

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS**

LUCAS FONSECA MENEZES OLIVEIRA

**ETIOLOGIA DA MANCHA MARROM DE PALMA (*Nopalea cochenillifera* Salm-
Dyck), RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS E EFEITO DA TEMPERATURA E
UMIDADE SOBRE A DOENÇA**

Rio Largo - AL
2016

LUCAS FONSECA MENEZES OLIVEIRA

ETIOLOGIA DA MANCHA MARROM DE PALMA (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck), RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS E EFEITO DA TEMPERATURA E UMIDADE SOBRE A DOENÇA

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Proteção de Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima

Rio Largo - AL
2016

LUCAS FONSECA MENEZES OLIVEIRA

ETIOLOGIA DA MANCHA MARROM DE PALMA (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck), RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS E EFEITO DA TEMPERATURA E UMIDADE SOBRE A DOENÇA

Tese de doutorado submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas.

Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima
Universidade Federal de Alagoas (Orientador)

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Silva Muniz
Universidade Federal de Alagoas (Examinador Interno)

Prof. Dr. José Teodorico de Araújo Filho
Universidade Federal de Alagoas (Examinador Externo)

Dr. João Gomes da Costa
Embrapa Tabuleiros Costeiros – UEP Rio Largo (Examinador Externo)

Rio Largo - AL
2016

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- O48e Oliveira, Lucas Fonseca Menezes.
 Etiologia da mancha marrom de palma (*Nopalea cochenillifera* **Salm - Dyck**), resistência de genótipos e efeito da temperatura e umidade sobre a doença / Lucas Fonseca Menezes Oliveira. – 2016.
 72 f. : il.
- Orientadora: Gaus Silvestre de Andrade Lima.
Tese (doutorado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2015.
- Inclui bibliografia.
1. Caracterização molecular. 2. Agressividade do patógeno. 4. Palma Forrageira – Doenças e pragas. 4. *Colletotrichum*. I. Título.

CDU: 633.39

*A Rosalva Fonseca Oliveira.
Todas suas histórias trazem
um aprendizado.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer inicialmente a minha família por todo o apoio e incentivo que me deram desde o momento que fiz a escolha pelo curso e Engenharia Agrônômica até hoje quando concluo o meu doutorado. Agradeço muito a meus pais, Antônio e Maria, e aos meus irmãos Yuri e Thais, por sempre estarem ao meu lado, me incentivando e apoiando, mesmo sem compreender absolutamente para quê eu passava tanto tempo na universidade. Agradeço também a meus avós, tios e primos que me apoiaram muito nessa jornada.

Faço um agradecimento mais que especial a Mirella Scarlati, minha noiva, que teve muita paciência comigo, quando eu ficava distraído pensando no que tinha que fazer, na quantidade de material que eu tinha que ler e escrever, agradeço por todo seu apoio, amor e carinho em todos os momentos dessa jornada.

Agradeço muito a Universidade Federal de Alagoas, que através do Programa de Pós Graduação em Proteção de Plantas possibilitou o meu doutorado. Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade e Lima, que acreditou em mim mesmo quando tive que me ausentar da Universidade.

Agradeço imensamente aos amigos que fiz no Laboratório de Fitopatologia e Virologia Molecular, Fred, Antônio, Nayana, Adso, Mayra, Roberto, Tamires, Ana, Ana, Laura, Leonardo, Janaine, Jussara, Gilberlan, Daniel, Isabella, Rafael, Sarah. Muitíssimo obrigado a todos, sem o esforço conjunto de todos seria impossível realizar o trabalho.

Agradeço imensamente a Embrapa Caprinos e Ovinos que me acolheu no meio deste percurso e que possibilitou a minha liberação para concluir o meu doutorado, muito obrigado Dr^a Ana Clara, Dr Vinicius, Dr Leandro, Dr Caetano, Dr Éden, pelo esforço e pelo incentivo.

Lembrar de todas as pessoas que participam de nossas vidas é uma tarefa muito difícil, tenho muito receio de ter omitido o nome de alguém, por isso deixo meu agradecimento a todas as pessoas que passaram pela minha vida. As palavras de todos me influenciaram de alguma forma nas minhas decisões que me trouxeram até esse momento.

Muito obrigado a todos.

RESUMO

A palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*) tem como seu centro de origem o México, sendo cultivada atualmente em todo o mundo, esta cultura foi inicialmente introduzida no Brasil pelos portugueses com o objetivo de hospedar a cochonilha do carmim, para a produção do corante vermelho carmim. Na primeira década do século XX a palma começou a despertar interesse como forrageira, sendo introduzida no Nordeste brasileiro. Mesmo apresentando grande rusticidade e adaptação as condições climáticas da região semiárida, a cultura da palma forrageira está sujeita ao ataque de diversas doenças que causam grandes prejuízos para a sua produção. Dentre os agentes causais de doenças em palma, os fungos do gênero *Colletotrichum* são responsáveis por danos econômicos consideráveis a cultura. Um dos maiores problemas na caracterização das espécies de *Colletotrichum* é a sua grande variabilidade morfocultural, sendo necessária a utilização de técnicas de biologia molecular para auxiliar na taxonomia deste gênero. Outra característica importante deste gênero fúngico é sua adaptabilidade, o que lhe permite crescer nas mais variadas condições climáticas e nos mais variados hospedeiros. Desta maneira o objetivo deste trabalho foi caracterizar a etiologia, a resistência e a epidemiologia entre isolados de *Colletotrichum* sp. e genótipos de palma (*Nopalea cochenillifera*). Cladódios apresentando sintomas de manchas necróticas em sua superfície, foram coletados em áreas produtoras nos estados de Alagoas e Pernambuco. No laboratório foi realizado o isolamento dos fitopatógenos e obtenção da cultura monospórica de cada um dos isolados. O material isolado foi caracterizado a partir de técnicas moleculares, morfológicas e culturais. A caracterização dos isolados possibilitou a identificação das espécies *C. siamense*, *C. fructicola* e *C. karstii* causando doença em palma forrageira no Brasil. Em seguida as espécies fúngicas identificadas foram utilizadas na determinação de qual temperatura e umidade favorecem o seu crescimento, além de serem utilizadas na caracterização da resistência dos seguintes genótipos de palma: Palma Alagoas, Miúda, Orelha de onça, Palma melancia, Tamazunchale, Clones 06, 07, 13, 21 e F-21. A partir das atividades realizadas a temperatura de 22 °C favoreceu o desenvolvimento das lesões nos cladódios, independente da espécie de *Colletotrichum* considerada. O período de permanência em câmara úmida superior a 36 horas favoreceu o desenvolvimento das lesões nos cladódios quando inoculados com isolados de *Colletotrichum*. *Colletotrichum siamense* apresentou maior agressividade em genótipos de palma forrageira quando comparado com *C. karstii* e *C. fructicola*. Os genótipos: Miúda, Clones 07, 13 e 21 apresentaram menores lesões quando inoculados com isolados de *Colletotrichum* spp.

Palavras-Chave: Caracterização molecular. Agressividade do patógeno. *Colletotrichum*.

ABSTRACT

The cactus (*Nopalea cochenillifera*) has as its center of origin Mexico, currently being grown around the world, this culture was first introduced in Brazil by the Portuguese in order to host cochineal carmine, for the production of carmine red dye. In the first decade of XX century the palm began to arouse interest as forage, being introduced in the Brazilian northeast. Even with great hardiness and adaptation to climatic conditions of the semiarid region, the culture of spineless cactus is subject to attack by various diseases that cause great harm to their production. Among the causative agents of diseases in cactus, fungi of the genus *Colletotrichum* are responsible for considerable economic damage to culture. One of the biggest problems in the characterization of species of *Colletotrichum* is its great variability morphocultural, requiring the use of molecular biology techniques to assist in the taxonomy of this genus. Another important feature of this fungal genus is its adaptability, which allows you to grow in various weather conditions and in various hosts. Thus the aim of this study was to characterize the etiology, epidemiology and resistance among isolates of *Colletotrichum* sp. and palm genotypes (*Nopalea cochenillifera*). Cladodes showing symptoms of necrotic spots on its surface, were collected in producing areas in the states of Alagoas and Pernambuco. In the laboratory it was carried out the isolation of pathogens and achieving monospórica culture each isolate. The isolated material was characterized from molecular, morphological and cultural techniques. Characterizing isolates allowed the identification of *C. siamense*, *C. karstii* and *C. fructicola* causing disease in forage cactus in Brazil. Then the identified fungus species were used in determining which temperature and humidity conducive to their growth, and are used to characterize the resistance of these palm genotypes: Palma Alagoas, Miúda, Orelha de Onça, Palma Melancia, Tamazunchale, Clones 06, 07, 13, 21 and F-21. From the activities carried out at 22 ° C favored the development of lesions in the cladodes, regardless of the species of *Colletotrichum* considered. The length of stay in a humid chamber more than 36 hours favored the development of lesions in the cladodes when inoculated with *Colletotrichum* isolates. *Colletotrichum siamense* showed greater aggression in forage cactus genotypes compared with *C. karstii* and *C. fructicola*. Genotypes: Miúda, Clones 07, 13 and 21 showed minor injuries when inoculated with *Colletotrichum* spp.

Keywords: Molecular characterization. Aggressiveness of the pathogen. *Colletotrichum*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Sintomas de manchas em cladódios de palma forrageira miúda.....31
- Figura 2 - Cladódios de palma miúda (*Nopalea cochenillifera*) inoculadas com discos contendo estruturas de *Colletotrichum* spp.....37
- Figura 3 - Árvore filogenética de Inferência Bayesiana com isolados de *Colletotrichum* pertencentes a dois complexos, utilizando o gene GAPDH.....40
- Figura 4 - Árvore filogenética de Inferência Bayesiana com isolados de *Colletotrichum* pertencentes a dois complexos, utilizando o gene TUB2.....41
- Figura 5 - Árvore filogenética de Inferência Bayesiana com isolados de *Colletotrichum* pertencentes a dois complexos, analisando os dados das regiões genômicas GAPDH, TUB2 e ITS de maneira concatenada.....42
- Figura 6 - Aspecto dos três grupos de isolados de *Colletotrichum* em meio BDA sintético, observados ao 7º dia. Imagem superior verso e imagem inferior reverso.....45
- Figura 7 - Características morfológicas de conídios (I) e apressórios (II) de *C. fructicola*, *C. siamense* e *C. karstii* cultivados em meio BDA. As imagens foram obtidas com lentes de 40x de aumento e escala de 20µm.....47
- Figura 8 - Manchas em cladódios causadas por *C. siamense*, *C. karstii* e *C. fructicola*, após 10 dias de incubação a 22, 26, 30 e 34 °C, em palma Miúda.....60
- Figura 9 - Diâmetro de lesões causadas por *C. siamense*, *C. karstii* e *C. fructicola* em diferentes temperaturas e períodos de permanência em câmara úmida, em palma Miúda.....61
- Figura 10 - Manchas em cladódios causadas por *C. siamense*, *C. karstii* e *C. fructicola*, após 10 dias de incubação em câmara úmida de 12, 24, 36, 48 e 60 horas, em palma Miúda.....63
- Figura 11 - Manchas de cladódios causadas por *C. siamense*, *C. karstii* e *C. fructicola* em genótipos promissores de palma forrageira do gênero *Nopalea*.....65
- Figura 12 - Diâmetro de lesões de *C. siamense*, *C. karstii* e *C. fructicola* inoculados em diferentes genótipos de palma forrageira do gênero *Nopalea*.....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Local e ano de coleta de cladódios de palma forrageira.....	31
Tabela 2 - Descrição dos primers usados para identificação de espécies pertencentes ao gênero <i>Colletotrichum</i>	34
Tabela 3 - Sequências do gênero <i>Colletotrichum</i> incluídas nas análises multigênicas e respectivos números de acessos do GenBank.....	35
Tabela 4 - Relação entre espécies de <i>Colletotrichum</i> e locais de coleta de isolados obtidos a partir de palma forrageira.....	39
Tabela 5 - Características morfológicas de isolados de <i>Colletotrichum</i> obtidos a partir de lesões em cladódios de palma forrageira.....	44
Tabela 6 - Variação e média de comprimento, largura e relação comprimento largura de conídios e apressórios de isolados de <i>Colletotrichum</i>	48
Tabela 7 - Diâmetro médio (mm) de mancha de cladódios causada por <i>C. siamense</i> , <i>C. karstii</i> e <i>C. fructicola</i> em genótipos de palma forrageira.....	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
2.1	Palma Forrageira	15
2.2	Principais Doenças na Cultura da Palma Forrageira	18
2.3	Gênero <i>Colletotrichum</i>	21
2.4	Efeito da temperatura e umidade sobre a severidade de doenças.	23
	REFERENCIAS	25
3	ETIOLOGIA DA MANCHA MARROM DE PALMA (<i>Nopalea cochenillifera</i> Salm-Dyck).	30
3.1	Introdução	32
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.2.1	Origem, obtenção e preservação dos isolados do gênero <i>Colletotrichum</i>	34
3.2.2	Teste de patogenicidade	35
3.2.3	Caracterização molecular	36
3.2.3.1	Extração de DNA.....	36
3.2.3.2	Amplificação do DNA e sequenciamento dos produtos de PCR	36
3.2.3.3	Análises filogenéticas	37
3.2.4	Caracterização cultural e morfológica.....	39
3.3	Resultados e Discussão	40
3.3.1	Testes de Patogenicidade	40
3.3.2	Caracterização Molecular.....	41
3.3.3	Caracterização Morfológica e Cultural	46
3.4	Conclusões	53
	REFERENCIAS	54
4	RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE <i>Nopalea cochenillifera</i> E EFEITO DA TEMPERATURA E UMIDADE SOBRE A MANCHA MARROM.	57

4.1	Introdução.....	59
4.2	Material e Métodos.....	61
4.2.1	Obtenção dos genótipos de palma da variedade miúda e isolados utilizados	61
4.2.2	Efeito da temperatura e de períodos de permanência em câmara úmida na severidade de manchas de cladódios	61
4.2.3	Comportamento de genótipos de palma em relação a manchas de cladódios.....	62
4.3	Resultados e Discussão.....	63
4.3.1	Efeito da temperatura e do período de permanência em câmara úmida na severidade de manchas de cladódios.	63
4.3.2	Comportamento de genótipos de palma em relação a manchas de cladódios.....	67
4.4	Conclusões.....	70
	REFERENCIAS	71

1 INTRODUÇÃO GERAL

Pertencendo a família das cactáceas, a palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill e *Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck) tem como centro de origem no México, sendo um dos símbolos florísticos da região. Atualmente a palma encontra-se disseminada por todo o planeta, desde os Estados Unidos da América, até a Coreia e Austrália, passando pelo Brasil, Chile, Peru, Argentina, Portugal, Itália, dentre outros (BARRIOS; MUÑOZ-URÍAS, 2001; HOFFMAN, 2001; TAYLOR, 2002).

Mundialmente, a palma forrageira apresenta múltiplos usos, desde o paisagismo até a produção de fármacos e produtos para a indústria de alimentos. No Brasil a palma inicialmente foi introduzida visando a produção do corante carmim, contudo houveram problemas na produção e a cultura ficou esquecida até o início do século XX quando passou a ser utilizada como alimento forrageiro para a bovinocultura na região Nordeste (PESSOA, 1967; SANTOS et al., 2012).

Atualmente a palma é utilizada como alimento estratégico para os rebanhos bovinos, caprinos e ovinos da região semiárida, como fonte de água e energia para os rebanhos. Isto se dá pela enorme adaptabilidade desta cultura as condições edafoclimáticas da região, resistindo a longos períodos de estiagem sem perder água e suas características físico-químicas. Atualmente no Brasil não existem dados precisos do total de palma forrageira produzida, mas estima-se que no país exista uma área plantada de aproximadamente 600.000 ha, com potencial produtivo de 200t/ha de massa fresca de palma por ano, fazendo do Brasil um dos maiores produtores mundiais desta cultura (FARIAS et al. 2000; SANTOS et al., 2006; DUBEUX JUNIOR et al. 2013)

Mesmo apresentando enorme rusticidade e adaptabilidade as condições edafoclimáticas da região Nordeste, a cultura da palma sofre com o ataque de pragas e doenças que podem reduzir significativamente o seu potencial produtivo. Dentre as doenças que acometem a palma forrageira as manchas e podridões nos cladódios aparecem como um dos principais causadores de danos na cultura (GRANATA, 2001).

Dentre os agentes fitopatogênicos causadores de manchas nos cladódios destaca-se o gênero fúngico *Colletotrichum* sp., responsável pela antracnose em uma infinidade de culturas agrícolas nas mais diversas regiões do planeta. Este gênero fúngico está presente em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, causando doenças em uma infinidade de hospedeiros, que vão de fruteiras, a gramíneas, olerícolas, oleaginosas, essências florestais, cereais, dentre outros (KELLY; OLSEN, 2011).

O gênero *Colletotrichum* é bastante diverso, com uma infinidade de espécies conhecidas e com novas espécies sendo descritas a cada dia. A diversidade existente neste gênero dificulta a sua classificação, sendo necessárias diversas técnicas para caracterizar corretamente suas espécies, técnicas estas que vão desde a caracterização morfocultural das suas estruturas até a caracterização molecular, utilizando técnicas de sequenciamento genético (KUMAR et al. 2011; DEAN et al. 2012; WEIR et al. 2012).

Os fungos fitopatogênicos podem ser encontrados em todos os ecossistemas do planeta podendo se desenvolver em locais com baixas temperaturas até regiões mais quentes. Esta diversidade de habitats possibilita a separação geográfica de algumas espécies e gêneros que são mais sensíveis e que necessitam de condições específicas para o seu desenvolvimento. Contudo alguns gêneros fúngicos, a exemplo do *Colletotrichum*, podem suportar variações de temperatura e umidade que lhes permitem colonizar diversos hospedeiros nas mais variadas condições edafoclimáticas do planeta (DODD et al. 1992; AGRIOS, 2005; KENAGA, 1994).

Desta maneira, objetivou-se com esse trabalho caracterizar a etiologia, a resistência e a epidemiologia entre isolados de *Colletotrichum* sp. e genótipos de palma (*N. cochenillifera*).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Palma Forrageira

A palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill e *Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck) tem como seu centro de origem o México, sendo cultivada atualmente em todo o mundo, desde o Canadá até a Argentina, do nível do mar até 5100 metros de altitude no Peru. A palma foi levada a Espanha em 1520, sendo levada então para Portugal, África, Ásia e Oceania (BARRIOS; MUÑOZ-URÍAS, 2001; HOFFMAN, 2001). São representantes da família das cactáceas e estão divididas em aproximadamente 178 gêneros com cerca de 2000 espécies (TAYLOR et al., 2002), sendo que nos gêneros *Opuntia* e *Nopalea*, são encontradas as cactáceas mais utilizadas como plantas forrageiras (SILVA et al., 1990).

Mundialmente, a palma forrageira é utilizada para o consumo humano como verdura, fruta fresca ou processada, utilizada na medicina, como fonte de energia, na indústria de cosméticos, fabricação de adesivos, fibras para artesanato, fabricação de papel, corantes, mucilagens, antitranspirantes, ornamentação e para produção de forragem (SANTOS et al., 2012).

Segundo Pessoa (1967) a palma foi inicialmente introduzida no Brasil pelos portugueses, provavelmente trazidas das Ilhas Canárias, com o objetivo de hospedar o inseto, denominado cochonilha do carmim [*Dactylopius coccus* Costa (Homóptera, Dactylopiidae)], que não causa danos à planta quando bem manejada, e que produz um corante vermelho (carmim). Contudo, o cultivo da palma com este objetivo não obteve sucesso e a partir de então passou a ser cultivada como planta ornamental (SANTOS et al., 2006). Apenas na primeira década do século XX a palma começou a despertar interesse como forrageira, sendo introduzida no Nordeste brasileiro e disseminada por ordem do governo após a seca de 1932, seu cultivo foi introduzido do Piauí a Bahia, tratando-se assim do primeiro trabalho governamental de difusão da cultura (LIMA et al., 2001).

