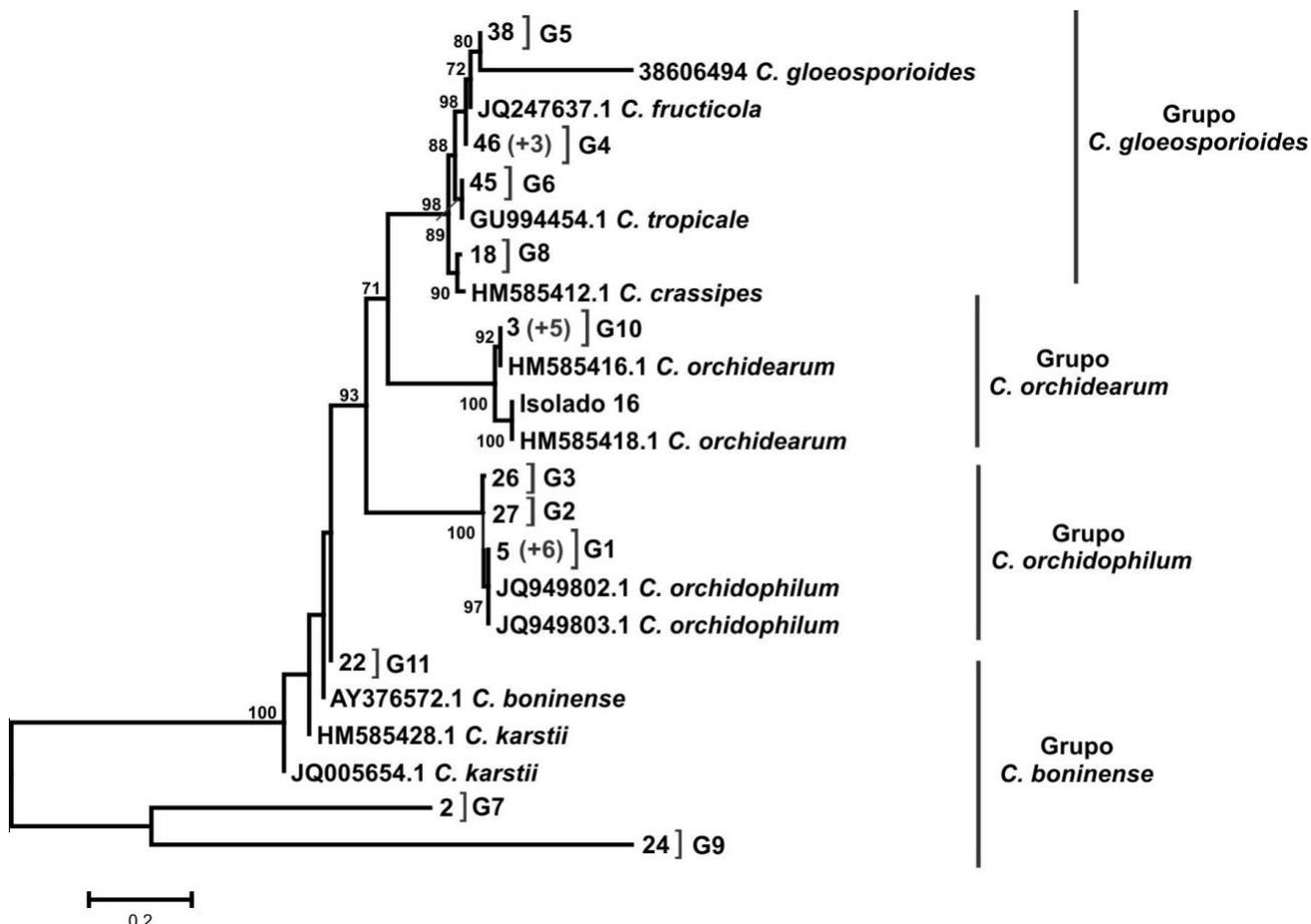


Figura 4. Árvore filogenética gerada a partir de 359 nucleotídeos alinhados de seqüências de um fragmento do gene β -tubulina. O agrupamento foi gerado com o método Neighbor-joining e modelo Kimura 2 parâmetros. Os valores de bootstrap (1000 repetições) acima de 70% são mostrados nos ramos correspondentes. O número de Isolados com seqüências idênticas em cada ramo é indicado entre parênteses. Os grupos BOX/REP são apresentados na frente dos colchetes e iniciam com a letra G. As barras verticais indicam isolados que pertencem aos grupos de *Colletotrichum* definidos nos bancos de dados.

