



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de mestrado

**Diversidade de espécies de *Colletotrichum*
endofíticos em Cajueiros**

Diana Gissell Barreto Ramos

Recife – PE

2023

DIANA GISSELL BARRETO RAMOS

Diversidade de espécies de *Colletotrichum*
endofíticos em Cajueiros

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós- Graduação em
Fitopatologia da Universidade
Federal Rural de Pernambuco,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Marcos Paz Saraiva Câmara, Ph.D. (DEPA/UFRPE)

Coorientador: Dr. Willie Anderson dos Santos Vieira (Departamento de
Micologia/UnB)

RECIFE - PE

JULHO - 2023

Dados Internacionais de Catalogação
na Publicação Universidade Federal
Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos
pelo(a) autor(a)

- R175d Ramos, DIANA GISSELL BARRETO
Diversidade de espécies de Colletotrichum endofíticos em Cajueiros: Estudo de diversidade de Colletotrichum /DIANA GISSELL BARRETO Ramos. - 2023.
54 f. : il.
- Orientador: Marcos Paz
Saraiva Camara.
Coorientador: Willie
Anderson dos Santos .Inclui
referências e anexo(s).
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, 2023.
1. Anacardium occidentale L.. 2. antracnose. 3. prevalência. 4. patogenicidade. I. Camara, Marcos Paz Saraiva, orient. II. , Willie Anderson dos Santos, coorient. III. Título

Diversidade de espécies de *Colletotrichum* endofíticos em Cajueiros

Diana Gissell Barreto Ramos

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 05/07/2023

ORIENTADOR:

Prof. Marcos Paz Saraiva Câmara, Ph.D. (UFRPE)

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Alexandre Sandri Capucho (UNIVASF)

Prof.^a Dr.^a Elineide Barbosa de Sousa (UFRPE)

RECIFE - PE
JULHO - 2023

Desde el cielo regando mis siembras y en la tierra fertilizando mi
suelo

In memoriam Misael

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

A Deus pela iluminação durante essa trajetória.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo concedida e pelo suporte para a realização deste trabalho. A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) pelo apoio institucional.

Ao professor Marcos Câmara e ao meu coorientador Willie Anderson, pela orientação, confiança e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao meu pai que sempre me apoiou em todas minhas ocorrências, e minha mãe que me ensinou a ser perseverante e lutar por meus sonhos.

Aos meus amigos do Laboratório de Micologia Ana Gabriele, Ingrid e Anthony pelo suporte e paciência nos trabalhos, pelas motivações e risadas que fizeram meus dias menos difíceis.

As minhas amigas da casa 56 Nanda e Larisse que me acolheram aqui em Recife e tiveram paciência em compreender-me. A Nanda pelas saídas conselhos e desafogos do meu dia a dia.

Ao meu amigo Marcos que me incentivou e ajudou desde o primeiro momento na realização de um mestrado e pelo apoio incondicional nos momentos difíceis.

Ao meu amigo Gabriel pela amizade e momentos de descontração.

Ao meu amigo Alex que desde a distância me mantém informada de todo.

À todos os professores do PPGF/UFRPE pelos ensinamentos transmitidos ao longo do curso.

À Romildo, secretário do PPGF, quem sempre auxilia os alunos.

A Adelmo e Seu Luiz pelo apoio nos trabalhos na casa de vegetação.

A Sra Eliane e Seu Luiz pelos momentos de descontração depois da rotina de laboratório.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a construção deste momento em minha vida.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO GERAL.....	vii
GENERAL ABSTRACT	viii
CAPÍTULO I.....	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
CAPÍTULO II.....	23
RESUMO	24
ABSTRACT	24
1. Introduction	25
2. Material and methods	26
3. Results	30
4. Discussion.....	32
5. Acknowledgments.....	35
6. References	35
CAPÍTULO III.....	53
Conclusões Gerais.....	54

RESUMO GERAL

Nativo da América do Sul, o cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma das espécies frutíferas cultivadas mais importantes das regiões tropicais. No Brasil, a produção se concentra na região do Nordeste, representando 99,5% da área cultivada do país. Não obstante, nos últimos anos a produtividade vem diminuindo devido a diversos fatores, dos quais a mais importante é a incidência de doenças. Antracnose é a principal doença do cajueiro ocorrendo em todo o país e ocasionada por diversas espécies do gênero *Colletotrichum*. Estudos anteriores investigaram as espécies sintomáticas associados ao cajueiro, porém a diversidade de espécies endofíticas ainda não foram estudadas. Diante disso no presente estudo objetivou-se avaliar a diversidade de espécies endofíticas de *Colletotrichum* do cajueiro no estado de Pernambuco, identificar essas espécies através de análises filogenéticas, avaliar a prevalência de espécies de *Colletotrichum* em diferentes órgãos do cajueiro e por último avaliar a patogenicidade e agressividade em folhas de cajueiro. Um total de 37 isolados foram recuperadas em duas áreas de plantio não comerciais, 12 isolados da área I (UFRPE) e 25 isolados da área II (UFPE). Foram testados diferentes métodos de inoculação. Seis espécies de *Colletotrichum* (*C. asianum*, *C. chrysophilum*, *C. karsti*, *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. tropicale*) foram identificadas como endofíticos de cajueiros. *Colletotrichum tropicale* foi a espécie prevalente em todas as áreas e em todos os tecidos vegetais coletados. Tecidos maduros foram os órgãos mais colonizados por espécies endofíticas de *Colletotrichum*. Todas as espécies de *Colletotrichum* foram patogênicas a folhas de cajueiro com ferimento, entretanto os métodos sem ferimento não apresentaram lesões significativas. Quanto a agressividade, *C. siamense* foi a espécie mais agressiva em relação a outras espécies.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale* L.; antracnose; prevalência; patogenicidade.

GENERAL ABSTRACT

Native to South America, the cashew tree (*Anacardium occidentale* L.) is one of the most important cultivated fruit species in tropical regions. In Brazil, production is concentrated in the Northeast region, representing 99.5% of the cultivated area in the country. However, in recent years productivity has been decreasing due to several factors, the most important of which is the incidence of diseases. Anthracnose is the main cashew disease occurring throughout the country and caused by several species of the genus *Colletotrichum*. Previous studies have investigated the symptomatic species associated with cashew trees, but the diversity of endophytic species has not yet been studied. In view of this, the present study aimed to evaluate the diversity of endophytic species of *Colletotrichum* in the cashew tree in the state of Pernambuco, to identify these species through phylogenetic analyses, to evaluate the prevalence of *Colletotrichum* species in different organs of the cashew tree and, finally, to evaluate the pathogenicity and aggressiveness in cashew leaves. A total of 37 isolates were recovered from two non-commercial plantation areas, 12 isolated from area I (UFRPE) and 25 isolated from area II (UFPE). Different inoculation methods were tested. Six species of *Colletotrichum* (*C. asianum*, *C. chrysophilum*, *C. karsti*, *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. tropicale*) were identified as endophytes of cashew trees. *Colletotrichum tropicale* was the prevalent species in all areas and in all plant tissues collected. Mature tissues were the organs most colonized by endophytic species of *Colletotrichum*. All *Colletotrichum* species were pathogenic to wounded cashew leaves, however the methods without wounding did not show significant lesions. As for aggressiveness, *C. siamense* was the most aggressive species compared to other species.

Keywords: *Anacardium occidentale* L.; anthracnose; prevalence; pathogenicity.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

Diversidade de espécies de *Colletotrichum* endofíticas em Cajueiros

INTRODUÇÃO GERAL

1. A cultura do cajueiro

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) pertence à família Anacardiaceae, a qual compreende cerca de 74 gêneros e 600 espécies de árvores e arbustos tropicais e subtropicais, com poucos representantes de clima temperado. Botanicamente, as anacardiáceas incluem árvores e arbustos com canais de resina, casca resinosa e exsudatos claros a leitosos, folhas alternadas, trifoliadas ou pinadas e flores geralmente não muito visíveis (DE PAIVA *et al.*, 2003).

Atualmente são conhecidas nove espécies do gênero *Anacardium*: *A. corymbosum* Barb.Rodr.p, *A. excelsum* L., *A. giganteum* Skeels, *A. humile* Hance ex Engl., *A. microcarpum* A.St.-Hil.ppp, *A. nanum* A.St.-Hil., *A. negrense* Pires & Froes, *A. occidentale* Terra A. *spruceanum* Benth. ex Engl. De todos, apenas o cajueiro comercial (*A. occidentale*) possui importância econômica (HABIBU *et al.*, 2021).

O principal centro de diversidade do gênero *Anacardium* é a região Amazônica, porém a maior diversidade de *A. occidentale* está no Nordeste brasileiro, onde pode ser encontrado de forma espontânea em diversos ecossistemas ou como cultura econômica. Atualmente, o caju é produzido em 32 países do mundo com clima quente e úmido. Os principais produtores são Costa do Marfim, Índia, Vietnã, Guiné Bissau, República do Benin, Brasil, Filipinas, Sri Lanka, Tanzânia (HABIBU *et al.*, 2021). Por sua origem tropical, o cajueiro desenvolve-se bem em temperaturas variando de 22°C a 40°C. Porém, 27°C é a temperatura média ideal para a frutificação, que ocorre na estação seca e leva cerca de 60 dias da frutificação até a colheita (CRISÓSTOMO *et al.*, 2004).

No Brasil a área de produção concentra-se no Nordeste, onde é uma cultura de elevada importância socioeconômica, e ocupa área de plantio de 439,2 mil ha, representando 99,5% da área do caju plantado no país (BRAINER; VIDAL, 2020). As maiores áreas de produção concentram-se no Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte, correspondendo a 90,6% da produção nacional (BRAINER, 2021). A produção desses estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte representa ao 90,6% da produção nacional (BRAINER, 2021).

O principal produto do cajueiro é o fruto conhecido como a amêndoa localizada no

interior da castanha. Da castanha-de-caju pode ser extraída a película que reveste a amêndoa, rica em tanino e utilizada na indústria química de tintas e vernizes. O resíduo da casca também é utilizado como fonte de energia nas indústrias, por meio de sua queima em fornalhas (SERRANO; PESSOA, 2016).

O pseudofruto do caju é processado por indústrias ou minifábricas para a obtenção do suco ou da polpa congelada, também pode ser aproveitado para a fabricação de produtos doces e na alimentação animal (PAIVA *et al.*, 2019). Também é comercializado *in natura* em feiras e supermercados (SERRANO *et al.*, 2013). Vários fatores limitam a expansão da cajucultura como agronegócio. Dentre estes fatores destaca-se a presença de fitopatógenos que podem reduzir a produtividade e a qualidade pós-colheita dos frutos e pseudofrutos.

2. Doenças do cajueiro

Atualmente tem sido relatada a ocorrência de doenças causadas por bactérias como mancha de *Xanthomonas* (*X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* Pammel) e mancha angular (*X. citri* pv. *anacardii* Nayudu) (GAMA *et al.*, 2015). Doenças ocasionadas por vírus ainda não foram relatadas no cajueiro (WONNI *et al.*, 2017). Dentre as doenças fúngicas, destacam-se o oídio (*Erysiphe quercicola* S. Takam. & U. Braun) (MARTINS *et al.*, 2021), mofo-preto (*Pilgeriella anacardii* Arx & Müller), resinose (*Lasiodiplodia theobromae* Pat.) e a antracnose (*Colletotrichum* spp.) (MARTINS *et al.*, 2016).

3. A antracnose do cajueiro

A antracnose é a doença mais importante do cajueiro no Brasil, ocorrendo em todas as regiões produtoras. A doença é caracterizada por lesões numerosas em qualquer parte da planta, de fácil reconhecimento, sendo mais encontradas em folhas novas (CARDOSO; LIMA, 2013). As folhas novas, inicialmente apresentam manchas necróticas de coloração parda e de coloração avermelhada em folhas velhas, com formatos irregulares e de tamanhos variáveis. As folhas acometidas geralmente apresentam encarquilhamento em consequência do crescimento desigual dos tecidos sadios e os tecidos afetados (GAMARRA-ROJAS *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2019). Na inflorescência, no início observa-se queda e queima das flores apresentando lesões necróticas nas hastes florais, com formato alongado que crescem até atingir a inflorescência. Nos frutos acomete desde o estágio inicial no pomar até o estágio pós-colheita (CARDOSO; LIMA, 2013). As lesões são escuras, deformadas e atrofiados, já nos frutos

maduros apresentam lesões necróticas, escuras, deprimidas, exibindo fendilhamento da área necrosada (SOUZA *et al.*, 2019). No pseudofruto, observa-se lesões escuras, deprimidas, irregulares e arredondadas, rachaduras ao passo que os frutos imaturos, quando infectados tornam-se escuros, deformados ou atrofiados e caindo prematuramente (Veloso *et al.*, 2022).

O ciclo de infecção do *Colletotrichum* varia estilos de vida conforme o hospedeiro, podendo infectar diferentes tecidos (DOWLING *et al.*, 2020). O patógeno penetra no tecido do hospedeiro de forma direta (superfície intacta do hospedeiro) ou indireta (aberturas naturais ou ferimentos) em qualquer estágio do desenvolvimento da planta.

A interação do *Colletotrichum* com a planta hospedeira é caracterizada por uma curta fase hemibiotrófica, seguida de uma fase necrotrófica na qual hifas secundárias crescem e secretam enzimas de degradação da parede celular, matando as células hospedeiras. A infecção geralmente começa através da formação de um apressório, que se desenvolve a partir da germinação do esporo na superfície da planta, seguida pela penetração direta e pelo rompimento da cutícula e da parede celular epidérmica (Figura 1). A penetração ocorre mecanicamente em associação de enzimas que atacam componentes da parede celular, seja da presença de lesão na cutícula, aberturas estomáticas ou outros tipos de aberturas naturais. Após a penetração, o patógeno pode permanecer em estado de quiescência ou endofítica, ou seja, os tecidos das plantas podem estar infectados sem apresentar nenhum tipo de sintoma; ou desenvolver-se intra e/ou intercelularmente resultando em lesões oriundas da fase necrotrófica (VELOSO *et al.*, 2022; JAYAWARDENA *et al.*, 2021; DE SILVA *et al.*, 2017).

Após a infecção extensa ocorre um colapso na cutícula do hospedeiro, formando uma massa de micélio que rompe a cutícula do hospedeiro e forma um acérvulo contendo conídios, que logo são dispersos (inóculo secundário da doença). O patógeno continua a produzir conídios, os quais são disseminados por respingos de água que dissolvem a mucilagem na qual estão imersos, dando início aos ciclos secundários da doença. A senescência do tecido hospedeiro pode induzir o desenvolvimento do estágio sexuado para reiniciar o ciclo de vida. (VELOSO *et al.*, 2022; JAYAWARDENA *et al.*, 2021; DE SILVA *et al.*, 2017).