No ano de 2014 o Governo Federal lançou o Projeto de Suporte de Plantio de Palma Forrageira (REPALMA), com o intuito de distribuir sementes de palma forrageira livres de pragas e doenças, através da implantação de unidades de produção de palma em áreas onde a cultura foi dizimada por pragas e pelos seguidos anos de seca na região semiárida.

A Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA) detém um banco de germoplasma de palma forrageira, localizado na Estação Experimental de Arcoverde (PE), com cerca de 1.400 acessos de diferentes materiais, sendo 200 destes introduzidos de vários locais como o México, EUA, África do Sul, Argélia, Chile entre outros (SANTOS et al.,

2006). No país, há a predominância de três cultivares para fins forrageiros, a gigante ou graúda, a redonda e a miúda ou doce.

Opuntia ficus-indica, popularmente referida como palma Gigante ou Graúda, é uma planta de porte médio e caule pouco ramificado, conferindo aspecto ereto e crescimento vertical e pouco frondoso para planta. Os cladódios têm forma oval elíptica ou sub ovalada e coloração verde fosco, podendo pesar entre 1kg e 1,8kg, medindo entre 40cm e 50cm de comprimento. As flores são hermafroditas, de coloração amarela e cuja corola fica aberta na antese, o fruto é uma baga ovoide de coloração amarela tornando-se roxo quando maduro. Esta cultivar é considerada mais produtiva e resistente à restrição hídrica, no entanto é considerada menos palatável para os animais e com menor valor nutritivo. (SANTOS et al., 1990; SANTOS et al., 2001).

Já *Nopalea cochenillifera*, (palma Miúda ou palma Doce), tem cladódio com forma acentuadamente obovada e coloração verde intenso brilhante, pesando aproximadamente 350g e medindo 25cm de comprimento. As flores são vermelhas e sua corola permanece meio fechada durante o ciclo, sendo que o fruto é uma baga de coloração roxa. Esta espécie é considerada mais exigente em água e quanto à qualidade do solo, apresentando maior produção de matéria seca quando comparada com *O. ficus-indica* (SANTOS et al., 1990; SANTOS et al., 2001). Nos últimos anos, têm-se observado grande expansão das áreas cultivadas com palma miúda no Nordeste brasileiro em função de sua resistência à cochonilha do carmim e de suas características de palatabilidade e digestibilidade para os ruminantes.

Desde a primeira intervenção governamental na produção de palma para fins forrageiros sua área plantada vem crescendo após períodos prolongados de estiagem na região semiárida. Nos últimos anos, a palma forrageira voltou a ser cultivada em larga escala pelos criadores das bacias leiteiras, principalmente de Pernambuco, Alagoas, Ceará e Paraíba (SANTOS et al., 2006). Segundo Dubeux Junior et al. (2013), o Brasil possui uma área aproximada de 600 mil hectares plantados com palma forrageira, sendo sua produção quase que exclusivamente encontrada na região semiárida do Nordeste brasileiro.

A agropecuária é uma das principais atividades desenvolvidas no Nordeste do Brasil, com destaque para os rebanhos bovino, ovino e caprino, que de forma geral são criados extensivamente. No Nordeste a pecuária é prejudicada pelas constantes secas e períodos curtos de chuvas, que contribui para a baixa produtividade nos rebanhos. A baixa disponibilidade de forragem faz com que os produtores procurem por alimentos alternativos, necessitando maiores investimentos. Nesta realidade, a palma forrageira aparece como alternativa de cultivo, adaptada ao clima semiárido, por ter mecanismo fisiológico especial no

que se refere a absorção, aproveitamento e perda de água (OLIVEIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2012).

O potencial forrageiro da palma vem da sua grande capacidade de absorver e aproveitar a água em seus processos fisiológicos, apresentando eficiência de uso de água de até 11 vezes quando comparada com plantas de mecanismo C3 (CAVALCANTE et al., 2014), com algumas variedades acumulando até 90% de seu peso vivo em água (SANTOS et al., 2006), e pela capacidade de produzir grande quantidade de matéria verde como, por exemplo, a palma miúda que produz, em média, 68 t.ha⁻¹.ano⁻¹ de massa verde, em densidade de cultivo de 20.000 plantas.ha⁻¹ (VASCONCELOS et al., 2007), e a redonda que produz, em média, 175 t.ha⁻¹.ano⁻¹ de massa verde na mesma densidade de plantio (FARIAS et al., 2000).

Mesmo sendo bastante adaptada às condições edafoclimáticas da região semiárida do Brasil, a palma forrageira é relativamente exigente quanto às características físico-químicas do solo. Desde que apresentem boa fertilidade, as áreas de plantio podem ser de textura arenosa à argilosa, sendo mais recomendados solos argilo-arenosos. Dependendo do espaçamento de plantio e nível de fertilidade do solo, nos plantios mais adensados podem ser utilizadas 30t de esterco de curral/ha. Além da fertilidade, é fundamental que os solos sejam de boa drenagem. O bom rendimento da palma forrageira está relacionado a precipitações que variam de 400 a 800 mm de chuva por ano, umidade relativa acima de 40% e temperaturas médias de 25 °C (LOPES et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2010).

Dada suas características morfofisiológicas, que garantem sua sobrevivência nas regiões áridas e semiáridas, a palma forrageira desempenha papel de grande importância como volumoso nos sistemas produtivos no semiárido nordestino, sendo utilizada principalmente na bovinocultura leiteira e na caprino e ovinoculturas, como fonte alternativa de água para os animais e como suplemento nas rações nos períodos mais secos do ano uma vez que. Diversas variedades de palma forrageira apresentam composição química e digestibilidade similares aos encontrados em silagens de milho e sorgo, tendo como único fator limitante na alimentação animal a quantidade de matéria seca e fibra que pode ser facilmente suplementada com outros volumosos (SANTOS et al., 2006 SILVA; SANTOS 2006).

Mesmo apresentando grande rusticidade e adaptação a condições de pouca disponibilidade de água, a cultura da palma forrageira está sujeita ao ataque de diversas doenças que podem ser causadas por vários agentes, como bactérias, micoplasmas, fungos, nematóides e vírus (GRANATA, 2001). A expansão das áreas de plantio, juntamente com o

uso de sistemas de irrigação projetados para aumentar a produtividade da cultura favorece o desenvolvimento destas doenças.

2.2 Principais Doenças na Cultura da Palma Forrageira

As doenças da palma têm sido pouco estudadas no Brasil e quase todos os trabalhos apenas descrevem o assinalamento, a sintomatologia e a patogenicidade dos agentes causadores. As doenças de origem fúngica são as mais importantes, podendo afetar cladódios, sistema radicular e frutos nas fases de pré e pós-colheita. A maior severidade das doenças fúngicas tem sido correlacionada com estresse nutricional, suscetibilidade de cultivares e clones e adensamento de plantio. Os danos causados por essas doenças à cultura reduzem a produtividade e limitam o cultivo de espécie, cultivar ou clone de maior interesse de cultivo ou valor comercial (GRANATA, 2001, BARBOSA et al., 2012).

Diversos autores (KIM et al., 2000b, GRANATA 2001, GRANATA; SIDOTI 2002, AYALA-ESCOBAR et al., 2006, QUEZADA-SALINAS et al., 2006, SANTOS et al., 2006, SOUZA et al., 2010, BARBOSA et al., 2012, BEZERRA et al., 2012) relatam um complexo de patógenos que podem ser associados às doenças mais comuns encontradas nos palméis do Brasil e de diversos países produtores desta cultura. Dentre as principais doenças elencadas pelos autores podemos citar:

Podridão de Fusário: o desenvolvimento desta doença é favorecido por solos de elevada acidez, baixa permeabilidade e alta umidade, ocorrendo nas raquetes-sementes e raquetes da base em plantas adultas. Tradicionalmente está associada aos fungos *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. e *F. oxysporum* Schltdl. Os sintomas se iniciam com podridão de consistência mole e coloração esverdeada na raquete da base. Tanto as raquetes primárias quanto as secundárias murcham e tombam sobre a planta poucos dias após a infecção. Os tecidos da raquete infectada tornam-se aquosos e escurecem. O seccionamento dos tecidos afetados revela uma cor vermelha evidente na membrana celular do tecido afetado (GRANATA 2001, SANTOS et al., 2006).

Podridão Negra: comumente associada ao fungo *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., a podridão ocorre, geralmente, a partir do local de inserção das raquetes, sendo no início de cor marrom e, em seguida, torna-se escura devido à produção de estruturas do fungo. A podridão é consistente, com abundante exsudação de goma de coloração amarelo leitosa tornando-se, posteriormente, enegrecida (SOUZA et al., 2010).

A Podridão de Macrofomina, está diretamente associada ao fungo *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid, ocorre com bastante frequência no México, podendo causar morte

em 50% das plantas nas áreas infectadas. A doença se manifesta inicialmente por meio de manchas cloróticas na parte externa e verde escuras na parte interna dos cladódios. Com a evolução da doença, ocorrem rachaduras no tecido devido a uma putrefação semi-aquosa, e se torna preta, o que é seguido de uma perfuração no local da mancha (GRANATA, 2001).

A Podridão do colo na palma forrageira é comumente associada a alguns patógenos do gênero *Phytophthora* como, por exemplo, *P. cactorum* (Leb. e Cohn) Schroet. e *P. nicotianae* (Breda Hahn). Em épocas quentes e úmidas, a planta doente exsuda uma goma na base do caule, perto da coroa. As plantas jovens apresentam uma putrefação marrom com um exsudato líquido. As partes internas do tecido enfermo apodrecem e se tornam avermelhados. A putrefação não se estende mais do que 20 a 30 cm acima da coroa, mas pode abranger toda a circunferência do caule, causando a morte da planta. Os sintomas das plantas afetadas são: interrupção do crescimento, clorose e murcha dos cladódios. A putrefação resulta numa menor turgescência do caule e muitas vezes as plantas tombam. Quando os zoósporos penetram nas raízes, ocorrem putrefação e desintegração do tecido (CACCIOLA & MAGNANO, 1988; GRANATA, 2001).

Mancha de *Alternaria*: atribuída ao fungo *Alternaria tenuis* Nees. Ex Pers, foi identificada no interior de Pernambuco ocorrendo de forma epidêmica com 70% de incidência em cultura de palma miúda e causando intensa queda das raquetes na cultura. Na palma miúda os sintomas da doença caracterizam-se por manchas de coloração preta nas raquetes, nas formas circulares ou elípticas, medindo 1,0-3,0 cm de diâmetro com abundante esporulação na superfície da lesão. As lesões podem se estender de uma face a outra da raquete, exibindo perfurações devido à queda do tecido infectado. As manchas podem coalescer, formando grandes áreas necrosadas e causando queda na raquete das plantas (SWART; SWART, 2003; SANTOS et al., 2006).

A Mancha Negra pode ser associada a fungos do gênero *Pseudocercospora*. Em palmas atacadas por estes fungos podem ser detectados dois sintomas distintos. Inicialmente as plantas apresentam descoloração da cutícula adquirindo cor clara com pequenos pontos de cor azeitona. Posteriormente, as manchas adquirem coloração café-escuro, com diâmetro entre 3 e 4 cm, apresentando também uma margem amarela. Em seguida, a parte afetada seca e muitas vezes o tecido afetado cai deixando orifícios através do cladódio. Outro sintoma observado, embora menos frequente, caracteriza-se por manchas indefinidas que podem invadir todo ou parte do cladódio. A sua incidência mais elevada foi observada nos cladódios sombreadas e na presença de umidade relativa elevada (MÉNDEZ-GALLEGOS et al., 2008). Realizando trabalhos de caracterização morfológica e molecular do agente causal de uma

nova doença que atingiu as plantações de palma forrageira no México, Ayala-Escobar et al. (2006), identificaram a nova espécie *Pseudocercospora opuntiae* como o agente causal da mancha negra em palma forrageira no México.

Buscando entender as origens da mancha negra em palma forrageira, Quezada-Salinas et al. (2006), realizaram diversos ensaios com materiais apresentando sintomas de manchas negras circulares de tamanho definido e manchas negras de formato indefinido que podem tomar parte ou até todo o cladódio, provenientes do Estado de Morelos no México, identificando como agentes causais da doença os fungos *Pseudocercospora* sp. e *Colletotrichum gloeosporioides*. Méndez-Gallegos et al. (2009), também associaram *C. gloeosporioides* como um dos agentes causadores da mancha negra, quando a doença está em estágio mais avançado.

Colletotrichum gloeosporioides é conhecido como o causador da antracnose, um problema em palmas cultivadas em épocas úmidas ou em áreas irrigadas. O patógeno pode causar lesões tanto nas raquetes quanto nos frutos e consiste de manchas marrom escuras com pontos avermelhados, começando geralmente pelas bordas dos cladódios, estendendo-se ao restante do mesmo. Quando ativo o fungo produz uma massa de esporos vermelho alaranjado no interior das lesões (KELLY; OLSEN, 2011).

Kim et al. (2000a), observaram mancha negra em pitaya (*Hylocereus trigonus*) cultivada em diversas casas de vegetação em regiões produtoras na Coreia. Os sintomas encontrados incluíam podridão úmida de coloração marrom clara ou podridão aquosa nas hastes das plantas. O fungo formava colônias cinza escuro, densa ou flocosa em meio de batata dextrose ágar, frequentemente apresentando vários acérvulos de coloração rosa clara, geralmente rodeados por setas. Os conídios eram hialinos, cilíndricos, unicelulares e arredondados no final. A partir destas características os autores identificaram o agente causal da mancha negra como *Colletotrichum* sp.

Em outro trabalho realizado na ilha de Cheju também na Coreia, Kim et al. (2000b), identificaram, a partir de características morfológicas e da sintomatologia na planta, o fungo *C. gloeosporioides* e o seu teleomorfo *Glomerella cingulata* Stoneman causando antracnose em extensas áreas produtoras de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) utilizada na produção de alimentos processados.

Buscando compreender as origens de lesões de antracnose em hastes de pitaya (*H. polyrhizus*) cultivado nos estados de Kedah e Penang na Malásia, Vijaya et al. (2015), analisaram 10 isolados de *Colletotrichum* obtidos a partir de lesões típicas nas hastes das plantas. A partir de características morfológicas, de cor e aparência das colônias e da forma

dos conídios, bem como de sequências das regiões ITS, TUB2, AC e GAPDH, os isolados foram identificados como sendo do fungo *C. truncatum*, sendo este o primeiro relato do patógeno *C. truncatum* causando antracnose em *H. polyrhizus* na Malásia.

2.3 Gênero *Colletotrichum*

Colletotrichum spp. é um importante gênero fúngico que abrange espécies saprofitas e fitopatogênicas associadas a plantas no mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (BAILEY et al., 1992), atingindo uma ampla gama de hospedeiros incluindo cereais, legumes, vegetais, culturas perenes e árvores frutíferas (KUMAR et al., 2011). Em levantamento realizado por Dean et al. (2012), a importância para a agricultura mundial do gênero *Colletotrichum* foi mais uma vez reconhecida quando este foi classificado como um dos 10 fungos de maior importância mundial.

Muitas incertezas existem no que diz respeito à sistemática de fungos patogênicos deste gênero e, a depender dos critérios utilizados, o número de espécies pode variar de 29 a mais de 700 (von ARX, 1957; SUTTON, 1992). Uma das espécies de taxonomia mais confusa é *C. gloeosporioides*, um exemplo disto é que 594 espécies de *Colletotrichum* foram reclassificadas por von Arx como sinônimos de *C. gloeosporioides*. Segundo Phoulivong et al. (2010) *C. gloeosporioides* pode infectar pelo menos 1000 espécies de plantas.

As espécies de *Colletotrichum* utilizam diversas estratégias para invadir o tecido dos hospedeiros, que vão desde a colonização hemibiotrófica intracelular até a necrotrófica subcuticular, além disto, estes agentes patogênicos desenvolveram uma série de estruturas especializadas de infecção como, por exemplo, tubos germinativos, apressórios e hifas intracelulares, que são utilizados na colonização de hospedeiros através de ferimentos, aberturas naturais ou diretamente via apressórios. Por causa disto, as espécies de *Colletotrichum* proporcionam excelentes modelos para o estudo da base molecular da infecção, diferenciação de estruturas e interações entre fungos e plantas (JEFFRIES et al., 1990; PERFECT et al., 1999; DEAN et al., 2012).

Em alguns casos, várias espécies de *Colletotrichum* ou seus biótipos podem formar um complexo de infecção em um único hospedeiro (FREEMAN et al., 1998). O potencial de inoculação cruzada de *Colletotrichum* spp. tem sido amplamente relatado como, por exemplo, *C. gloeosporioides* isolado de abacate e manga que também pode produzir lesões em morango, pimenta, goiaba e mamão que são cultivados em áreas adjacentes (SANDERS; KORSTEN, 2003).

Em decorrência da grande quantidade de hospedeiros e da inoculação cruzada das espécies de *Colletotrichum*, a distinção entre as espécies deste gênero é de fundamental importância para o desenvolvimento ou aperfeiçoamento de práticas que visam o controle eficiente das doenças causadas por esses fungos (FREEMAN et al., 1998).

Antes do acesso a sequências de DNA, a taxonomia do *Colletotrichum* era baseada em características como: espécies hospedeiras, substrato, tamanho e formato de conídios, formato do apressório, velocidade de crescimento da cultura, cor da cultura, surgimento ou não de fase teleomorfa, etc. No entanto, surgiram problemas porque muitas das características morfológicas mudam sob diferentes condições de crescimento, além disto estas características também podem mudar ou se perder com repetidos subcultivos (WEIR et al., 2012).

Atualmente a morfologia e patologia não são suficientes na distinção entre espécies de *Colletotrichum* e métodos baseados no DNA são agora rotineiramente utilizados em conjunto com características morfológicas para identificar e caracterizar *Colletotrichum* spp. (McKAY et al., 2009; RATANACHERDCHAI et al., 2010). A região ITS do 5.8S rDNA tem sido amplamente sequenciada em estudos de identificação molecular das espécies do gênero *Colletotrichum* (MILLS et al., 1992). A epitipificação para *C. gloeosporioides* com base nas sequências de ITS, por exemplo, possibilitou um grande avanço no entendimento deste gênero (CANNON et al., 2008). No entanto, já são conhecidas as limitações do gene ITS para identificação de algumas espécies, e o conhecimento de genes mais informativos tornou-se cada vez mais necessário (WEIR et al., 2012; SHARMA et al., 2013).

Através da análise multilocus, quando mais de uma região genômica é utilizada na caracterização molecular dos isolados, as espécies deste gênero foram separadas em nove principais complexos: *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. acutatum*, *C. graminicola*, *C. spaethianum*, *C. destructivum*, *C. dematium*, *C. truncatum*, *C. orbiculare* (CANNON et al., 2012) e posteriormente, o complexo *C. brevisporum* foi adicionado (NOIREUNG et al., 2012).

A partir do conceito de complexos dentro do gênero *Colletotrichum* vários trabalhos foram desenvolvidos, como as revisões dos complexos *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. acutatum*, *C. destructivum*, com base em análise multilocus utilizando os genes GAPDH, ACT, CHS-1, TUB2, CAL, HIS3, GS, superóxido-dismutase de manganês (SOD) e a região ITS (CANNON et al., 2012; WEIR et al., 2012; DAMM et al., 2012a; DAMM et al., 2012b; DAMM et al., 2014).