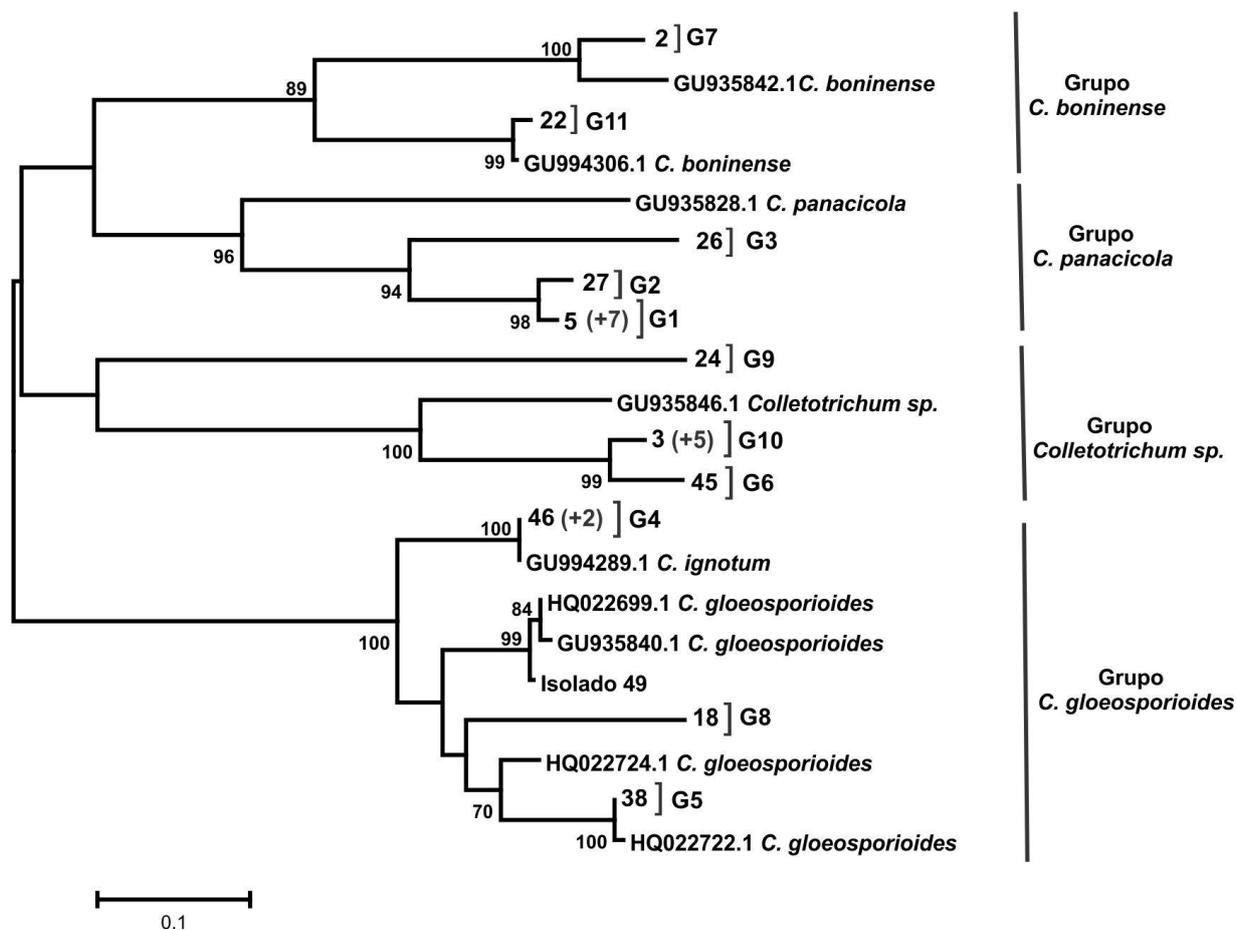


Figura 5. Árvore filogenética gerada a partir de 220 nucleotídeos alinhados de sequências de um fragmento do gene EF1 - α . O agrupamento foi gerado com o método Neighbor-joining e modelo Kimura 2 parâmetros. Os valores de bootstrap (1000 repetições) acima de 70% são mostrados nos ramos correspondentes. O número de Isolados com sequências idênticas em cada ramo é indicado entre parênteses. Os grupos BOX/REP são apresentados na frente dos colchetes e iniciam com a letra G. As barras verticais indicam isolados que pertencem aos grupos de *Colletotrichum* definidos nos bancos de dados.

DISCUSSÃO

Nesse trabalho, um estudo polifásico para identificação de 41 isolados de *Colletotrichum* obtidos de orquídeas foi realizado. Análises moleculares revelaram quatro grupos filogenéticos de *Colletotrichum*. Entretanto, esses grupos filogenéticos não foram correspondentes aos agrupamentos encontrados nas análises morfológicas e nas moleculares por BOX/REP.