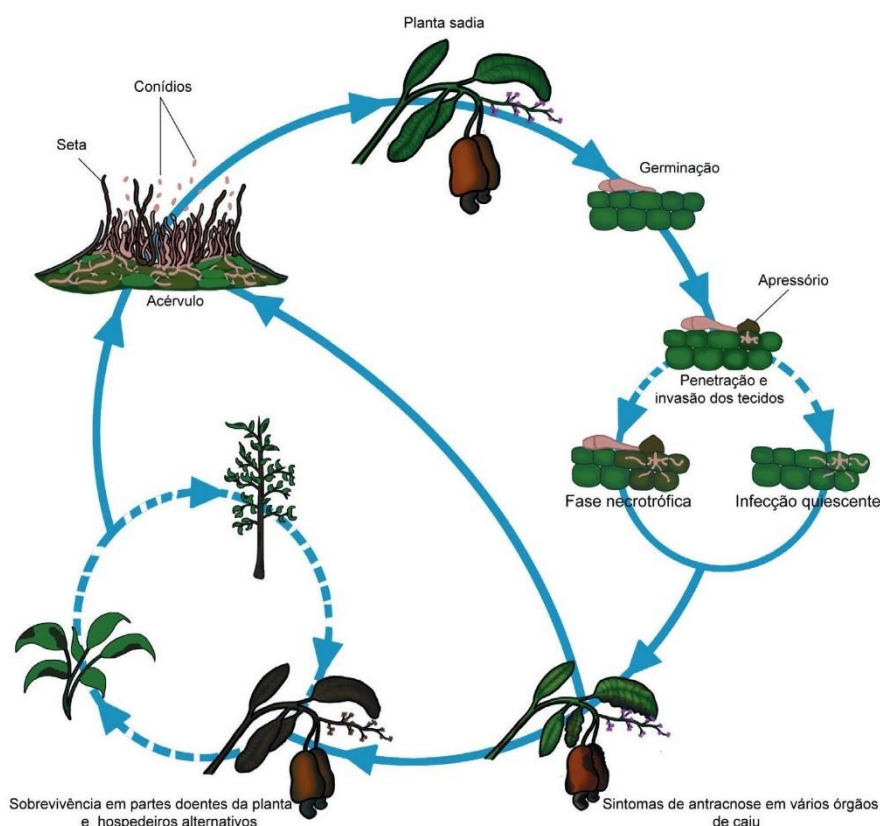


Figura 1 Ciclo da antracnose do cajueiro causada por *Colletotrichum* spp. (VELOSO *et al.*, 2022)

4. O gênero *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* foi relatado pela primeira vez por Corda em 1831. *Colletotrichum* pertence ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Glomerellales, família Glomerellaceae (CAI *et al.*, 2009). O gênero ocupa o oitavo lugar no ranking de fungos fitopatogênicos mais importantes do mundo. Possui importância por sua vasta gama de hospedeiros devido aos seus diferentes modos de colonização (DEAN *et al.*, 2012).

Colletotrichum produz conídios incolores, asseptados, ovoides, cilíndricos e às vezes curvados ou na forma de acérvulos. As massas de conídios são de cor salmão ou rosa. Os acérvulos são subepidérmicos, em forma de disco e mucilaginosos, com conidióforos simples e curtos, que brotam através da superfície dos tecidos vegetais. (AMORIM *et al.*, 2018; AGRIOS, 2005).

Anteriormente o gênero era conhecido como *Vermicularia* descrito por Tode (1790). O gênero foi estabelecido por Corda (1831), pois existiam algumas características taxonômicas na estrutura e forma dos conídios, que não eram estáveis dependendo das condições ambientais e condições nutricionais (MENEZES, 2005 SUTTON, 1992). Algumas dessas características

taxonômicas como diferenças na estrutura e forma da conidiomata, presença ou ausência de seta marginal separavam as espécies do gênero *Colletotrichum* de espécies do gênero *Vermicularia*. A consequência dessas características foram que muitas espécies passaram a ser consideradas pertencentes ao gênero *Colletotrichum* (DUKE, 1928). Até 1957 o gênero *Colletotrichum* continha cerca de 750 espécies, nesse mesmo ano Von Arx realizou uma nova abordagem na taxonomia do *Colletotrichum*, baseada em características morfológicas com pouca ou nenhuma ênfase nas características patogênicas. Isso fez com que o número de espécies fosse reduzido de 750 para 11 espécies (dentro de 23 táxons específicos e infraespecíficos aceitos) (SUTTON, 1992). Em 1980 Sutton aceitou 22 espécies de *Colletotrichum* considerando também as características patogênicas além das morfoculturais. Mais tarde o mesmo autor revisou esse número, resultando em 40 espécies (SUTTON, 1992).

Caracteres morfológicos foram utilizados por muito tempo como principal método para a delimitação de espécies. Entretanto, a plasticidade dos caracteres morfológicos e culturais, levantou discordâncias e tornou impossível a correta identificação e delimitação de espécies baseada somente nessas características (CAI *et al.*, 2009). Em 1990 foi realizado o primeiro Workshop Internacional sobre *Colletotrichum* no Reino Unido, e marcou o início do uso de métodos moleculares em estudos de *Colletotrichum* (BAILEY; JEGGER, 1992). Novas ferramentas úteis como uso de marcadores moleculares contendo sequências de DNA na taxonomia de *Colletotrichum*, permite entender as relações filogenéticas entre suas espécies e distinguir espécies crípticas (CAI *et al.*, 2009; CANNON *et al.*, 2012; VELOSO, 2018).

Os primeiros estudos filogenéticos dentro do gênero *Colletotrichum* demonstraram a eficiência na diferenciação de espécies usando análise de parcimônia da região ITS (Internal Transcribed Spacer) conseguindo identificar seis grupos infragenéricos (SREENIVASAPRASAD *et al.*, 1996). As primeiras análises filogenéticas multilocus foram feitas utilizando os genes ITS, TUB2 (β -tubulina) e HIS4 (Histona 4) pois o uso apenas da região ITS demonstrou ter pouca informatividade (TALHINHAS *et al.*, 2002). Desde então muitas revisões foram publicadas no gênero utilizando diferentes grupos de regiões gênicas, como tentativas de padronizar metodologias de identificação (JAYAWARDENA *et al.*, 2021). Nos últimos anos, vários estudos foram publicados a fim determinar um padrão ideal de marcadores moleculares para identificação de espécies de *Colletotrichum* (CAI *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2017). Recentemente, foi-se publicado um trabalho sendo propostos os melhores marcadores para a delimitação de espécies em 13 dos 14 complexos de espécies do gênero *Colletotrichum* (VIERA *et al.*, 2020). Em 2009, foram publicados diversos artigos com focos em revisão taxonômica, identificação correta e revisão de diversas espécies e seus hospedeiros

onde, 66 nomes de espécies de *Colletotrichum* baseadas nos critérios morfológicos e na abordagem filogenética multilocus foram aceitas, destacando do uso de métodos moleculares (HYDE *et al.*, 2009; CAI *et al.*, 2009). Em 2016, foram introduzidas 190 espécies com dados moleculares. Desde então, muitas revisões foram publicadas sobre o gênero com base em dados de sequência multilocus (JAYAWARDENA *et al.*, 2016)

De acordo com a última revisão feita para o gênero existem 280 espécies aceitas conforme com dados moleculares, as quais se distribuem em 16 complexos de espécies: *C. caudatum* s. l., *C. acucatum* s. l., *C. agaves* s. l., *C. boninense* s. l., *C. dematium* s. l., *C. dracaenophilum* s. l., *C. destructivum* s. l., *C. gigasporum* s. l., *C. gloeosporioides* s. l., *C. graminícola* s. l., *C. bambusicola* s. l., *C. magnum* s. l., *C. orbiculare* s. l., *C. orchidearum* s. l., *C. spaethianum* s. l., *C. truncatum* s. l.. Também são relatadas 15 espécies não associadas a nenhum complexo (LIU *et al.*, 2022).

5. Estilos de vida de *Colletotrichum*

No gênero *Colletotrichum* os padrões de estilo de vida podem ser categorizados como endofíticos, hemibiotróficos, necrotróficos, e latentes ou quiescentes. A mudança de estilo de vida pode ser consequências da maturidade fisiológica e resistência dos hospedeiros, fatores ambientais e genes de virulência dos táxons fúngicos que sustentam essas mudanças (DE SILVA *et al.*, 2017; JAYAWARDENA *et al.*, 2021).

Estilo de vida biotrófico

No estilo de vida biotrófico, o patógeno permanece dentro do tecido vegetal e absorve os nutrientes para seu crescimento sem matar as células vegetais. Para isso, produzem estruturas especializadas chamadas de haustórios, estruturas de infecção necessárias para a patogênese (DE SILVA *et al.*, 2017; JAYAWARDENA *et al.*, 2021). Sem uma existência da fase biotrófica, a morte inicial das células hospedeiras pode levar ao reconhecimento do fungo e início de respostas de defesa do hospedeiro que podem inibir o seu crescimento (DE SILVA *et al.*, 2017; JAYAWARDENA *et al.*, 2021).

Estilo de vida hemibiotrófico

As espécies de *Colletotrichum* não apresentam biotrofia verdadeira, no entanto, algumas

espécies têm um estágio biotrófico em seu ciclo de vida, que é seguido por um estilo de vida necrotrófico, que é referido como hemibiotrófico. Essa estratégia também pode contribuir como evidência de espécies de *Colletotrichum* como endófitas assintomáticas em tecidos de plantas vivas. O grau de hemibiotrofia varia entre as espécies de *Colletotrichum* com base em seu padrão de estilo de vida (DE SILVA *et al.*, 2017).

Para as espécies que apresentam hemibiotrofia, vesículas de infecção primária são formadas durante a infecção inicial das células epidérmicas sem matar as células. Isto é seguido por um estágio necrotrófico no qual as hifas de infecção secundária invadem e matam as células adjacentes (JAYAWARDENA *et al.*, 2021).

Estilo de vida necrotrófico

Geralmente as espécies de *Colletotrichum* desenvolvem um estágio necrotrófico em algum ponto de seus ciclos de vida, com exceção daquelas que são verdadeiramente endofíticas (PRUSKY *et al.*, 2013). O patógeno necrotrófico infecta e coloniza ativamente as células da planta levando à morte e aparecimento de sintomas da doença. Em sua maioria os necrotróficos secretam enzimas e toxinas que degradam a parede celular e outras enzimas extracelulares nos tecidos do hospedeiro antes e durante a colonização (JAYAWARDENA *et al.*, 2021).

Estilo de vida quiescente/latente

A quiescência ou latência não é considerada como um estilo de vida importante, no entanto, mas como uma fase de transição para as outras fases do ciclo de vida (DE SILVA *et al.*, 2017). A quiescência é definida como um período prolongado no ciclo de vida, na qual o fungo está dormente dentro do hospedeiro antes de mudar numa fase ativa, este estilo de vida é importante para espécies que causam doenças pós-colheita (JAYAWARDENA *et al.*, 2021; PRUSKY *et al.*, 2013).

O estilo de vida quiescente é difícil de definir pois cada espécie de fungo pode apresentar diferentes transições de quiescência para necrotrofia, como alterações fisiológicas e bioquímicas durante o processo de amadurecimento do fruto que mantêm ou facilitam a transição do estilo de vida quiescente para necrotrófico (DE SILVA *et al.*, 2017; PRUSKY *et al.*, 2013).

Estilo de vida endofítico

Fungos endófitos são aqueles micróbios que ocorrem dentro do tecido vegetal por pelo menos parte de seu ciclo de vida sem causar doenças (LE COCQ *et al.*, 2017). Abundantes na natureza e comuns em quase todas as plantas vasculares, musgos, etc. (DE SILVA *et al.*, 2017). Existem evidências que sugere que a maioria das espécies de *Colletotrichum* demonstraram ter uma fase endofítico (estado latente inativo) como uma fase do ciclo de vida da doença (DE SILVA *et al.*, 2017).

A transmissão dos fungos endofíticos ocorre de duas formas, vertical ou horizontal (CARROLL, 1988). A vertical é transmitida através de propágulos vegetativos ou via semente, nisto a relação que existe entre o endófito-hospedeiro é mais próxima de ser mutualística, devido a relação já existente entre o fungo e a planta e a colonização ser do tipo sistêmica. Na transmissão horizontal são transmitidos por meio de esporos sexuados ou assexuados, que são transportados pelo água ou insetos, aqui a relação endofito-hospedeiro é mais próxima da antagonista ou neutra e a colonização é do tipo não sistêmica. (NASCIMENTO, 2015). Uma vez estabelecido na planta hospedeira os fungos endofíticos podem assumir um estado latente (inativo) durante toda sua vida ou por um determinado período, ou seja, até que as condições bióticas e abióticas do ambiente favoreçam o desenvolvimento para que ele atue de forma mutualística ou antagonista (GAO *et al.*, 2010).

Os fungos endofíticos tem atraído muito interesse de pesquisas nos últimos anos porque possuem alto valor econômico e importância biotecnológica, já que fornecem novas fontes de compostos citotóxicos (moléculas anticarcinogênicas) e substâncias antibacteriais. No âmbito agrônomo podem contribuir na defesa da planta hospedeira, promotor de crescimento e atuar como agente de controle biológico (ALAM *et al.*, 2021; NASCIMENTO, 2015).

Estudos recentes demonstraram que mudas de guaraná tratadas com *C. siamense*, um fungo endofítico apresentaram menor percentual de lesões de antracnose e aumento da parte aérea e do sistema radicular. O que sugere que as espécies endofíticas de *Colletotrichum* poderiam ser empregadas para manejos de doenças como antracnose (CASAS *et al.*, 2021)

Por outro lado, alguns estudos foram feitos sobre espécies endofíticas e patogênicas de *Colletotrichum* associadas na cultura da mangueira. Lima *et al.* (2013) relatou as espécies patogênicas *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. karsti* e *C. siamense* (syn. *C. dianesei*). No seguinte ano Vieira *et al.* (2014) no estudo sobre espécies endofíticas relatou 6 espécies; *C. asianum*, *C. cliviae*, *C. siamense* (syn. *C. dianesei* e *C. endomangiferae*), *C. fructicola*, *C. karsti* e *C. tropicale*, as mesmas relatadas previamente. Esses isolados endofíticas foram patogênicos em frutos de manga. Estudos diversos foram feitos sobre a diversidade de fungos endofíticos

em *Colletotrichum* em diversas culturas, sendo a maioria dessas espécies incluídas nos complexos de espécies *Gloeosporioides*, complexos de espécies *Boninense* e complexos de espécies *Graminicola* (DE SILVA *et al.*, 2017; JAYAWARDENA *et al.*, 2021).

Muitos estudos investigaram a diversidade das espécies de *Colletotrichum* endofíticas em plantas ornamentais, frutíferas, aquáticas, etc. No entanto, pouco se sabe sobre espécies endofíticas de *Colletotrichum* associadas ao cajueiro. O trabalho mais recente foi feito por Veloso *et al.* (2018) que revelaram que as espécies de *Colletotrichum* sintomáticas associadas no cajueiro são sete e pertencem ao complexo *C. gloeosporioides sensu lato* (s.l.); *C. chrysophilum*, *C. fragariae*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides*, *C. queenslandicum*, *C. siamense* e *C. tropicale*. Algumas dessas espécies já foram relatadas como endófitos em outros hospedeiros.