Nos últimos anos o gene GAPDH tem sido utilizado em muitos trabalhos como medida inicial de diversidade de espécie do gênero *Colletotrichum* (LIMA et al., 2013;

COSTA, 2014) e tem sido indicado como referencial na identificação de espécies, visto que sua combinação com outros genes pode ser utilizada para distinguir de forma confiável a maioria das espécies do gênero (WEIR et al., 2012).

2.4 Efeito da temperatura e umidade sobre a severidade de doenças.

Fatores ambientais tem papel fundamental no desenvolvimento epidemiológico de doenças. As relações entre intensidade e duração da chuva, disposição da lavoura e dispersão do inóculo possibilitam diferentes níveis de severidade das doenças (DODD et al., 1992). Segundo Agrios (2005) a temperatura e a umidade na superfície da planta são os fatores ambientais que mais afetam o início e o progresso de doenças infecciosas em plantas. Existem quatro combinações de temperatura e umidade que favorecem um grande número de doenças e seus agentes causais: quente e seco, quente e úmido, frio e seco, frio e úmido (KENAGA, 1994).

A temperatura interage com outros fatores, como umidade na superfície das folhas, umidade no ambiente, luz ou microbiota competidora (ROYLE; BUTLER, 1986), influenciando no crescimento micelial, na esporulação, na germinação de conídios e na coloração das colônias, podendo ser utilizada, em alguns casos, como parâmetro para diferenciação de espécies (MAIA et al., 2011).

A duração da umidade superficial, no entanto, aparenta ter a relação mais direta com a germinação, infecção e crescimento do patógeno no hospedeiro. A umidade é indispensável para a germinação da maioria dos esporos fúngicos e para a penetração do tubo germinativo no hospedeiro, além de aumentar a suscetibilidade a certos patógenos, afetando a incidência e a severidade, possibilitando a ocorrência de doenças (ARINZE, 1986).

O efeito do clima no progresso da doença torna-se aparente quando se considera a importância da época do ano, isto é, as condições climáticas e o estágio de crescimento das plantas, quando o hospedeiro e o patógeno podem coexistir, a duração e a frequência de temperatura e pluviosidade favorável, o tempo de aparecimento dos vetores e a duração do ciclo de infecção de uma doença em particular (KENAGA, 1994).

Variáveis de clima como temperatura, umidade relativa e número de dias chuvosos têm grande influência no desenvolvimento da antracnose. Em condições de temperatura mais amenas, o patógeno pode crescer rapidamente e surtos severos de doença são esperados durante estações chuvosas prolongadas (PANDEY et al., 1997). Em trabalho com antracnose em goiaba Soares et al. (2008), observaram que a taxa de germinação e formação dos apressórios no *C. gloeosporioides* é maior em temperaturas que variam de 15 a 30 °C, com

temperatura ótima de 25 °C, já *C. acutatum* é mais sensível as variações de temperatura, com ponto ótimo a 20 °C. O período de umidade afeta mais *C. acutatum* que *C. gloeosporioides*, apresentando menor germinação com 6 horas de umidade do que com 12 ou 24 horas.

As variáveis ambientais, principalmente a temperatura e a umidade relativa influenciam diretamente a disseminação de *C. gossypii* South var. *cephalosporioides* S.A. Costa bem como o progresso da ramulose no algodoeiro (CIA; SALGADO, 2005). Em regiões com temperaturas elevadas, a viabilidade dos esporos e a formação de lesões são reduzidas, culminando com a redução no progresso da doença. Por outro lado, a maior incidência de tombamento de plântulas de algodoeiro, em pré e pós-emergência, é atribuída a baixas temperaturas no solo durante o período de germinação (TANAKA, 1995).

A relação de dependência entre temperatura e período de umidade com a percentagem de doença, estabelecida sob condições controladas, nem sempre pode ser observada no campo. Isto ocorre especialmente por causa das variações de temperatura e umidade nas lavouras, além disto, também existem variáveis no campo que não estão presentes em estudos com condições controladas, como plantas em estágios de maturação e em condições fisiológicas diferentes (BIALE, 1950).

O conhecimento sobre o processo de infecção e colonização do *Colletotrichum* spp., e os fatores ambientais que influenciam este processo, são pré-requisitos para o desenvolvimento de estratégias de controle eficientes e no desenvolvimento de sistemas de prevenção de doenças (FRAISSE et al., 2006; SOARES et al., 2008).

REFERENCIAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. Califórnia: Elsevier Academic Press. 5. ed, 952p. 2005.
- ARINZE, A.E. Post-harvest diseases of tomato fruits in Southern Nigeria. **Journal Fitopatologia Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 637 – 645. 1986.
- AYALA-ESCOBAR, V. et al. *Pseudocercospora opuntiae* sp. nov., the causal organism of cactus leaf spot in Mexico. **Fungal Diversity**, v. 21, p. 1 – 9, 2006.
- von ARX, J. A. Die arten der gattung *Colletotrichum* Cda. **Phytopathology**, v. 29, p. 413 - 468, 1957.
- BAILEY, J. A. et al. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. CAB International, p. 88-120. 1992.
- BARBOSA, R. S. et al. Doenças da Palma Forrageira. In: LOPES, E. B. (Ed.) **Palma forrageira: Cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino**. João Pessoa: EMEPA/FAEPA, p. 81 – 98, 2012.
- BARRIOS, E. P.; MUÑOZ-URÍAS, A. Domesticação de Opuntias e variedades cultivadas. In: BARBERA et al. (Eds.). **Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira**. Roma/Brasília: FAO / SEBRAE – PB, p. 58 - 64, 2001.
- BEZERRA J. P. D. et al. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. **World Journal of Microbiological Biotechnology**, v. 28, p. 1989 – 1995, 2012.
- BIALE, J. B. Postharvest physiology and biochemistry of fruits. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 1, p. 183-206, 1950.
- CACCIOLA, S. O.; MAGNANO, DI SAN LIO, G. Foot rot of prickly pear cactus by *Phytophthora nicotianae*. **Plant Disease**, v. 72, p. 793 – 796. 1988.
- CANNON, P. F. et al. The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mycotaxonomy**, v. 104, p. 189-204, 2008.
- CANNON, P.F. et al. *Colletotrichum*- current status and future directions. **Studies in Mycology**. v.73, p.181-213, 2012.
- CAVALCANTE, L. A. D. et al. Respostas de genótipos de palma forrageira a diferentes densidades de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 4, p. 424-433, 2014.
- CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro. In: KIMATI, H. et al. (Eds.) **Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas**. 4 ed., v. 2, p. 40-54, 2005.

- COSTA, J. F. de O. **Caracterização e epidemiologia comparativa de espécies de *Colletotrichum* em anonáceas no estado de Alagoas**. 2014. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) - Universidade Federal de Alagoas (CECA), Rio Largo, 2014.
- DAMM, U. et al. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p.1-36, 2012a.
- DAMM, U. et al. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, v.73, p. 37–113, 2012b.
- DAMM, U. et al. The *Colletotrichum destructivum* species complex – hemibiotrophic pathogens of forage and field crops. **Studies in Mycology**, v. 79, p. 49–84, 2014.
- DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414 – 430, 2012.
- DODD, J. C., Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* in the Tropics. In: BAILEY, J. A., JEGER, M. J. (Eds.), **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. CAB International, p.308-325. 1992.
- DUBEUX JÚNIOR, J. C. B. et al. Potencial da palma forrageira na América do Sul. **Cactusnet Newsletter**, v. 13, ed. esp., p. 29-40, 2013.
- FARIAS, I. et al. Manejo de colheita e espaçamento da palma-forrageira, em consórcio com sorgo granífero, no agreste de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 341-347, 2000.
- FRAISSE, C. W., et al. AgClimate: a climate forecast information system for agricultural risk management in the southeastern USA. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 53, n. 1, p. 13-27, 2006.
- FREEMAN, S. et al. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, v. 82, p. 596-605. 1998.
- GRANATA G. Doenças bióticas e abióticas. In: BARBERA et al. (Eds.). **Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira**. Roma/Brasília: FAO / SEBRAE – PB, p. 112 – 122, 2001.
- GRANATA, G. & SIDOTI, A. Survey of diseases discovered on *Opuntia ficus-indica* in produces countries. **Acta Horticulturae**, v. 581, p. 231-237, 2002.
- HOFFMANN, W. Etnobotânica. In: BARBERA et al. (Eds.). **Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira**. Roma/Brasília: FAO / SEBRAE – PB, p. 12 - 19, 2001.
- JEFFRIES, P. et al. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathology**, v. 39, p. 343-366, 1990.
- KELLY, J.; OLSEN, M. W. Problems and pests of agave, aloe, cactus and yucca. **Arizona Cooperative Extension**. The University of Arizona: College of Agriculture and Life Sciences, 9p. 2011.

KENAGA, C. B. Plant disease concept, definitions, symptoms and classification. In: KENAGA, C. B. **Principles of phytopathology**. 2nd ed., Balt Publishers, p.12-31. 1994.

KIM, Y. H. et al. Occurrence of Colletotrichum stem rot caused by *Glomerella cingulata* on graft-cactus in Korea. **Plant Pathology Journal**, v. 16, n. 4, p. 242 - 245, 2000a.

KIM, W. G. et al. Occurrence of anthracnose on indian fig cactus caused by *Glomerella cingulata* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Pathology Journal**, v. 16, n. 5, p. 294 – 296, 2000b.

KUMAR, N. et al. Molecular and Pathological Characterization of *Colletotrichum falcatum* Infecting Subtropical Indian Sugarcane. **Journal of Phytopathology**, v. 159, n. 4, p. 260–267, 2011.

LIMA, I. M. M.; GAMA, N. S. Registro de plantas hospedeiras (cactaceae) e de nova forma de disseminação de *Diaspis echinocacti* (Bouché) (Hemíptera: Diaspididae), cochonilha da palma forrageira, nos estados de Pernambuco e Alagoas. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 3, p. 479 – 481, 2001.

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

LOPES, E. B. et al. Cultivo da Palma Forrageira. In: LOPES, E. B. (Ed.) **Palma forrageira: Cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino**. João Pessoa: EMEPA/FAEPA, p. 21 - 60, 2012.

MAIA, F. G. M. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira com sintomas de antracnose. **Bioscience Journal**, v.27, n.2, p.205-210, 2011.

McKAY, S. F. et al. Morphological, genetic, and pathogenic characterization of *Colletotrichum acutatum*, the cause of anthracnose of almond in Australia. **Phytopathology**, v. 99, p. 985-995. 2009.

MÉNDEZ-GALLEGOS, S.J.; et al. Identificación y control de las principales enfermedades del nopal. **Revista Salud Pública y Nutrición**, v. 2, p. 2 – 13, 2008.

MILLS, P. R. et al. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 98, p.137-143, 1992.

NOIREUNG, P. et al. Novel species of *Colletotrichum* revealed by morphology and molecular analysis. **Mycologie**, v. 33, n.3, 2012.

OLIVEIRA, F. T. et al. Palma forrageira: adaptação e importância para os ecossistemas áridos e semiáridos. **Revista Verde**, v. 5, n. 4, p. 27 – 37, 2010.

PANDEY, R. R., et al. Effect of environmental conditions and inoculum density on infection of guava fruits by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mycopathologia**, v. 137, p. 165-172, 1997.

- PESSOA, A. S. **Cultura da palma forrageira**. Recife, 1967. SUDENE. Divisão de documentação, p. 98, 1967. (SUDENE. Agricultura, 5).
- PERFECT, S. E. et al. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal–plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, p. 186 – 198, 1999.
- PHOULIVONG, S. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity**, v. 44, n.1, p. 33-43, 2010.
- QUEZADA-SALINAS, A. et al. Etiología de la mancha negra del nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill) en Tlalnepantla, Morelos, México. **Agrociencia**, v. 40, p. 641 – 653, 2006.
- RATANACHERDCHAI, K. et al. ISSR for comparison of cross-inoculation potential of *Colletotrichum capsici* causing chilli anthracnose. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n.1, p. 076-083. 2010.
- ROYLE, D. J., BUTLER, D. R., Epidemiological Significance of Liquid Water in Crop Canopies and its Role in Disease Forecasting. In: AYRES, P. G., BODDY, L. (Eds.), **Water, Fungi and Plants**. Cambridge University Press, p.139-156. 1986.
- SANDERS, G. M.; KORSTEN, L. Comparison of cross inoculation potential of South African avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Microbiological Research**, v. 158, n. 2, p. 143-150. 2003.
- SANTOS, M. V. F. et al. Estudo comparativo de cultivares de palma forrageira “Gigante”, “Redonda” (*Opuntia ficus-indica* Mill) e “Miúda” (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dick) na produção de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 19, n. 6, p. 504 – 511, 1990.
- SANTOS, D. C. et al. Desempenho produtivo de vacas 5/8 holando/zebu alimentadas com diferentes cultivares de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Zootecnia, v. 30, n. 1, p. 12 – 17, 2001.
- SANTOS, D. C. et al. **Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) em Pernambuco**. Recife: IPA, 2006. 48p. (IPA, Documento 30).
- SANTOS, D. C. E. et al. Usos e aplicações da palma forrageira. In: LOPES, E. B. (Ed.) **Palma forrageira: Cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino**. João Pessoa: EMEPA/FAEPA, p. 99 - 150, 2012.
- SHARMA, G. et al. ITS-based diversity of *Colletotrichum* from India. **Current Research in Environmental & Applied Mycology** v. 3, n. 2, p. 194–220. Outubro, 2013.
- SILVA, D. M. P. Ocorrência de calloenesis sobre a cochonilha em Alagoas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 281 – 282, 1990.
- SILVA, C. C. F.; SANTOS, L. C. Palma Forrageira (*Opuntia Ficus-Indica* Mill) como alternativa na alimentação de ruminantes. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 7, n. 10, p. 1 – 13. Outubro, 2006.

SOARES, A. R. Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e período de molhamento. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.4, p.265- 272, 2008.

SOUZA, A. E. F. et al. Ocorrência e identificação dos agentes etiológicos de doenças em palma forrageira (*Opuntia ffcus-indica* Mill.) no semiárido paraibano. **Revista Biotemas**, v. 23, n. 3, p. 11 – 20, 2010.

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

SWART, W. J.; SWART, V. R. An Overview of Research on Diseases of Cactus Pear in South África. **Journal of the Professional Association for Cactus Development**. v. 15, p. 115 – 120. 2003

TANAKA, M. A. S. Transmissão planta-semente e semente-plântula do agente causal da ramulose do algodoeiro. In: MENTEN, J. O. M. (Ed.) **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**, p.171-178, 1995.

TAYLOR, N. P. et al. Realignment and revision of the Opuntioideae (Cactaceae) of Estern Brazil. In: HUNT, D. et al. (Ed.). **Studies in the Opuntioideae (Cactaeae)**, p. 99 – 132. 2002.

VASCONCELOS, A. G. V. et al. Micropropagação de palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera* Salm Dyck). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias, Recife**, v. 2, n. 1, p. 28-31, 2007.

VIJAYA, S. I. Characterization and Pathogenicity of *Colletotrichum truncatum* Causing Stem Anthracnose of Red-Fleshed Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*) in Malaysia. **Journal of Phytopathology**, v. 163, p. 67 – 71. 2015.

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

3 ETIOLOGIA DA MANCHA MARROM DE PALMA (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck).

RESUMO

A palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*), começou a despertar interesse como forrageira na primeira década do século XX, sendo introduzida no Nordeste brasileiro. Mesmo apresentando grande rusticidade e adaptação a condições climáticas da região semiárida, a cultura da palma forrageira está sujeita ao ataque de diversas pragas e doenças que causam grandes prejuízos para a sua produção. Dentre os agentes causais de doenças em palma, os fungos do gênero *Colletotrichum* são responsáveis por danos econômicos consideráveis à cultura. Um dos maiores problemas na caracterização das espécies de *Colletotrichum* é a sua grande variabilidade morfocultural, sendo necessária a utilização de diversas técnicas de identificação, dentre elas, estão as técnicas de biologia molecular, que possibilitam identificação mais precisa das espécies deste gênero fúngico. Desta forma, objetivou-se neste trabalho realizar um estudo sobre a etiologia de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos a partir de lesões características de mancha marrom em cladódios de palma forrageira. Para tanto cladódios apresentando sintomas de manchas marrons em sua superfície, foram coletados em áreas produtoras nos estados de Alagoas e Pernambuco. No laboratório foi realizado o isolamento dos fitopatógenos e obtenção da cultura monospórica dos mesmos para posterior identificação. O material isolado foi caracterizado a partir de técnicas moleculares utilizando as seguintes regiões genômicas: GAPDH, TUB2 e ITS, em conjunto com técnicas de caracterização morfológica e cultural. A caracterização dos isolados possibilitou a identificação das espécies *C. siamense*, *C. fructicola* e *C. karstii* causando doença em palma forrageira no Brasil.

Palavras-Chave: Morfologia. Sequenciamento genético. Antracnose.

ETIOLOGY BROWN STAIN IN PALMA (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck).**ABSTRACT**

The cactus (*Nopalea cochenillifera*), began to arouse interest as forage in the first decade of the XX century, being introduced in the Brazilian northeast. Even with great hardiness and adaptation to climatic conditions of the semiarid region, the culture of spineless cactus is subject to attack by various pests and diseases that cause great harm to their production. Among the causative agents of diseases in cactus, fungi of the genus *Colletotrichum* are responsible for considerable economic damage to the crop. One of the biggest problems in the characterization of species of *Colletotrichum* is its great variability morphocultural, requiring the use of several identification techniques, among which are the techniques of molecular biology, which allow more precise identification of the species of this fungal genus. Thus, the objective of this study was to conduct a study on the etiology of *Colletotrichum* sp. obtained from injuries brown stain characteristics in cladodes of cactus pear. Therefore cladodes with symptoms of brown spots on its surface, were collected in producing areas in the states of Alagoas and Pernambuco. In the laboratory we performed the isolation of plant pathogens and obtaining monospórica culture the same for later identification. The isolated material was characterized using molecular techniques from the following genomic regions: GAPDH, TUB2 and ITS, together with morphological and cultural characterization techniques. Characterizing isolates allowed the identification of *C. siamense*, *C. karstii* and *C. fructicola* causing disease in forage cactus in Brazil.

Keywords: Morphology. Genetic sequencing Anthracnose.

3.1 Introdução

O potencial forrageiro da palma, aliado à sua capacidade de reter e conservar água, faz dessa cultura uma alternativa viável para os prolongados períodos de seca que ocorrem no Nordeste brasileiro. Sendo plantada na maioria dos estados do Nordeste, a palma forrageira fornece água e reserva energética para os rebanhos de bovinos, caprinos e ovinos durante vários meses do ano. A sua adaptabilidade às condições edafoclimáticas da região semiárida não isenta a palma forrageira do ataque de pragas e doenças (SANTOS et al., 2006; SANTOS et al., 2012; CAVALCANTE et al., 2014).

Entre as principais doenças que atacam a cultura os fungos causadores de podridões e manchas dos cladódios estão entre os mais devastadores para a palma forrageira. O gênero *Colletotrichum* já foi relatado causando danos econômicos em diversas culturas agrícolas de importância mundial, como cereais, frutas, hortaliças, plantas medicinais, dentre outros. Na palma forrageira este fungo é conhecido por causar antracnose nos frutos e manchas nos cladódios, já sendo relatado em diversos países produtores de palma (GRANATA, 2001; BARBOSA et al., 2012).

O gênero *Colletotricum* apresenta uma grande variedade de espécies, sendo encontrado em todos os continentes. Tal variedade de espécies, hospedeiros e ambientes onde este fungo é encontrado dificulta a sua caracterização de forma eficaz, o que ocasionou, durante muitos anos, diversas sinonímias e informações conflitantes sobre a sua taxonomia. Originalmente este gênero era identificado a partir de características morfológicas e culturais, dos seus hospedeiros, dos sintomas que causavam em seus hospedeiros e das condições edafoclimáticas nas quais se desenvolviam. Contudo, com o surgimento das técnicas de biologia molecular observou-se as diversas falhas na classificação deste fitopatógeno (von ARX, 1957; SUTTON, 1992; DEAN et al., 2012; WEIR et al., 2012).

