



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
BACHARELADO EM AGRONOMIA**

Myrella Graziela Gomes da Silva

RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO:

Diversidade de espécies de *Colletorichum* associadas à antracnose do Inhame no estado de
Pernambuco

Recife

2024

RELAÇÃO DE ESTÁGIO REALIZADO

NOME: Myrella Graziela Gomes da Silva

MATRÍCULA: 200712295

CURSO: Bacharelado

ORIENTADOR (a): Marcos Paz Saraiva Câmara

ESTABELECIMENTO DE ENSINO: Universidade Federal Rural de
Pernambuco

AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder à vida e a oportunidade de batalhar pelos meus objetivos, abrindo portas para um futuro promissor e permitindo-me persistir durante as adversidades.

À minha mãe, Patrícia Gomes da Silva, por ser meu maior suporte, meu porto seguro, minha melhor amiga, minha companheira, minha inspiração, meu incentivo a evoluir a cada dia.

À minha avó e minha tia, por todo apoio e companheirismo ao longo dos meus anos de vida, por todo cuidado e fé que depositam em mim diariamente, por serem exemplos de persistência naquilo que acreditam, por toda jornada que me acompanharam.

Aos meus amigos Thiago Andrezo, Débora Oliveira e Gilmar Ribeiro, por todos os momentos felizes e estressantes vividos, por todo apoio e suporte, por termos ido até o fim mesmo com tantos percalços.

À equipe do Laboratório de Fungos Fitopagênicos e Adelmo de Santana por todos os ensinamentos, apoio e companheirismo, agradeço à confiança em mim para desenvolver este trabalho e pela responsabilidade a mim encabida.

À mim, por ter persistido, por ter tentado o meu melhor e falhado tantas vezes, por ter me dedicado tantos anos e por ter decidido recomeçar. Nenhuma mudança é fácil, as vezes acreditar em si mesmo é mais do que angustiante, mas precisamos ter fé. Em Deus, na vida e em nós mesmos. Não importa quantas vezes tenhamos que recomeçar. Tenha fé em Deus e tenha fé na vida, tente outra vez.

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	6
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1. A CULTURA DO INHAME.....	6
2.2. A ANTRACNOSE DO INHAME.....	8
2.3. O GÊNERO COLLETOTRICHUM.....	8
3. OBJETIVOS.....	9
3.1. OBJETIVO GERAL.....	9
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
4.1. COLETA, ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO.....	10
4.2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	11
4.3. ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	11
4.4. RECONHECIMENTO DE ESPÉCIES.....	12
4.5. PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA.....	12
4.6. PREVALÊNCIA.....	12
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
5.1. COLETA E ISOLAMENTO.....	13
5.2. ANÁLISES FILOGENÉTICAS MULTILOCUS E RECONHECIMENTO DE ESPÉCIES.....	13
5.3. PREVALÊNCIA.....	17
5.4. PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA.....	17
6. CONCLUSÃO.....	19
7. REFERÊNCIAS.....	20

RESUMO

O inhame é uma monocotiledônea perene, pertencente ao gênero *Dioscorea* e família Dioscoreaceae. A antracnose do inhame ocasionada por espécies de *Colletotrichum*, causam manchas necróticas que tendem a coalescer formando grandes áreas necrosadas. O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do inhame no estado de Pernambuco. As coletas foram realizadas em três municípios do estado de Pernambuco: Bonito, Recife e Vitória de Santo Antão. Folhas com sintomas característicos de antracnose foram encaminhadas ao Laboratório de Micologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os isolados foram obtidos de fragmentos de folhas de inhame. Os fragmentos foram desinfestados em etanol 70% por 30 segundos, seguido por hipoclorito de sódio à 1,5% por 1 minuto, e lavagem dupla em água destilada esterilizada por 30 segundos. Os isolados obtidos foram preservados pelos métodos de Castellani e sílica-gel. As preservações foram depositadas na coleção do Laboratório de Micologia. Posteriormente iniciou-se a identificação molecular dos isolados. Para obtenção do DNA genômico, os isolados foram cultivados em placas de Petri com meio de cultura asparagina e incubados por 7 dias. Os resultados das extrações foram visualizados em gel de agarose a 1,5%. Para identificação molecular, foram sequenciados genes informativos para esse gênero fúngico. As relações evolutivas foram analisadas utilizando a análise de máxima verossimilhança (MV). Para o teste de patogenicidade, mudas de inhame (cv. da Costa) com 45 dias de idade, foram inoculadas com suspensão de esporos (10^6 conídios mL⁻¹) mediante ferimento, com isolados representativos de cada espécie de *Colletotrichum*. As mudas inoculadas foram mantidas em câmara úmida por 24h e a avaliação se deu 7 dias após a inoculação. A avaliação consistiu na medição do diâmetro ortogonal das lesões. A testemunha foi inoculada com água destilada esterilizada. Foram obtidos 39 isolados de *Colletotrichum* a partir das lesões de antracnose no inhame. Através da identificação molecular constatou-se 6 espécies de *Colletotrichum* ocasionando a doença. Todos os isolados avaliados foram patogênicos. A espécie *Colletotrichum* sp1 foi a prevalente entre os municípios pernambucanos e também a mais virulenta.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo do inhame (*Dioscorea* sp.) desempenha importante papel socioeconômico no estado de Pernambuco. Trata-se de uma atividade que movimenta a economia local, emprega mão-de-obra, visa à alimentação, geração de renda direta e indireta. Dentre os municípios produtores da cultura no estado, Bonito destaca-se com maior expressividade de produção, com mais de três mil hectares designados para cultivo. escoando sua produção tanto para mercados locais, quanto alguns países da Europa e Estados Unidos. (MENDES, 2010; SANTOS, 2023)