Compreender os padrões complexos de estilo de vida que possuem as espécies de *Colletotrichum* e o estado dinâmico das interações patogênicas com seus respectivos hospedeiros, auxiliaram ao desenvolvimento de estratégias eficientes no manejo fitossanitário, melhorando o controle da doença no cajueiro. Desta forma, o objetivo do presente trabalho é avaliar a diversidade de espécies endofíticas de *Colletotrichum* do cajueiro no estado de Pernambuco, identificar as espécies através de análises filogenéticas, avaliar a prevalência de espécies de *Colletotrichum* em diferentes órgãos do cajueiro, e avaliar a patogenicidade e virulência em folhas de cajueiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. eds. **Manual de Fitopatologia**. Volume 1 - Princípios e Conceitos. 5ª Edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo, 2018.
- AGRIOS, G. N. Plant diseases caused by fungi. In: AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Burlington: Academic Press, 2005. v.5, cap. 11, p. 385-614.
- ALAM, B.; LI, J.; GE, Q.; Khan, M. A.; GONG, J.; MEHMOOD, S.; GONG, W. Endophytic Fungi: From Symbiosis to Secondary Metabolite Communications or Vice Versa? **Frontiers in Plant Science**, China, v. 12, p. 791033. 2021.
- AGOSTINI-COSTA, T. S.; FARIA, J. P.; NAVES, R. V.; VIEIRA, R. F. Cajus do Cerrado. In: VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. da S.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. **Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2006. v. 1, cap. 8, p.136-151.
- BAILEY, L.A; JEGGER, M.J. **Colletotrichum: Biology, Pathology and control**. Ed. Wallingford: CAB International, 1992. 388p.
- BRAINER, M.S.C.P. **Cajucultura: o proveito do pedúnculo**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2021. Disponível em: https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/990/3/2021_CDS_190.pdf. Acesso em: 25 maio. 2022.
- BRAINER, M. S. de C. P.; VIDAL, M. de F. **Cajucultura**. Caderno Setoria ETENE. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, ano 5, n.114, maio 2020.
- CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, Cambridge, v. 69, n. 1, p. 2-9, 1988.
- CAI, L.; HYDE, K.D.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; WALLER, J.M.; 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 polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, p. 183-204, 2009.
- CASAS, L. L.; PEREIRA, J. O.; COSTA-NETO, P. Q.; SILVA, J. F.; ALMEIDA, L. N.; BIANCO, R. A.; AZEVEDO, J. L. Endophytic *Colletotrichum siamense* for biocontrol and resistance induction in guarana seedlings. **International Journal of Microbiology**, Brazil, v. 2021.
- CANNON, P.F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P.R.; WEIR, B.S. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, p. 181–213, 2012.
- CORDA, A.C.I., 1831. Die Pilze Deutschlands. In: Deutschlands Flora in Abbildungen nach 16 der Natur mit Beschreibungen (Sturm, J, ed.). Sturm, Nürnberg. Vol. 3, Abt. 12: 33–64, tab. 21–32.
- CORDA, A.C.I., 1837. Icones Fungorum hucusque cognitorum vol. 1. Calve, Prague.
- CRISÓSTOMO, L. A.; ROSSETTI, A. G.; PIMENTEL, C. R. M.; BARRETO, P. B.; LIMA, R. N. Produtividade, atributos industriais e avaliação econômica de castanha em cajueiro-anão precoce adubado com doses crescentes de nitrogênio e potássio, em cultivo sob sequeiro.

Revista Ciência Agronômica, Fortaleza, v. 35, n.1, p. 87-95, 2004.

DEAN, R.; VAN KAN, J.A.L.; PRETORIUS, Z.A.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; DI PIETRO, A.; PIETRO, D.S.; RUDD, J.J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G.D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 414–430, 2012.

DE PAIVA, F. A.; FONSECA, N. C. P. CAJU: O Sabor do nordeste. **REVISTA DE GASTRONOMIA**, v. 1, n. 1, 2019.

DE SILVA, D. D.; CROUS, P. W.; ADES, P. K.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. **Fungal Biology Reviews**, Australia, v. 31, n. 3, p. 155-168, 2017.

DOWLING, M.; PERES, N.; VILLANI, S.; SCHNABEL, G. Managing *Colletotrichum* on fruit crops: A “complex” challenge. **Plant Disease**, Florida, v. 104, n. 9, p. 2301-2316, 2020.

DUKE, M.M. The genera *Vermicularia* Fr. and *Colletotrichum* Cda. **Transactions of the British Mycological**, London, v.13, p. 156–184, 1928.

GAMARRA-ROJAS, G.; SILVA, N. C. G.; VIDAL, M. S. C. Contexto, agricultura e interação no agroecossistema familiar do caju no semiárido brasileiro. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Rio Grande do Norte, v. 34, n. 3, p. 315-338, 2017.

GAMA, M. A. S.; FELIX, K. C. S.; SILVA, A. M. F.; SANTOS, L. A.; SANTOS, M. M. B. dos; SOUZA, L. J. do N. O Cajueiro e suas fitobacterioses: Mancha angular e Mancha de *Xanthomonas*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 10, p. 123–142, 2015.

GAO, F. K.; DAI, C. C.; LIU, X. Z. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. **African Journal of Microbiology Research**, Nanjing, v. 4, n.13, p. 1346-1351, 2010

HYDE, K.D.; CAI, L.; CANNON, P.F.; CROUCH, J.A.; CROUS, P.W.; DAMM, U.; GOODWIN, P.H.; CHEN, H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P.R.; JONES, E.B.G.; LIU, Z.Y.; MCKENZIE, E.H.C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S.R.; PFENNING, L.H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R.G.; TAN, Y.P.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; YANG, Y.L.; ZHANG, J.Z. *Colletotrichum*—names in current use. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, n. 1, p. 147-182, 2009.

HABIBU, A.; MUSA, I. A.; ASKIRA, H. M.; ALIYU, S. H. A review of research in soil fertility management and plant nutrition of cashew (*Anacardium occidentale* L.) in Nigeria. **World Journal of Advanced Research and Reviews**, Nigeria, v. 11, n. 3, p. 160–167, 2021.

JAYAWARDENA R. S.; Hyde, K. D.; Damm, U.; Cai, L.; Liu, M.; Li, X. H.; Yan, J. Y. Notes on currently accepted species of *Colletotrichum*. **Mycosphere**, China v. 7, n. 8, 1192-1260, 2016.

JAYAWARDENA R. S.; BHUNJUN C. S.; HYDE K. D.; GENTEKAKI E.; ITTHAYAKORN P. *Colletotrichum*: lifestyles, biology, morpho-species, species complexes and accepted species. **Mycosphere**, China, v. 12, n. 1, p. 519-669, 2021.

LE COCQ, K.; GURR, S. J.; HIRSCH, P. R.; MAUCLINE, T. H. Exploitation of

endophytes for sustainable agricultural intensification. **Molecular Plant Pathology**, Reino Unido, v. 18, n. 3, p. 469-473, 2017.

LIU, F.; MA, Z. Y.; HOU, L. W.; DIAO, Y. Z.; WU, W. P.; DAMM, U.; Cai, L. Updating species diversity of *Colletotrichum*, with a phylogenomic overview. **Studies in Mycology**, China, n. 101, p. 1-86, 2022.

LIU, F.; MA, Z.Y.; HOU, L.W.; et al. Updating species diversity of *Colletotrichum*, with a phylogenomic overview. **Studies in Mycology**, China, v. 101, n. 1, p. 1–56, 2022.

LIMA, N. B.; de A. BATISTA, M. V.; DE MORAIS, M. A.; BARBOSA, M. A.; MICHEREFF, S. J.; HYDE, K. D.; CAMARA, M. P. Cinco espécies de *Colletotrichum* são responsáveis pela antracnose da mangueira no nordeste do Brasil. **Fungal Diversity**, Brasil, v. 61, p. 75-88, 2013.

MARTINS V. V.; LIMA, W. N.; DA SILVA L. J.; JUNIOR. R.V.J. Monitoramento do oídio do cajueiro-anão visando ao seu controle. Embrapa Agroindústria Tropical. 2021. 20 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 225).

MENEZES, M. Doenças do cajueiro. In KIMATI, H. AMORIM, L. BERGAMIN FILHO, A. CAMARGO, L. E. A. REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, cap 18, p. 193-199.

MOREIRA, R. C.; CARDOSO, J. E.; LIMA, J. S. Resistência de clones de cajueiro comum à antracnose. 2010. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/870601/1/AT10079.pdf>. Acesso em: 22 maio. 2023.

M. V. V. MARTINS.; VIANA, F. M. P.; CARDOSO, J. E. **Doenças do cajueiro**. Embrapa Agroindústria Tropical.2016. Disponível em: https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducao6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=7705&p_r_p_-996514994_topicoId=10318. Acesso em: 23 maio. 2023.

NASCIMENTO, I. M. **Estudo químico de duas linhagens de fungos endofíticos com atividade ao fitopatógeno *Colletotrichum sp.*** 2015. 102 f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PAIVA, J. R.; CRISÓSTOMO, J. R.; BARROS, L. de M. Recursos genéticos do cajueiro: **Coleta, conservação, caracterização e utilização**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003. 43 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 65).

PRUSKY, D.; ALKAN, N.; MENGISTE, T.; FLUHR, R. Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p. 155-176, 2013.

SERRANO, L. A. L.; OLIVEIRA, V. H. de. Aspectos botânicos, fenologia e manejo de cultura do cajueiro. In: ARAÚJO, J. P. P. (Ed.). **Agronegócio caju: práticas e inovações**. Brasília, Embrapa, 2013 p. 77-165.

SERRANO, L. A. L.; PESSOA, P. F. A. de P. **Aspectos econômicos da cultura do cajueiro**. Embrapa Agroindústria Tropical. Sistema de Produção, 2016. Disponível em:

https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducao6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=7705&p_r_p_-996514994_topicoId=10308. Acesso em: 22 maio. 2023.

SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E.; MILLS, P.R. DNA sequence variation and inter-relationship among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose.

Physiological and Molecular Plant Pathology, London, v. 41, p. 265-281, 1992.

SOUZA, A. C.; VIEIRA, G. ; NEVES, L. . Uso de Óleos essenciais no controle do *Colletotrichum gloesporioides* causador da antracnose no caju. **ENCICLOPEDIA BIOSFERA**, [S. l.], v. 16, n. 29, 2019.

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

TALHINHAS, P.; SREENIVASAPRASAD, S.; NEVES-MARTINS, J.; OLIVEIRA, H. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, p. 986-996, 2002.

VELOSO, J. S. **Filogenia e epidemiologia de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do cajueiro**. 2017. 121 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

VELOSO, J. S.; CÂMARA, M. P., LIMA, W. G., MICHEREFF, S. J.; DOYLE, V. P. Why species delimitation matters for fungal ecology: *Colletotrichum* diversity on wild and cultivated cashew in Brazil. **Fungal biology**, Brasil, v. 122, n. 7, p. 677-691, 2018.

VELOSO, J. S.; DUARTE G. I.; DE FARIAS P. O.; CÂMARA, M. P. S Antracnose do cajueiro: etiologia, sintomatologia e aspectos epidemiológicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Brasil, v. 28, p. 200–215, 2022.

VIEIRA, W. A. S.; MICHEREFF, S. J.; JR MORAIS, M. A.; HYDE, K. H.; CÂMARA, M.P. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, Brasil, 67, p. 181–202. 2014.

VIEIRA, W. A. S.; LIMA, W. G.; NASCIMENTO, E. S.; MICHEREFF, S. J.; CÂMARA, M. P. S.; DOYLE, V. P. The impact of phenotypic and molecular data on the inference of *Colletotrichum* diversity associated with *Musa*. **Mycologia**, Bronx, v. 109, p. 912-934, 2017.

VIEIRA, W. A. S.; BEZERRA, P. A.; SILVA, A. C.; VELOSO, J. S.; CÂMARA, M. P. S.; DOYLE, V. P. Optimal markers for the identification of *Colletotrichum* species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Brasil, v. 143, p.106-694, 2020.

WONNI, I.; SEREME, D.; OUEDRAOGO, I.; ABALO, I. K.; DAO, I.; L. OUEDRAOGO, S. L N. Doenças de plantas de castanha de caju (*Anacardium Occidentale* L.) em Burkina Faso. **Advances in Plants Agriculture Research**, Burkina Faso, v. 6, n. 3, p. 78-83, 2017.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

CAPÍTULO II



Endophytic species of *Colletotrichum* associated with cashew tree in
northeastern Brazil

Endophytic species of *Colletotrichum* associated with cashew tree in northeastern Brazil

D. G. B. Ramos¹, A. G. G. Amaral¹, I. G. Duarte¹, A. C. Silva¹, W.A.S. Vieira², M.P.S. Câmara¹

1 Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brazil

2 Universidade de Brasília, Departamento de Fitopatologia, Brasília, 70910-900, Brazil.

Corresponding author: marcos.camara@ufrpe.br

RESUMO

A antracnose causada por espécies do gênero *Colletotrichum* é a doença do cajueiro mais grave e amplamente distribuída no Brasil. Espécies de *Colletotrichum* são comumente encontradas como patógenos, endófito e ocasionalmente saprófitas em uma ampla gama de hospedeiros. As espécies endofíticas associadas aos cajueiros são pouco estudadas. Neste estudo, relatamos as espécies de *Colletotrichum* endofíticas associadas aos cajueiros do estado de Pernambuco, sua prevalência em diferentes órgãos vegetais (folhas, nervuras, ramos e inflorescência) em duas áreas da área urbana de Recife-PE e comparamos as espécies quanto à patogenicidade e agressividade usando diferentes métodos de inoculação (com ferimento/sim ferimento). Seis espécies de *Colletotrichum* foram identificadas de acordo com análises filogenéticas multilocus *C. asianum*, *C. chrysophilum*, *C. karsti*, *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. tropicale* de tecidos sadios de cajueiro. Houve diferenças na porcentagem de isolamento em relação à prevalência de tecidos colonizados e áreas coletadas. *C. tropicale* foi a espécie prevalente em ambas as áreas e tecidos vegetais coletados. Não houve padrão de distribuição das espécies entre áreas e tecidos vegetais. Todos os isolados foram patogênicos em tecidos feridos em plantas de cajueiro. Descobrimos que o melhor método para testar a patogenicidade das espécies de *Colletotrichum* é a combinação de plantas + presença de ferimento + suspensão de conídios, pois representa melhor a infecção natural. *C. siamense* foi mais agressiva entre todas as demais espécies.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale* L., prevalência, patogenicidade, métodos de inoculação, multilocus.

ABSTRACT

Anthracnose caused by species of the genus *Colletotrichum* is, the most severe and widely cashew disease occurring in Brazil. *Colletotrichum* species are commonly found as pathogens, endophytes and occasionally saprophytes in a wide range of hosts. The endophytic species associated with cashew trees are poorly studied. In this study, we report the *Colletotrichum* endophytic species associated with cashew trees in the state of Pernambuco, their prevalence in different plant organs (leaves, veins, branches and inflorescences) in two areas of the urban area of Recife-PE, and compare the species in terms of pathogenicity and aggressiveness using different inoculation methods (wounded $\times$ unwounded). Six species of *Colletotrichum* were identified according to multilocus phylogenetic analyzes *C. asianum*, *C. chrysophilum*, *C. karsti*, *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. tropicale* of healthy cashew tree tissues. There were differences in the percentage of isolation in relation to the prevalence of colonized tissues and collected areas. *C. tropicale* was the prevalent species in both areas and plant tissues collected. There was no pattern of distribution of species between areas and plant tissues. All isolates were pathogenic in injured tissues of cashew plants. We found that the best method to test the pathogenicity of *Colletotrichum* species is the combination of leaves + presence of wounds + conidial suspension, as it better represents the natural infection. *C. siamense* was more aggressive among all other species.

Keywords: *Anacardium occidentale* L., prevalence, pathogenicity, inoculation methods, multilocus.

1. Introduction

The cashew tree (*Anacardium occidentale* L.) is a perennial plant, originating in South America, found in tropical regions and some subtropical areas with favorable climatic conditions (Paiva et al. 2009). The genus comprises about 38 species of wild and cultivated plants, but only *A. occidentale* is cultivated for commercial purposes in different parts of the world (Velooso et al. 2018). Currently, the main cashew producers in terms of production per ton are Costa de Marfim (28.6%), India (15.7%) and Vietnam (8.3%) followed by other countries such as Burundi, Philippines, and Tanzania. Brazil ranks eleventh, with 99.7% in the Northeast Region (Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2022).