O sequenciamento da região genômica ITS do 5.8S rDNA foi utilizado durante vários anos como ferramenta para identificar e reclassificar as diversas espécies de *Colletotrichum*, contudo com o passar dos anos e com o aperfeiçoamento das técnicas de biologia molecular observou-se que este fitopatógeno não pode ser classificado apenas a partir de uma região genômica. A partir deste momento teve início a exploração de novas regiões genômicas com potencial para auxiliar na taxonomia deste e de outros fitopatógenos. Atualmente são utilizadas várias regiões genômicas na caracterização molecular do gênero *Colletotrichum*, tais como os genes GAPDH, ACT, CHS-1, TUB2, CAL, HIS3, GS, superóxido-dismutase de manganês (SOD) e a região ITS (MILLS et al., 1992; CANNON et

al., 2012; WEIR et al., 2012; DAMM et al., 2012a; DAMM et al., 2012b; DAMM et al., 2014).

Vale ressaltar que a caracterização molecular não é aceita como única ferramenta para identificar uma espécie fúngica, sendo necessária a utilização de uma série de ferramentas como, por exemplo, características culturais, morfológicas e hospedeiros, para caracterizar e classificar corretamente fitopatógenos (McKAY et al., 2009; RATANACHERDCHAI et al., 2010).

Desta forma objetivou-se nesse trabalho realizar estudo sobre a etiologia de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos a partir de lesões características de mancha marrom em cladódios de palma forrageira.

3.2 Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia vegetal do Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

3.2.1 Origem, obtenção e preservação dos isolados do gênero *Colletotrichum*.

Cladódios apresentando sintomas de machas necróticas em sua superfície (Figura 1), foram coletados em áreas produtoras de nove municípios nos estados de Alagoas e Pernambuco. (Tabela 1). Em cada área foram coletados 50 cladódios apresentando sintomas de manchas (Figura 1).

Figura 1 - Sintomas de manchas em cladódios de palma forrageira miúda.



Fonte: Feijó, F. M.

Tabela 1 - Local e ano de coleta de cladódios de palma forrageira

Município de Coleta	Coordenadas Geográficas		Ano
	N	W	
Atalaia/AL	09° 30' 07"	36° 01' 22"	2014
Arapiraca/AL	09° 47' 54"	36° 36' 00"	2015
Estrela de Alagoas/AL	09° 23' 24"	36° 45' 36"	2015
Delmiro Gouveia/AL	09° 38' 58"	37° 99' 90"	2015
Santana do Ipanema/AL	09° 37' 04"	37° 24' 84"	2015
Cassimbinhas/AL	09° 40' 16"	36° 99' 14"	2015
Bom Conselho/PE	09° 10' 12"	36° 40' 48"	2015
São João/PE	08° 52' 33"	36° 22' 01"	2015
Lajedo/PE	08° 65' 83"	36° 32' 97"	2015

Fonte: Autor.

No Laboratório, os cladódios foram lavados em água corrente e secos ao ar. Foi realizada a técnica de isolamento indireto onde foram retirados fragmentos da área de transição entre o tecido sadio e o doente, os quais foram desinfestados com soluções de álcool

a 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio a 1% por um minuto, lavados em água destilada esterilizada (ADE), postos para secar em papel de filtro e posteriormente transferidos para placas de Petri contendo meio BDA (Batata – Dextrose – Ágar). Após a formação das colônias, discos de meio de cultura contendo o crescimento do fungo, foram retirados das bordas das colônias e transferidos para placas de petri contendo meio BDA e mantidos em temperatura ambiente por 10 dias, até o surgimento das estruturas de reprodução do fungo para posterior identificação.

Para a obtenção das culturas monospóricas foram preparadas suspensões de esporos através de uma raspagem superficial sobre a colônia e colocada em um recipiente contendo 1mL de ADE. Em seguida, foram realizadas contagens de esporos em câmara de Neubauer de forma a ajustar a suspensão para 10^5 esporos/ml. Após a diluição foram colocados 40 μ l desta suspensão em uma placa de petri contendo meio AA (ágar - água) e espalhada uniformemente com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas de Petri contendo os esporos foram examinadas no microscópio óptico e os esporos individuais e germinados foram transferidos para placas contendo BDA, onde foram mantidas à temperatura ambiente.

Após a obtenção das culturas monospóricas, os isolados foram preservados utilizando dois métodos: no primeiro método foram utilizados tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA, onde se transferia um disco de micélio do fungo 5 mm de cada isolado por tubo; o segundo método utilizado foi o de Castellani, onde cinco discos de 5mm contendo o micélio foram transferidos para frascos de vidro (10mL) contendo 5mL de ADE.

3.2.2 Teste de patogenicidade

O teste de patogenicidade foi realizado em cladódios sadios os quais foram tratados com solução de hipoclorito de sódio a 1% por cinco minutos, posteriormente lavados em água destilada (AD) e secos à temperatura ambiente. Foram utilizados dois métodos para o teste de patogenicidade. No primeiro método as inoculações foram realizadas através da aplicação de quatro gotas de 40 μ L de uma suspensão de esporos (10^6 conídios/ml) sobre a superfície dos cladódios em posições equidistantes. Os ferimentos foram realizados com o auxílio de uma agulha previamente flambada. Na testemunha foi utilizada apenas ADE. No segundo método discos de micélio de 5mm foram depositados sobre os cladódios com ferimentos realizados com uma agulha previamente flambada. Na testemunha foi utilizada apenas discos de BDA (FLORES - FLORES et al. 2013).

Posteriormente, cada cladódio foi acondicionado separadamente em sacos plásticos contendo um chumaço de algodão umedecido com AD, após 48h os cladódios foram retirados

dos sacos plásticos e acondicionados em BOD. O experimento foi mantido em incubadora BOD a 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas por até 10 dias.

3.2.3 Caracterização molecular

3.2.3.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada segundo protocolo CTAB adaptado de Doyle & Doyle (1987), onde o micélio dos isolados crescidos em meio líquido de Asparagina durante cinco dias foi lavado com ADE e em seguida, macerado com nitrogênio líquido em almofariz de porcelana com auxílio de um pistilo. Em seguida adicionou-se 2000 μ L de tampão de extração CTAB a 4% (CTAB a 4%, NaCl 1,4/M, EDTA 20/mM, Tris-HCl 100 mM, PVP a 1%) e 4 μ L de β -mercaptoetanol, onde apenas 500 μ L do micélio macerado foi transferido para tubos de micro centrífuga com capacidade de 1,5 ml. Os tubos foram mantidos em banho maria a 65°C por 30 minutos.

Após o banho maria os tubos foram deixados em repouso até atingirem temperatura ambiente, em seguida foram adicionados 600 μ L de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico - 24:1) em cada tubo e as amostras foram agitadas em vortex para homogeneização. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000rpm por 5 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5mL onde foram adicionados 400 μ L de isopropanol, as amostras foram acondicionadas a -20 °C por no mínimo 30 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000rpm por 5 minutos. Após a centrifugação a fase líquida foi descartada e o DNA precipitado foi lavado com 1 ml de etanol a 70% e centrifugado por 3 minutos a 12000rpm, sendo o procedimento de lavagem realizado duas vezes. Após as lavagens o DNA foi seco em temperatura ambiente e, em seguida, ressuspendido com 40 μ L de TE (Tris- HCl 10 mM, EDTA 1 mM) (10mL) + RNase (50 μ L), na proporção de 1:49. O DNA obtido foi armazenado sob temperatura de -20°C até sua utilização para amplificação.

3.2.3.2 Amplificação do DNA e sequenciamento dos produtos de PCR

O DNA de cada isolado foi utilizado como molde em PCR contendo primers específicos para o gene que codifica para a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Os produtos de PCR obtidos foram sequenciados na empresa Macrogen (Coreia do Sul), sendo as sequências utilizadas para determinação preliminar das espécies, por meio de inferência filogenética. Com base nessa primeira análise, representantes de cada espécie

tiveram seu DNA utilizado em outras reações visando à amplificação do gene β -tubulina (TUB2) e da região ITS-rDNA para confirmação das espécies identificadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Descrição dos primers usados para identificação de espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum*

Gene	Primer	Sequencia (5' - 3')	Referências
GAPDH	GDR	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	Guerber et al., 2003
	GDF	GGGTGGAGTCGTACTTGAGCATGT	
TUB2	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	O'Donnel; Cigelnik, 1997 Glass; Donaldson, 1995
	Bt2B	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al., 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

Fonte: Autor.

As reações de amplificação foram preparadas com tampão 10X, MgCl₂ 50 mM, DNTP's 10 mM, 10 μ M de cada oligonucleotídeo, 1U de Taq DNA Polimerase e 1 μ L de DNA diluído (1:20). O volume final das reações foi ajustado para 30 μ L com água Milli-Q auto clavada. As reações de PCR ocorreram em termociclador Applied Biosystems (2720 Thermal Cycler) nas seguintes condições: um ciclo a 94°C por 4 min (desnaturação inicial); 35 ciclos a 94°C por 45s (desnaturação), 60°C por 45s (anelamento), e 72°C por 1 min (extensão); e um ciclo final à 72°C por 7 min, para o gene GAPDH. Para o gene TUB2, a desnaturação inicial consistiu em 95°C por 4 min e 35 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 45 s e um ciclo final de 7 min por 72°C. Para a região ITS, a desnaturação inicial foi de 95°C por 2 min e 38 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 30 s, 72°C por 45 s e um ciclo final de 10 min por 72°C. Em seguida, o produto de PCR foi enviado para purificação e sequenciamento com os mesmos primers utilizados na amplificação.

3.2.3.3 Análises filogenéticas

As sequências de nucleotídeos foram montadas com o software Códon Code Aligner v. 4.1.1 (www.codoncode.com) (Códon Code Corporation, Dedham, Massachusetts, USA), e analisadas visualmente. Os arranjos de nucleotídeos em posições ambíguas foram corrigidos por comparação das sequências senso e anti-senso. Sequências parciais obtidas para o gene GAPDH foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLASTn e o banco de dados de nucleotídeos não-redundante GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), e também comparadas com sequências no banco de dados Q-Bank Fungi (<http://www.q-bank.eu/fungi/>) para determinar as espécies fúngicas com as quais elas compartilharam maior identidade de sequência.

Para identificação preliminar dos isolados, foi construída uma árvore filogenética bayesiana com as sequências parciais do gene GAPDH. Para posicionamento taxonômico definitivo, um subgrupo de isolados foi escolhido para obtenção de sequências adicionais com os genes TUB2 e ITS. Foram então obtidas filogenias para os dados concatenados das sequências parciais dos genes GAPDH, TUB2 e ITS do subgrupo dos isolados obtidos neste trabalho e sequências disponíveis no GenBank (Tabela 3).

Tabela 3 - Sequências do gênero *Colletotrichum* incluídas nas análises multigênicas e respectivos números de acessos do GenBank

Espécie	N. da Cultura	Número de acesso no GenBank		
		GAPDH	TUB2	ITS
<i>C. alienum</i>	C1189	JX010018	JX010385	JX010217
<i>C. theobromicola</i>	C1316.13	JX010006	JX010447	JX010294
<i>C. tropicale</i>	5101	JX010007	JX010407	JX010264
<i>C. gloeosporioides</i>	IMI 356878	JX010056	JX010445	JX010152
<i>C. musae</i>	C1266.11	JX010015	JX010395	JX010142
<i>C. fructicola</i>	C1253.2	JX009998	JX010388	JX010167
<i>C. siamense</i>	C1276.5	JX009942	JX010402	JX010245
<i>C. boninense</i>	CBS:112115	JQ005247	JQ005594	JQ005160
<i>C. cymbidiicola</i>	CBS:123757	JQ005255	JQ005602	JQ005168
<i>C. constrictum</i>	CBS:128504	JQ005325	JQ005672	JQ005238
<i>C. brasiliense</i>	CBS:128501	JQ005322	JQ005669	JQ005235
<i>C. karstii</i>	CBS:106.91	JQ005307	JQ005654	JQ005220
<i>C. truncatun*</i>	CBS:151.35	GU228254	GU228156	NR111458

Fonte: Autor

Nota: *Out group. GAPDH: *glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase*; TUB2: β -*tubulin*; ITS: *internal transcribed spacer*.

Alinhamentos múltiplos de sequências nucleotídicas foram preparados para os conjuntos de dados GAPDH, TUB2 e dados concatenados (GAPDH, TUB2) utilizando-se o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004) e ajustados manualmente no pacote MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (TAMURA et al., 2013). A análise de Inferência Bayesiana (BI) para os conjuntos de dados GAPDH, TUB2 e dados concatenados foi realizada, separadamente, empregando o método da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), no portal CIPRES (MILLER et al., 2010) usando MrBayes v. 3.2.3 (RONQUIST et al., 2012).

O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi determinado para os dados de cada região genômica usando MrModeltest 2.3 (POSADA; BUCKLEY, 2004) de acordo com o Akaike Information Criterion (AIC). As quatro cadeias MCMC foram conduzidas simultaneamente, iniciando as árvores aleatoriamente até 10.000.000 de gerações, para cada

conjunto de dados. As árvores foram amostradas a cada 1.000 gerações, resultando em 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas da análise, como uma fase de *burn-in*. Os valores de probabilidade posterior (RANNALA, YANG, 1996) foram determinados a partir de uma árvore consenso *majority-rule* gerada com as 7.500 árvores remanescentes. As árvores foram visualizadas e editadas nos programas FigTree v. 1.4 (ztree.bio.ed.ac.uk/software/figtree).

3.2.4 Caracterização cultural e morfológica

De cada isolado foi retirado da borda da colônia um disco de meio contendo o micélio, e em seguida transferidos para o centro de placas de petri contendo meio BDA. Foram avaliados diariamente, durante sete dias, o diâmetro médio das colônias tomado no reverso das placas, através da mensuração, em dois sentidos diametralmente opostos, com o auxílio de um paquímetro digital. Ao final, foi observada também a coloração das colônias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, sendo a repetição constituída por uma placa de Petri. Os dados obtidos foram utilizados para calcular o índice de crescimento micelial – ICM (mm/dia) pela seguinte fórmula:

$$ICM = \frac{C1}{N1} + \frac{C2}{N2} \dots + \frac{Cn}{Nn}$$

Onde:

ICM= índice de crescimento micelial

C1= crescimento micelial no primeiro dia

N1= número de dias

A caracterização morfológica baseou-se no tamanho e forma dos conídios e apressórios de cada isolado observados com auxílio de microscópio óptico, com aumento de 40 vezes. A produção de esporos dos isolados foi obtida por meio do cultivo em meio BDA em temperatura de 25 ± 1 °C por 10 dias e fotoperíodo de 12 horas. Imagens da morfologia dos conídios foram capturas e posteriormente, cinquenta conídios de cada isolado tiveram largura e comprimento medidos por meio da mensuração projetadas em monitor de computador, através do software Cell senses Standard.

Foi utilizado o método de micro cultivo em ágar-água para avaliação do formato dos apressórios. As lâminas foram observadas em microscópio óptico e a mensuração dos

apressórios feita como descrito para os conídios. O formato dos conídios e apressórios foi avaliado de acordo com chave de identificação proposta por Sutton (1980; 1992).

3.3 Resultados e Discussão

A partir das coletas realizadas em localidades de Alagoas e Pernambuco foram obtidos 17 isolados de fungos apresentando características morfológicas compatíveis com o gênero *Colletotrichum*.

3.3.1 Testes de Patogenicidade

Durante o teste de patogenicidade todos os isolados obtidos causaram lesões em raquetes de palma miúda quando inoculados a partir de discos contendo estruturas do patógeno na superfície da raquete com ferimento (Figura 2). Quando a inoculação ocorreu a partir da suspensão de conídios nenhum dos isolados causou lesão nas raquetes de palma.

Figura 2 - Cladódios de palma miúda (*Nopalea cochenillifera*) inoculadas com discos contendo estruturas de *Colletotrichum* spp



Fonte: Feijó, F. M.

É sabido que a maioria das infecções fúngicas na parte aérea da palma ocorre a partir de ferimentos nas raquetes (SOUZA et al., 2010), ferimentos estes que podem ser atribuídos a ação de insetos, pequenos roedores, do rebanho quando o palmar é utilizado para pastejo direto ou quando as raquetes são cortadas para alimentação no cocho pelos animais.

Não foram observados sintomas quando a inoculação se deu a partir de suspensão de conídios, possivelmente em decorrência do fato de o patógeno necessitar de um período de

tempo elevado para iniciar a infecção. Quezada-Salinas et al. (2006), estudaram a etiologia da mancha negra em palma forrageira verificando que as lesões características da doença foram observadas após 110 dias de inoculação por aspersão de conídios, sendo que estruturas características do *Colletotrichum* sp. foram identificadas após o aparecimento de estruturas de *Pseudocercospora* sp., indicando correlação entre os dois patógenos no desenvolvimento da doença. Desta forma, é interessante que seja estudado o efeito sinérgico de *Colletotrichum* spp. com outros fungos fitopatogênicos.

Em sequência ao teste de patogenicidade foi realizado o reisolamento dos 17 isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos, confirmando desta forma os postulados de Koch. Após a conservação dos isolados foi realizada a caracterização molecular, cultural e morfológica dos mesmos objetivando identificar as espécies de *Colletotrichum* encontradas na cultura da palma forrageira.

3.3.2 Caracterização Molecular

A análise molecular dos genes GAPDH, TUB2 e ITS permitiu identificar três espécies de *Colletotrichum* nas amostras coletadas, *C. siamense*, *C. karstii* e *C. fructicola*. Estas espécies estão distribuídas em dois complexos dentro do gênero, o complexo *C. gloeosporioides* (WEIR et al., 2012) e o complexo *C. boninense* (DAMM et al., 2012). A comparação das sequências dos isolados caracterizados neste estudo com as sequências depositadas no Genbank, permitiu a atribuição preliminar das espécies, bem como os complexos de espécies que as mesmas se enquadram conforme Tabela 4.