A ocorrência de doenças na cultura do inhame é um dos principais fatores responsáveis pela redução da produtividade. Dentre os fitopatógenos incidentes no inhame, os fungos apresentam alta importância pela capacidade de causar perdas econômicas. Entre os fungos que infectam a parte aérea, foram relatadas espécies do gênero *Colletotrichum* associadas à antracnose do inhame no mundo. A infecção do patógeno na região foliar causa redução de área fotossintética, e consequente menor desenvolvimento da tubera, produto comercial, gerando perdas de rendimento superiores a 85% (GREEN, 1994). Contudo, no Brasil, trabalhos sobre a etiologia de *Colletotrichum* causando a antracnose do inhame ainda são escassos, criando um empecilho referente ao entendimento da epidemiologia da doença para elaboração de estratégias de manejo eficientes.

Atualmente, a identificação de espécies de *Colletotrichum* baseia-se na abordagem polifásica, considerando diversos dados que possibilitam maior confiabilidade nas identificações. Diante disso, é de extrema importância o estudo sobre a diversidade de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do inhame no estado de Pernambuco.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A CULTURA DO INHAME

O inhame (*Dioscorea* spp.) é uma monocotiledônea, perene, pertencente ao gênero *Dioscorea* e família Dioscoreaceae, originário no continente africano e cultivado em regiões de clima tropical e subtropical. O gênero *Dioscorea* apresenta cerca de 600 espécies, sendo as mais importantes as que produzem túberas comestíveis, como *D. cayennensis*, *D. rotundata*, *D. alata*, *D. trifida* e *D. esculenta* (SANTOS et al. 2006). A dispersão do gênero *Dioscorea* ocorreu no final do período

Cretáceo, causando evoluções em diferentes regiões que originaram diferentes espécies. As principais regiões de dispersão para tais espécies são as Américas, África, Madagascar, Sul e Sudeste da Ásia, Melanésia e Austrália (LEBOT, 2009).

Embora seja cultivado desde a antiguidade por povos primitivos, o inhame só chegou à civilização ocidental quando o tráfico de escravos se intensificou (SIQUEIRA, 2009). O processo de colonização pelos portugueses e espanhóis foi responsável pela inserção de novas variedades de inhame na América do Sul, contudo, portugueses e espanhóis relataram que encontraram índios cultivando essa planta quando chegaram à América, por isso o nome “cará”, que é originário da língua tupi-guarani (ABRAMO, 1990). Por causa do processo de dispersão continental as espécies de *Dioscorea* estão espalhadas por mais de 50 países tropicais (LEBOT, 2009).

Em 2019, a produção de inhame no Brasil alcançou em torno de 249 mil toneladas, com a região Nordeste sendo a maior produtora nacional (ASSIS e SILVA, 2017; FAO, 2021). Destacam-se os estados da Paraíba, Bahia, Pernambuco, Alagoas, Maranhão e Sergipe com grandes números de produção e importância socioeconômica da cultura (BRITO *et al.*, 2011). Nesses estados, destacam-se o cultivo das espécies *D. cayannensis* e *D. alata*, conhecidos popularmente como inhame-da-costa e inhame São Tomé, ou cará São Tomé, respectivamente. A maior parte desta produção de inhame é encaminhada para o comércio interno e a outra parte, a de melhor qualidade comercial, para exportação, sendo os Estados Unidos, Reino Unido, Países Baixos, Canadá e França os principais importadores (MESQUITA, 2002). Em Pernambuco, o município de Bonito é caracterizado como maior produtor de inhame, com destinação das túberas à mercados internos e externos (MENDES, 2010).

Os problemas fitossanitários do inhame no Nordeste são os principais fatores que limitam a produtividade da cultura, pois afetam o desenvolvimento e qualidade das túberas, reduzem o valor unitário no comércio interno, além de provocarem exclusões nas exportações (MOURA, 2006). Dentre os patógenos de importância da cultura, os fungos e os nematoides se destacam pelos danos causados e perdas econômicas (NORONHA, 2014). No inhame, os fungos estão entre os patógenos associados a doenças de parte aérea, destacando-se a queima das folhas e a antracnose.

2.2. A ANTRACNOSE DO INHAME

A antracnose é frequentemente relatada como uma das principais doenças foliares do inhame. A infecção ocorre durante todo o ciclo fenológico da planta, embora as plantas jovens sejam mais vulneráveis ao ataque do patógeno. As plantas jovens podem morrer sem produzir túberas, ou cada rebento pode produzir pequenas túberas sem valor comercial antes de morrer com o ataque precoce do patógeno (NTUI *et al.*, 2021).

A antracnose inicia quando o patógeno penetra nas aberturas naturais, como os estômatos e a cutícula intacta na superfície da folha (NWANKITI *et al.*, 1987). No geral, os sintomas de antracnose são descritos como lesões necróticas, deprimidas, com bordas salientes e formato angular, que sob condições favoráveis de temperatura e umidade tendem a coalescer e apresentar os sinais do patógeno no centro da lesão. No inhame, os sintomas variam conforme a variedade e as condições climáticas da região (AKEM, 1999). Os sintomas iniciais são caracterizados por pequenas lesões amarronzadas ou pretas nas folhas jovens, frequentemente vistas na face adaxial, podendo ou não apresentar halo clorótico. Em condições favoráveis, ocorre a coalescência das lesões e necrose foliar, reduzindo a área fotossintética do tecido foliar (NTUI *et al.*, 2021).