Despite its economic importance for the Brazilian Northeast region, the cashew yield in recent years has decreased due to several factors, especially plant disease (Martins et al. 2016). Among the diseases that affect the cashew tree, anthracnose is considered the most severe in Brazil because it occurs in all vegetative states of the plant. The disease is characterized by

numerous lesions that can occur on both sides of the leaves, branches, inflorescences, fruits, and peduncles (Martins et al. 2016; Freire et al. 2003). Cashew anthracnose in Brazil is associated with several species of *Colletotrichum* belonging to the complex *C. gloeosporioides sensu lato* (s.l.): *C. chrysophilum*, *C. theobromicola* (syn. *C. fragariae*), *C. fructicola*, *C. gloeosporioides*, *C. queenslandicum*, *C. siamense*, and *C. tropicale* (Veloso et al. 2018).

Colletotrichum is an important and widely distributed genus in the world, *Colletotrichum* species are generally found in many host plants as pathogens and endophytes (Ma et al. 2018) and are among the most common terrestrial plant pathogens and foliar endophytes common in the world (Farr and Rossman 2013).

In recent years the term endophytic has been well discussed and different definitions have been proposed, however, the most recent definition was proposed by Le Cocq et al. (2017) which defines endophytes as microbes that inhabit the internal tissues of the plant by at least part of their life cycles and do not cause damage to the host plant under any circumstances. Some species of *Colletotrichum* present an endophytic/asymptomatic phase that can usually be associated with hemibiotrophy, quiescence, or endophytism. (Paez-Redondo et al. 2022). These changes occur due to several factors such as biotic stresses, drastic climate changes, and host senescence that break the balance between the fungus leading to a transition from latent to pathogenic mode, although there is no evidence of disease symptoms before this transition (Poveda et al. 2020). Endophytes are usually associated with different parts of plants, including stems, roots, petioles, leaf segments, fruits, and even seeds. Endophytes can also show tissue specificity to adapt to different physiological conditions in hosts (Bhunjun et al. 2023).

There are currently no studies available on the identification of endophytic species of *Colletotrichum* associated with cashew trees. *Colletotrichum* species are known to switch sequentially from one lifestyle to another as part of their infectious process. Accurate information about the diversity of endophytic species in the host and whether these species are also found in an pathogenic form in different areas and organs of the plant are very important in any disease management strategy.

Thus, the aim of this study was: to elucidate the species diversity of endophytic *Colletotrichum* in cashew trees; determine the prevalence of *Colletotrichum* species; and compare species for pathogenicity and agressividade in cashew leaves using different inoculation methods.

2. Material and methods

2.1. Sampling and fungal isolation

Samplings were carried out in two non-commercial areas of the State of Pernambuco in the city of Recife from September 2021 to June 2022. Ten plants were randomly sampled in area I (Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE) and 12 plants in area II (Universidade Federal de Pernambuco - UFPE). Two young leaf blade and vein, a stem fragment, and a mature inflorescence without any disease symptoms were sampled from each plant. Plant organs were washed under running water before surface sterilization. The protocol developed by Vieira et al. (2014) was followed to obtain *Colletotrichum* isolates endophytes in cashew trees.

Fungal isolates with morphology similar to *Colletotrichum* (Sutton, 1980) were cultivated in pure culture and preserved in cryogenic tubes with sterile distilled water (Figuereido, 1977). The isolates were deposited in the fungal collection of the Laboratório de Micologia at Universidade Federal Rural de Pernambuco–UFRPE.

Colletotrichum's isolation percentage was determined by the total number of isolates from each part of the plant divided by the number of isolates in each area x 100.

2. 2. DNA extraction, PCR, sequencing

The *Colletotrichum* isolates were cultivated in an L-asparagine liquid culture medium at 25 ± 2 °C for 7 days and 12 hours of light (Alfenas, 2007). for genomic DNA extraction. Extraction was performed following the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) protocol with minor changes (Doyle and Doyle, 1990).

The partial region of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was amplified to identify from which *Colletotrichum* species complex the isolates belong, and to determine the haplotype diversity. Sequences were queried against NCBI database using the BLAST for a previous species identification. Haplotype diversity was accessed in DnaSP v5 (Librado and Rozas, 2009). A representative isolate from each haplotype was randomly chosen for multilocus analysis and further assays. The following remaining loci were amplified for multilocus analysis: intergenic spacer between DNA lyase and locus mating-type MAT1-2-1 (APN2/MAT-IGS), calmodulin (CAL), glutamine synthetase (GS) and β -tubulin (TUB2). These markers are indicated as the most informative markers to identify *Colletotrichum* species from various species complexes (Vieira et al. 2020).

The APN2/MAT-IGS region was amplified and sequenced with the primers AMF and AMR (Silva et al. 2012); CAL with CL1C and CL2C (Weir et al. 2012); GAPDH with GDF

and GDR (Templeton et al. 1992) GS with GS-64F and GS-967R (Vieira et al. 2017); and TUB2 with T1 and Bt2B (O'Donnell and Cigelnik, 1997; Glass and Donaldson, 1995). PCR amplifications were performed in a 25 μ L volume reaction containing 13.1 μ L PCR grade water, 3 μ L template DNA (2.5 ng μ L⁻¹, 1.25 μ L of each primer (10 μ M), 1.25 μ L dimethyl sulfoxide, 2.5 μ L dNTPs (100 mM), 2.5 μ L PCR Buffer and 0.2 μ L Taq DNA polymerase (1 U).

PCR reactions were performed using the following cycling parameters: APN2/MAT-IGS – initial denaturation for 5 min at 95 C, followed by 40 cycles of 95 C for 30 s, 50 C for 1 m, and 72 C for 1 min, followed by a final extension at 72 C for 10 m; CAL – initial denaturation for 5 min at 95 C, followed by 40 cycles of 95 C for 30 s, 57 C for 45 s and 72 C for 1 min, followed by a final extension at 72 C for 10 min; GS – initial denaturation for 5 min at 95 C, followed by 40 cycles of 95 C for 30 s, 55 C for 45 s and 72 C for 1 min, followed by a final extension at 72 C for 10 min; GAPDH – initial denaturation for 3 min at 95 C, followed by 40 cycles of 95 C for 30 s, 60 C for 45 s and 72 C for 30 s, followed by a final extension at 72 C for 10 min; and TUB2 – initial denaturation for 3 min at 95 C, followed by 40 cycles of 95 C for 45 s, 55 C for 45 s and 72 C for 1 min, followed by a final extension at 72 C for 10 min.

The PCR products were purified and sequenced on an ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) on the DNA sequencing platform located at the Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva – LABBE at Universidade Federal de Pernambuco (Pernambuco, Recife, Brazil) Sequence reads were assembled into contigs and edited using the Staden package (Staden et al. 1998). The sequences generated in this study were deposited in GenBank (Supplementary Table S1).

2. 3. Phylogenetic analyses

Sequences representing ex-type cultures and related published sequences were retrieved from the NCBI database by MEGA 7 (Kumar et al. 2016), and aligned with the online version of MAFFT version 7 with the L-INS-i iterative refinement method (Katoh and Stanley 2013; Katoh et al. 2019). The phylogeny of each locus and concatenated alignments were inferred using Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) analyses. MSAs were converted, concatenated, and partitioned using SequenceMatrix 1.8 (Vaidya et al. 2011).

ML analyses were performed on IQ-TREE v. 2.1.2 (Nguyen et al. 2015) SH-alrt bootstrap support $\geq$ 80%. The best ML tree was estimated using a substitution model for each locus. Model parameters were considered separately for each partition using ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al. 2017; Minh et al. 2020), allowing each partition to have its own rate

of evolution (-m MFP -p). Branching supports were estimated using the approximate likelihood ratio test with Shimodaira-Hasegawa interpretation (SH-*alrt*) with 1000 bootstrap samples (-keep-ident -p -m MFP -nstop 1000 -pers 0.2 -*alrt* 1000) (Guindon et al. 2010).

Bayesian inferences were performed using MrBayes 3.2.6 1 (Ronquist et al. 2012) implemented in CIPRES Science Gateway. Analyses were performed using best-fit nucleotide substitution models selected according to AICc by MrModeltest 2.3 (Nylander 2004). Four runs were performed with four Markov Monte-Carlo chain search (MCMC) strings per run for 10^7 generations, sampling every 1000 generations. The convergence of all parameters was checked in the “pstat” file (Estimated Sample Size – EES ≥ 100 , and Potential Scale Reduction Factor – PSRF = 1), and posterior probabilities were calculated after discarding the first 25% of generations as burn-in. Clades were considered well supported when BI posterior probability ≥ 0.95 .

2. 4. Species recognition

The genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition (GCPSR) approach was employed to identify the phylogenetic lineages of *Colletotrichum* species (Dettman et al. 2003; Taylor et al. 2000). A clade was recognized as an evolutionary lineage independent of any one GCPSR criteria were accepted: Genealogical concordance - the clade was present in most of the individual gene trees; Genealogical non-discordance - when the clade is well supported in at least one of the individual gene trees in both ML and BI analyses and is not contradicted in any other individual gene tree at the same level of support.

2. 5. Prevalence of *Colletotrichum* species

The prevalence of the general *Colletotrichum* species was determined by the formula: $P(\%) = (C_x/C_t) \times 100$, where C_x is the number of isolates of the same species and C_t is the total number of isolates. Prevalence was also calculated for each sampling area and plant tissue.

2. 6. Pathogenicity and aggressiveness assay

The pathogenicity and aggressiveness assays were carried out on cashew leaves and detached leaves. Inoculations were performed on fully developed leaves of 180-day-old leaves. The following combinations were used: leaves $\times$ detached leaves; conidial suspension $\times$

mycelial plugs; wounded × unwounded.

Inoculations were carried out on unwounded and wounded leaves. Both pre-inoculation methods were tested in the same leaf: the right side was kept unwounded; in the left side, wounds (5 millimeters diameter) were done in two points by gently scratching the leaf surface with a toothbrush.

Inoculations were conducted using plugs of mycelia grown in PDA at 25 ± 2 for 7 days. For inoculations with mycelia plugs were cut. the margins of the 7-day colonies. Inoculations with conidial suspension were determined at a concentration of 10^6 conidia mL⁻¹. Four mycelial plugs (5 millimeters diameter) and 10 µL of conidial suspension 10^6 conidia mL⁻¹ were deposited on the leaf sites (wounded/unwounded). The plants were kept in a humid chamber for 48 h at 25 °C and a light period of 12 h. The humid chamber was removed after 48 hours and the plants were kept in for 8 and 15 days and then evaluated. Detached leaves were placed in a humid chamber on tray containing a thin layer of water and covered with plastic film to maintain 100% relative for 8 days and then evaluated humidity until evaluation. As a negative control, plugs (5 millimeters diameter) of PDA culture medium and 10 µL of sterilized distilled water were used.

After the best inoculation method has been selected, it was used to compare the aggressiveness between species. The pathogenicity of the isolates was verified by the presence of typical symptoms of anthracnose. Aggressiveness was assessed by measuring the orthogonal diameter of the lesions. The experiment was repeated twice. All data for treatment were analyzed separately. The data that did not show normality after transformation were treated as non-parametric. They were then analyzed by one-way analysis of variance - ANOVA, compared analyzed by the Kruskal-Wallis test using the Statistix 10 program (Statistix 2013).

3. Results

3. 1. Sampling and fungal isolation

A total of 37 *Colletotrichum* isolates were obtained from asymptomatic plants: The percentage of *Colletotrichum* isolation in plant organs differed in the two sites. The highest number of isolates was found in young vein in site I (83%) and site II (36%). The percentage of isolation at site II was 20% in young leaf blade and 25% in old vein with. The lowest rates of *Colletotrichum* isolation were from site II, inflorescences (4 %), stems (8 %) (Fig. 1).

3. 2. Phylogenetic analyses and species assignment

The GAPDH region revealed a total of 8 haplotypes among *Colletotrichum* isolates from cashew trees. BLAST information showed that 7 haplotypes showed high similarity with species within the *C. gloeosporioides* s.l. species complex and 1 haplotype showed similarity to a species within the *C. boninense* s.l. species complex.

Colletotrichum species assigned to the *C. gloeosporioides* species complex were identified using sequence data from five loci: APN2/MAT-IGS, CAL, GS, GAPDH and TUB2. These species were assigned to six clades. Two isolates were grouped with *C. tropicale*, one isolate with *C. chrysophilum*, two with *C. siamense*, one with *C. asianum* and finally one isolate with *C. theobromicola*. All species showed maximum support 100% (ML) and 1(BI) in both multilocus analyses (Fig. 2).

The second analysis included the species assigned to the *C. boninense* species complex. Three loci; CAL, GAPDH and TUB2 were used to identify this species. One isolate was grouped with *C. karsti*, clades were inferred with support $\geq 80\%$ (ML) and ≥ 0.95 (BI) in both analyses (Fig. 3).

3. 3. Prevalence

Colletotrichum tropicale was the prevalent species representing approximately 51.4% of the isolates. The least prevalent was *C. karsti* (4%) (Fig. 4).

Four species were isolated from site I and site II. Two species were restricted to site II, *C. karsti* and *C. asianum*. *Colletotrichum tropicale* was the most predominant species in the sites, with the highest percentage in site II (60%) and the lowest in site I with (33%). *Colletotrichum tropicale* was the most prevalent species in all evaluated tissues with an isolation percentage above 42%, except in inflorescences. The percentage of isolation of *C. theobromicola* in inflorescence was 100%. The other species were restricted to young and mature tissues and stems, except for *C. Karsti* (5%) and *C. siamense* (17%) which was limited only to mature tissues (leaf and veins) (Fig. 5).

3. 4. Pathogenicity and aggressiveness

All tested isolates were pathogenic when there were wounds showing typical symptoms of anthracnose. In contrast, unwounded methods showed 81—100% disease escape. The best inoculation method chosen was (conidial suspension + leaves), as they presented the natural form of inoculation. (Fig 6).

Colletotrichum siamense was the most aggressiveness species in all inoculation methods. The other species were significantly less aggressiveness. (Fig. 7). Control leaves inoculated with sterilized distilled water remained healthy.

4. Discussion

In the present study endophytes were isolated from leaves, stems and inflorescences. There was a higher percentage of *Colletotrichum* species in mature leaf tissues (leaves and veins) in all areas. In contrast, a lower number of species were found in inflorescences and stems. The increased incidence of endophytes in vein tissues is indirect evidence that these leaves had more time to accumulate endophytes from the environment (Photita et al. 2001). The low incidence in inflorescences and stems could indicate that some fungi have tissue specificities and preferences. These specificities in leaves depend on several factors, such as the initial colonization of endophytes or substances within these tissues (Bhunjun et. al. 2023). Other studies done have the same conclusions that endophytic species of *Colletotrichum* are abundantly isolated from mature leaves (Vieira et al. 2014; Chen et al. 2011).

We also noticed differences in the isolation percentages between the two areas. The percentage of isolation in areas can vary because of various environmental factors such as precipitation, temperature, humidity, inoculum potential and surface nutrients. (Lu et al. 2018; Lima 2013). Area I is in the urban area. This area presents a smaller population of plants when compared to area II, which reduces the dispersion of potential inoculum. This could have contributed to the lower percentages of isolation. However, area II, although also located in an urban area presented the highest percentage of isolation. We speculate that the fact the isolations were made after the rain season could have led to an increase in the overall *Colletotrichum* inoculum in the area.