O presente trabalho, assim como os apresentados por outros autores (CAI et al., 2009; HYDE et al., 2009; DU et al., 2005; LIU et al., 2012; MEHTA & MEHTA, 2010) demonstram que apenas os dados morfológicos são insuficientes para serem usados como caracteres de valor taxonômico em *Colletotrichum* spp. Essa dificuldade é decorrente de uma sobreposição das características morfológicas, não permitindo a definição de barreiras claras para a delimitação de espécies. Dentre as razões para a grande diversidade observada dentro de certas espécies de *Colletotrichum* está a capacidade que essas possuem de realizar anastomose de tubos conidiais. Esse fenômeno, redescoberto há alguns anos (ROCA et. al., 2004) pode ocorrer dentro da mesma espécie e entre espécies diferentes, em condições naturais ou artificiais (ROCA et. al., 2003). Ainda não se sabe ao certo a extensão das trocas de materiais genéticos e nem como o processo influencia especiação no gênero. No entanto, existem indicações de recombinação entre espécies dentro de certos grupos de *Colletotrichum* (ROCA et. al., 2004).

A taxonomia de *Colletotrichum* é complexa, apesar desse gênero de fungos ser estudado há muitos anos. No começo a identificação era realizada principalmente por meio de especificidade por plantas hospedeiras e análises morfológicas, causando uma grande confusão na taxonomia do gênero. Ao longo dos anos correções taxonômicas foram realizadas, no entanto, um melhor entendimento sobre a identificação principalmente em nível de espécie ocorreu no final do século XX (1990). Nesse período aconteceu o primeiro workshop internacional sobre *Colletotrichum* com a presença de vários taxonomistas que trabalhavam com biologia molecular. Diversas publicações sobre taxonomia molecular de *Colletotrichum* surgiram, e no século XXI começaram a ser mais exploradas (CANNON et al., 2012).

Estudos moleculares no gênero *Colletotrichum* por meio de análises de DNA demonstram maior confiabilidade na delimitação de espécies, mas mesmo com o uso desses caracteres, dificuldades tem sido encontradas dentro

de certos complexos de espécies, como por exemplo *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. boninense* (DAMM et al., 2012a; DAMM et al., 2012b; WEIR, 2012). Análises filogenéticas multilocus com uso de regiões informativas e isentas de recombinação deverão ser definidas para a definição de espécies desse gênero.

Marcadores moleculares como RAPD, AFLP e RFLP foram muito usados para estudos de diversidade em *Colletotrichum* (ALMEIDA & COELHO, 2007; BENTES & COSTA, 2011; RIBEIRO et al., 2009), porém, esses marcadores, por não refletirem a filogenia das espécies, não devem ser utilizados em estudos taxonômicos. De fato, os marcadores BOX e REP, aqui utilizados não corresponderam aos grupos filogenéticos encontrados com a análise de sequências dos genes B-tubulina e EF1- α . Os marcadores BOX e REP foram inicialmente desenvolvidos para bactérias, no entanto, foram utilizados com sucesso para o estudo da diversidade de muitos gêneros de fungos, inclusive de *Colletotrichum* (MAHUKU & RIASCOS, 2004; REDONDO et al., 2009; MEHTA & MEHTA, 2010; SUZUKI et al., 2010).

Alguns *primers* específicos foram desenvolvidos para a identificação de espécies de *Colletotrichum*, mas incongruências foram observadas por alguns autores (ALMEIDA & COELHO, 2007; ANDRADE et al., 2007). No presente trabalho também foi observado que um par de *primers* específico para *C. gloeosporioides* mostrou-se pouco útil, pois apresentou resultados erráticos, algumas vezes amplificando isolados pertencentes a outros grupos filogenéticos.

Todos os grupos filogenéticos determinados nas análises de sequências de fragmentos dos genes β -tubulina e EF1- α nesse trabalho foram encontrados anteriormente em associação com orquídeas. Os grupos *C. boninense*, *C. gloeosporioides* e *C. orchidearum* foram encontrados na China (YANG et al., 2011) e o grupo *C. orchidophilum* no Havaii (DAMM et al., 2012a). A especificidade por plantas hospedeiras foi um critério utilizado anteriormente para a delimitação de espécies (CANNON et al., 2012). Porém, diversos estudos demonstram que grupos como *C. gloeosporioides* e *C. boninense* podem ser patogênicos a uma ampla gama de plantas hospedeiras (KAFURI, 2003; DAMM et al., 2012b; WEIR et al., 2012). Por outro lado, alguns grupos, como *C. orchidearum* e *C. orchidophilum* parecem ter uma gama de hospedeiras ampla, mas limitada a família *Orchidaceae* (YANG et al., 2011; DAMM et al., 2012a).