No leste da África, a espécie mais devastadora associada à antracnose do inhame é a *C. alatae* (NTUI *et al.*, 2021), enquanto no Brasil a antracnose do inhame é associada a espécie *C. gloesporioides*, com base em caracteres morfológicos, embora a etiologia da doença careça de estudos até o momento.

2.3. O GÊNERO COLLETORICHUM

O gênero *Colletotrichum*, pertencente ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes e família Glomerellaceae, foi inicialmente introduzido por Tode (1790) como *Vermicularia*. Contudo, apenas através da revisão feita por Corda em 1831 foi estabelecida identificação atual. Trata-se de um gênero com ampla difusão geográfica, considerado cosmopolita, encontrado em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Os fungos desse gênero possuem micélio septado, conídios hialinos e unicelulares, reproduzem-se via assexuada por meio dos conídios em conidióforos do tipo acérvulos (PUTZKE; PUTZKE, 2002). Os principais estilos de vida fitopatogênicos deste gênero são biotrófico, hemibiotrófico, endofítico e necrotrófico (DUARTE, 2021).

Atualmente, 280 espécies fazem parte do gênero, 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. (LIU et al., 2022).

Por muitas décadas a identificação de espécies do gênero *Colletotrichum* baseava-se principalmente na análise das características morfológicas, como o tamanho e forma dos conídios, apressórios, células conidiogênicas, presença ou ausência de setas, escleródios e acérvulos, presença de teleomorfo, cor, taxa de crescimento e textura da colônia (SUTTON, 1980).

Entretanto, atualmente, a identificação molecular baseada em análises filogenéticas multilocus tem sido uma ferramenta utilizada para classificação, descrição e elucidação das relações filogenéticas dos membros do *Colletotrichum* (DOWLING, et al., 2020; TALHINHAS; BARONCELLI, 2021).

O advento da biologia molecular para análises filogenéticas inicialmente baseou-se na região espaçadora transcrita interna (ITS) e posteriormente na tipagem de sequência multilocus (TALHINHAS; BARONCELLI, 2021). Atualmente, estudos têm mostrado o uso de vários marcadores moleculares como actina (ACT), quitina sintase (CHS-1), β -tubulina (TUB2), Calmodulina (CAL), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), histamina (HIS3), glutamina sintetase (GS), DNA lyase (apn2), região intergênica de apn2 e MAT1-2-1 (APMAT) para compreender melhor a divergência filogenética de espécies de *Colletotrichum*.

A identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas ao inhamé por meio de análises filogenéticas multi-locus é extremamente necessária para conhecimento da variabilidade da população do patógeno e compreender o seu ciclo de vida.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL:

- Identificar as espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do Inhamé no estado de Pernambuco através de análises filogenéticas multi-locus.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar a diversidade de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do inhame no estado de Pernambuco;
- Avaliar a prevalência das espécies de *Colletotrichum* nas diferentes áreas amostradas;
- Caracterizar as diferentes espécies de *Colletotrichum* quanto à patogenicidade e virulência em mudas de inhame.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. COLETA, ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO

As coletas foram realizadas nas cidades de Bonito, Vitória de Santo Antão e Recife. Folhas com sintomas típicos de antracnose foram coletadas e encaminhadas para o Laboratório de Fungos Fitopatogênicos da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Para obtenção dos isolados, as folhas foram lavadas em água corrente e submetidas à técnica de isolamento indireto, retirando fragmentos da interseção entre tecido lesionado e tecido sadio para desinfestação por 1 minuto em etanol 70%, 1 minuto no hipoclorito de sódio à 1,5% e enxaguados duas vezes por 30 segundos em água destilada esterilizada (ADE).

Em seguida, os fragmentos foram transferidos para placas de Petri com meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) acrescidos de sulfato de estreptomicina (0.03 g L⁻¹) para inibir crescimento bacteriano, com posterior incubação à 25 ± 2 °C em luz contínua. O crescimento fúngico a partir do material botânico lesionado foi conferido diariamente e as colônias que possuíam características fenotípicas semelhantes às de *Colletotrichum* foram repicadas e novamente colocadas em meio BDA para posterior preservação dos isolados em tubos criogênicos de 1,5 µl contendo água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1939) e em tubos criogênicos contendo sílica-gel (PERKINS, 1962).

4.2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Para obtenção do DNA genômico, os isolados foram cultivados em placas de Petri com meio composto por asparagina (2 g/L⁻¹), extrato de levedura (2 g/L⁻¹), nitrato de potássio (1 g/L⁻¹), e dextrose (10 g/L⁻¹), com incubação por 7 dia. Retirou-se uma fração do micélio das colônias e utilizou-se o protocolo adaptado CTAB (brometo de

cetiltrimetilamônio) descrito por Doyle & Doyle (1990). Os resultados das extrações foram visualizados em gel de agarose/TAE 1,5%, por eletroforese.