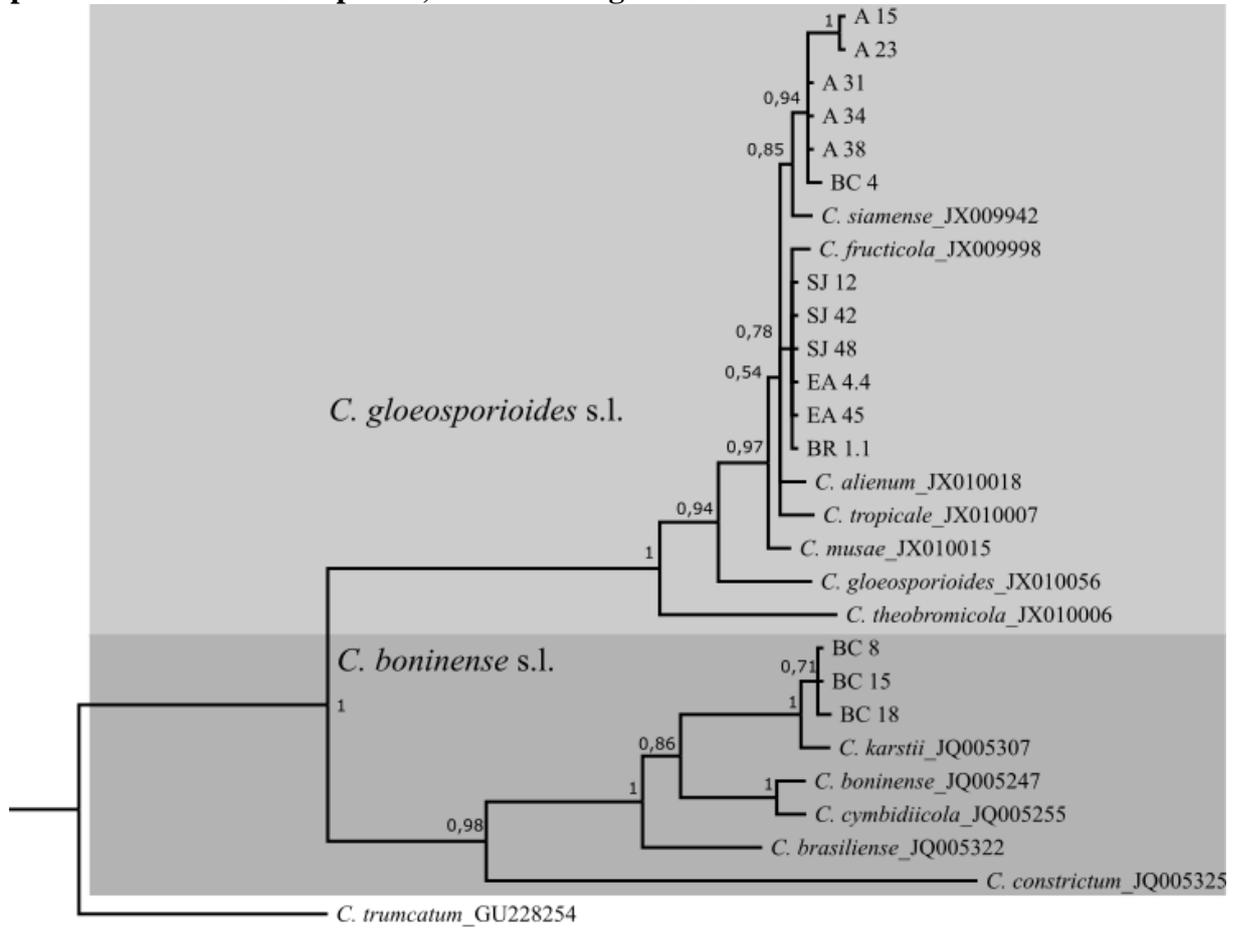
Tabela 4 - Relação entre espécies de *Colletotrichum* e locais de coleta de isolados obtidos a partir de palma forrageira

Localidade	Isolado	Espécie	Complexo de Espécies.
Arapiraca/AL	A15	<i>C. siamense</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
Arapiraca/AL	A23	<i>C. siamense</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
Arapiraca/AL	A31	<i>C. siamense</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
Arapiraca/AL	A34	<i>C. siamense</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
Arapiraca/AL	A38	<i>C. siamense</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
Atalaia/AL	BR1.1	<i>C. fructicola</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
Estrela de Alagoas/AL	EA4.4	<i>C. fructicola</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
Estrela de Alagoas/AL	EA45	<i>C. fructicola</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
Estrela de Alagoas/AL	EA5.1	<i>C. fructicola</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
São João/PE	SJ2	<i>C. fructicola</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
São João/PE	SJ12	<i>C. fructicola</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
São João/PE	SJ42	<i>C. fructicola</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
São João/PE	SJ48	<i>C. fructicola</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
Bom Conselho/PE	BC4	<i>C. siamense</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
Bom Conselho/PE	BC8	<i>C. karsti</i>	<i>C. boninense</i>
Bom Conselho/PE	BC15	<i>C. karsti</i>	<i>C. boninense</i>
Bom Conselho/PE	BC18	<i>C. karsti</i>	<i>C. boninense</i>

Fonte: Autor

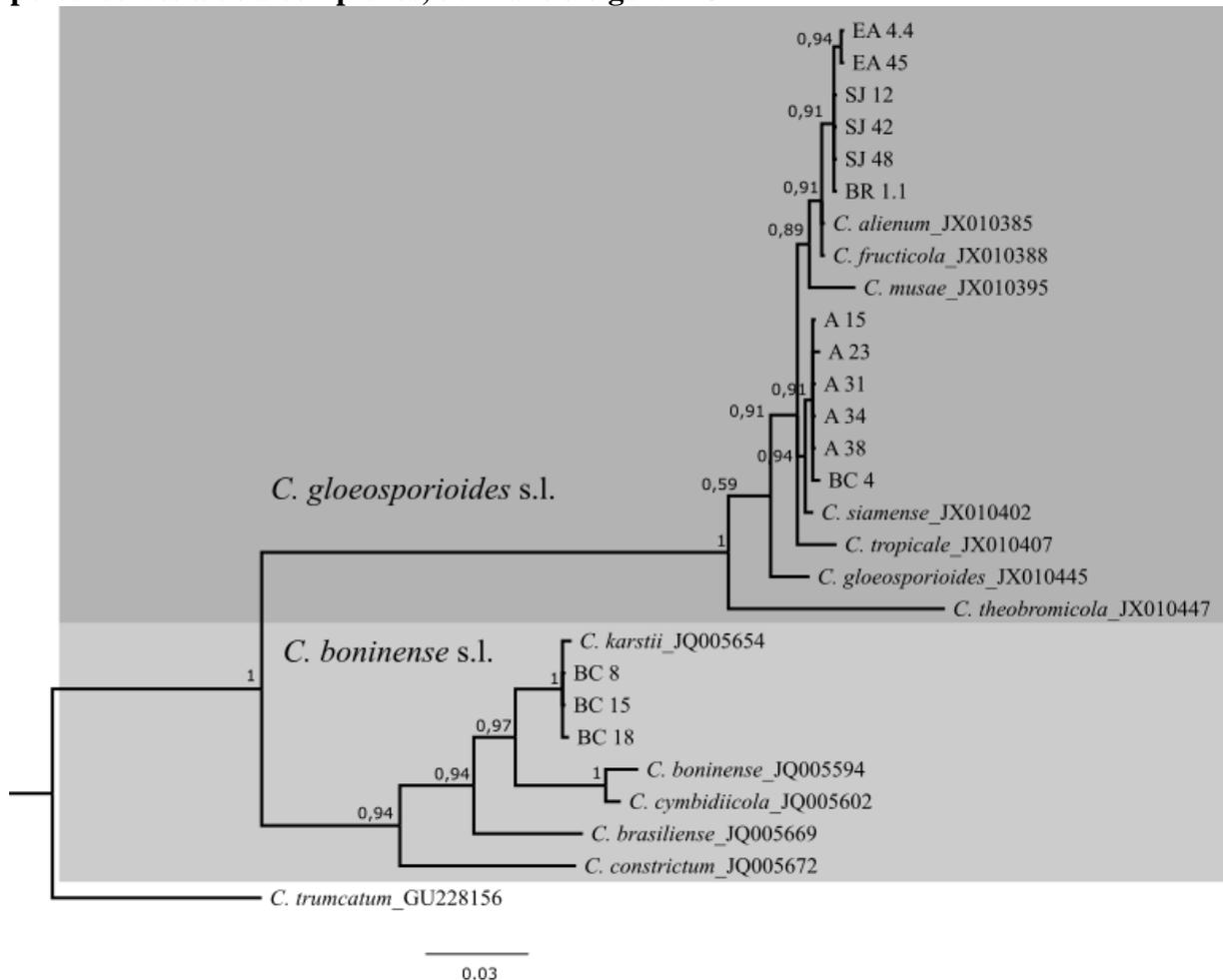
A análise filogenética confirmou a atribuição preliminar das espécies baseadas no Blastn. Independentemente das regiões genômicas consideradas (GAPDH ou TUB2), a filogenia resultou em árvores com a mesma topologia, com as amostras de *C. siamense* e *C. fructicola* no mesmo ramo filogenético por pertencerem ao mesmo complexo de espécies, *C. gloeosporioides*, enquanto as amostras de *C. karstii* agruparam em um ramo distinto, pertente ao complexo de espécies *C. boninense* (Figura 3; Figura 4).

Figura 3 - Árvore filogenética de Inferência Bayesiana com isolados de *Colletotrichum* pertencentes a dois complexos, utilizando o gene GAPDH



Fonte: Autor

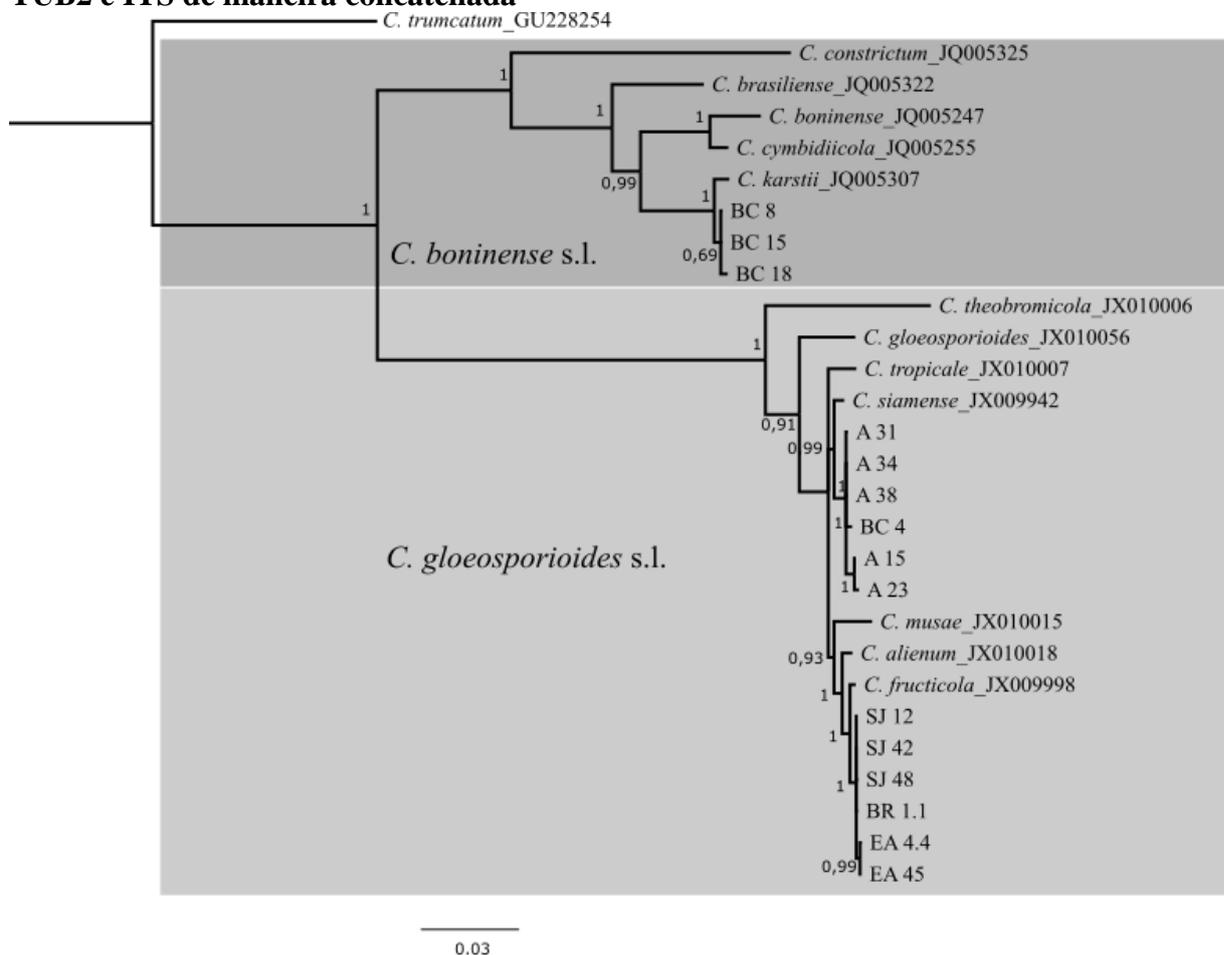
Figura 4 - Árvore filogenética de Inferência Bayesiana com isolados de *Colletotrichum* pertencentes a dois complexos, utilizando o gene TUB2



Fonte: Autor

A topologia da árvore filogenética também não foi influenciada quando os dados de GAPDH e TUB2 foram analisados de maneira concatenada (Figura 5), reforçando novamente a caracterização preliminar das amostras como sendo pertencentes às espécies de *C. siamense*, *C. fructicola* e *C. karstii*.

Figura 5 - Árvore filogenética de Inferência Bayesiana com isolados de *Colletotrichum* pertencentes a dois complexos, analisando os dados das regiões genômicas GAPDH, TUB2 e ITS de maneira concatenada



Fonte: Autor.

Takahashi et al. (2008), baseando-se em características morfo-culturais, relataram pela primeira vez no Brasil o fungo *C. gloeosporioides* como agente causador de antracnose em plantas de pitaya (*Hylocereus megalanthus*) uma cactácea de alto valor comercial pelos seus frutos, sendo este um dos primeiros relatos no país deste patógeno causando doenças em cactáceas.

No Brasil os relatos existentes de *Colletotrichum* causando doenças em palma são bastante escassos, sendo o primeiro relato de *C. gloeosporioides* em *N. cochenillifera* no país realizado por Rosa et al. (2008), a partir de caracterização morfo-cultural e do sequenciamento da região genômica ITS.

Entretanto, a caracterização de espécies de *Colletotrichum* utilizando o gene ITS para identificação das mesmas apresenta algumas limitações, e o conhecimento de genes mais informativos tornou-se cada vez mais necessário (SHARMA et al., 2013; WEIR et al., 2012).

Em países tradicionalmente produtores de palma forrageira e outras cactáceas, como o México e a Coreia, encontram-se relatos, baseando-se na caracterização morfológica do patógeno, *C. gloeosporioides* como um dos agentes causadores da mancha negra e da antracnose em suas lavouras (KIM et al., 2000a; KIM et al., 2000b; QUEZADA-SALINAS et al., 2006; MÉNDEZ-GALLEGOS et al., 2008). Em estudo realizado para identificar os fungos relacionados à mancha negra em palma forrageira e sua sensibilidade à quitozana FLORES - FLORES et al. (2013), identificaram *C. gloeosporioides* a partir do sequenciamento do gene ITS como sendo um dos agentes causadores dessa enfermidade na palma.

Sabe-se, contudo, que a caracterização de espécies do gênero *Colletotrichum* não deve ser realizada apenas pela morfologia de suas estruturas reprodutivas (McKAY et al., 2009; RATANACHERDCHAI et al., 2010; WEIR et al., 2012), tornando imprecisas as afirmações de que o agente causador de doenças em palma forrageira no Brasil seria *Colletotrichum gloeosporioides*.

3.3.3 Caracterização Morfológica e Cultural

Durante a caracterização cultural, os isolados estudados apresentaram dados para o índice de crescimento micelial (ICM) variando entre 6,52 e 10,25 mm/dia, não havendo diferença estatística entre os isolados em relação ao ICM. Em relação a topografia das colônias, todos os isolados apresentaram micélio aéreo (com crescimento de até 3mm de altura).

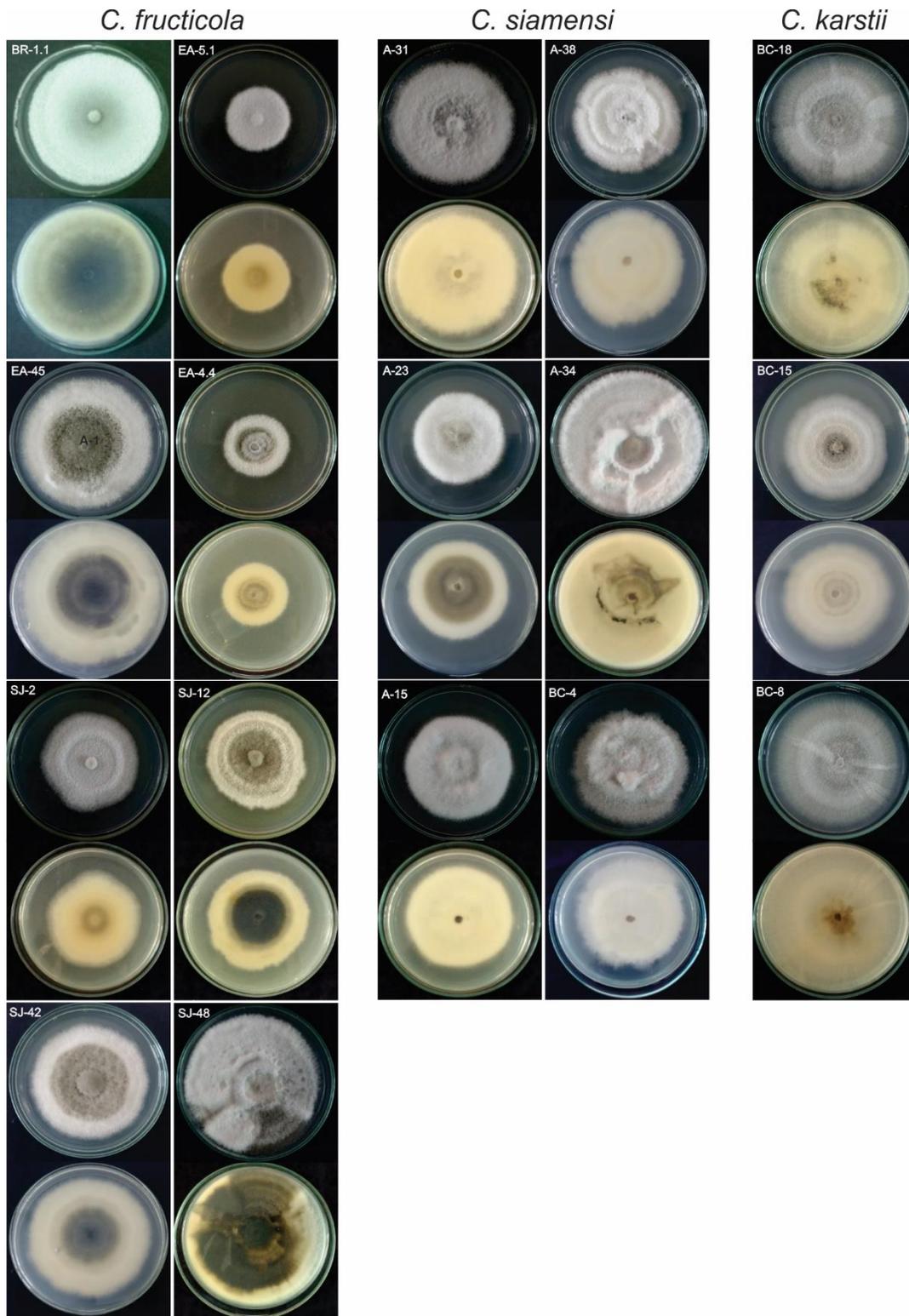
Tendo como base as características culturais das colônias em meio BDA sintético, os isolados avaliados apresentaram-se distintos em relação à coloração das colônias, permitindo que os isolados fossem agrupados em três grupos distintos (Tabela 5). O grupo I, representado pelos isolados: BR1.1, EA4.4, EA45, EA5.1, SJ2, SJ12, SJ42 e SJ48 da espécie *C. fructicola*. O grupo II foi representado pela espécie *C. siamense* e pelos isolados: A15, A23, A31, A34, A38 e BC4. O grupo III, corresponde à espécie *C. karstii* e aos isolados: BC8, BC15 e BC18 (Figura 6).