Os grupos filogenéticos foram definidos com valores significativos de bootstrap no presente trabalho, mas mesmo assim reconhecemos que a análise apresenta limitações quanto ao número de caracteres analisados. Possivelmente essa tenha sido a razão para que alguns dos grupos mudaram de posição, como por exemplo, o 9 e o 6, quando os dendrogramas são comparados.

Amostragens incompletas e erros de nomenclatura nos bancos de dados são entraves para o estabelecimento de uma sistemática confiável para o gênero *Colletotrichum*. Segundo Cai et al., (2009) que realizou um estudo com 343 sequências da região ITS de *C. gloeosporioides* em banco de dados públicos, observou que mais de 80% estão nomeadas incorretamente. Além disso, assim como ocorre para certos microrganismos recombinogênicos (HANAGE et al., 2005), um continuum entre isolados de espécies relacionadas também pode ocorrer para *Colletotrichum* de certos grupos filogenéticos, dificultando a delimitação de espécies dentro desses complexos. Nesses casos, talvez a única solução viável seja aceitar que existe uma maior diversidade dentro desses grupos, devendo os mesmos serem classificados na mesma espécie.

Em resumo, nesse trabalho, isolados de *Colletotrichum* patogênicos a orquídeas foram classificados dentro dos grupos filogenéticos *C. gloeosporioides* e *C. boninense*, *C. orchidearum* e *C. orchidophilum*, que não corresponderam às análises morfológicas e com marcadores BOX e REP. Outros loci devem ser sequenciados para complementar a análise filogenética aqui apresentada.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em coletas realizadas foram encontradas ferrugens em mais duas espécies de orquídeas, *Oeceoclades macula* e *Polystachya concreta*. No entanto, apenas a fase uredinial das ferrugens foi observada, o que impossibilitou a identificação da espécie com precisão. Coletas futuras para encontrar a fase telial e identificar as espécies serão realizadas.

Novos loci serão sequenciados para complementar a análise filogenética dos isolados de *Colletotrichum*, e um estudo mais completo por meio da concatenação dos fragmentos dos genes será realizado.

Este estudo constitui um passo inicial para a identificação precisa ao nível de espécie dos 41 isolados de *Colletotrichum* patogênicos em plantas nativas e comerciais de orquídeas.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5ª ed. California: Elsevier, 2004. 1936 p.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa. Editora UFV. 1ª ed. 2007.

ALMEIDA, L. C. C.; COELHO, R.S.B. **Caracterização da agressividade de isolados de *Colletotrichum* de maracujá amarelo com marcadores bioquímico, fisiológico e molecular**. Fitopatologia Brasileira, v.32, p.318-328, 2007.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

ANDRADE, E.M., UESUGI, C.H., UENO, B. & FERREIRA, M.A.S.V. **Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro**. Fitopatologia Brasileira, v.32, p. 021–031, 2007.

ANEFALOS, L. C. **Modelo insumo – produto como instrumento de avaliação econômica da cadeia de suprimentos: o caso da exportação de flores de corte**. 2004. Tese (Doutorado em Ciências, Área de Concentração: Economia aplicada) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ, Piracicaba, 2004.

ATKINS, S. D.; CLARK, I.M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal of Applied Genetics**, v. 45, n. 1, p.3 – 15, 2004.

BAG, T. K. **Two New Orchid Hosts of *Sclerotium rolfsii* Sacc. from India**. New Disease Reports, v. 8, n. 20, 2003.

BARROS, A. P. O.; XAVIER, A. S.; ARRUDA, L. A. M.; ALMEIDA, A. P.; MELO, A. P.; ALVES, A. O.; MONTEIRO, J. H. A.; GALDINO, R. M. N. **Manchas foliares em *Catasetum expansum* (Orchidaceae) incitadas por *Colletotrichum* sp.** IX Jornada de ensino, pesquisa e extensão, JEPEX. Recife, PE, 2009.

BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M. 2012. **Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000179>).

BENTES, J. L. S.; COSTA, P. Q. **Variabilidade genética de *Colletotrichum guaranicola* usando marcadores AFLP**. Acta amazônica, v.41, n.2, 2011.

BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia volume :1 princípios e conceitos**. Ed: 3°, São Paulo: ed, Agronômica Ceres Ltda, 1995.