In this study, we report for the first time the endophytic species of *Colletotrichum* associated with cashew trees in Brazil. The present study demonstrates that *C. asianum*, *C. chrysophilum*, *C. karsti*, *C. siamense*, *C. theobromicola*, and *C. tropicale* are endophytes in Cashew trees. Seven species of *Colletotrichum* were reported as pathogenic previously associated with cashew (Veloso et al. 2018) of which *C. chrysophilum*, *C. siamense* and *C. tropicale* are reported as endophytes in the present work. Five of the species belong to *Colletotrichum gloeosporioides* s. l species complex and one to *Colletotrichum boninense* s. l. Previous studies on endophytic species of *Colletotrichum* on various plants in different ecosystems have revealed great diversity of species. Most of these species belong to *Colletotrichum gloeosporioides* s. l, *Colletotrichum boninense* s. species complex l (Kumar and

Hyde, 2004; Rojas et al. 2010; Vieira et al. 2014; Veloso et al. 2018; Zheng et al. 2022). *Colletotrichum gloeosporioides* s. l. currently and one of the largest within the genus comprising 52 species, most of this complex is known to be pathogenic and endophytic. On the other hand, *Colletotrichum boninense* s. l. comprises 27 species, most of which are considered endophytes (Liu et al. 2022).

The prevalence of species found that *Colletotrichum tropicale* was the most isolated species in the present study with 51.4%, followed by *C. chrysophilum* and *C. siamense* with 13%. *Colletotrichum tropicale* was initially described as a leaf endophyte of several forest species in Panama (Rojas et al. 2010). Currently *C. tropicale* is considered a cosmopolitan species of wide occurrence. *C. siamense* is widely distributed in the world, in addition, this species has a wide range of hosts, being found in at least 103 hosts (Talhinhas and Baroncelli, 2021). *C. chrysophilum* was described as causing anthracnose in banana trees in Brazil (Vieira et al. 2017) it was also associated with cashew anthracnose (Veloso et al. 2018) and with several hosts such as blueberry and apple (Soares et al. 2021; Khodadadi et al. 2020). Previous studies on the prevalence of symptomatic *Colletotrichum* species in cashew trees in the Brazil reported *C. siamense* species as the most predominant, followed by *C. chrysophilum* and *C. tropicale* (Veloso et al. 2018). However, in the present study, the prevalent species were *C. tropicale*, *C. siamense* and *C. chrysophilum*. We consider that this may have been influenced by the fact that there was a larger sampling area, collection times and species specificities that influenced these prevalence.

All *Colletotrichum* species isolated in this study were pathogenic on wounded tissues, differing significantly in terms of aggressiveness. Inoculations of leaves and detached leaves wound with conidial suspensions and mycelial plugs of the pathogen caused lesions typical of anthracnose. It was observed that the most extensive lesions on the leaves were from inoculations with a mycelial plugs. Mycelial plugs are usually larger because fungal conidia are more sensitive to dehydration and other non-ideal environmental such as temperature UV light. On the other hand, mycelial plugs are usually more active and have a great nutritional reserve. Although the evaluations take less time, accurate quantitation of mycelium can be a problem, as standard measurement methods are not as accurate for mycelium as for conidial. Inaccurate quantification of mycelia can lead to a standardized result such as changes in the order of aggressiveness, etc. The mycelial plugs also do not represent the natural form of the pathogen inoculation process since conidial are usually disseminated by splashing water or insects. Also based on our results, the wounding method in leaves with spore suspension is the most effective and reliable method for testing pathogenicity in *Colletotrichum* species.

Colletotrichum siamense proved to be the most aggressive species in relation to other species in cashew tree leaves. This agrees with previous studies on aggressiveness, where *Colletotrichum siamense* was the most aggressive in cashew tree leaves (Veloso et al. 2020) other authors such as Vieira et al. (2014) in endophytic *Colletotrichum* species in mango culture also demonstrated that *C. siamense* was the most aggressive species on fruits.

Unwounded inoculations, either on leaves or detached leaves, presented the highest rate of escape (81—100%) (Fig. 6). This result agrees with previous reports of *C. camelliae*, *C. fructicola* and *C. aenigma* associated with *Camellia sinensis* in Taiwan, where none of the tested isolates were able to successfully infect unwounded leaves (Lin et al. 2023). This has been reported in cashew culture, where isolates of *Colletotrichum* species did not show lesions on leaves without wounding (Veloso et al. 2020). In the field, plants are exposed to environmental stress and feeding insects that cause wounds, which favors these infections. The plant cuticle is the first physical barrier against biotic and abiotic stresses and generally in the pathogen's infection processes, the host's cuticular wax layer inhibits entry, but this process tends to be simpler through tissue injury. The use of detached leaves in inoculations has several advantages such as space saving, ease of control and manipulation of environmental factors (Gabardo et al. 2020). However, they do not represent the natural method that occurs in the fields. The use of leaves allows the study of the plant as a whole organism interacting with the pathogen which does not occur in detached leaves.

This study demonstrates that endophytically isolated fungi can become pathogenic and cause symptoms. The endophytic species of *Colletotrichum* can behave as latent pathogens as part of their cycle life. This hypothesis was corroborated by several authors who isolated endophytic fungi from healthy plant tissues (Azuddin et al. 2023; Zheng et al. 2022; Vieira et al. 2014). Endophytism plays an important role in the life cycle of *Colletotrichum* species. And special attention should be paid when making decisions regarding the management and control of the disease. Because it is known that species within the same genus tend to be variable in terms of susceptibility to preventive and curative treatments.

In summary, this study reports several endophytic *Colletotrichum* species associated with cashew trees in Brazil, including species previously described as pathogenic. *C. tropicale* proved to be the most common species, suggesting that it is a generalist pathogenic and endophytic pathogen. Furthermore, we demonstrate that *Colletotrichum* species collected as endophytes are pathogenic for cashew plants. *C. siamense* was the most aggressive species in tests. We conclude that the best method to test pathogenicity in *Colletotrichum* species, whether pathogenic or endophytic, is the woundend + leaves + conidial suspension method.

Phylogenetic studies involving *Colletotrichum* species are crucial for the correct identification of the diversity of the causative agent of the disease, and extremely essential to develop strategies for adequate measures to control the disease. For it is known that *Colletotrichum* species differ in terms of aggressiveness and susceptibility to fungicides in relation to the host and more studies on diversity need to be developed. Reports of different endophytic species from our results may contribute to the development of effective and adequate management of cashew anthracnose in Brazil.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflicts of interest.

5. Acknowledgments

Diana Gissell Barreto Ramos acknowledges “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq” for the Masters scholarship. Marcos P. S. Câmara acknowledges CNPq for the research productivity fellowship. Willie A. S. Vieira acknowledge the “Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior – CAPES” and the “Programa Nacional de Pós-Doutorado/CAPES – PNPd/CAPES” for the postdoctoral fellowships

Appendix A. Supplementary data

6. References

- Alfenas AC, Mafia RG, 2007. *Métodos em fitopatologia*. Ed: UFV, Viçosa.
- Azuddin NF, Mohamad SMNA, Latiffah Zakaria, 2023. Molecular identification of endophytic fungi in lawn grass (*Axonopus compressus*) and their pathogenic ability. *Scientific Reports* **13**: 4239.
- Bhagya CH, Wijesundera Sulochana WS, Hemamali NP, 2013. Polymerase chain reaction optimization for amplification of Guanine-Cytosine rich templates using buccal cell DNA.

- 468 *Indian journal of human genetics* **19**, 78–83.
- 469 Bhunjun CS, Phukhamsakda C, Hyde KD, McKenzie EH, Saxena RK, Li Q. 2023. Do all
470 fungi have ancestors with endophytic lifestyles?. *Fungal Diversity*, 1-26.
- 471 Cai L, Hyde KD, Taylor PWJ, Weir B, Waller J, Abang MM, Shivas RG, 2009. A polyphasic
472 approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* **39**: 183-204.
- 473 Cannon PF, Damm U, Johnston PR., Weir BS, 2012. *Colletotrichum*: current status and future
474 directions. *Studies in mycology* **73**: 181-213.
- 475 CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. 2012. [https://www.conab.gov.br/info-](https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-castanha-de-caju/item/download/37889_d1dcfb853366346219117a35a72bf47a)
476 [agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-](https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-castanha-de-caju/item/download/37889_d1dcfb853366346219117a35a72bf47a)
477 [de-castanha-de-caju/item/download/37889_d1dcfb853366346219117a35a72bf47a](https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-castanha-de-caju/item/download/37889_d1dcfb853366346219117a35a72bf47a). Accessed
478 on 21 January 2023.
- 479 Damm U, Sato T, Alizadeh A, Groenewald JZ, Crous PW, 2019. *The Colletotrichum*
480 *dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. *Studies in mycology* **92**:
481 1-46.
- 482 Dettman JR, Jacobson DJ, Taylor JW, 2003. A multilocus genealogical approach to
483 phylogenetic species recognition in the model eukaryote *Neurospora*. *Evolution* **57**: 2703-
484 2720.
- 485 Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf
486 tissue (No. RESEARCH).
- 487 Doyle VP, Oudemans PV, Rehner SA, Litt A, 2013. Habitat and host indicate lineage identity
488 in *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. from wild and agricultural landscapes in North
489 America. *PLoS One* **8**e62394.
- 490 Duke MM, 1928. The genera *Vermicularia* Fr. and *Colletotrichum* Cda. *Transactions of the*
491 *British Mycological* **13**: 156-184.
- 492 Freire FCO, Cardoso J E, 2003. Doenças do cajueiro. In: Freire FCO, Cardoso JE, Viana F
493 MP. *Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial*. Brasília, DF: Embrapa
494 Informação Tecnológica, pp. 192-226.
- 495 Gabardo G, Pria MD, Silva HL, Harms MG, 2020. Detached leaf method for evaluating
496 resistance induction of alternative products in *Phakopsora pachyrhizi*, *Sclerotinia*
497 *sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani* in soybean. *Brazilian Journal of Development* **6**: 43847-
498 43862.
- 499 Gonzaga LL, Costa LEO, Santos TT, Araújo EF, Queiroz MV, 2015. Endophytic fungi from
500 the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic
501 diversity. *Journal of applied microbiology* **118**: 485-496.
- 502 Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New Algorithms

- 503 and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of
504 PhyML 3.0. *Systematic Biology* **59(3)**: 307-321.
- 505 Glass NL, Donaldson GC, 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR
506 to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental*
507 *microbiology* **61(4)**: 1323–1330.
- 508 Jeger MJ, 1992. *Colletotrichum* – Biology, Pathology and Control. Wallingford: CAB
509 *International* 1-26.
- 510 Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, Haeseler A, Jermiin LS, 2017. ModelFinder: fast
511 model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods* **14(6)**: 587–589.
- 512 Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD, 2019. MAFFT online service: multiple sequence
513 alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in bioinformatics* **20**:
514 1160-1166.
- 515 Kumar DSS, Hyde KD, 2004. Biodiversity and tissue recurrence of endophytic fungus from
516 *Tripterygium willfordii*. *Fungal Diversity* **17**: 69-90.
- 517 Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis
518 version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33(7)**: 1870-1874.
- 519 Khodadadi F, González JB, Martin PL, Giroux E, Bilodeau GJ, Peter KA, Aćimović SG,
520 2020. Identification and characterization of *Colletotrichum* species causing apple bitter rot in
521 New York and description of *C. noveboracense* sp. nov. *Scientific reports* **10**: 11043.
- 522 Librado P, Rozas J, 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA
523 polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451-1452.
- 524 Le Cocq K, Gurr SJ, Hirsch PR, Mauchline, TH. 2017. Microreview Exploitation of
525 endophytes for sustainable agricultural intensification. *Molecular Plant Pathology* **18**: 469–
526 473.
- 527 Lima NB, Batista MVDA, Morais Jr MA, Barbosa MAG, Michereff SJ, Hyde KD, Câmara
528 MPS, 2013. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in
529 northeastern Brazil. *Fungal Diversity* **61**:75-88
- 530 Liu JW, Manawasinghe IS, Liao XN, Mao J, Dong ZY, Jayawardena RS, Luo M,
531 2023. Endophytic *Colletotrichum* (Sordariomycetes, Glomerellaceae) species associated with
532 *Citrus grandis* cv. “Tomentosa” in China. *MycoKeys* **95**: 163-188.
- 533 Liu F, Weir BS, Damm U, Crous PW, Wang Y, Liu B, Cai L, 2015. Unravelling
534 *Colletotrichum* species associated with Camellia: employing ApMat and GS loci to resolve
535 species in the *C. gloeosporioides* complex. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of*
536 *Fungi* **35**: 63-86.
- 537 Liu F, Ma ZY, Hou LW, Diao YZ, Wu WP, Damm U, Cai L, 2022. Updating species
538 diversity of *Colletotrichum*, with a phylogenomic overview. *Studies in Mycology* **101**: 1-56.

- 539 Lin SR, Lin YH, Ariyawansa HA, Chang YC, Yu SY, Tsai I, Hung TH, 2023. Analysis of the
540 pathogenicity and phylogeny of *Colletotrichum* species associated with brown blight of tea
541 (*Camellia sinensis*) in Taiwan. *Plant Disease* **107**: 97-106.
- 542 Lu Q, Wang Y, Li N, Ni D, Yang Y, Wang X, 2018. Differences in the characteristics and
543 pathogenicity of *Colletotrichum camelliae* and *C. fructicola* isolated from the tea plant
544 *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Frontiers in Microbiology* **9**: 3060.
- 545 Ma X, Nontachaiyapoom S, Jayawardena RS, Gentekaki E, Zhou S, Qian Y, Kang J, 2018.
546 Endophytic *Colletotrichum* species from *Dendrobium* spp. in China and northern
547 Thailand. *MycKeys* **43**: 23.
- 548 Martins VV, Lima WN, Da Silva LJ, Junior RVJ, 2021. Monitoramento do oídio do cajueiro-
549 anão visando ao seu controle. Embrapa Agroindústria Tropical 20 p (Boletim de Pesquisa e
550 Desenvolvimento, 225).
- 551 Minh BQ, Schimdt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A,
552 Lanfear, 2020. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in
553 the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution* **37(5)**: 1530–1534.
- 554 Nguyen LT, Schmidt HA, Haeseler A, Minh BQ. 2015.IQ-TREE: A Fast and Effective
555 Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology*
556 *and Evolution* **32(1)**: 268-74.
- 557 Nylander JAA. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary
558 Biology Centre, Uppsala University.
- 559 O'Donnell K, Cigelnik E, 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a
560 monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics*
561 *and Evolution* **7(1)**: 103-116.
- 562 Paiva FA, Fonseca NCP, 2019. Caju o sabor do nordeste. Revista de gastronomia.
- 563 Pérez-Redondo, A Prusky, D Hoyos-Carvajal L, 2022. Quiescence as a strategic stage for the
564 infective process of *Colletotrichum* species. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación*
565 *Científica* **25**:1-12.
- 566 Photita W, Lumyong S, Lumyong P, McKenzie EHC, Hyde KD, 2004. Are some endophytes
567 of *Musa acuminata* latent pathogens? *Fungal Diversity* **16**:131-140.
- 568 Poveda J, Abril-Urias P, Escobar C, 2020. Biological control of plant-parasitic nematodes by
569 filamentous fungi inducers of resistance: *Trichoderma*, mycorrhizal and endophytic
570 fungi. *Frontiers in Microbiology* **11**: 992.
- 571 Templeton MD, Rikkerink EH, Solon SL, Crowhurst RN, 1992. Cloning and molecular
572 characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA
573 from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. *Gene* **122**: 225-230.