Tabela 5 - Características morfológicas de isolados de *Colletotrichum* obtidos a partir de lesões em cladódios de palma forrageira

Espécie	Isolado	Caracterização Cultural		ICM
		Verso	Reverso	
<i>C. fruticola</i>	BR 1.1	Branco aveludado, com centro acinzentado.	Centro esverdeado, com borda esbranquiçada.	9,36
	EA 5.1	Centro esbranquiçado, com bordas marrom escuro.	Centro amarelado, com borda bege.	5,09
	EA 45	Centro esverdeado, com bordas brancas.	Centro acinzentado, com halo escuro em volta e bordas esbranquiçadas.	8,13
	EA 4.4	Centro branco-acinzentado, com halo esverdeado e borda verde-musgo.	Centro bege escuro, com halo bege claro e bordas amareladas.	6,52
	SJ 2	Centro cinza claro, com halo branco acinzentado e bordas verde musgo com halo branco.	Centro bege escuro, com halo bege claro e bordas amareladas.	7,27
	SJ 12	Centro cinza esverdeado, com halo acinzentado e borda bege claro.	Centro preto com halo acinzentado, borda amarelada com halo bege.	7,41
	SJ 42	Centro cinza esverdeado, com borda esbranquiçada.	Centro acinzentado, com halo marrom claro e borda branca-amarelada.	8,72
	SJ 48	Branco aveludado.	Marrom esverdeado com borda bege.	9,29
<i>C. siamense</i>	A 31	Branco aveludado.	Bege.	10,25
	A 38	Branco aveludado.	Centro bege, com borda branca.	8,07
	A 23	Branco aveludado com centro marro claro.	Centro marrom, com borda bege claro.	7,95
	A 34	Branco aveludado, com centro acinzentado.	Centro esverdeado, com borda bege.	8,98
	A 15	Branco aveludado.	Bege.	8,80
	BC 4	Branco acinzentado.	Branco.	9,29
	BC 18	Cinza claro.	Centro esverdeado, com borda bege.	9,18
<i>C. karstii</i>	BC 15	Centro cinza médio, com borda branca.	Centro marrom claro, com borda bege claro.	7,77
	BC 8	Cinza claro.	Centro esverdeado, com borda bege.	8,50

Fonte: Autor.

Figura 6 - Aspecto dos três grupos de isolados de *Colletotrichum* em meio BDA sintético, observados ao 7º dia. Imagem superior verso e Imagem inferior reverso



Fonte: Feijó, F. M.

As características culturais das espécies de *Colletotrichum* observadas neste trabalho estão de acordo com o que foi apresentado por Prihastuti et al. (2009), ao descrevem as

colônias de *C. fructicola* em meio BDA como sendo inicialmente brancas e tornando-se cinza escuro no centro com a idade e com reverso verde acinzentado com halo branco, apresentando micélio aéreo cinza claro, denso e cotonoso, com massa de conídios visível.

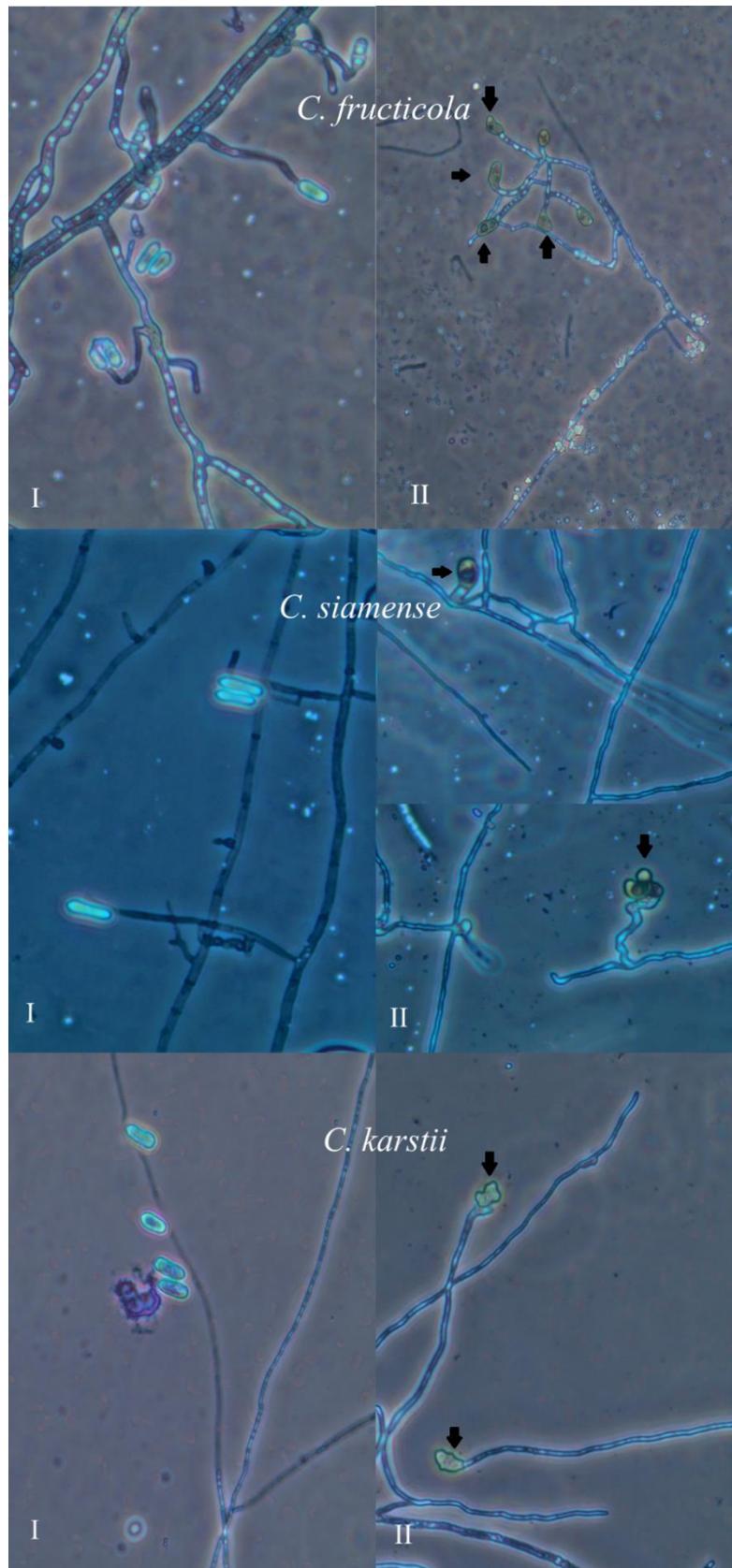
Prihastuti et al. (2009) também descrevem colônias de *C. siamense* em BDA como sendo de coloração inicialmente branca passando a marrom ou rosa claros, com reverso entre amarelo e rosa claros, micélio aéreo verde claro para branco, denso e cotonoso e massa de conídios visível no ponto de deposição do disco contendo estruturas do patógeno.

Damm et al. (2012), descrevem as colônias de *C. karstii* em meio BDA com coloração variando de cinza claro a branca, com micélio aéreo no centro e disperso em tufo, o reverso das colônias sendo laranja claro, com os conídios em massas alaranjadas. As diferenças observadas entre a caracterização cultural dos isolados deste trabalho e ao que foi relatado na literatura estão associadas a idade das colônias e a condições específicas de crescimento destas, fatores que não influenciam diretamente na identificação das espécies.

Quando analisados em microscópio óptico os isolados de *C. frutícola* apresentaram conídios com coloração hialina, formato reto, cilíndrico tendo uma das extremidades arredonda e outra afilada ou ligeiramente pontiaguda. Apressórios com coloração castanho claro a médio, subglobosos, ovóides ou elipsoidais. Já os isolados de *C. siamense* apresentaram conídios com coloração hialina, formato reto, cilíndrico, com ligeira constrição no centro, tendo as duas extremidades arredondas. Apressórios de coloração castanho médio a escuro, subglobosos ou com formato irregular. Os isolados de *C. karstii* apresentaram conídios com coloração hialina, formato reto, cilíndrico com as extremidades arredondas. Apressórios de coloração castanho claro a médio, formato irregular ou elipsoidal (Figura 7).

A tabela 6 apresenta a variação no comprimento, na largura e na relação entre comprimento e largura de conídios e apressórios dos isolados obtidos neste trabalho e os seus respectivos valores médios, não havendo diferença estatística entre os valores de comprimento, largura e relação comprimento largura tanto para conídios quanto para apressórios dos isolados em cada uma das espécies de *Colletotrichum* identificadas.

Figura 7 - Características morfológicas de conídios (I) e apressórios (II) de *C. fruticola*, *C. siamense* e *C. karstii* cultivados em meio BDA. As imagens foram obtidas com lentes de 40x de aumento e escala de 20µm



Fonte: Autor

Tabela 6 - Variação e média de comprimento, largura e relação comprimento largura de conídios e apressórios de isolados de *Colletotrichum*

Espécie	Isolado	Conídio			Apressório		
		Comp.	Larg.	Com./Larg.	Comp.	Larg.	Com./Larg.
<i>C. fructicola</i>	SJ2	3,38-6,68	1,13-2,15	2,01-4,44	2,09-5,90	2,08-5,22	0,51-2,28
		4,87	1,64	3,02	3,75	2,93	1,32
	SJ12	3,39-6,40	0,93-2,40	1,74-4,28	3,06-7,64	2,00-4,51	0,82-2,53
		4,8	1,79	2,78	5,13	3,1	1,7
	SJ42	4,08-7,26	1,54-2,97	1,85-3,72	4,58-6,26	2,56-4,98	0,97-2,44
		5,81	2,29	2,59	5,28	3,43	1,63
	SJ48	4,18-7,01	1,40-2,54	1,99-4,45	4,05-9,52	2,33-5,15	0,94-2,51
		5,66	1,94	2,97	5,59	3,51	1,63
	EA4.4	4,17-6,85	1,29-2,78	2,00-4,80	3,65-7,50	2,48-4,50	0,91-2,79
		5,62	1,94	2,98	5,41	3,55	1,56
	EA45	4,64-7,33	1,36-2,74	1,93-4,10	3,70-7,80	2,66-4,47	1,01-2,23
		5,67	2,1	2,75	5,1	3,39	1,52
	EA5.1	3,95-6,77	1,53-2,74	1,93-4,24	3,85-7,14	2,33-4,30	1,06-2,34
		5,43	1,97	2,8	5,28	3,4	1,58
BR1.1	3,85-9,06	1,69-3,67	1,14-3,37	3,85-9,06	1,69-3,67	1,14-3,83	
	5,76	2,75	2,15	5,7	2,67	2,22	
<i>C. siamense</i>	A15	3,68-9,37	1,12-2,72	1,35-4,43	1,84-5,23	1,25-3,20	0,81-2,38
		5,48	1,93	2,87	3,52	2,43	1,49
	A23	2,23-6,17	0,96-2,09	1,07-5,02	1,58-5,64	1,17-2,95	0,72-2,41
		4,44	1,59	2,93	3,8	2,08	1,45
	A31	3,26-6,75	1,25-2,31	1,62-4,66	1,63-5,54	1,37-3,30	0,76-2,46
		4,79	1,75	2,82	3,71	2,56	1,47
	A34	3,34-7,49	1,25-2,84	1,78-4,67	1,74-5,83	1,51-3,42	0,78-2,51
		5,27	1,92	2,82	3,47	2,61	1,52
	A38	3,55-6,11	0,93-2,83	1,85-4,39	1,95-4,80	1,58-2,86	0,87-2,31
		4,98	1,94	2,63	3,18	2,17	1,48
	BC4	4,65-7,16	1,40-2,93	2,24-4,50	2,96-7,47	2,72-4,21	1,08-2,67
		5,99	2,05	2,97	5,17	3,26	1,61
	BC8	4,35-7,22	1,95-3,24	1,65-3,43	4,35-7,22	1,95-3,24	1,65-3,43
		5,98	2,52	2,41	5,98	2,52	2,41
<i>C. karstii</i>	BC15	5,66-9,41	2,44-4,49	1,49-2,88	3,20-7,76	2,31-5,32	0,87-2,20
		7,23	3,46	2,12	4,89	3,55	1,41
BC18	2,53-9,16	1,76-6,15	0,90-3,55	2,24-6,24	1,44-5,26	0,43-3,13	
	5,87	2,62	2,31	3,71	2,35	1,68	

Fonte: Autor

Quando caracterizados por Prihastuti et al. (2009), os conídios e apressórios de *C. siamense* e *C. fructicola* apresentaram comprimento e largura médios superiores aos

observados neste trabalho e com características de formato e coloração similares. Damm et al. (2012), ao caracterizar os conídios e apressórios de *C. karstii* observaram as estruturas com comprimento e largura superiores aos observados neste trabalho, mas com relação entre comprimento e largura semelhantes às descritas para os isolados de *C. karstii* de palma forrageira.

A variabilidade entre as características culturais nas espécies de *Colletotrichum* é bastante relatada na literatura (COUTO; MENEZES, 2004; MENEZES, 2006; WEIR et al., 2012), podendo estar relacionada às condições de cultivo, luminosidade, temperatura, umidade, idade das colônias e hospedeiro de origem. Tal variabilidade impede que características culturais e morfológicas sejam utilizadas como ferramentas exclusivas para a identificação de espécies de *Colletotrichum*, sendo necessária a associação com ferramentas da biologia molecular para auxiliar na identificação de espécies deste gênero fúngico.

Até o momento não existem relatos de *C. fructicola*, *C. siamense* e *C. boninense* causando doenças em palma forrageira no Brasil. Bragança et al. (2015) utilizando análises multilocus identificaram *C. fructicola* causando lesões necróticas em folhas de mandioca cultivada em lavouras no interior da Bahia. Capobiango et al. (2015), realizando estudos no interior de Minas Gerais isolou e caracterizou *C. siamense* a partir de frutos de morango que apresentavam lesões necróticas e deprimidas típicas de patógenos do gênero *Colletotrichum*. Lima et al. (2013) identificou *C. karstii* causando sintomas de antracnose durante a pós colheita de mangas cv. Tommy Atkins cultivadas na região do Vale do São Francisco, interior de Pernambuco. Os relatos destas espécies de *Colletotrichum* causando danos econômicos em diversas culturas de importância agrícola corrobora a existência de diversas espécies deste patógeno no Brasil.

Os municípios de Arapiraca, Atalaia, Bom Conselho, Estrela de Alagoas e São João, onde foram obtidos os isolados de *Colletotrichum* em palma forrageira utilizados neste estudo produzem fruteiras e culturas agrícolas (IBGE, 2014), que são relatadas como hospedeiras das espécies de *Colletotrichum* identificadas neste trabalho. Tal fato sugere que o patógeno possa estar migrando de outros hospedeiros para a palma forrageira, uma vez que a área plantada desta cultura vem crescendo de forma constante nos últimos anos.

A ocorrência de apenas uma espécie de *Colletotrichum* em cada um dos locais de coleta, *C. siamense* em Arapiraca, *C. karstii* em Bom Conselho e *C. fructicola* em Atalaia, São João e Estrela de Alagoas, com exceção de apenas um isolado de *C. siamense* em Bom Conselho, indica isolamento geográfico entre as espécies deste patógeno.

Tal isolamento pode ser resultante de características edafoclimáticas e de relevo nas regiões de coleta impedindo a livre circulação dos patógenos entre as localidades. Chiorato et al. (2006) analisaram a co-evolução entre patótipos de *C. lindemuthianum* oriundos de regiões geográficas distintas e espécies de feijoeiro, constatando que a origem geográfica dos isolados alterou as condições de crescimento e de patogenicidade do fungo quando inoculado em vagens de feijoeiro.

O primeiro relato de três espécies distintas de *Colletotrichum* causando doenças em palma forrageira no Brasil, evidência a falta de especificidade entre as espécies deste gênero e os seus hospedeiros, a variabilidade nas características de crescimento e patogenicidade do fungo, tornando necessários estudos epidemiológicos comparativos entre as espécies de *Colletotrichum* na palma forrageira.

3.4 Conclusões

- Este é o primeiro relato das espécies *C. siamense*, *C. fructicola* e *C. karstii* causando doença em palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*) no Brasil.

REFERENCIAS

- von ARX, J. A. Die arten der gattung *Colletotrichum* Cda. **Phytopathology**, v. 29, p. 413 - 468, 1957.
- BRAGANÇA, C. A. D. et al. First Report of Mango Anthracnose Caused by *Colletotrichum karstii* in Brazil. *Plant Disease*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-15-0645-PDN>. 2015.
- CANNON, P. F. et al. The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mycotaxonomy**, v. 104, p. 189-204, 2008.
- CAPOBIANGO, N. P. et al. Anthracnose on Strawberry Fruits Caused by *Colletotrichum siamense* in Brazil. **Plant Disease**. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-15-1121-PDN>. 2015.
- CHIORATO, A. F. et al. Co-evolução entre raças de *Colletotrichum lindemuthianum* e feijoeiro. **Bragantia**, v. 65, n. 3, p. 381 - 388, 2006.
- COUTO, E.F., MENEZES, M. Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.4, p.406-412, Jul./Ago., 2004.
- DAMM, U. et al. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p.1-36, 2012.
- DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry**, v.19, p.11-15, 1987.
- EDGAR, R.C. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatic**, v.5, p.1-19, 2004.
- FLORES - FLORES, R. F. et al. Identification of Fungal Species Associated with Cladode Spot of Prickly Pear and Their Sensitivity to Chitosan. **Journal of Phytopathology**, v. 161, p. 544–552, 2013.
- GLASS, N.L.; DONALDSON, G. Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p.1323-1330, 1995.
- GRANATA G. Doenças bióticas e abióticas. In: BARBERA et al. **Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira**. FAO / SEBRAE – PB, p. 112 – 122, 2001.
- GUERBER, J.C. et al. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. **Mycologia**, v. 95, p. 872-895, 2003.
- IBGE. **IBGE Cidades: Produção Agrícola Municipal 2014**. Disponível em: < <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/home.php> >. Acesso em: 9 de Fevereiro de 2016, 2014.

KELLY, J.; OLSEN, M. W. Problems and pests of agave, aloe, cactus and yucca. **Arizona Cooperative Extension**. The University of Arizona: College of Agriculture and Life Sciences, 9p. 2011.

KIM, Y. H. et al. Occurrence of *Colletotrichum* stem rot caused by *Glomerella cingulata* on graft-cactus in Korea. **Plant Pathology Journal**, v. 16, n. 4, p. 242 - 245, 2000a.

KIM, W. G. et al. Occurrence of anthracnose on indian fig cactus caused by *Glomerella cingulata* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Pathology Journal**, v. 16, n. 5, p. 294 – 296, 2000b.

LIMA, I. M. M.; GAMA, N. S. Registro de plantas hospedeiras (cactaceae) e de nova forma de disseminação de *Diaspis echinocacti* (Bouché) (Hemíptera: Diaspididae), cochonilha da palma forrageira, nos estados de Pernambuco e Alagoas. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 3, p. 479 – 481, 2001.

LIMA, N. B. et al. First Report of Mango Anthracnose Caused by *Colletotrichum karstii* in Brazil. **Plant Disease**, v. 97, n. 9, p. 1248, 2013.

McKAY, S. F. et al. Morphological, genetic, and pathogenic characterization of *Colletotrichum acutatum*, the cause of anthracnose of almond in Australia. **Phytopathology**, v. 99, p. 985-995. 2009.

MÉNDEZ-GALLEGOS, S.J.; et al. Identificación y control de las principales enfermedades del nopal. **Revista Salud Pública y Nutrición**, v. 2, p. 2 – 13, 2008.

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

MILLER, M. A. et al. The CIPRES Portals. CIPRES. Website. Disponível em: <http://www.phylo.org/sub_sections/portal>. Acesso em: 6 jun. 2015.

MILLS, P. R. et al. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 98, p.137-143, 1992.

O'DONNELL K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNAITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 7, p. 103-116, 1997.

PESSOA, A. S. **Cultura da palma forrageira**. Recife, 1967. SUDENE. Divisão de documentação, p. 98, 1967. (SUDENE. Agricultura, 5).

PHOULIVONG, S. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity**, v. 44, n.1, p. 33-43, 2010.