BEZERRA, J.L. & RAM, A. **A crosta-negra da baunilha (*Vanilla fragans*) causada por *Mycoleptodiscus indicus* (Moniliales, Hiphomycetes)**. Fitopatologia Brasileira, v.11, p.717-724, 1986.

BURNETT, H.C. Rust, *Sphenospora kevorkianii* Linder, on *Epidendrum tampense* orchids in Florida. Plant Pathology Circular. N 132, 1973.

BUAINAIN, A. M.; BATALHA, M. O. **Cadeia produtiva de flores e mel/ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Política Agrícola, Instituto Internacional de Cooperação para a Agricultura**. – Brasília: IICA: MAPA/SPA, 2007, 140p.

CABRERA, M. G.; GALMARINI, M. R.; FLACHSLAND, E. ***Colletotrichum gloeosporioides*, patógeno de orquídeas en el noreste de Argentina**. Manejo integrado de plagas y agrecología, n. 68, p. 57 – 61, 2003.

CAI, L.; HYDE, K.D.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; WALLER, J.; ABANG, M.M.; ZHANG, J.Z.; YANG, Y.L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z.Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R.G.; MCKENZIE, E. H. C.; JOHNSTON, P. R. A. **A polyphasic approach for studying *Colletotrichum***. Fungal Diversity, v. 39, p. 183 – 204, 2009.

CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S. ***Colletotrichum* – current status and future directions**. Studies in Mycology, v. 73, 2012.

CANO, J.; GUARRO, J.; GENE, J. **Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest**. Journal of Clinical Microbiology, v. 42, p. 2450 – 2454, 2004.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. **A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes**. Mycologia, v.91, p.553 – 556, 1999.

CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C.; GOODAY, W. G. **The fungi**. Londres: Academic Press, 1994.

CHUNG, C. W.; CHEN, L. W.; HUANG, J. H.; HUANG, H. C.; CHUNG, H. W. A new 'forma specialis' of *Fusarium solani* causing leaf yellowing of *Phalaenopsis*. *Plant Pathology*, v. 60, p. 244 – 252, 2011.

CLARO, D. P. **Análise do complexo agroindustrial das flores do Brasil**. 1998. Dissertação (M.S.) – Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, 1998.

COUTINHO, L.N.; TOFOLI, J.G.; TAKADA, H.M.; FIGUEIREDO, M.B. **Aspectos fitossanitários das orquídeas**. São Paulo: Instituto Biológico. 1998.

COSTA, C. R. **Fungos associados às plantas ornamentais tropicais no Distrito Federal**. 2007. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade de Brasília, UNB, Brasília, 2007.

COTO, G. R.; MOREIRA, G. C. **Problemas fitosanitarios que amenazan la conservación de las orquídeas en Costa Rica**. *Lankesteriana*, v.7, p. 347-352, 2007.

CUMMINS, B. G.; HIRATSUKA, Y. **Illustrated Genera of Rust Fungi**. The American Phytopathological Society. USA. 2003.

CÚNDOM, M. A.; GALDEANO, E.; TARRAGÓ, J. R.; FLACHSLAND E. ***Sphenospora kevorkianii* on the orchids *Epidendrum paniculatum* and *Stanhopea graveolens* newly reported in Argentina**. *Plant Pathology*, v. 58, p. 401, 2009.

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

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; CROUS, P. W. **The *Colletotrichum acutatum* species complex**. *Studies in Mycology*, v. 73, p. 37–113, 2012a.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S.; TAN, Y. P.; SHIVAS, R. G. CROUS, P. W. **The *Colletotrichum boninense* species complex**. *Studies in Mycology*, v. 73, p. 1-36, 2012b.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J. L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. *Focus*, v. 12, p. 13-15, 1990.

DU, M.; SCHARDL, C. L.; NUCKLES, E. M.; VAILLANCOURT, L. J. **Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Collectotrichum* species complexes.** Mycologia, v. 97, n.3, p.641-658, 2005.

HAMPL, V.; PAVLICEK, A.; FLEGR, J. **Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites.** International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology, v.51, p.731-735, 2001.