Para identificação molecular, inicialmente foi amplificada a região parcial da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) para todos os isolados para identificar a diversidade de haplótipos através do DnaSP v.6. As sequências obtidas foram comparadas com as do GenBank utilizando a ferramenta BLAST para identificar o complexo de espécies de *Colletotrichum* que os isolados pertenciam.

As amplificações por PCR foram realizadas em uma reação de volume de 12,5 µL contendo 4 µL de água, 1 µL de modelo de DNA, 0,625 µL de cada primer (10 µM) e 6,25 µL de mix de PCR 2× (Promega GoTaq Master Mix; Madison, Wisconsin, EUA). Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose/TAE 1,5%, por eletroforese.

Os produtos de PCR foram purificados por precipitação com etanol e acetato de amônio e sequenciados em analisador de DNA ABI 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) em plataforma de sequenciamento de DNA localizada no Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva – LABBE da Universidade Federal de Pernambuco. As leituras de sequência foram montadas em contigs e editadas usando o pacote Staden (STADEN et al. 1998).

4.4. ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Sequências de isolados ex-tipo e referências de *Colletotrichum* de estudos anteriores foram recuperadas do GenBank e incluídas em análises filogenéticas (Tabela 1). Alinhamentos de múltiplas sequências (MSA) foram gerados com a versão online do MAFFT 7 com o método de refinamento iterativo Q-INS-i (KATO et al. 2002). Para a análise multi-locus, os loci foram concatenados usando Sequence Matrix v. 1.8 (VAIDYA et al. 2011).

As relações evolutivas foram analisadas usando a análise de máxima verossimilhanças (MV) utilizando os programas RAXML-HCP2 v.7.0.4 (STAMATAKIS, 2014) implementado no Portal CIPRES Science Gateway (<https://www.phylo.org/portal2/home.action>). As análises MV foram realizadas com 1000 pseudoreplicatas (-m GTRGAMMA -p 12345 -k -f a -N 1000 -x 12345) sob modelo GTRGAMMA.

4.5. RECONHECIMENTO DE ESPÉCIES

Foi aplicado o método da concordância genealógica para identificação de linhagens filogenéticas independentes (DETTMAN *et al.*, 2003; TAYLOR *et al.*, 2000). Um clado é considerado uma linhagem filogenética independente se pelo menos um dos dois critérios de concordância for satisfeito (DUARTE *et al.*, 2023). O critério de concordância genealógica determina que o clado é presente na maioria das árvores genéticas individuais. O critério genealógico de discordância determina que o clado é fortemente suportado em pelo menos uma das árvores genéticas individuais em análises de ML e BI e não contraditas em qualquer outra árvore genética individual no mesmo nível de suporte.

Novas espécies são aceitas se o clado (i) for reconhecido como uma linhagem filogenética independente; (ii) apresentar apoio significativo em análises multi-locus de ML e BI; e (iii) não conter o tipo de qualquer espécie descrita anteriormente (DUARTE *et al.*, 2023).

4.6. PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA

O teste de patogenicidade foi realizado de conforme os postulados de Koch. Mudanças de inhame (cv. da Costa) com 45 dias de idade foram inoculadas com 10 µl de suspensão de esporos (10^6 conídios mL⁻¹) mediante ferimento, com isolados representativos de cada espécie de *Colletotrichum* testados. A quantificação de esporos ocorreu na Câmara de Newbauer (hemacitômetro). As mudas inoculadas foram mantidas em câmara úmida por 24h e a avaliação se deu 7 dias após a inoculação.

Sintomas típicos de antracnose foram verificados em todas as mudas. A avaliação consistiu na medição do diâmetro ortogonal das lesões. Sintomas típicos de antracnose foram verificados em todas as mudas 7 dias após a inoculação. O patógeno foi reisolado das lesões e fenotipicamente comparado com os isolados inoculados. A virulência foi avaliada medindo o diâmetro ortogonal das lesões com auxílio de um paquímetro em duas direções perpendiculares. Foi realizado os cálculos do diâmetro médio da lesão (DML). Os sintomas foram comparados com os da testemunha inoculada com água destilada esterilizada.

4.7. PREVALÊNCIA

A prevalência das espécies de *Colletotrichum* foi determinada pela equação: $P (\%) = (N_x / N_t) \times 100$, onde: P = prevalência, N_x = número de isolados da mesma espécie e N_t = número total de isolados. A prevalência total de espécies e a prevalência de espécies por região geográfica também foram calculadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. COLETA E ISOLAMENTO

Um total 38 isolados de *Colletotrichum* foram obtidos a partir das lesões características de antracnose nas coletas realizadas em Bonito, Vitória de Santo Antão e Recife (Tabela 1), nas espécies *Dioscorea alata* e *Dioscorea cayennensis*. Dos 38 isolados, 5 foram obtidos das coletas feitas em Recife, 9 em Vitória de Santo Antão e 24 em Bonito. Os isolados foram adicionados a coleção do laboratório de Fungos Fitopatogênicos.

5.2. ANÁLISES FILOGENÉTICAS MULTILOCUS E RECONHECIMENTO DE ESPÉCIES

A região GAPDH identificou 18 haplótipos pertencentes ao gênero *Colletotrichum*. As formações retiradas da ferramenta BLAST mostraram que 11 haplótipos apresentaram alta similaridade com espécies do complexo *C. gloeosporioides* s.l, 6 haplótipos apresentaram alta similaridade com espécies do complexo *C. orchidearum* s.l e 1 haplótipo apresentou similaridade com espécies do complexo de espécies *C. boninense* s.l.

