



# XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

## Instituto Agrônomo - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

### PRIMEIRO RELATO DE *Colletotrichum fructicola* CAUSANDO ANTRACNOSE EM FOLHAS DE *Annona* spp. NO BRASIL

J. F. O. COSTA<sup>1</sup>, R. R. SOBRINHO<sup>1</sup>, T. P. CHAVES<sup>1</sup>, A. R. G. SILVA<sup>1</sup>, J. R. A. SILVA<sup>1</sup>,  
D. B. PINHO<sup>2</sup>, K. C. CORREIA<sup>3</sup>, G. S. A. LIMA<sup>1</sup>, I. P. ASSUNÇÃO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ciências Agrárias/Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Alagoas. BR 104 Norte km 85, CEP 57100-000, Rio Largo-AL. jaquelinefigueredo@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade de Brasília, Brasil, Setor de Fitossanidade/Centro de Ciências Agrárias. <sup>3</sup>Centro de Ciências Agrárias e da Biodiversidade, Universidade Federal do Cariri, 63133-610 Crato, Ceará

**RESUMO** - A antracnose causada por espécies do gênero *Colletotrichum*, é uma importante doença das anonáceas, tornando-se um dos fatores limitantes à produção devido ao ataque severo nas folhas, frutos, flores e pecíolos. No Brasil, apenas *Colletotrichum gloeosporioides* foi relatado como agente etiológico associado à antracnose em anonáceas. O objetivo desse trabalho foi identificar por meio da caracterização molecular e morfocultural o agente causal da antracnose em anonáceas. Isolados de *Colletotrichum*, obtidos de folhas apresentando sintomas típicos da doença, foram coletados nos municípios de Maragogi e Estrela de Alagoas, Estado de Alagoas. A caracterização molecular foi realizada com os genes gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), actin (ACT),  $\beta$ -tubulin (TUB 2), calmodulin (CAL), chitin synthase (CHS-1), manganese-superoxido dismutase (SOD) e região rDNA internal transcribed spacer (ITS). A caracterização morfológica foi realizada através de medições de conídios e apressórios. Com a análise da sequencia multilocus, juntamente com as características morfoculturais e teste de patogenicidade foi possível comprovar que *C. fructicola* é responsável por causar antracnose em anonáceas no estado de Alagoas.

**Palavras-chave:** *Annona squamosa*. *Annona muricata*. Multilocus

## INTRODUÇÃO

As anonáceas são dicotiledôneas pertencentes à Família Annonaceae, que engloba um grupo de frutíferas de importância econômica no Brasil e em várias regiões do mundo. No Brasil, estas culturas são encontradas desde o Norte até o Sul do país, mas foi na região semiárida do Nordeste que o cultivo se espalhou, devido às condições climáticas bastante favoráveis. As principais espécies cultivadas são *Annona squamosa* e *Annona muricata*, naturais de clima tropical, mais encontradas nos Estados da Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Alagoas (RIBEIRO et al., 2007).

As anonáceas estão sujeitas a várias doenças, sendo a antracnose aquela que causa os maiores prejuízos, tendo com agente causal espécies do gênero *Colletotrichum*. O fungo incide



# **XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA** **Instituto Agrônomo - Campinas, SP**

**7 a 9 de Fevereiro de 2017**

sobre folhas, ramos e frutos, em diversas fases do desenvolvimento, ocasionando manchas escuras que podem coalescer. Além de reduzir a produtividade e desqualificar comercialmente as frutas, provoca ferimentos ou lesões que favorecem a infestação de fungos oportunistas e insetos pragas (JUNQUEIRA, JUNQUEIRA, 2014).

O gênero *Colletotrichum* apresenta uma ampla distribuição geográfica, em ambientes quentes e úmidos dos trópicos, causando danos em diversas culturas. Os sintomas de antracnose em anonáceas são caracterizados, nas folhas, por manchas de coloração pardo-escura ou preta, com o centro mais claro, de contorno irregular, distribuídas por todo o limbo foliar. As folhas ficam deformadas e, em ataques mais severos, ocorre desfolhamento (JUNQUEIRA, JUNQUEIRA, 2014).

Diversas espécies de fungos são identificadas com base em caracteres morfológicos e culturais, para as espécies de *Colletotrichum*. Essa metodologia dificulta a identificação devido à grande diversidade fenotípica em função das condições do ambiente (CAI et al., 2009). A região ITS (Internal Transcribed Spacer) do 5.8S rDNA é amplamente sequenciada em estudos filogenéticos do gênero *Colletotrichum*. No entanto, atualmente já são conhecidas as limitações do gene ITS para identificação de algumas espécies, e o desenvolvimento e uso de genes mais informativos tornou-se cada vez mais necessário (MILLS et al., 1992).