HIBBETT, D.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P. F.; ERIKSSON, O. E.; HUHNENDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P. M.; LUCKING, R.; LUMBSCH, H. T.; LUTZONI, F.; MATHENY, P. B.; MCLAUGHLIN, D. J.; POWELL, M. J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C. L.; SPATAFORA, J. W.; STALPERS, J. A.; VILGALYS, R.; AIME, M. C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G. L.; CASTLEBURY, L. A.; CROUS, P. W.; DAÍ, Y. C.; GAMS, W.; GEISER, D. M.; GRIFFITH, G. W.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D. L.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HEMBER, R. A.; HYDE, K. D.; IRONSIDE, J. E.; KÖLJALG, U.; KURTZMAN, C. P.; LARSSON, K. H.; LICHTWARDT, R.; LONGCORE, J.; MIADLIKOWSKA, J.; MILLER, A.; MONCALVO, J. M.; STANDRIDGE, S. M.; OBERWINKLER, F.; PARMASTO, E.; REEB, V.; ROGERS, J. D.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J. P.; SCHUBLER, A.; SUGIYAMA, J.; THORN, R. G.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W. A.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, Z.; WEISS, M.; WHITE, M. M.; WINKA, K.; YOA, Y. J.; ZHANG, N. **A higher-level phylogenetic classification of the Fungi.** ScienceDirect, p. 509 – 547, 2007.

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

FERNANDES, M. F. G.; OLIVEIRA, C. S.; SIMÕES, M. O. M.; MOTA, B. C. F. **Aplicações terapêuticas de orquídeas.** III Fórum gestão, pesquisa, ensino e extensão, Montes Claros. Resumo expandido, 2009.

FERREIRA, J. B.; ABREU, M. S.; PEREIRA, I. S. **Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos de *Coffea arabica* L. em diferentes estádios fisiológicos e tecidos do fruto maduro.** Ciência e agrotecnologia, v. 29, n. 4, 2005.

FRANÇA, F. F. **Uredinales (Basidiomycota) da Reserva Biológica do Lago Piratuba e entorno, Amapá, Brasil.** 2007. Dissertação (mestrado em Botânica) - Universidade Federal Rural da Amazônia, UFRA, Amapá, 2007.

FRANÇA, C. A. M.; MAIA, M. B. R. **Panorama do agronegócio de flores e plantas ornamentais no Brasil**. In: WLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, Rio Branco, 2008.

FREEMAN, S.; MINZ, D.; MAYMON, M.; ZVEIBIL, A. **Genetic Diversity Within *Colletotrichum acutatum sensu Simmonds***. *Phytopathology*, v. 6, p. 586, 2001.

GIORIA, R. **D and P que atacam as orquídeas**. Ed: Brasil Orquídeas Ltda. Taubaté, São Paulo. 2002.

GIORIA, R. **Pragas e doenças na orquidofilia**. Clube da Orquídea. São Paulo. 2006.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. **Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes**. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p.1323 – 1330, 1995.

GONZÁLEZ, A.F.R. **Caracterización molecular de poblaciones de *Colletotrichum* spp. asociadas a *Coffea arábica* em Colombia y su aplicación em El diagnóstico**. 2007 – Dissertação (mestrado em Microbiólogo industrial), Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2007.

GUARRO, J. GENE, J. STCHIGEL, A. M. **Developments in fungal taxonomy**. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 1999.

HANAGE, W. P.; FRASER, C.; SPRATT, B. G. **Fuzzy species among recombinogenic bacteria**. *BMC Biology*, v.3, 2005.

HENNEN, J. F.; FIGUEIREDO, M. B.; CARVALHO Jr, A. A.; HENNEN, P. G. 2005. **Catalogue of species of plant rust fungi (Uredinales) of Brazil**. Disponível: http://www.jbrj.gov.br/em_publicações/publicações_gerais. Consultado em 15/10/2011.

HYDE, K. D.; CAI, L.; MCKENZIE, E. H. C.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z.; PRIHASTUTI, H. ***Colletotrichum*: a catalogue of confusion**. *Fungal Diversity*, v.39, p. 1 – 17, 2009.

SCHOENMAKER, K. **Ibraflor – Release Imprensa**. Instituto Brasileiro de Floricultura, Holambra, SP, 2012.

IMENES, S. D. L.; ALEXANDRE, M. A. V. **Pragas e doenças em plantas ornamentais**. São Paulo: Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Instituto Biológico, 2001.

KAFURI, L.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. **Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus**. *Phytopathology*, v.93, p.579-587, 2003.

KASULO, V.; MWABUMBA, L.; CRY, M. **A review of edible orchids in Malawi**. *Journal of Horticulture and Forestry*, v. 1, p. 133-139, 2009.

KLEIN, E. H. S. – **Levantamento e Desenvolvimento de Kit Diagnóstico de Patógenos e Propagação In Vitro de Orquídeas no Estado do Rio de Janeiro**. 2008 Dissertação (mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, 2008.

KIMATI, H; AMORIM, L; REZENDE, J. A. M; BERGAMIM FILHO. A; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia doenças das plantas cultivadas**, Vol. 2. Quarta edição. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.