Para identificação da espécie do complexo *C. boninense* s.l foram utilizados os marcadores Calmodulina (CAL), Beta-tubulina (TUB) e GAPDH. Já para identificação das espécies do complexo *C. orchidearum* s.l. foram amplificadas as regiões quitina (CHS-1), GAPDH, Histona (HIS-3) e Beta-tubulina (TUB).

As espécies do complexo *C. gloeosporioides* s.l foram identificadas usando os genes, GAPDH, Região intergênica de *apn2* e dos genes MAT1-2-1 (APMAT) e Glutamina sintetase (GS). Os genes utilizados são extremamente informativos para identificação de espécie do gênero *Colletotrichum*.

Ao todo seis espécies foram identificadas através de uma robusta análise filogenética. Tais resultados revelam alta diversidade de espécies do gênero *Colletotrichum* associadas à antracnose do inhame em Pernambuco.

Colletotrichum sp. 1, *Colletotrichum* sp. 4 e *Colletotrichum* sp. 5 pertencem ao complexo de espécies *Colletotrichum gloeosporioides* s. l., *Colletotrichum* sp. 2 e *Colletotrichum* sp. 6 pertencendo à *Colletotrichum orchidearum* s.l. e *Colletotrichum* sp. 3 foi identificada pertencendo à *Colletotrichum boninense* s.l.

Colletotrichum gloeosporioides s. l. é um dos maiores complexos do gênero *Colletotrichum*, apresentando atualmente 52 espécies já identificadas, destacando-se em sua maioria espécies fitopatogênicas, causando à antracnose em uma ampla gama de hospedeiros mundialmente distribuídos (RAMOS, 2023; THAO *et al.*, 2024).

Colletotrichum boninense s. l. detém até o momento 27 espécies, a maioria das quais são consideradas patogênicas e endofíticas (LIU *et al.*, 2022).

O complexo *Colletotrichum orchidearum* s.l. possui menor quantidade de espécies identificadas em relação à *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. e *Colletotrichum boninense* s.l., porém três espécies possuem ocorrência comum em um grande número de hospedeiros (DAMM *et al.*, 2019).

Tabela 1. Descrição dos isolados de *Colletotrichum* obtidos do inhame no estado de Pernambuco.

ISOLADO	ESPÉCIES	CIDADE	ESTADO	Host
LM544	<i>Colletotrichum</i> sp. 3	Bonito	PE	<i>Dioscorea cayennensis</i>
LM546	<i>Colletotrichum</i> sp. 3	Bonito	PE	<i>Dioscorea alata</i>
LM548	<i>Colletotrichum</i> sp. 4	Bonito	PE	<i>Dioscorea alata</i>
LM555	<i>Colletotrichum</i> sp. 5	Bonito	PE	<i>Dioscorea alata</i>
LM591	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	Recife	PE	<i>Dioscorea cayennensis</i>
LM595	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	Bonito	PE	<i>Dioscorea alata</i>
LM596	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	Recife	PE	<i>Dioscorea cayennensis</i>
LM597	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	Recife	PE	<i>Dioscorea cayennensis</i>
LM602	<i>Colletotrichum</i> sp. 6	Recife	PE	<i>Dioscorea cayennensis</i>
LM604	<i>Colletotrichum</i> sp. 6	Recife	PE	<i>Dioscorea cayennensis</i>
LM801	<i>Colletotrichum</i> sp. 2	Vitória de Santo Antão	PE	<i>Dioscorea alata</i>
LM802	<i>Colletotrichum</i> sp. 2	Vitória de Santo Antão	PE	<i>Dioscorea alata</i>
LM803	<i>Colletotrichum</i> sp. 2	Vitória de Santo Antão	PE	<i>Dioscorea alata</i>
LM804	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	Vitória de Santo Antão	PE	<i>Dioscorea alata</i>
LM805	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	Vitória de Santo Antão	PE	<i>Dioscorea alata</i>
LM808	<i>Colletotrichum</i> sp. 2	Vitória de Santo Antão	PE	<i>Dioscorea alata</i>
LM809	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	Vitória de Santo Antão	PE	<i>Dioscorea alata</i>
LM810	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	Vitória de Santo Antão	PE	<i>Dioscorea alata</i>
LM811	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	Vitória de Santo Antão	PE	<i>Dioscorea alata</i>
LM 1089	<i>Colletotrichum</i> sp. 5	Bonito	PE	<i>Dioscorea cayennensis</i>
LM 1090	<i>Colletotrichum</i> sp. 5	Bonito	PE	<i>Dioscorea cayennensis</i>
LM 1091	<i>Colletotrichum</i> sp. 5	Bonito	PE	<i>Dioscorea cayennensis</i>
LM 1092	<i>Colletotrichum</i> sp. 5	Bonito	PE	<i>Dioscorea cayennensis</i>
LM 1093	<i>Colletotrichum</i> sp. 5	Bonito	PE	<i>Dioscorea cayennensis</i>
LM 1094	<i>Colletotrichum</i> sp. 6	Bonito	PE	<i>Dioscorea cayennensis</i>
LM 1095	<i>Colletotrichum</i> sp. 6	Bonito	PE	<i>Dioscorea cayennensis</i>
LM 1096	<i>Colletotrichum</i> sp. 6	Bonito	PE	<i>Dioscorea cayennensis</i>