- 574 Rojas EI, Rehner AS, Samuels GJ, Van Bael SA, Herre EA, Cannon P, Sha T, 2010.
 575 *Colletotrichum gloeosporioides* sl associated with *Theobroma cacao* and other plants in
 576 Panama: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic
 577 endophytes. *Mycologia* **102**: 1318-1338.
- 578 Silva DN, Talhinhos P, Várzea V, Cai L, Paulo OS, Batista D. 2012. Application of the
 579 *apn2/mat* locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: an
 580 example from coffee (*Coffea* spp.) hosts. *Mycologia* **104**: 396-409.
- 581 Sutton BC, 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. *The genus*
 582 *Glomerella and its anamorph Colletotrichum* 1-26.
- 583 Staden R, Beal KF, Bonfield JK, 1999. The staden package, 1998. *Bioinformatics methods*
 584 *and protocols* 115-130.
- 585 Statistix 2013. Statistix 10, Version 10. Analytical Software, Tallahassee, FL, USA.
- 586 Soares VF, Velho AC, Stadnik MJ, 2022. First Report of *Colletotrichum chrysophilum*
 587 Causing Anthracnose on Blueberry in Brazil. *Plant Disease* **106**: 322.
- 588 Sutton BC, 1980. The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata
 589 Kew: Common wealth Mycological Institute.
- 590 Talhinhos P, Sreenivasaprasad S, Neves-Martins J, Oliveira H, 2002. Genetic and
 591 morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins.
 592 *Phytopathology* **92**: 986-996.
- 593 Talhinhos P, Baroncelli R, 2021. *Colletotrichum* species and complexes: geographic
 594 distribution, host range and conservation status. *Fungal Diversity* **110**: 109-198.
- 595 Tao G, Liu ZY, Liu F, Gao YH, Cai L, 2013. Endophytic *Colletotrichum* species from *Bletilla*
 596 *ochracea* (Orchidaceae), with descriptions of seven new specieses. *Fungal Diversity* **61**: 139-
 597 164.
- 598 Vaidya G, Lohman DJ, Meier R, 2011. SequenceMatrix: concatenation software for the fast
 599 assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics* **27(2)**:
 600 171-180.
- 601 Veloso JS, Câmara MP, Lima WG, Michereff SJ, Doyle VP, 2018. Why species delimitation
 602 matters for fungal ecology: *Colletotrichum* diversity on wild and cultivated cashew in
 603 Brazil. *Fungal biology* **122**: 677-691.
- 604 Veloso JS, Lima WG, Reis A, Doyle VP, Michereff SJ, Câmara MP, 2021. Factors
 605 influencing biological traits and aggressiveness of *Colletotrichum* species associated with
 606 cashew anthracnose in Brazil. *Plant Pathology* **70**: 167-180.

- 607 Veloso JS, Duarte IG, Farias OR, Câmara MPS, 2022. Antracnose do cajueiro: etiologia,
608 sintomatologia e aspectos epidemiológicos. *Revisão Anual de Patologias de plantas* **28**: 200-
609 215.
- 610 Vieira WAS, Michereff SJ, Jr Morais MA, Hyde KH, Câmara MPS. 2014. Endophytic species
611 of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. *Fungal Diversity* 67: 181–
612 202.
- 613 Vieira WA, Lima WG, Nascimento ES, Michereff SJ, Câmara MPS, Doyle VP, 2017. The
614 impact of phenotypic and molecular data on the inference of *Colletotrichum* diversity
615 associated with Musa. *Mycologia* **109**: 912-934.
- 616 Vieira WA, Bezerra PA, da Silva AC, Veloso JS, Câmara MPS, Doyle VP, 2020. Optimal
617 markers for the identification of *Colletotrichum* species. *Molecular phylogenetics and*
618 *evolution* **143**: 106-694.
- 619 Villegas-Fernández AM, Sillero JC, Rubiales D, 2012. Triagem de fava para resistência à
620 mancha chocolate: métodos de avaliação e efeitos da idade do tecido hospedeiro e
621 temperatura. *Eur J Plant Pathol* **132**, 443–453
- 622 Xavier CR, da Silva Guerra C, da Silva FSN, Neto OZS, Rodrigues LJ, Takeuchi KP, 2022.
623 Aspectos Produtivos Da Cajucultura e Aproveitamento Integral de Derivados de Caju no
624 Processamento AGROINDUSTRIAL. *RECIMA21-Revista Científica Multidisciplinar-ISSN*
625 **2675-6218**, **3**: 381792.
- 626 Chen J, Hu KX, Hou XQ, Guo SX, 2011. Endophytic fungi assemblages from 10 Dendrobium
627 medicinal plants (Orchidaceae). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **27**: 1009-
628 1016.
- 629 Weir BS, Johnston PR, Damm U, 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex.
630 *Studies in Mycology* **73**: 115-180
- 631 Yu Z, Jiang X, Zheng H, Zhang H, Qiao M, 2022. Fourteen new species of foliar
632 *Colletotrichum* associated with the invasive plant *Ageratina adenophora* and surrounding
633 crops. *Journal of fungi* **8**: 185.
- 634 Zheng H, Yu Z, Jiang X, Fang L, Qiao M, 2022. Endophytic *Colletotrichum* species from
635 aquatic plants in southwest China. *Journal of Fungi* **8**: 87.

Supplementary table S1 Collection details and GenBank accession numbers of isolates included in this study.

Species complex	<i>Colletotrichum</i> species	Culture	Host	Country	Accession number				
					APN2/MAT-IGS	CAL	GAPDH	GS	TUB2
Gloeosporioides	<i>C. aenigma</i>	ICMP 18608*	<i>Persea americana</i>	Israel	KM360143	JX009683	JX010044	JX010078	JX010389
Gloeosporioides	<i>C. aeshynomenes</i>	ATCC 201874*	<i>Aeschynomene virginica</i>	USA	KM360145	JX009721	JX009930	JX010081	JX010392
Gloeosporioides	<i>C. alatae</i>	ICMP 17919*	<i>Dioscorea alata</i>	India	KC888932	JX009738	JX009990	JX010065	JX010383
Gloeosporioides	<i>C. alienum</i>	LC3114	<i>Camellia sinensis</i>	China	KJ954545	KJ954684	KJ954832	KJ954982	KJ955279
Gloeosporioides	<i>C. alienum</i>	ICMP 12071*	<i>Malus domestica</i>	New Zealand	KM360144	JX009654	JX010028	JX010101	JX010411
Gloeosporioides	<i>C. artocarpicola</i>	MFLUCC 18-1167*	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	Thailand	-	-	MN435568	-	MN435567
Gloeosporioides	<i>C. australianum</i>	VPRI 43075*	<i>Citrus sinensis</i>	Australia	MG572171	-	MG572127	MG572160	MG572149
Gloeosporioides	<i>C. asianum</i>	ICMP 18580*, B26CBS 130418	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	FR718814	FJ917506	JX010053	JX010096	JX010406
Gloeosporioides	<i>C. asianum</i>	HKUCC 10862, ICMP 18605	<i>Mangifera indica</i>	Thailand	-	JX009726	JX010021	-	-
Gloeosporioides	<i>C. asianum</i>	IMI 313839, ICMP 18696	<i>Mangifera indica</i>	Australia	-	JX009723	JX009915	JX010073	JX010384
Gloeosporioides	<i>C. asianum</i>	GJS08147	<i>Mangifera indica</i>	Panama	GU994437	-	MF040776	-	GU994466
Gloeosporioides	<i>C. asianum</i>	Coll38	<i>Mangifera indica</i>	USA	JX145308	-	-	-	JX145201
Gloeosporioides	<i>C. asianum</i>	LM1559	<i>Anacardium occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-	
Boninense	<i>C. annellatum</i>	CBS129826	<i>Hevea brasiliensis</i>	Colombia	-	JQ005743	JQ005309		JQ005656
Boninense	<i>C. beeveri</i>	CBS 128527, ICMP 18594*	<i>Brachyglottis repanda</i>	New Zealand	-	JQ005692	JQ005258		JQ005605
Boninense	<i>C. boninense</i>	CBS 123755, MAFF 305972*	<i>Crinum asiaticum</i> var. <i>sinicum</i>	Japan	-	JQ005674	JQ005240		JQ005588
Boninense	<i>C. brasiliense</i>	CBS 128501, ICMP 18607, PAS12*	<i>Passiflora edulis</i>	Brazil	-	JQ005756	JQ005322		JQ005669
Boninense	<i>C. brassicicola</i>	CBS 101059, LYN 16331*	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	New Zealand	-	JQ005693	JQ005259		KC860036
Boninense	<i>C. bromeliacearum</i>	LC0951*	<i>Bromeliaceae</i> .	China	-	MZ799236			MZ673956
Boninense	<i>C. camelliae-japonicae</i>	CGMCC3.18117, LC6415	<i>Camellia japonica</i>	Japan	-	-	KX893583		KX893579
Boninense	<i>C. camelliae-japonicae</i>	CGMCC3.18118, LC6416*	<i>Camellia japonica</i>	Japan	-	-	KX893584		KX893580
Boninense	<i>C. catinaense</i>	CBS 142417 = CPC 27978*	<i>Citrus reticulata</i>	Italy, Catania	-	KY856053	KY856224		KY856482

Boninense	<i>C. citricola</i>	CBS 134228, CGMCC 3.15227*	<i>Citrus unchiu</i>	China	-	KC293697	KC293736		KC293656
Boninense	<i>C. citricola</i>	CBS 134229	<i>Citrus unchiu</i>	China	-	KC293697	KC293737		KC293657
Boninense	<i>C. citricola</i>	SXC161	<i>Proteaceae</i>	China	-	KC293698	KC293738		KC293658
Boninense	<i>C. citricola</i>	LZ4-5	<i>Musa</i> spp	China	-	OL361848	OL361845		OL361857
Boninense	<i>C. colombiense</i>	CBS 129818, G2*	<i>Passiflora edulis</i>	Colombia	-	JQ005695	JQ005261		JQ005608
Gloeosporioides	<i>C. conoides</i>	CAUG17*	<i>Capsicum annuum</i>	China	-	KP890150	KP890162	-	KP890174
Boninense	<i>C. condaoense</i>	CBS 134299	<i>Ipomoea pes-caprae</i>	Vietnam	-		MH229920		MH229923
Boninense	<i>C. constrictum</i>	CBS 128504, ICMP 12941*	<i>Solanum betaceum</i>	New Zealand	-	JQ005759	JQ005325		JQ005672
Boninense	<i>C. cymbidicola</i>	IMI 347923*	<i>Cymbidium</i> sp.	Australia	-	JQ005687	JQ005253		JQ005600
Gloeosporioides	<i>C. chrysophilum</i>	8395	<i>Theobroma cacao</i>	Panama	GU994444	KX094056	KX094176	KX094209	GU994473
Gloeosporioides	<i>C. chrysophilum</i>	CMM4268*	<i>Musa</i> sp.	Brazil	KX094325	KX094063	KX094183	KX094204	KX094285
Gloeosporioides	<i>C. chrysophilum</i>	LM1551	<i>Anacardium occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-	-
Gloeosporioides	<i>C. chrysophilum</i>	Coll919	<i>Terpsichore taxifolia</i>	Puerto Rico	JX145317	KX094057	KX094177	KX094207	KX094288
Boninense	<i>C. dacrycarpi</i>	CBS 130241, ICMP 19107*	<i>Dacrycarpus dacrydioides</i>	New Zealand	-	JQ005757	JQ005323	-	JQ005670
Boninense	<i>C. diversum</i> sp. nov.	LC11292, CQ775*	<i>Philodendron selloum</i>	China	-	-	MZ664081	-	MZ673965
Boninense	<i>C. doitungense</i>	MFLUCC 14-0128*	<i>Dendrobium</i> sp	China	-	-	MH049480	-	MH351277
Gloeosporioides	<i>C. endophyticum</i>	MFLUCC 130418	<i>Pennisetum purpureum</i>	Thailand	-	KC810018	KC832854	-	-
Boninense	<i>C. feijoicola</i>	CBS 144633*	<i>Acca sellowiana</i>	Portugal	-	-	MK876475	-	MK876507
Gloeosporioides	<i>C. fruticicola</i>	3589	<i>Theobroma cacao</i>	Panama	GU994440	KX094067	KX094175	KX094199	KX094280
Gloeosporioides	<i>C. fruticicola</i>	CBS 125397*	<i>Tetragastris panamensis</i>	Panama	JQ807839	JX009674	JX010032	JX010099	JX010409
Gloeosporioides	<i>C. grevilleae</i>	CBS132879	<i>Grevillea</i> sp.	taly		KC296963	KC297010	KC297033	KC297102
Gloeosporioides	<i>C. gloeosporioides</i>	IMI 356878*	<i>Citrus sinensi</i>	Italy	JQ807843	JX009731	JX010056	JX010085	JX010445
Gloeosporioides	<i>C. grossum</i>	CGMCC3.17614, CAUG7, LC6227*	<i>Chili pepper</i>	China	-	-	KP890159	-	KP890171
Boninense	<i>C. hippeastri</i>	CBS 125376, CSSG1*	<i>Hippeastrum vittatum</i>	China	-	JQ005752	JQ005318	-	JQ005665
Gloeosporioides	<i>C. hystricis</i>	CBS142412	<i>Citrus hystrix</i>	Italy	-	KY856104	KY856275	-	KY856533
Gloeosporioides	<i>C. hystricis</i>	CBS142411*	<i>Citrus hystrix</i>	Italy	-	KY856103	KY856274	-	KY856532
Boninense	<i>C. karsti</i>	CBS 111998	<i>Leucospermum</i> sp.	Australia	-	JQ005733	JQ005299	-	JQ005646
Boninense	<i>C. karsti</i>	CBS 112762	<i>Leucospermum</i> sp.	Australia	-	JQ005734	JQ005300	-	JQ005647
Boninense	<i>C. karsti</i>	CBS126532	<i>Citrus</i> sp.	South Africa	-	JQ005730	JQ005296	-	JQ005643

Boninense	<i>C. karsti</i>	CBS 127597*	<i>Diospyros australis</i>	Australia	-	JQ005725	JQ005291	-	JQ005638
Boninense	<i>C. karsti</i>	LM122	<i>Carica papaya</i>	Brazil	-	ON063634	MN228522	-	-
Boninense	<i>C. karsti</i>	LM124	<i>Carica papaya</i>	Brazil	-	ON063635	MN228525	-	-
Boninense	<i>C. karsti</i>	LM1565	<i>Anacardium occidentale L.</i>	Brazil	-	-	-	-	-
Boninense	<i>C. karsti</i>	LM142	<i>Carica papaya</i>	Brazil	-	ON063627	MN228529	-	-
Boninense	<i>C. karsti</i>	LM322	<i>Carica papaya</i>	Brazil	-	ON063632	MN228521	-	-
Boninense	<i>C. karsti</i>	LM329	<i>Carica papaya</i>	Brazil	-	ON063631	MN228523	-	-
Boninense	<i>C. karsti</i>	CBS 128551, ICMP 12065	<i>Citrus sp.</i>	New Zealand	-	JQ005729	JQ005295	-	JQ005642
Boninense	<i>C. karsti</i>	CBS 128548, ICMP 18589	<i>Solanum lycopersicum</i>	New Zealand	-	JQ005726	JQ005292	-	JQ005639
Boninense	<i>C. karsti</i>	CBS 125468, GBZ7-3	<i>Coffea sp.</i> , berry tissue	Vietnam	-	OK040206	OK040216	-	OK040221
Boninense	<i>C. limonicola</i>	CBS 142410 = CPC 31141*	<i>Citrus limon</i>	Malta	-	KY856125	KY856296	-	KY856554
Gloeosporioides	<i>C. makassarens</i>	CBS 143664*	<i>Capsicum annum</i>	Indonesia	-	-	MH728820	MH748264	MH846563
Gloeosporioides	<i>C. mengyinense</i>	SAUCC200912	<i>Juglans regia</i>	China	-	MW922539	MW876472	MW88896	MW888971
Gloeosporioides	<i>C. mengyinense</i>	SAUCC200983	<i>Juglans regia</i>	China	-	MW922543	MW876476	MW888966	MW888975
Gloeosporioides	<i>C. musae</i>	CBS 116870*, ICMP 19119	<i>Musa sp.</i>	USA	KC888926	JX009742	JX010050	JX010103	HQ596280
Boninense	<i>C. novae-zelandiae</i>	CBS 128505, ICMP 12944*	<i>Capsicum annum</i>	New Zealand	-	JQ005749	JQ005315	-	JQ005662
Gloeosporioides	<i>C. noveboracense</i>	AFK423	<i>Malus domestica</i>	Ulster/NY	MN701184	MN701191	MN741085	MN741099	MN701194
Gloeosporioides	<i>C. noveboracense</i>	AFKH109*	<i>Apple/Idared</i>	Columbia/NY	MN640564	MN640566	MN640567	MN640568	MN640569
Gloeosporioides	<i>C. nupharicola</i>	CBS 472.96, ICMP 17940	<i>Nymphaea odorata</i>	USA	JX145320	JX009662	JX010031	JX010089	JX010399
Gloeosporioides	<i>C. nupharicola</i>	CBS 470.96*, ICMP 18187	<i>Nuphar lutea subsp. polysepala</i>	USA	JX145319	JX009661	JX009936	JX010088	JX010397
Boninense	<i>C. parsonsiae</i>	CBS 128525, ICMP 18590*	<i>Parsonsia capsularis</i>	New Zealand		JQ005754	JQ005320	-	JQ005667
Gloeosporioides	<i>C. perseae</i>	GA039	<i>Persea americana</i>	Israel	KX620172	KX620200	KX620236	KX620269	KX620335
Gloeosporioides	<i>C. perseae</i>	CBS141365*	<i>Persea americana</i>	Israel	KX620177	KX620206	KX620242	KX620275	KX620341
Gloeosporioides	<i>C. proteae</i>	CBS132882*	<i>Protea sp.</i>	South Africa	-	KC296960	KC297009	KC297032	KC297101
Gloeosporioides	<i>C. proteae</i>	CBS134301	<i>Protea sp.</i>	South Africa	-	KC842375	KC842379	KC842381	KC842387
Boninense	<i>C. petchii</i>	CBS 378.94*	<i>Dracaena marginata</i>	Italy	-	JQ005744	JQ005310	-	JQ005657
Boninense	<i>C. phyllanthi</i>	GS10	<i>B. variegata</i>	India	-	JX863677	JX576718	-	JX576715