O objetivo do trabalho foi caracterizar através de técnicas moleculares e morfoculturais espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose em *Annona* sp. no estado de Alagoas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Em 2012, folhas de *Annona squamosa* L. e *Annona muricata* L. exibindo sintomas de manchas foliares foram coletadas em plantios comerciais nos municípios de Maragogi e Estrela de Alagoas, Estado de Alagoas, Brasil. No laboratório procedeu-se a desinfestação, isolamento e obtenção das culturas monospóricas para os estudos de caracterização molecular, cultural, morfológica e teste de patogenicidade. Os isolados foram inicialmente identificados morfológicamente como pertencendo ao gênero *Colletotrichum* (SUTTON, 1980).

O teste de patogenicidade foi realizado em folhas assintomáticas obtidas de plantas de pinheira (var. Crioula) e gravioleira (var. Morada) inoculados conforme protocolo descrito por Yang et al., 2014. O DNA foi obtido usando o protocolo Doyle & Doyle (1987) e posteriormente,



# **XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA**

## **Instituto Agrônomo - Campinas, SP**

**7 a 9 de Fevereiro de 2017**

amplificado com os genes gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), actin (ACT),  $\beta$ -tubulin (TUB 2), calmodulin (CAL), chitin synthase (CHS-1), manganese-superoxido dismutase (SOD) e regiões rDNA internal transcribed spacer (ITS).

As sequências foram inicialmente alinhadas com o software MUSCLE (EDGAR, 2004), disponível no pacote computacional MEGA 6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (TAMURA et al., 2011) e, posteriormente, construída uma árvore filogenética concatenada para análises de Inferência Bayesiana (BI). A árvore foi visualizada no software FigTreev. 1.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) e Inkscape (<https://inkscape.org/pt/>). A espécie *C. boninense* CBS123755 foi utilizada como grupo externo (outgroup).

Foi observada taxa de crescimento micelial, morfologia da colônia, caracterização de conídios e apressórios para a espécie fúngica identificada. A caracterização cultural dos isolados foi realizada medindo o diâmetro das colônias (cm) no reverso das placas, através da mensuração, em dois sentidos perpendiculares, com o auxílio de uma régua, sob temperatura de  $25 \pm 1$  °C e fotoperíodo de 12 horas e aos sete dias foi observado a morfologia das colônias.

Para avaliação da morfologia das estruturas reprodutivas do patógeno, prepararam-se lâminas semipermanentes. As medições foram obtidas por meio de imagens capturadas por câmera digital (Olympus® IX2-SLP) acoplada ao microscópio óptico (OLYMPUS® CKX 41®) utilizando o software CellSens Standard – Olympus 2010. Foram realizadas 50 medições para cada estrutura.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os isolados de *Colletotrichum* foram patogênicos após cinco dias, observaram-se lesões em 100% das folhas inoculadas. Para cumprirem os postulados de Koch, o patógeno foi reisolado e não foram observados sintomas de doença nas folhas controle. A análise filogenética de Inferência bayseana dos isolados (Números de Acesso KX013517 a KX013530) usando os genes gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), actin (ACT),  $\beta$ -tubulin (TUB 2), calmodulin (CAL), chitinsynthase (CHS-1), manganese-superoxido dismutase (SOD) e região rDNA internal transcribed spacer (ITS) juntamente com sequencias adicionais do Genbank colocaram os isolados de *Colletotrichum* aqui relatados em um mesmo clado com outras espécies de *C. fructicola* (Figura 1).



# XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

## Instituto Agrônomo - Campinas, SP

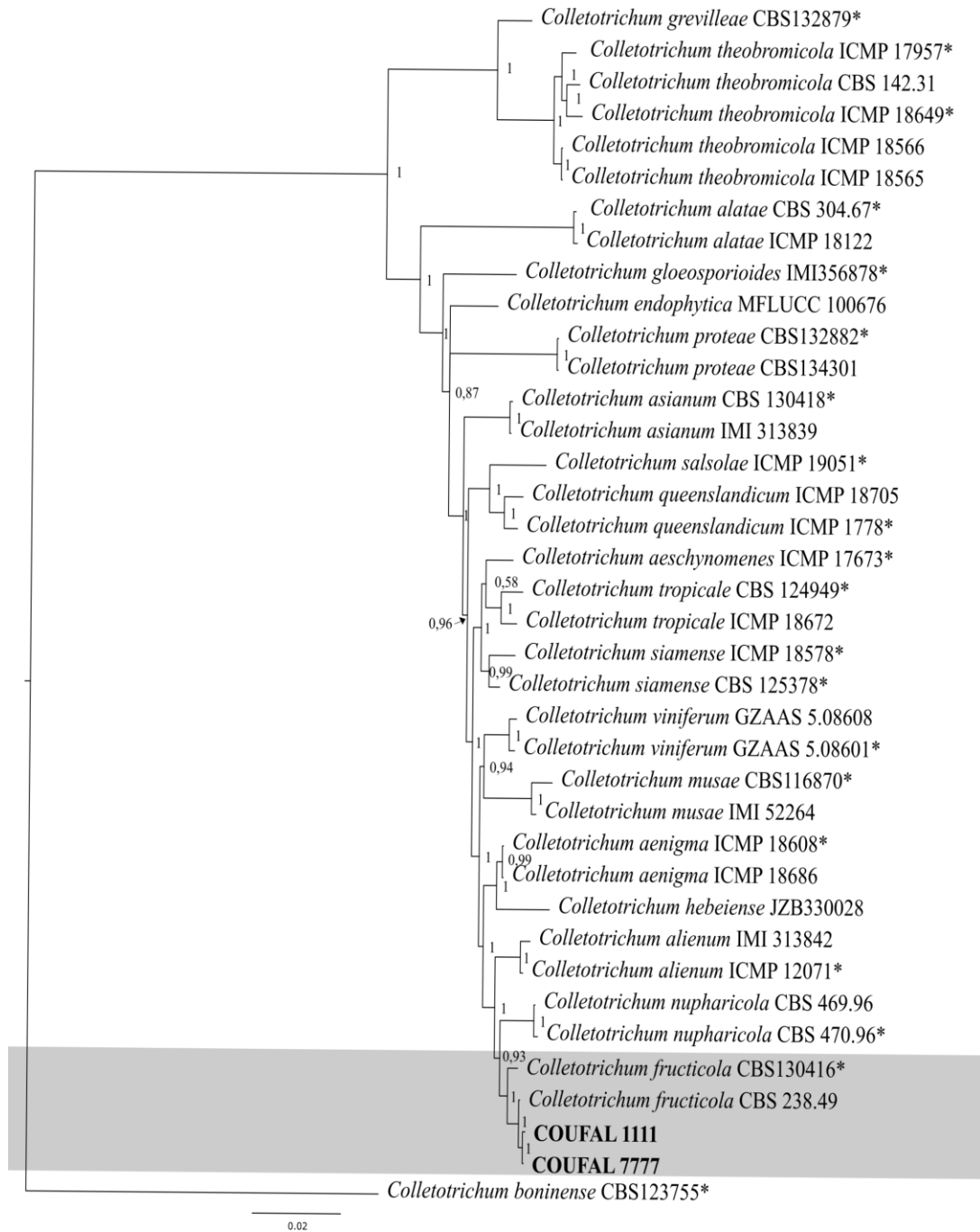
7 a 9 de Fevereiro de 2017

Atualmente *C. fructicola* está associado a diversas culturas de interesse agrícola. No Brasil, existem relatos da ocorrência dessa espécie em macieira (WEIR, JOHNSTON, DAMM, 2012), frutos de goiaba (*Psidium guajava* L.) (BRAGANÇA, 2013) e em frutos e folhas de mangueira (*Mangifera indica* L.) (LIMA et al., 2013; VIEIRA et al., 2014).

**Figura 1:** Árvore filogenética de Inferência Bayseana com isolados de *Colletotrichum fructicola*, usando a sequência da combinação parcial de dados dos genes GAPDH, ACT, TUB 2, CAL, CHS-1, SOD e região rDNA internal transcribed spacer (ITS). *Colletotrichum boninense* foi usado como outgroup.



**XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA**  
**Instituto Agronômico - Campinas, SP**  
**7 a 9 de Fevereiro de 2017**



As características morfológicas obtidas em batata-dextrose-agar (BDA) para ambos os isolados foram depositados na Coleção de Culturas De Fungos Fitopatogênicos da Universidade Federal de Alagoas (códigos COUFAL1111 E COUFAL7777), apresentaram conídios cilíndricos, assépticos, hialinas, arredondados em ambas as extremidades apresentando (10.5 a





# **XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA**

## **Instituto Agrônomo - Campinas, SP**

**7 a 9 de Fevereiro de 2017**

22.5  $\mu\text{m}$ ) comprimento e (3 a 6.5  $\mu\text{m}$ ) largura. Os apressórios eram globosos, clavados, irregulares, as médias de comprimento e largura foram de 7.43-5.85 $\mu\text{m}$ , respectivamente. As colônias em meio BDA eram cinza-claro com bordas esbranquiçadas apresentaram taxa de crescimento de 9,0 mm/dia. O lado inferior da colônia era uniformemente cinza apresentando setores em direção as bordas. As características culturais observadas nos isolados de *Colletotrichum* provenientes de pinheira e gravioleira assemelham-se às encontradas por vários autores como Sutton (1992); Damm et al. (2012) e Weir, et al. (2012) que descrevem as colônias do gênero *Colletotrichum* como sendo bastante variáveis.