CONTINUAÇÃO

LM 1098	<i>Colletotrichum</i> sp. 6	Bonito	PE	<i>Dioscorea cayennensis</i>
LM 1099	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	Bonito	PE	<i>Dioscorea cayennensis</i>
LM 1100	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	Bonito	PE	<i>Dioscorea cayennensis</i>
LM 1101	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	Bonito	PE	<i>Dioscorea cayennensis</i>
LM 1102	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	Bonito	PE	<i>Dioscorea cayennensis</i>
LM 1103	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	Bonito	PE	<i>Dioscorea cayennensis</i>
LM 1104	<i>Colletotrichum</i> sp. 5	Bonito	PE	<i>Dioscorea cayennensis</i>
LM 1105	<i>Colletotrichum</i> sp. 5	Bonito	PE	<i>Dioscorea cayennensis</i>
LM 1106	<i>Colletotrichum</i> sp. 5	Bonito	PE	<i>Dioscorea cayennensis</i>

5.3. PREVALÊNCIA

Colletotrichum sp. 1 foi prevalente em Pernambuco (36,84%), enquanto *Colletotrichum* sp. 3 foi a espécie menos prevalente (5,26%), restringindo-se apenas ao município de Bonito. Em Bonito foi encontrada a maior diversidade de espécies, com exceção apenas de *Colletotrichum* sp. 2, enquanto *Colletotrichum* sp. 5 foi prevalente (37,5%). Tamanho diversidade de espécies em Bonito explica-se pela grande área plantada da cultura em relação as demais regiões do estado. Em Vitória de Santo Antão, *Colletotrichum* sp. 1 foi prevalente (55,5%), enquanto em Recife, tanto *Colletotrichum* sp. 1 quanto *Colletotrichum* sp. 6 tiveram o mesmo percentual (Figura 1).

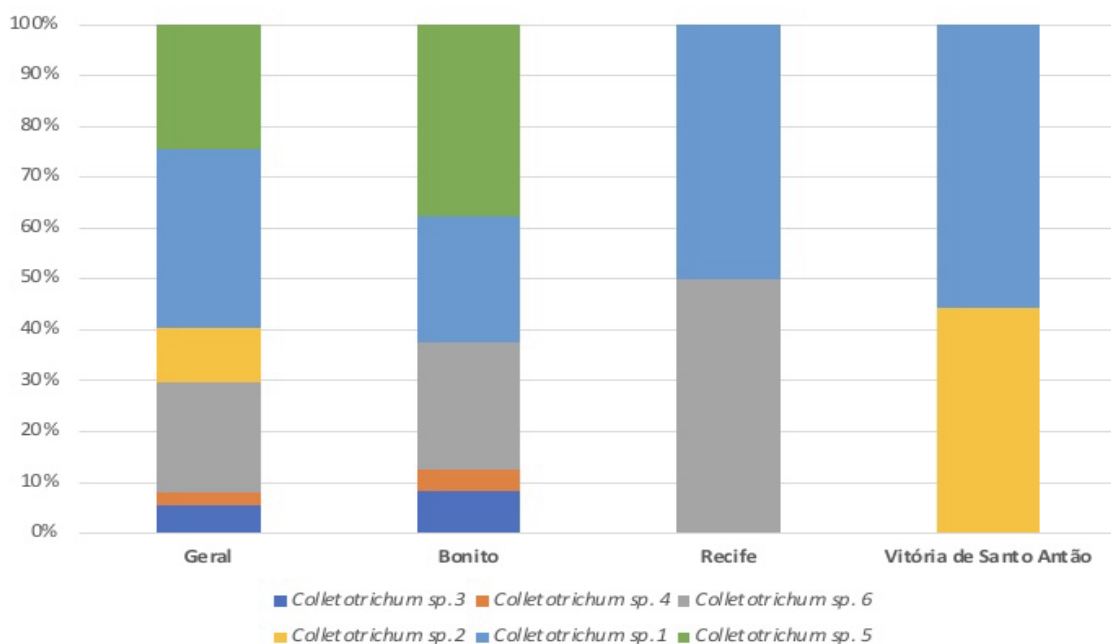


Figura 1. Prevalência de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do inhame no estado de Pernambuco.

5.4. PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA

Todas as espécies ocasionaram sintomas, classificando-se como patogênicas. Os isolados testados apresentaram sintomas de antracnose semelhantes aos encontrados no campo (Figura 2). A virulência diferiu significativamente entre as espécies. *Colletotrichum* sp. 1 classificou-se como a espécie mais virulenta, com diâmetro ortogonal da lesão ultrapassando 30mm, seguida por *Colletotrichum* sp. 2

Colletotrichum sp. 3, *Colletotrichum* sp. 4, *Colletotrichum* sp. 5, e *Colletotrichum* sp. 6, que apresentou diâmetro ortogonal da lesão inferior à 20 mm (Figura 3).

A cultivar inhame-da-costa é uma das mais produzidas em Pernambuco, contudo, conforme os resultados do teste de patogenicidade e virulência realizados neste estudo, nota-se susceptibilidade desta variedade ao ataque de espécies do gênero *Colletotrichum*, evidenciando, portanto, à necessidade de métodos de manejo eficientes para esse patossistema, principalmente para regiões em que *Colletotrichum* sp. 1 é prevalente, em decorrência da alta virulência da espécie.