POSADA, D.; BUCKLEY, T.R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic Biology**, v. 53, n. 5, p.793-808, 2004.

- PRIHASTUTI, H. et al. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 89 – 109, 2009.
- QUEZADA-SALINAS, A. et al. Etiología de la mancha negra del nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill) en Tlalnepantla, Morelos, México. **Agrociencia**, v. 40, p. 641 – 653, 2006.
- RANNALA, B.; YANG, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. **Journal of Molecular Evolution**. v.43, p.304-311, 1996.
- RATANACHERDCHAI, K. et al. ISSR for comparison of cross-inoculation potential of *Colletotrichum capsici* causing chilli anthracnose. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n.1, p. 076-083. 2010.
- RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. **Systematic Biology Advance Access**, 2012.
- ROSA, R. C. T. et al. Assinalamento de *Colletotrichum gloeosporioides* em palma forrageira cultivar doce (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck). In: XLI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2008, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2008 (CD-ROM).
- SHARMA, G. et al. ITS-based diversity of *Colletotrichum* from India. **Current Research in Environmental & Applied Mycology** v. 3, n. 2, p. 194–220. Outubro, 2013.
- SOUZA, A. E. F. et al. Ocorrência e identificação dos agentes etiológicos de doenças em palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill.) no semiárido paraibano. **Revista Biotemas**, v. 23, n. 3, p. 11 – 20, 2010.
- SUTTON, B.C. Fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata. **The Coelomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 696p, 1980.
- SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A. and JEGER, M. J. (eds) *Colletotrichum: Biology, Pathology, and Control*, Wallingford: CAB International, p. 1 – 26, 1992.
- TAKAHASHI, L. M. et al. First report of *Colletotrichum gloeosporioides* on *Hylocereus megalanthus* in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 3, p. 96 – 97. 2008.
- 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.
- WEIR, B. S. et al. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 115–180, 2012.
- WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: INNIS, M. A. et al. (eds). **A guide to methods and applications**. Academic Press, p. 315-322, 1990.

4 RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE *Nopalea cochenillifera* E EFEITO DA TEMPERATURA E UMIDADE SOBRE A MANCHA MARROM.

RESUMO

A palma vem sendo utilizada no Brasil desde o início do século XX na alimentação animal. Mesmo apresentando grande rusticidade e adaptação às condições climáticas da região semiárida, a cultura da palma forrageira está sujeita ao ataque de diversos patógenos que causam grandes prejuízos para a sua produção. Dentre os agentes causais de doenças em palma, os fungos do gênero *Colletotrichum* são responsáveis por danos econômicos consideráveis a cultura. Outra característica importante deste gênero fúngico é sua adaptabilidade, o que lhe permite crescer nas mais variadas condições climáticas e nos mais variados hospedeiros. Objetivou-se com este trabalho determinar a influência da temperatura e da umidade na severidade da mancha marrom em genótipos de palma forrageira. Cladódios apresentando sintomas de manchas marrons em sua superfície, foram coletados em áreas produtoras nos estados de Alagoas e Pernambuco. No laboratório foi realizado o isolamento dos fitopatógenos e obtenção da cultura monospórica de cada um dos isolados. Cladódios de palma miúda foram inoculados com isolados de *C. siamense*, *C. fructicola* e *C. karstii* e acondicionadas nas temperaturas de 22, 26, 30 e 34 °C com o intuito de determinar qual temperatura favorece o crescimento do patógeno, posteriormente os cladódios foram inoculados com as mesmas espécies de *Colletotrichum* e acondicionadas em câmara úmida durante 12, 24, 36, 48 e 60 horas buscando determinar qual período de umidade favorece o patógeno. Essas mesmas espécies fúngicas também foram utilizadas na caracterização da resistência dos seguintes genótipos de palma: Palma Alagoas, Miúda, Orelha de onça, Palma melancia, Tamazunchale, Clones 06, 07, 13, 21 e F-21. A partir das atividades realizadas a temperatura de 22 °C favoreceu o desenvolvimento das lesões nos cladódios, independente da espécie de *Colletotrichum* considerada. O período de permanência em câmara úmida superior a 36 horas favoreceu o desenvolvimento das lesões nos cladódios quando inoculados com isolados de *Colletotrichum* spp. *Colletotrichum siamense* apresentou maior agressividade em genótipos de palma forrageira quando comparado com *C. karstii* e *C. fructicola*. Os genótipos: Miúda, Clones 07, 13 e 21 apresentaram menor diâmetro de lesões quando inoculados com isolados de *Colletotrichum* spp.

Palavras-Chave: Palma forrageira. Agressividade do patógeno. *Colletotrichum*.

RESISTANCE OF GENOTYPES OF *Nopalea cochenillifera* AND EFFECT OF TEMPERATURE AND HUMIDITY ON THE BROWN STAIN.**ABSTRACT**

The palm has been used in Brazil since the early XX century in animal feed. Even with great hardiness and adaptation to climatic conditions of the semiarid region, the culture of cactus is subject to attack by many pathogens that cause great harm to their production. Among the causative agents of diseases in cactus, fungi of the genus *Colletotrichum* are responsible for considerable economic damage to culture. Another important feature of this fungal genus is its adaptability, which allows you to grow in various weather conditions and in various hosts. The objective of this study was to determine the influence of temperature and humidity on the severity of brown spot of forage palm genotypes. Cladodes with symptoms of brown spots on its surface, were collected in producing areas in the states of Alagoas and Pernambuco. In the laboratory it was carried out the isolation of pathogens and achieving monospórica culture each isolate, cactus cladodes were inoculated with isolates of *C. siamense*, *C. fructicola* and *C. karstii* and conditioned at temperatures of 22, 26, 30 and 34 ° C in order to determine which temperature favors the growth of pathogens, subsequently the cladodes They were inoculated with the same species of *Colletotrichum* and placed in a moist chamber for 12, 24, 36, 48 and 60 hours trying to determine which moisture period favors the pathogen. These same fungal species were also used to characterize the resistance of the following palm genotypes: Palma Alagoas, Miúda, Orelha de Onça, Palma Melancia, Tamazunchale, Clones 06, 07, 13, 21 and F-21. From the activities carried out at 22 ° C favored the development of lesions in the cladodes, regardless of the species of *Colletotrichum* considered. The length of stay in a humid chamber more than 36 hours favored the development of lesions in the cladodes when inoculated with isolates *Colletotricum* spp. *Colletotrichum siamense* showed greater aggression in forage cactus genotypes compared with *C. karstii* and *C. fructicola*. Genotypes: Miúda, Clones 07, 13 and 21 showed smaller diameter lesions when inoculated with *Colletotrichum* spp.

Keywords: Cactus. Aggressiveness of the pathogen. *Colletotrichum*.

4.1 Introdução

A família das cactáceas é composta por aproximadamente 178 gêneros e mais de 2000 espécies, dentre estes os gêneros *Opuntia* e *Nopalea* dispõem de diversas espécies com potencial forrageiro. No Brasil as espécies *Opuntia ficus-indica* Mill e *Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck mais conhecidas como palma gigante e palma miúda, respectivamente, são utilizadas como forrageiras na alimentação de rebanhos na agropecuária nordestina (SANTOS et al., 1990; TAYLOR et al., 2002).

Na agropecuária brasileira são exploradas, predominantemente, três variedades de palma forrageira, Gigante e Redonda (*O. ficus-indica*) e palma Miúda (*N. cochenillifera*), pelas suas características agronômicas de produtividade, palatabilidade, rusticidade e digestibilidade. No entanto, o Brasil possui um banco ativo de germoplasma de palma forrageira composto por cerca de 1.400 acessos de diferentes materiais, sendo 200 destes introduzidos de vários locais como o México, EUA, África do Sul, Argélia, Chile entre outros, sob a administração do Instituto de Pesquisa Agropecuária de Pernambuco (IPA), que realiza parcerias com instituições de pesquisa e universidades no desenvolvimento de novas cultivares e variedades (SANTOS et al., 2006).

Atualmente no Brasil, são escassos os trabalhos envolvendo o desenvolvimento de novas cultivares de palma forrageira, sendo que os trabalhos existentes são voltados ao desenvolvimento de cultivares que mantenham o seu potencial produtivo e que sejam resistentes à principal praga da cultura, a cochonilha do carmim. Contudo, trabalhos voltados à resistência de doenças também são necessários, em vista da grande quantidade de fitopatógenos que causam danos a cultura. Um fator importante no desenvolvimento dos fitopatógenos é a sua interação com as condições edafoclimáticas do local (VASCONCELOS et al., 2009; LOPES et al. 2010; CAVALCANTE et al., 2014; SILVA et al., 2014).

Os fungos fitopatogênicos desenvolvem-se nos mais diversos ambientes, com grande variedade de temperatura e umidade. O gênero *Colletotrichum* apresenta-se em grande variedade de ambientes, podendo se desenvolver em temperaturas variando entre 15 – 30 °C e em locais com umidade variando entre 40 – 80%. Esta variedade de ambiente permite que os fungos desse gênero criem estratégias específicas para colonizar e se desenvolver nos hospedeiros (PANDEY et al., 1997; SOARES, et al. 2008).

A região semiárida brasileira apresenta temperaturas que variam de 15 – 40 °C a depender da época do ano, com umidade relativa podendo passar dos 80%. Tal variabilidade climática pode restringir o desenvolvimento de diversos seres vivos, incluindo várias espécies

fúngicas. Contudo algumas espécies se adaptaram podendo sobreviver em condições adversas causando danos na produção de diversas culturas agrícolas, incluindo a palma forrageira.

Objetivou-se com esse trabalho determinar a influência da temperatura e da umidade na severidade da mancha marrom em genótipos de palma forrageira.

4.2 Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA/UFAL), localizado no município de Rio Largo.

4.2.1 Obtenção dos genótipos de palma da variedade miúda e isolados utilizados

Os cladódios de palma-forrageira do gênero *Nopalea* (*N. cochenillifera*) utilizados neste estudo foram provenientes do banco de germoplasma da Secretaria de Agricultura do Estado de Alagoas situado no município de Santana do Ipanema – Alagoas. Foram avaliados dez genótipos: Palma Alagoas, Miúda, Orelha de Onça, Palma Melancia, Tamazunchale, Clones 06, 07, 13, 21 e F-21.

Durante os experimentos de temperatura, umidade e comportamento dos genótipos de palma, foi escolhido aleatoriamente um isolado de cada espécie de *Colletotrichum* identificada anteriormente: *C. siamense* (A38), *C. karstii* (BC15), e *C. fruticola* (EA45).

4.2.2 Efeito da temperatura e de períodos de permanência em câmara úmida na severidade de manchas de cladódios

Para inoculação dos cladódios de palma miúda, os mesmos foram feridos com agulha previamente flambada, onde foram inoculados discos de meio de cultura contendo estruturas do patógeno e com 5mm de diâmetro. Na testemunha foram utilizados discos de BDA puro (FLORES - FLORES et al. 2013). Em seguida cada cladódio foi acondicionado separadamente em sacos plásticos contendo um chumaço de algodão umedecido com AD. Após 48h os cladódios foram retirados dos sacos plásticos e novamente acondicionados em BOD (Biochemistry Oxygen Demand). Posteriormente, os cladódios foram mantidos em incubadoras BOD ajustadas para as temperaturas de 22, 26, 30 e 34°C. O experimento foi mantido em incubadora BOD com fotoperíodo de 12 horas por até 10 dias.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial (4 x 3), representado por quatro temperaturas, três espécies de *Colletotrichum* e quatro repetições, sendo a unidade experimental constituída por um cladódio com quatro pontos de inoculação sendo um a testemunha. Dez dias após a inoculação o diâmetro das lesões foi determinado medindo-se cada lesão em dois sentidos perpendiculares com o auxílio de um paquímetro digital, obtendo-se assim a severidade das manchas.

Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância e os dados utilizados na realização de análises de regressão linear entre a variável temperatura e o

diâmetro médio das lesões. As severidades das lesões ocasionadas pelos diferentes isolados (diâmetro das lesões) foi comparada pelo teste de Scott - Knott a de 5% de probabilidade utilizando o software ASSISTAT 7.7 beta.

O experimento que determinou o efeito de períodos de permanência em câmara úmida também foi conduzido em incubadoras B.O.D. na temperatura que causou maior severidade para cada espécie de *Colletotrichum* testada. Os períodos de câmara úmida, foram montados de acordo com a metodologia do teste de temperatura, onde, cada cladódio foi acondicionado separadamente em sacos plásticos contendo um chumaço de algodão umedecido com AD que foram retirados a cada 12 horas constituindo assim cinco períodos de permanência em câmara úmida a serem avaliados: 12, 24, 36, 48 e 60 horas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial (5 x 3), representado por cinco períodos de permanência em câmara úmida, três espécies de *Colletotrichum* e quatro repetições, sendo a unidade experimental constituída por um cladódio com quatro pontos de inoculação sendo um a testemunha. Dez dias após a inoculação o diâmetro das lesões foi determinado medindo-se cada lesão em dois sentidos perpendiculares com o auxílio de um paquímetro digital, obtendo-se assim a severidade das manchas.

Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância e os dados utilizados na realização de análises de regressão quadrática entre a variável período de permanência em câmara úmida e o diâmetro médio das lesões. O diâmetro das lesões ocasionadas pelos diferentes isolados de *Colletotrichum* foi comparada pelo teste de Scott - Knott a 5% de probabilidade, utilizando o software ASSISTAT 7.7 beta.

4.2.3 Comportamento de genótipos de palma em relação a manchas de cladódios

Cladódios dos dez genótipos de *Nopalea* foram inoculados com discos de meio de cultura contendo estruturas do patógeno com 5mm de diâmetro, na testemunha foram utilizados discos de BDA (FLORES - FLORES et al., 2013). Posteriormente, cada cladódio foi acondicionado separadamente em sacos plásticos contendo um chumaço de algodão umedecido com AD. Após 48h os cladódios foram retirados dos sacos plásticos e novamente acondicionados em BOD. Após a inoculação os cladódios foram acondicionados em incubadoras do tipo B.O.D. à temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (10 x 3), representado por dez genótipos, três espécies de *Colletotrichum* e quatro repetições, sendo a unidade experimental constituída por um cladódio com quatro pontos de

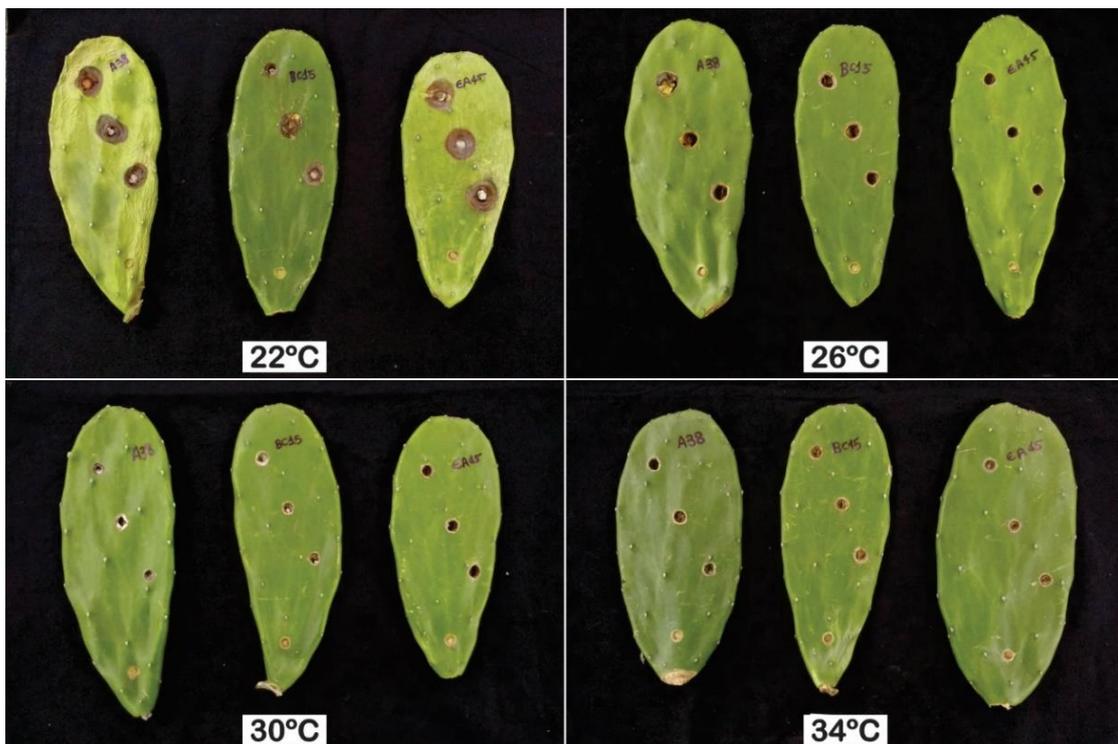
inoculação sendo um a testemunha. Dez dias após a inoculação os diâmetros das lesões foram determinados em dois sentidos perpendiculares com o auxílio de um paquímetro digital, obtendo-se assim a severidade das lesões. As médias de severidade das lesões foram submetidas à análise de variância e os valores obtidos comparados pelo teste de Scott - Knott ao nível de 5% de probabilidade utilizando o software ASSISTAT 7.7 beta.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Efeito da temperatura e do período de permanência em câmara úmida na severidade de manchas de cladódios.

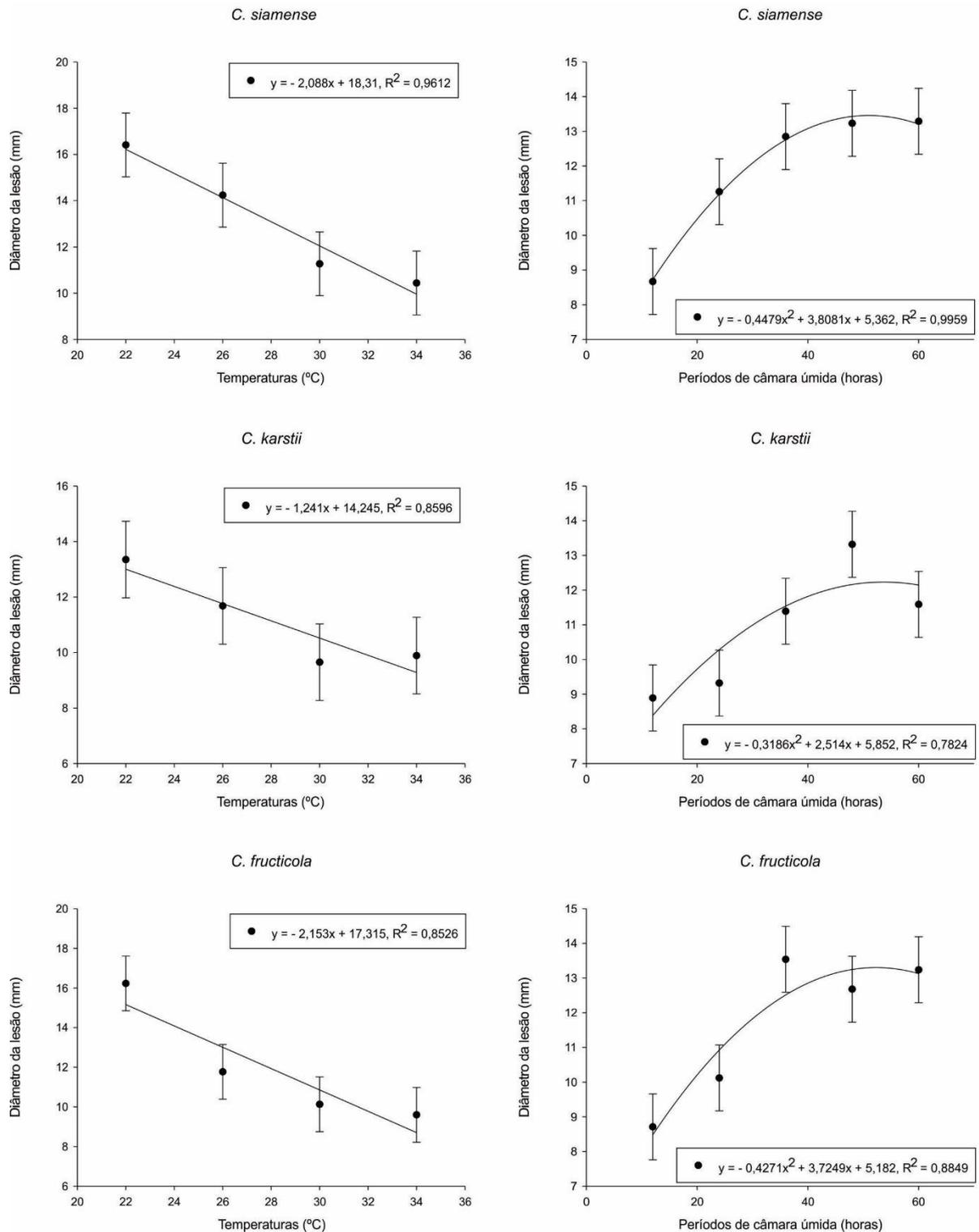
Passado o período de incubação, todos os cladódios utilizados no experimento apresentaram lesões características de mancha marrom, com tamanho da lesão variando de acordo com a temperatura de incubação e com o isolado utilizado (Figura 8).