Prihastuti et al. (2009), caracterizaram os conídios de *C. fructicola* em frutos de café na Tailândia como, cilíndrico, ligeiramente arredondados e hialinos medindo (9.7-14 x 3-4.3 $\mu\text{m}$ ) e os apressórios como ovóides e clavados medindo (4.7-8.3 x 3.5-5 $\mu\text{m}$ ). Yang et al. (2009) também observaram apressórios clavados e ovoides em isolados de *C. fructicola* a partir de lesões em espécies da família *Amaryllidaceae*. O formato dos conídios e apressórios são de grande importância na identificação das espécies, mas não deve ser considerado o único parâmetro, uma vez que o patógeno pode sofrer influências do ambiente, apresentando alterações na estabilidade das características, sendo necessário a utilização conjunta de outros métodos para um melhor esclarecimento (MENEZES, 2006; CAI et al., 2009).

### **CONCLUSÃO**

Esta é o primeiro relato de *Colletotrichum fructicola* causando antracnose em folhas de *Annona* spp. no Brasil.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BRAGANÇA, C.A.D. Molecular characterization of *Colletotrichum* spp. associated with fruits in Brazil. University of São Paulo “Luiz de Queiroz” College of Agriculture. Piracicaba. 2013. 69p:il Tese (Doutorado). Escola superior “Luiz de Queiroz”.

CAI L. et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. Fungal Divers. v.39, p.183-204. 2009.



# **XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA**

## **Instituto Agrônomo - Campinas, SP**

**7 a 9 de Fevereiro de 2017**

DAMM, U. et al. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Stud Mycol.* v. 73, p.1-36. 2012.

DOYLE, J.J., DOYLE J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.* v.19, p.11-15. 1987.

EDGAR, R.C., MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics.* v.5, p.1-19. 2004.

LIMA, N.B. et al. Five *Colletotrichum* species are responsible Brazil. *Fungal Diversity.* v.61, p.75-88. 2013.

JUNQUEIRA, N. T. V., JUNQUEIRA, K. P. Principais doenças de anonáceas no Brasil: Descrição e Controle. v. 36, edição especial, p. 55-64, Janeiro 2014.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica, Recife,* v. 3, p.170-179, 2006.

MILLS, P. R., SREENIVASAPRASAD, S., BROWN, A.E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiology Letters, Amsterdam,* v. 98, p.137-143, 1992.

PRIHASTUTI, H. et al. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Divers.* v. 39, p.89-109. 2009.

RIBEIRO, G. S. et al. Aspectos da biologia floral relacionados à produção de frutos de pinha (*Annona squamosa* L.). *Acta Scientiarum. Biological Sciences.* v. 29, p.369-373, 2007.

SAUQUET, H. et al. Phylogenetic analysis of Magnoliales and Myristicaceae based on multiple data sets: implications for character evolution. *Botanical Journal of the Linnean Society.* v.142, p. 125-186, 2003.

SUTTON, B.C. Fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata. *The Coelomycetes.* Kew: Commonwealth Mycological Institute, 696p.1980.



# **XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA**

## **Instituto Agrônomo - Campinas, SP**

**7 a 9 de Fevereiro de 2017**

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey, J.A. & Jeger, M.J. (eds.) *Colletotrichum – Biology, Pathology and Control*. Wallingford. CAB International, p. 1-26, 1992.

TAMURA, K. et al. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. v.28, n.10, p. 2731 – 2739, 2011.

VIEIRA, W. A. S. et al. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. *Fungal Diversity*. DOI 10.1007/s13225-014-0293-6. 2014.

WEIR, B.S., JOHNSTON, P.R., DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud Mycol*. v.73, p.115-180. 2012.

YANG, Y.L. et al. *Colletotrichum* anthracnose of Amaryllidaceae. *Fungal Divers*. v.39, p.123-146. 2009.

Hospedeiro (nome científico e vulgar): *Annona muricata*; graviola e *Annona squamosa*; pinha

Patógeno (nome científico): *Colletotrichum fruticola*

Área:

( ) etiologia ( ) epidemiologia ( ) controle químico ( ) controle biológico ( ) patologia de sementes  
( ) manejo integrado ( x ) biologia molecular ( ) resistência outro: especificar \_\_\_\_\_