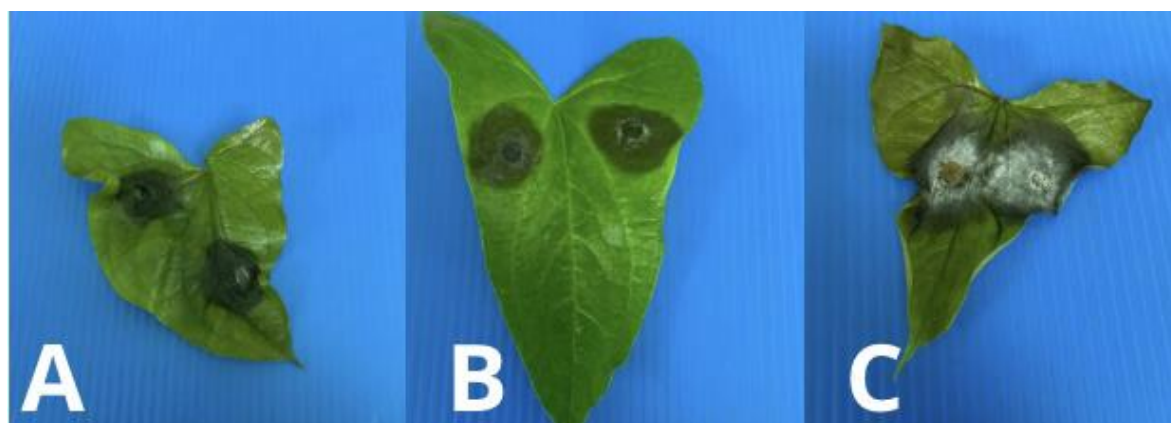


Figura 2. Sintomas de antracnose nas folhas de inhame (cv. da Costa) no sétimo dia após inoculação.

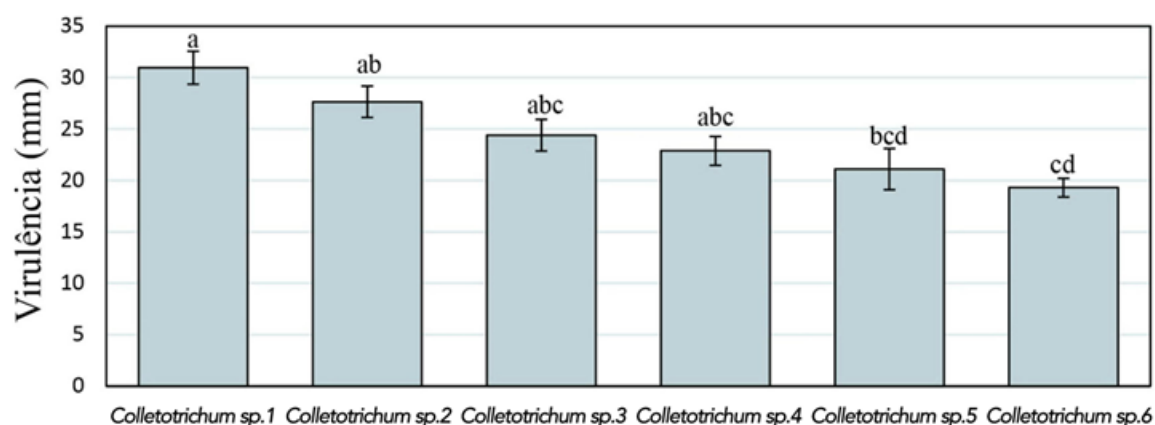


Figura 3. Virulência de espécies de *Colletotrichum* nas folhas do inhame avaliadas 7 dias após inoculação. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa entre si (Tukey < 0,05).

6. CONCLUSÃO

No Brasil, a etiologia da antracnose do inhame é frequentemente associada a espécie *C. gloesporioides*. Nesse trabalho, foi possível a identificação de seis espécies associadas a doença no estado de Pernambuco, através de uma robusta análise multi-locus com genes informativos para espécies do gênero *Colletotrichum*. Foi constatada diversidade de espécies associadas a doença no estado, principalmente no município de Bonito, principal região produtora. Todas as espécies identificadas são patogênicas à cultura. A identificação de espécies patogênicas para a agricultura é extremamente importante, pois possibilita estudos sobre a epidemiologia da doença e a elaboração de métodos de manejo eficientes para a doença.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMO, M.A. Taioba, cará e inhame: o grande potencial inexplorado. São Paulo: **Editora Ícone**. 80p. 1990.

AKEM, C.N. Yam dieback and its principal cause in the yam belt of Nigeria. **Pakistan Journal of Biological Science**. (4): 1106–1109.1999.

ASSIS, M.H.N.; SILVA, D.C. Avaliação do planejamento experimental no processo de secagem do inhame (*Dioscorea* spp.). **Revista Brasileira de Iniciação Científica**, v. 4, n. 6, 2017.

BRITO, T.T.; SOARES, L.S.; FURTADO, M.C.; CASTRO, A.A.; CARNELOSSI, M.A. G. Composição centesimal de inhame (*Dioscorea* sp.) in natura e minimamente processado. **Scientia Plena**, v. 7, n. 6, p. 17, 2011.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 42, p. 225-226, 1939.

DAMN, U.; SATO, T.; ALIZADEH, A.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. **Studies in mycology**, 92(1), 1-46. 2019.