Boninense	<i>C. phyllanthi</i>	CBS 175.67, MACS 271*	<i>Phyllanthus acidus</i>	India	-	JQ005742	JQ005308	-	-
Singleton	<i>C. pyrifoliae</i>	PAFQ22a	<i>Pyrus spp.</i>	China	-	-	MG874826	-	MG874842
Gloeosporioides	<i>C. pseudotheobromicola</i>	MFLUCC 18-1602	<i>Prunus avium</i>	China	-	-	MH853675	-	MH853684
Boninense	<i>C. pseudoboninense</i>	CBS 123921	<i>Dendrobium kingianum</i>	Japan		JQ005684	JQ005250		JQ005597
Gloeosporioides	<i>C. queenslandicum</i>	ICMP1778	<i>Anacardium occidentale</i>	Brazil	MF110640	MF110829	MF110850	MF110997	MF111060
Agaves	<i>C. sansevieriae</i>	MAFF 239721*	<i>Sansevieria trifasciata</i>		-	LC180125	LC180130	-	LC180128
Gloeosporioides	<i>C. salsolae</i>	ICMP 19051*	<i>Salsola tragus</i>	Hungary	KC888925	JX009696	JX009916	JX010093	JX010403
Gloeosporioides	<i>C. siamense</i>	CMM4244	<i>Musa sp.</i>	Brazil	KX094315	KX094055	KX094172	KX094226	KX094299
Gloeosporioides	<i>C. siamense</i>	CMM4247	<i>Musa sp.</i>	Brazil	KX094301	KX094038	KX094155	KX094196	KX094261
Gloeosporioides	<i>C. siamense</i>	CMM4248	<i>Musa sp.</i>	Brazil	KX094314	KX094037	KX094154	KX094229	KX094300
Gloeosporioides	<i>C. siamense</i>	LM130	<i>Carica papaya</i>	Brazil	ON063610	ON063628	MN228552	ON063603	-
Gloeosporioides	<i>C. siamense</i>	CBS130417	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	KP703769	FJ917505	-	JX010094	JX010404
Gloeosporioides	<i>C. siamense</i>	CMM4081	<i>Mangifera indica</i>	Brazil	KX094310	KX094053	KX094166	KX094220	KX094272
Gloeosporioides	<i>C. siamense</i>	ICMP 18578*, CBS 130417	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	JQ899289	FJ917505	JX009924	-	-
Gloeosporioides	<i>C. siamense</i>	LM1548	<i>Anacardium occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-	-
Gloeosporioides	<i>C. siamense</i>	LM1553	<i>Anacardium occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-	-
Gloeosporioides	<i>C. tainanense</i>	CBS 143666*	<i>Capsicum annum</i>	Taiwan	MH728836	-	MH728823	MH748259	MH846558
Boninense	<i>C. torulosum</i>	CBS 128544, ICMP 18586*	<i>Solanum melongena</i>	New Zealand		JQ005685	JQ005251	-	JQ005598
Gloeosporioides	<i>C. theobromicola</i>	CBS 124945*, ICMP 18649	<i>Theobroma cacao</i>	Panama	KC790726	JX009591	JX010006	JX010139	JX010447
Gloeosporioides	<i>C. theobromicola</i>	CMM4242	<i>Musa sp.</i>	Brazil	KX094320	KX094068	KX094173	KX094197	KX094278
Gloeosporioides	<i>C. theobromicola</i>	GJS0843	<i>Theobroma cacao</i>	Panama	GU994447	-	-	-	GU994476
Gloeosporioides	<i>C. theobromicola</i>	LM1548	<i>Anacardium occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-	
Gloeosporioides	<i>C. theobromicola</i>	IMCP17895	<i>Annona diversifolia</i>	Mexico	-	JX009600	JX010057	JX010066	JX010382
Gloeosporioides	<i>C. tropicale</i>	CBS 124949*, ICMP 18653	<i>Theobroma cacao</i>	Panama	GU994425	JX009719	JX010007	JX010097	GU994454
Gloeosporioides	<i>C. tropicale</i>	CMM2999	<i>Anacardium occidentale</i>	Brazil	MF110688	MF110804	MF110846	MF111038	MF111088
Gloeosporioides	<i>C. tropicale</i>	CMM3228	<i>Anacardium occidentale</i>	Brazil	MF110690	MF110806	MF110905	MF111039	-
Gloeosporioides	<i>C. tropicale</i>	LM1558	<i>Anacardium occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-	-
Gloeosporioides	<i>C. tropicale</i>	LM1564	<i>Anacardium occidentale</i>	Brazil	-	-	-	-	-

Gloeosporioides	<i>C. tropicale</i>	CMM 4073	<i>Mangifera indica</i>	Brazil	-	KC517217	KC517185	KC430870	KC517262
Gloeosporioides	<i>C. viniferum</i>	GZAAS 5.08601*	<i>Vitis vinifera</i>	China	-	JQ309639	JN412798	-	JN412813
Boninense	<i>C. watphraense</i>	MFLUCC 14-0123*	<i>Dendrobium sp</i>	China	-	-	MH049479	-	MH351276
Boninense	<i>C. chamaedoreae</i>	NN052890*	<i>Chamaedorea erumpens</i>	China	-	-	MZ664086	-	MZ674009
Boninense	<i>C. chongqingense</i>	CS0612*	<i>Camellia sinensis</i>	China	-	MT976104	MG602029	-	MG602051
Boninense	<i>C. chongqingense</i>	CB6-2	<i>Camellia sinensis</i>	China	-	MT976098	MG602023	-	MG602045
Boninense	<i>C. chongqingense</i>	CB6-3	<i>Camellia sinensis</i>	China	-	MT976099	MG602024	-	MG602046
Gloeosporioides	<i>C. xanthorrhoeae</i>	CBS 127831*	<i>Xanthorrhoea preissii</i>	Australia	KC790689	JX009653	JX009927	JX010138	JX010448

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands; CMM: Culture Collection of Phytopathogenic Fung “Prof. Maria Menezes”, Recife, Brazil; GZAAS: Guizhou Academy of Agricultural Sciences Herbarium, China; ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants, Auckland, New Zealand; LC: Working collection of Lei Cai, housed at CAS, China; MFLUCC: Mae Fah Luang University Culture Collection, Chiang Rai, Thailand; LM: Working collection of Laboratório de Micologia, housed at UFRPE, Brazil; CGMCC: China General Microbiological Culture Collection Center, China; GZAAS: herbarium of Guizhou Academy of Agricultural Sciences, China; JZB: Culture collections of Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, China.
T = ex-type culture. Strains collected and sequences generated for this study are in bold font.
APN2/MAT-IGS: intergenic spacer between DNA lyase and the mating-type locus MAT1-2; CAL: calmodulin; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GS: glutamine synthetase; TUB2: β -tubulin

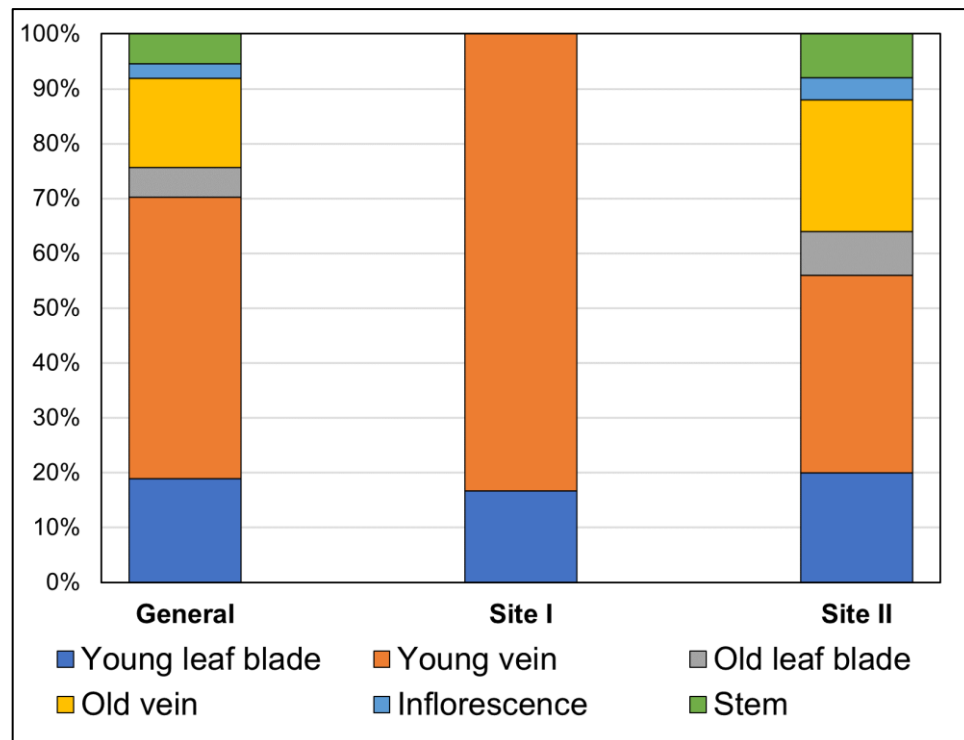


Fig. 1. Percentage of *Colletotrichum* isolation in different plant organs in *Anacardium occidentale* in two areas of Recife-PE

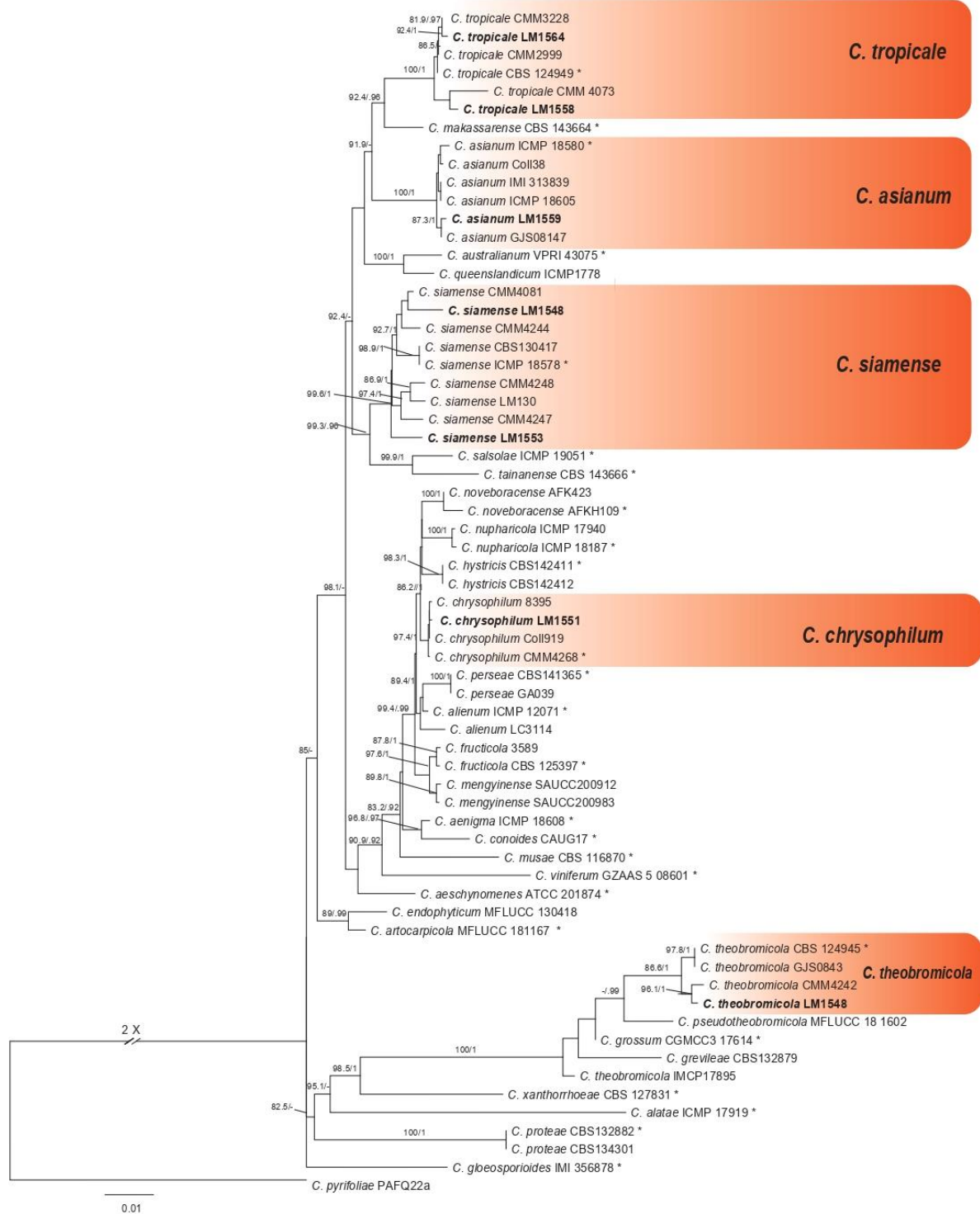


Fig. 2. Maximum likelihood tree of the *C. gloeosporioides* species complex inferred in IQ-TREE from a concatenated alignment of APN2/MAT-IGS, CAL, GAPDH, GS and TUB2. Bootstrap support values (ML ≥ 80) and posterior Bayesian probability values (PP ≥ 0.95) are shown above the branch with “*” at the end of taxon labels. *Colletotrichum* isolates are highlighted in bold. The scale bar indicates the average number of replacements per site.