LATUNDE, D. A . O. ***Colletotrichum*: Tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout**. *Molecular. Plant Pathology*, v. 2, p. 187 - 198, 2001.

LIU, B.; LOUWS, F. J.; SUTTON, T. B. **A rapid qualitative molecular method for the identification of *Colletotrichum acuntatum* and *C. gloeosporioides***, v. 132, p. 593, 2012.

MANARINI, A.; AGNES, R. **Orquídeas Brasileiras em Foco**. ED. Ver curiosidades. 1994.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; VENTURA, G. M.; ALFENAS, R. F. **Antracnose em *Paphiopedilum insigne* (Orquidaceae) causada por *Colletotrichum gloeosporioides***. *Fitopatologia Brasileira*, v.30, n. 4, 2005.

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

MEHTA, Y. R.; MEHTA, A. **Variabilidade genética entre isolados de *Colletotrichum gossypii* do algodoeiro.** Summa Phytopathologica. Botucatu, v. 36, n.1, p.40 - 44, 2010.

MENDES, M. A. S.; URBEN, A. F.; **Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp>. Acesso em: 23/10/2012.

MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. **Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* using PCR.** FEMS Microbiology Letters. Amsterdam, v. 98, p.137-144, 1992.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Agenda estratégica 2010 – 2015 flores e plantas.** Brasília, 2011.

MORAES, C. P.; SOUZA, M. C.; RONCONI, C. C.; MARTELINE, M. A. **Response of *Cattleya* Hybrids for *Fusarium oxysporum* f. sp. *cattleyae* Foster.** Brazilian archives of biology and technology, v.54, n.2, p. 267 – 271, 2011.

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

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics.** Ed: Oxford University Press, New York. 2000.

NOGUEIRA, R. E. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de orquídeas.** 2004. Tese (Doutorado em Microbiologia agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, 2004.

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

PAULA, C.C., SILVA, H.M.P. **Cultivo prático de orquídeas.** Viçosa: UFV. 2004.

PILEGGI, S.A.V.; OLIVEIRA, S.F.V.; WACULICZ-ANDRADE, C.E.; VICENTE, V.A.; DALZOTO, P.R.; CRUZ, G.K.; GABARDO, J.; MASSOLA, N.Jr.;

TORRES, H.J. Jr.; PILEGGI, M.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLI-TERESAWA, L.V.; PIMENTEL, I.C.; GLIENKE, C. **Molecular and Morphological Identification of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum boninense* isolated from *Maytenus ilicifolia*, Canadian.** Journal of Microbiology, v. 55, p. 1076 - 1088, 2009.

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

PRUSKY, D. **Pathogen quiescence in postharvest diseases.** Annual Review of Phytopathology, v.34, p. 413 – 434, 1996.

RAMPERSAD, S. N. **Molecular and Phenotypic Characterization of *Colletotrichum* Species Associated with Anthracnose Disease of Papaya in Trinidad.** Plant Disease, v. 95, n. 10, 2011.

REDONDO, C.; CUBERO, J.; MELGAREIO, P. **Characterization of *Penicillium* Species by Ribosomal DNA Sequencing and BOX, ERIC and REP-PCR Analysis.** Mycopathologia, v. 168, p. 11 - 22, 2009.

RIBEIRO, D. C.; BOGO, A.; DANTAS, A. C. M.; GOMES, E. A.; COELHO, C. M. M.; GUIDOLIN, A. F. **Comparação das técnicas de PCR-RFLP e sequenciamento de região ITS-rDNA para análise filogenética de isolados de *Colletotrichum* spp.** Revista de Ciências Agroveterinárias, v.8, n.1, p.43-52, 2009.

RITSCHER, A.; OBERWINKLER, F.; BERNDT, R. ***Desmosorus*, a new rust genus (Uredinales).** Mycological Progress, v. 4, p. 333 – 338, 2005.

ROCA, M. G.; DAVIDE, L. C.; COSTA, M. C. M.; WHEALS, A. **Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum*.** Fungal Genetics and Biology, v. 40, p. 138 – 145, 2003.

ROCA, M. G.; DAVIDE, L. C.; DAVIDE, L. M.; COSTA, M. C. M.; SCHWAN, R. F. WHEALS, A. E. **Conidial anastomosis fusion between *Colletotrichum* species.** Mycological Research, v.108, n.11, p.1320-1326, 2004.

ROJAS, E. I.; REHNER, S. A.; SAMUELS, G. J.; VAN BAELE, S. A.; HERRE, E. A.; CANNON, P.; CHEN, R.; PANG, J.; WANG, R.; ZHANG, Y.; PENG, Y.; SHA, T. ***Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes.** Mycologia, v.102, n.6, p. 1318-1338, 2010.