DETTMAN, J.R.; JACOBSON, D.J.; TAYLOR, J.W. A multilocus genealogical approach to phylogenetic species recognition in the model eukaryote *Neurospora*. **Evolution**.. 57:2703–2720. doi:10.1111/j.0014-3820.2003.tb01514.x. 2003.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12:13–15. 1990.

DOWLING, M.; PERES, N.; VILLANI, S.; SCHNABEL, G. Managing *Colletotrichum* on fruit crops: A “complex” challenge. **Plant Dis**. 104, 2301–2316. 2020.

DUARTE, I.G. Espécies de *Colletotrichum* associadas a antracnose do bastão do imperador (*Etilingera elatior*). **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2021.

DUARTE, I.G.; AMARAL, A.G.G.; VIEIRA, W.A.D.S.; VELOSO, J.S.; SILVA, A.C.D.; SILVA, C.F.B.D.; BALBINO, V.Q.; CASTLEBURY, L.A.; CÂMARA, M.P.S. Diversity

of *Colletotrichum* species associated with torch ginger anthracnose, **Mycologia**, 115:5, 661-673, DOI: 10.1080/00275514.2023.2227747. 2023.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em 26 de Jan de 2021.

KATOH, K.; MISAWA, K; KUMA, K; MIYATA, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Res.** Jul 15;30(14):3059-66. 2002.

LEBOT, V. Tropical root and tuber crops Cassava, sweet potato, yams and aroids. **Publ. CABI.** 413p. 2009.

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.** 101: 1-56. 2022.

MENDES, L.M. a cadeia produtiva de inhame em pernambuco: caracterização de governança. **Dissertação de Mestrado.** Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife-PE. 2010.

MESQUITA, A.S. Inhame *Dioscorea cayennensis* Lam. e taro *Colocassia esculenta*(L) Schott-Cenários dos mercados brasileiros e internacional. In: Anais. **II Simpósio Nacional sobre as culturas do inhame e taro.** II SINCIT, João Pessoa, Paraíba, v.1, p. 215-238, 2002.

MOURA, R.M. Principais doenças do inhame-da-costa no nordeste do brasil. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, vol. 3, p.180-199, 2006.

NORONHA, M.A. Principais doenças do inhame (*Dioscorea cayenensis*) nos Tabuleiros Costeiro do Nordeste. **Comunicado Técnico**, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, 2014.

NTUI, V.O.; UYOH, E.A.; ITA, E.E.; MARKSON, A.A.A., TRIPATHI, J.N.; OKON, N.I.; TRIPATHI, L. Strategies to combat the problem of yam anthracnose disease: Status and prospects. **Molecular Plant Pathology**, 22(10), 1302-1314. 2021.

NWANKITI, A.O.; OKOLI, O.O.; OKPALA, E.O. Screening for water yam (*Dioscorea alata*) cultivars for tolerance to anthracnose/brown blotch disease. **Fito Pathologia Brasileira**, **12**, 35–39. 1987.

PERKINS, D.D. Preservation of *Neurospora* Stock Cultures with Anhydrous Silica Gel. **Canadian Journal of Microbiology**, **8**, 591-594. 1962.

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

RAMOS, D.G.B. Diversidade de espécies de *Colletotrichum* endofíticos em Cajueiros. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2023..

SANTOS, E.S. dos; CAZÉ FILHO, J.; LACERDA, J.T. de; CARVALHO, R.A.; FONTINÉLLI, I. S.C.; SILVA, J.B. d a ; BARBOSA , M.M . ; CASSIMIRO, C.M. Inhame e preservação ambiental. João Pessoa, PB: **Embrapa**, Emepa, 6 p. il. 2006.

SANTOS, M.R. Sazonalidade da comercialização do inhame nas centrais de abastecimento de Alagoas e Pernambuco. **Tese**. Arapiraca. 2023.

SIQUEIRA, M.V.B.M. Inhame (*Dioscorea* spp): uma cultura ainda negligenciada. **Horticultura Brasileira** **27**: S4075-S4090. 2009.

STADEN, R., *et al.* The Staden Package. **Methods in Molecular Biology**, **132**, 115-130. 1998.

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, **30**:1312–1313. 2014.

SUTTON, B.C. The Coelomycetes. **Commonwealth Mycological Institute**, Kew, London, 696p. 1980.

TAYLOR, J.W., JACOBSON, D.J., KROKEN, S., KASUGA, T., GEISER, D.M, HIBBETT, D.S., FISHER, M.C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genet Biol.** **31** (1):21–32. doi:10.1006/fgbi.2000.1228. 2000.

TALHINHAS, P.; BARONCELLI, R. *Colletotrichum* species and complexes: geographic distribution, host range and conservation status. **Fungal Diversity**, v. 110, n. 1, p. 109-198, 2021.

THAO, L.D., CHOI H., CHOI, Y., MAGESWARI, A., LEE, D., KIM, D.H., SHIN, H.D., CHOI, H., JU, H.J., HONG, S.B. Re-identification of *Colletotrichum gloeosporioides* Species Complex Isolates in Korea and Their Host Plants. **Plant Pathol J.** 2024 Feb;40(1):16-29. doi: 10.5423/PPJ.OA.09.2023.0133. Epub 2024 Feb 1. PMID: 38326955; PMCID: PMC10850535.

VAIDYA, G.; LOHMAN, D.J.; MEIER, R. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. **Cladistics**, v. 27, n. 2, p. 171-180, 2011.