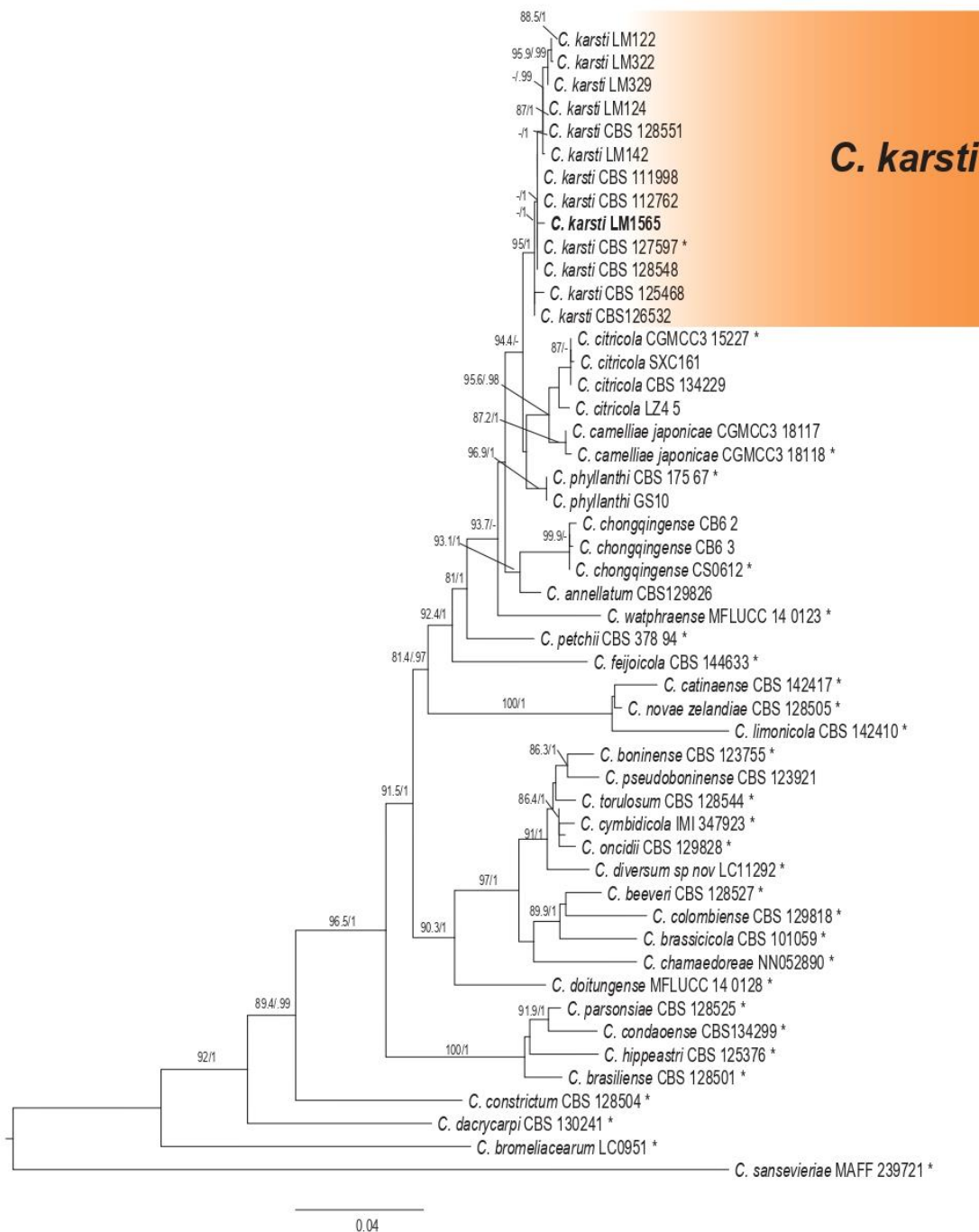


Fig. 3. Maximum likelihood tree of the *C. boninense* species complex inferred in IQ-TREE from a concatenated alignment of CAL, GAPDH and TUB2. Bootstrap support values (ML $\geq$ 80) and posterior Bayesian probability values (PP $\geq$ 0.95) are shown above the branches. The tree was rooted with *Colletotrichum sansevieriae*. Ex-type isolates are indicated with “*” at the end of taxon labels. *Colletotrichum* isolates are highlighted in bold. The scale bar indicates the average

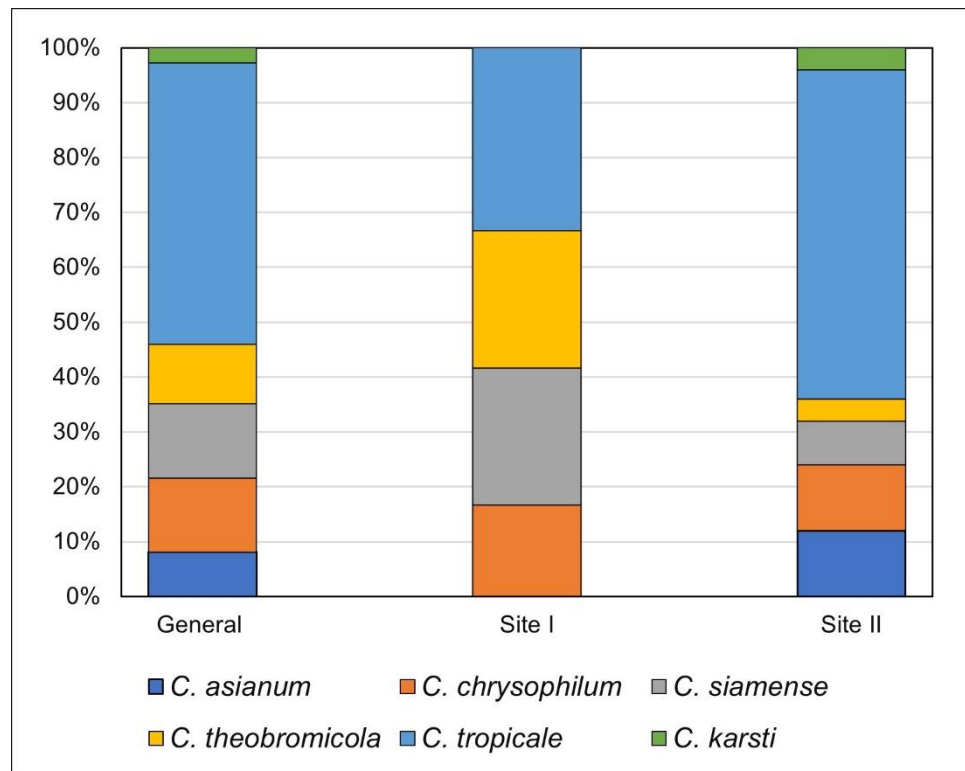


Fig. 4. Prevalence of *Colletotrichum* species isolated as cashew endophytes from each sampled sites.

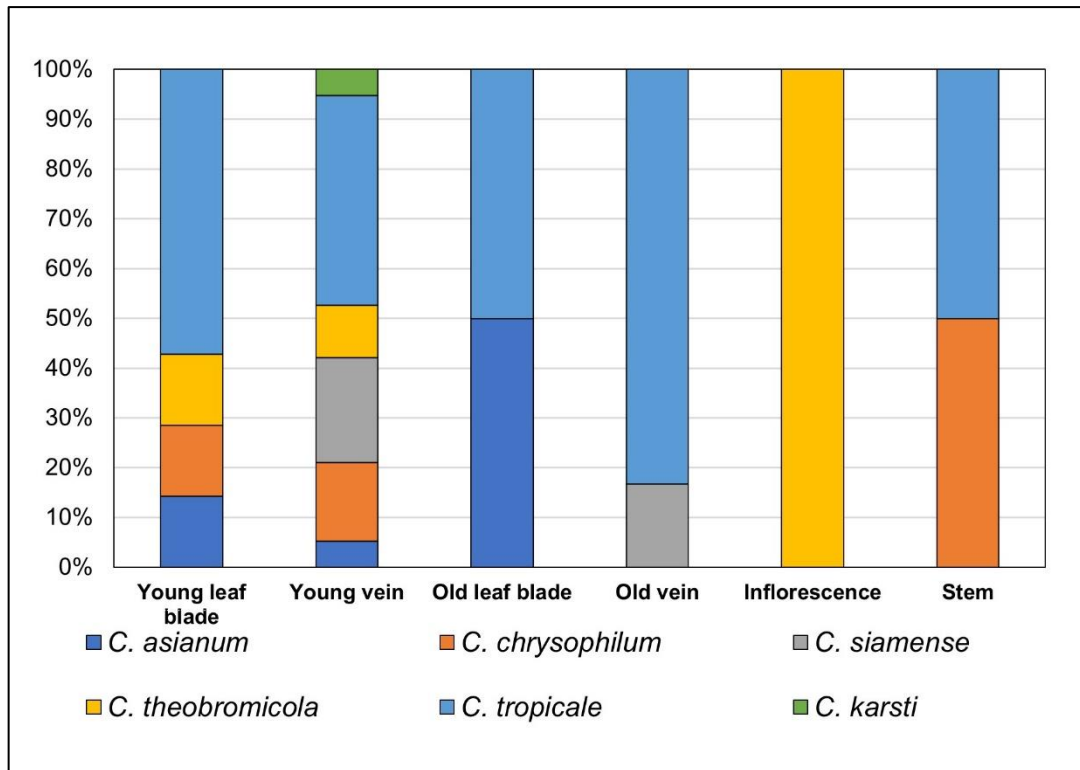


Fig. 5. Prevalence of *Colletotrichum* species isolated as cashew endophytes by plant organ.

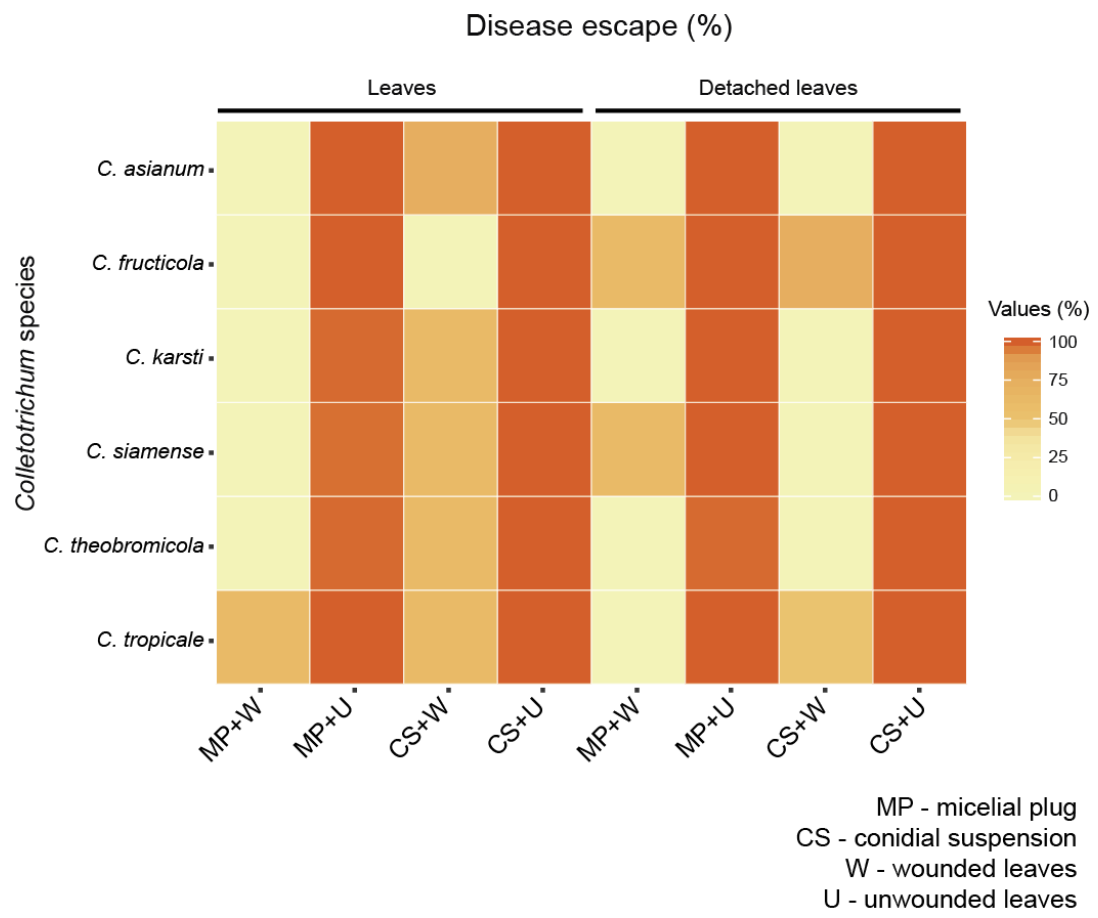


Fig. 6. Comparison of disease escape of species in leaves and detached leaves in different inoculation methods. Evaluations were in 8 days on detached leaves and 8 to 15 days on leaves. The data were transformed into Log X,0 1 for the construction of Heapmat.

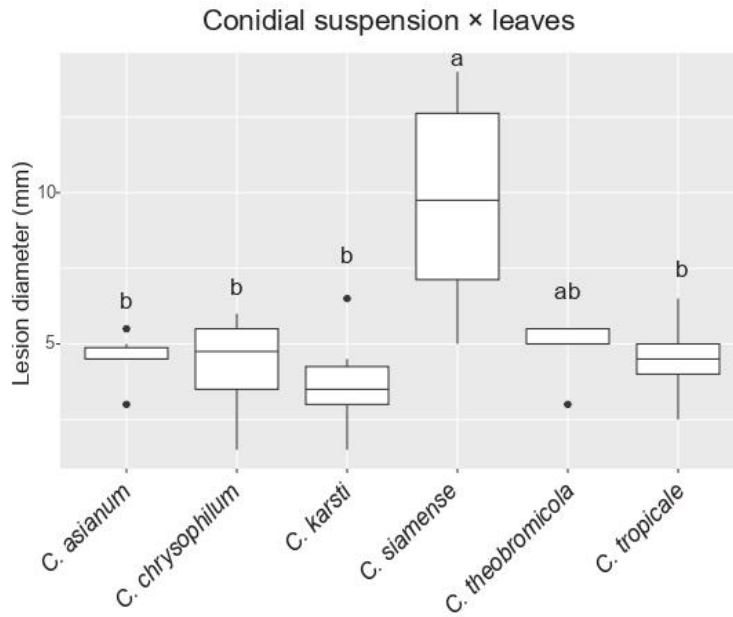


Fig. 7. Aggressiveness of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on wounded leaves of *Anacardium occidentale*. Leaves inoculated with conidia suspension evaluated at 15 days. Data were treated as non-parametric and analyzed using the Kruskal-Wallis test. Black circles show data distribution discrepancies.

151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165

166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184

CAPÍTULO III



Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

- Area de coleta e a parte da planta interferem na porcentagem de isolamento de *Colletotrichum* endofíticos em cajueiros no estado de Pernambuco.
- A combinação dos genes APN2/MAT-IGS, CAL, GAPDH, GS e TUB2 foi eficiente para a identificação de seis espécies de *Colletotrichum* endofíticas associadas ao cajueiro no Brasil.
- 5 espécies endofíticas em cajueiros (*C. asianum*, *C. chrysophilum*, *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. tropicale*) pertencentes ao complexo de espécies *C. gloeosporioides* s. l. e 1 espécie (*C. karsti*) ao complexo de espécies *C. boninense* s. l.
- Os isolados de *Colletotrichum* endofíticos são patogênicos quando inoculadas ao cajueiro.
- *Colletotrichum tropicale* e a espécie endofítica mas prevalente em cajueiros nas duas áreas analisadas.