SALAZAR, Y. M.; BURITICÁ C. P. **Nuevos registros de hospedantes para la Uredomicota colombiana**. Revista Facultad Nacional de Agronomía, v. 55, p. 1615-1632, 2002.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

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

SANTOS JÚNIOR, N.A.S.; BOTELHO, S.A.; DAVIDE, A.C. **Estudos da germinação e sobrevivência de espécies arbóreas em sistemas de semeadura direta, visando à recomposição de mata ciliar**. Cerne, v. 10, n. 1, p. 103-117, 2004.

SILVA, E. N. S.; SCUDELLER, V. V. **Diversidade Biológica e Sociocultural do Baixo Rio Negro, Amazônia Central**. V, 2. Manaus: Ed: UEA, 2009.

SOUSA, E. M. R. **Levantamento de fungos causadores de doenças em orquídeas no estado da Bahia**. In: 60° Congresso Nacional de Botânica, 2009. Resumo.

SOUSA, E. M. R. **Fungos causadores de doenças em orquídeas**. 2010. Trabalho de graduação (graduação em Bacharelado em Biologia) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, UFRB, Cruz das Almas, 2010.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005.

SREENIVASAPRASAD, S.; MILLS, P.R.; MEEHAN, B. M.; BROWN, A. E. **Phylogeny and systematic of *colletotrichum* species based on ribosomal dna spacer sequences**. Genome, v. 39, p. 499 – 512, 1996.

SUZUKI, T.; MIWA, C. T.; EBIHANA, Y.; ITO, Y. **Genetic polymorphism and virulence of *Colltotrichum gloeosporioides* isolated from strawbwrry (*Fragaria x ananassa* Duchesne)**. Journal of General Plant Pathology, 2010.

SWARTS, N. D.; DIXON, K. W. **Terrestrial orchid conservation in the age of extinction**. *Annals of Botany*, v. 104, p. 543 – 556, 2009.

TAKANE, J. T.; FARIA, R. T.; ALTAFIN, V. L. **Cultivo de orquídeas**. Ed: LK, 2006.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. **MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods**. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, p. 2731 - 2739, 2011.

TSAI, A. C.; PAN, S. L.; LIAO, C. H.; GUH, J. H.; WANG, S. W.; SUN, H. L.; LIU, Y. N.; CHEN, C. C.; SHEN, C. C.; CHANG, Y. L.; TENG, T. M. **Moscatilin, a bibenzyl derivative from the India orchid *Dendrobium loddigesii*, suppresses tumor angiogenesis and growth *in vitro* and *in vivo***. *Cancer Letters*, v.292, p. 163-170, 2010.

VAN DEN BERG, C.; C.O. AZEVEDO. No prelo. **Orquídeas da Chapada Diamantina**. In: L.S. Funch, L.P. Queiroz & R.R. Funch (eds.). *Biodiversidade da Chapada Diamantina*. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Brasil. 2004.

VECANTO, A.; SILVA, C.; REETZ, E.; Da ROSA, G. R.; RIGON, L.; RUDOLFO, R. **Anuário brasileiro das flores 2006**. Ed. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, p. 112, 2006.

VINNERE, O. **Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study of two extreme cases**. Uppsala: Faculty of Science and a Technology, 2004.

YANG, Y.L.; LIU, Z.Y.; CAI, L.; HYDE, K.D.; YU, Z.N.; MCKENZIE, E.H.C. ***Colletotrichum* anthracnose of *Amaryllidaceae***. *Fungal Diversity*, v.39, p.123-146, 2009.

YANG, Y.; CAI, L.; YU, Z.; LIU, Z.; HYDE, K. D. ***Colletotrichum* species on *Orchidaceae* in southwest China**. *Mycologie*, v. 32, n.3, p.229-253, 2011.

YEPES, M. S.; CARVALHO Jr. A. A. C. **Ferrugem: diversidade de Uredinales do parque Nacional do Itatiaia, Brasil**. Ed: Technical books, Rio de Janeiro. 2010a.

YEPES, M. S.; CARVALHO Jr., A. A. C. **Novos registros de ferrugens (fungi, Uredinales) para o Brasil, coletados no Parque Nacional do Itatiaia.** Acta Botanica Brasilica, v. 24, n.2, p. 378 – 385, 2010b.

WATSON, J. B. **Orchid pests and diseases.** American orchid society. Florida, 2008.

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

WHITE Jr., J. F.; MORROW, A. C. **Endophyte-host associations in forage grasses.** XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. Mycologia, v. 82, p.218-226, 1990.