Figura 8 - Manchas em cladódios causadas por *C. siamense*, *C. karstii* e *C. fructicola*, após 10 dias de incubação a 22, 26, 30 e 34 °C, em palma Miúda



Fonte: Feijó, F. M.

Figura 9 - Diâmetro de lesões causadas por *C. siamense*, *C. karstii* e *C. fructicola* em diferentes temperaturas e períodos de permanência em câmara úmida, em palma Miúda



Fonte: Feijó, F. M.

Passados 10 dias da inoculação observou-se que a temperatura de 22 °C possibilitou o maior desenvolvimento das manchas de cladódios causadas pelos três isolados utilizados, seguida pela temperatura de 26 °C e por fim pelas temperaturas de 30 e 34 °C que

possibilitaram as menores lesões nos cladódios. Observou-se também que *C. siamense* apresentou maiores lesões nas temperaturas de 22 e 26 °C diferindo estatisticamente das demais temperaturas, e que esta espécie de *Colletotrichum* causou maiores lesões médias em todas as temperaturas estudadas, indicando maior agressividade quando comparado com as demais espécies testadas. Já *C. karstii* e *C. fructicola* apresentaram lesões significativamente maiores apenas na temperatura de 22 °C (Figura 9).

O modelo matemático utilizado durante a análise de regressão da interação entre temperaturas de incubação e isolados de *Colletotrichum* foi o linear para todos os isolados, demonstrando que quanto maior a temperatura de incubação dos cladódios, menor o desenvolvimento dos isolados de *Colletotrichum*.

Colletotricum é um gênero fúngico cosmopolita, encontrado em regiões tropicais e subtropicais, onde as temperaturas médias variam entre 15 e 35 °C (BAILEY et al., 1992). Maia et al. (2011), constataram que temperaturas entre 20 e 25 °C proporcionaram maior crescimento de colônias de *Colletotrichum* spp. obtidos a partir de folhas, hastes e frutos de mangueiras.

Avaliando o desenvolvimento de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* em frutos de goiaba Soares – Colletti; Lourenço (2014), constataram que os patógenos apresentaram o maior desenvolvimento em temperaturas entre 25 e 27 °C após 12 dias de incubação, não havendo diferença estatística entre o desenvolvimento das lesões das duas espécies de *Colletotrichum* utilizadas no estudo. Dias et al. (2005), avaliando o desenvolvimento de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos a partir de folhas, ramos e frutos de cafeeiro no interior de Minas Gerais, observaram que temperaturas entre 22 e 28 °C possibilitaram maior desenvolvimento das colônias do patógeno, sendo as temperaturas entre 23 e 25 °C mais adequadas para a produção de conídios dos mesmos.

Temperaturas variando de 10 a 26 °C possibilitaram o crescimento de *C. lupini* em variedades de *Lupinus angustifolius* L. (tremoceiro) com vários graus de susceptibilidade ao patógeno. Neste mesmo trabalho, Tomas et al. (2008), constataram que a susceptibilidade das variedades de tremoceiro a *C. lupini* não foi alterada com a variação da temperatura, após todas as variedades apresentarem incidência da doença inferior a 10% quando submetidas a temperatura de 10 °C.

Os cladódios de palma Miúda incubados a 22 °C durante 10 dias apresentaram lesões características da mancha marrom com diâmetros variados de acordo com o período de permanência em câmara úmida (Figura 10).

Figura 10 - Manchas em cladódios causadas por *C. siamense*, *C. karstii* e *C. fructicola*, após 10 dias de incubação em câmara úmida de 12, 24, 36, 48 e 60 horas, em palma Miúda



Fonte: Feijó, F. M.

Após o período de incubação observou-se que nos cladódios inoculados com *C. siamense* os períodos de câmara úmida de 24, 36, 48 e 60 horas proporcionaram maiores lesões típicas das manchas de cladódios. Já nos cladódios inoculados com *C. karstii* e *C. fructicola* os períodos de câmara úmida de 36, 48 e 60 horas foram os que proporcionaram maiores lesões típicas da doença (Figura 9).

Os resultados apresentados indicam que a partir de 36 horas de câmara úmida as três espécies de *Colletotrichum* utilizadas neste trabalho se desenvolvem da mesma forma e que o acréscimo no período de umidade não ocasiona diferenças significativas na formação de lesões. Soares et al. (2008), observaram elevada germinação de conídios e formação de apressórios em goiabas inoculados com isolado de *C. gloeosporioides* após período de molhamento de 6 horas, em contrapartida ao inocular frutos de goiaba com isolado de *C. acutatum* os autores observaram maior geminação de conídios e formação de apressórios em períodos de molhamento superiores a 12 horas.

A origem tropical e subtropical do gênero *Colletotrichum* sofre influência da temperatura e umidade necessária para o desenvolvimento do patógeno. Regiões mais quentes e úmidas possibilitam o maior desenvolvimento do fungo ocasionando maiores lesões em seus hospedeiros, confirmando a adaptabilidade deste patógeno às mais variadas condições edafoclimáticas do planeta.

Espécies de *Colletotrichum* utilizam diversas estratégias para invadir, infectar e colonizar o tecido dos hospedeiros através de ferimentos, aberturas naturais ou diretamente via apressórios, além de poderem emitir tubos germinativos e hifas intracelulares. (JEFFRIES et al., 1990; PERFECT et al., 1999). Estas e outras ferramentas adaptativas permitem que este patógeno se desenvolva nas mais diversas localidades do planeta e sob as mais variadas condições de temperatura e umidade.

4.3.2 Comportamento de genótipos de palma em relação a manchas de cladódios

Passado o período de incubação observou-se o desenvolvimento de lesões típicas de mancha de cladódios nos dez genótipos utilizados no experimento (Figura 11).

Os genótipos Orelha de Onça, Alagoas, Melancia, Tamazunchale e Clone 6 apresentaram os maiores diâmetros de lesões quando inoculados com o isolado A38 (*C. siamense*), diferindo estatisticamente dos demais genótipos. Quando inoculados com o isolado EA45 (*C. fructicola*), o genótipo Clone F21 e Tamazunchale apresentaram os maiores diâmetros de lesões, diferindo estatisticamente dos demais. As lesões provocadas pelo isolado BC15 (*C. karstii*) não apresentaram diferença estatística em nenhum dos genótipos utilizados neste trabalho (Tabela 7).

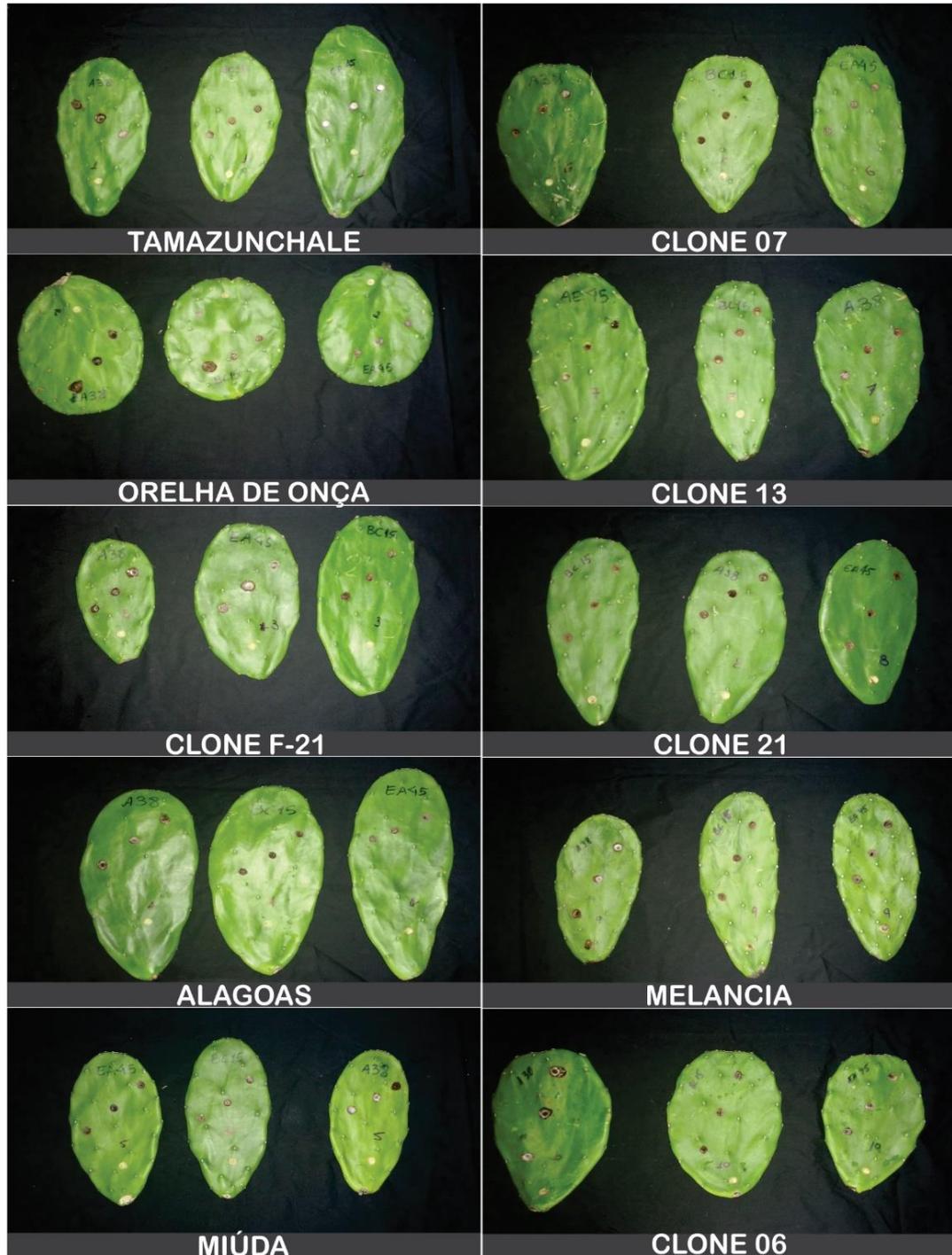
Tabela 7 - Diâmetro médio (mm) de mancha de cladódios causada por *C. siamense*, *C. karstii* e *C. fructicola* em genótipos de palma forrageira

Genótipo	Isolado		
	<i>C. siamense</i>	<i>C. karstii</i>	<i>C. fructicola</i>
Clone 06	11,11aA	8,21aB	8,83bB
Clone 07	8,70bA	8,15aA	8,33bA
Clone 13	8,88bA	8,38aA	8,35bA
Clone 21	8,85bA	8,33aA	8,93bA
Clone F21	9,75bA	8,40aB	10,71aA
Miuda	9,50bA	8,41aA	8,60bA
Alagoas	11,32aA	8,45aB	8,27bB
Melancia	10,88aA	9,00aB	9,19bB
Tamazunchale	10,61aA	8,96aB	9,88aA
O. Onça	11,01aA	9,27aB	8,91bB

Fonte: Autor

Nota: Valores seguidos pela mesma letra minúscula na vertical e mesma letra maiúscula na horizontal não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-knott.

Figura 11 - Manchas de cladódios causadas por *C. siamense*, *C. karstii* e *C. fructicola* em genótipos promissores de palma forrageira do gênero *Nopalea*

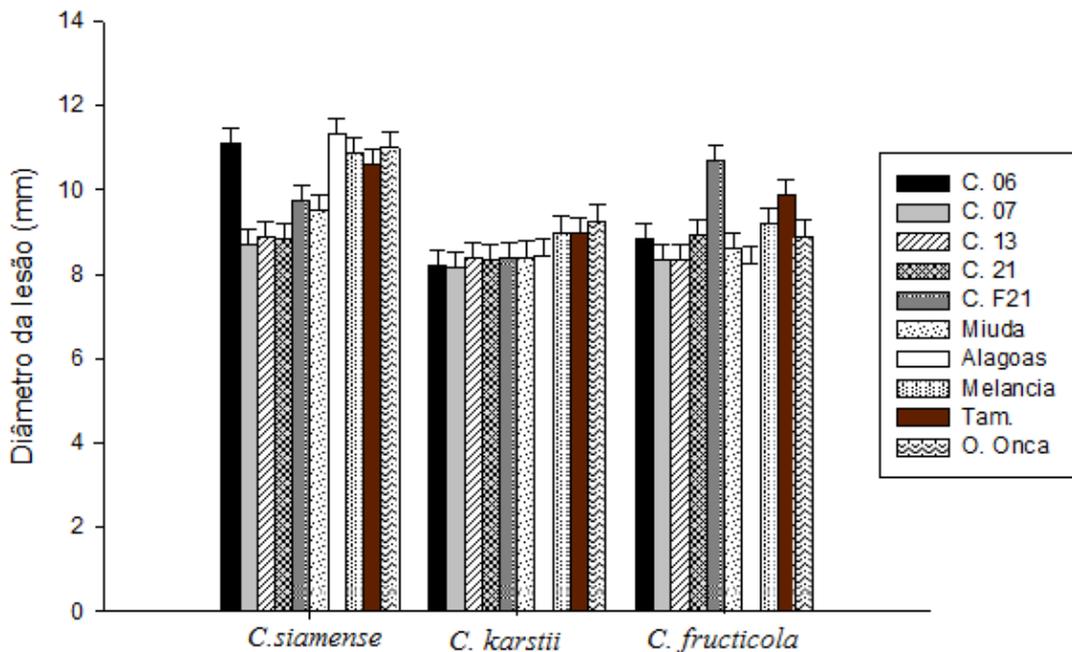


Fonte: Feijó, F. M.

Observa-se ainda que nos genótipos Clone 06, Alagoas, Melancia e Orelha de Onça o isolado de *C. siamense* (A38) apresentou lesões, que diferiram estatisticamente, quando comparado com os isolados de *C. karstii* (BC15) e *C. fructicola* (EA45), nos genótipos Clone F21 e Tamazunchale os isolados A38 e EA45 proporcionaram maiores lesões, diferindo estatisticamente das lesões causadas pelo isolado BC15.

Os resultados apresentados indicam que *C. siamense* apresenta maior agressividade a genótipos de palma forrageira, quando comparado com *C. fructicola* e *C. karstii*. Dentre os genótipos utilizados neste trabalho os Clones 7, 13, 21 e Miuda apresentaram os menores diâmetros médios de lesões ocasionadas por *Colletotrichum*, quando comparados com os demais genótipos (Figura 12).

Figura 12 - Diâmetro de lesões de *C. siamense*, *C. karstii* e *C. fructicola* inoculados em diferentes genótipos de palma forrageira do gênero *Nopalea*



Fonte: Feijó, F. M.

Os resultados observados sugerem que determinados genótipos de palma forrageira têm potencial de resistência a espécies de *Colletotrichum*. Estudos relacionando resistência de genótipos de palma forrageira a doenças fúngicas no Brasil são escassos, sendo encontrados trabalhos tratando da seleção de genótipos que apresentam resistência a insetos (VASCONCELOS et al., 2009; LOPES et al. 2010) e seleção de genótipos que apresentam melhores respostas produtivas à diferentes condições de manejo (CAVALCANTE et al., 2014; SILVA et al., 2014).

Desta forma os resultados apresentados sugerem a necessidade de novos estudos relacionando genótipos promissores de palma forrageira a patógenos causadores de manchas de cladódios como, por exemplo, *Colletotrichum* spp., em busca de cultivares que aliem a resistência a fitopatógenos com outras características agronômicas interessantes, como produtividade, acúmulo de água, produção de matéria seca, digestibilidade etc.

4.4 Conclusões

- A temperatura de 22 °C favoreceu o desenvolvimento das lesões nos cladódios, independente da espécie de *Colletotrichum* considerada;
- O período de permanência em câmara úmida superior a 36 horas favoreceu o desenvolvimento das lesões nos cladódios quando inoculados com isolados de *Colletotrichum* spp.;
- *Colletotrichum siamense* apresentou maior agressividade em genótipos de palma forrageira quando comparado com *C. karstii* e *C. fructicola*;
- Os genótipos de palma forrageira Miúda e os Clones 07, 13 e 21 apresentaram menores diâmetros de lesões quando inoculados com isolados de *Colletotrichum* spp.

REFERENCIAS

- BAILEY, J. A. et al. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). ***Colletotrichum: Biology, Pathology and Control***. CAB International, p. 88-120. 1992.
- CAVALCANTE, L. A. D. et al. Respostas de genótipos de palma forrageira a diferentes densidades de plantio. ***Pesquisa Agropecuária Tropical***, v. 44, n. 4, p. 424-433, 2014.
- DIAS, M. D. et al. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de *Coffea arábica* L. ***Ciência e agrotecnologia***, v. 29, n. 3, p. 545-552, 2005.
- FLORES - FLORES, R. F. et al. Identification of Fungal Species Associated with Cladode Spot of Prickly Pear and Their Sensitivity to Chitosan. ***Journal of Phytopathology***, v. 161, p. 544–552, 2013.
- JEFFRIES, P. et al. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. ***Plant Pathology***, v. 39, p. 343-366, 1990.
- LOPES, E. B. et al. Seleção de genótipos de palma forrageira (*Opuntia* spp.) e (*Nopalea* spp.) resistentes à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius opuntiae* Cockerell, 1929) na Paraíba, Brasil. ***Engenharia Ambiental***, v. 7, n. 1, p. 204-215, 2010.
- MAIA, F. G. M. et al. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira com sintomas de antracnose. ***Bioscience Journal***, v 27, n 2, p. 205-210, 2011.
- PERFECT, S. E. et al. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal–plant interactions. ***Fungal Genetics and Biology***, v. 27, p. 186 – 198, 1999.
- SILVA, L. M. et al. Produtividade da palma forrageira cultivada em diferentes densidades de plantio. ***Ciência Rural***, v. 44, n. 11, p. 2064-2071, 2014.
- SOARES, A. R. Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento. ***Tropical Plant Pathology***, v. 33, n. 4, p. 265 – 272, 2008.
- SOARES – COLLETTI, A. R.; LOURENÇO, S. A. Effect of temperature, wetness duration and cultivar on the development of anthracnose in guava fruits. ***Summa Phytopathology***, v 40, n 4, p. 307-312, 2014.
- TOMAS, G. J. et al. Effect of temperature on growth of *Colletotrichum lupini* and on anthracnose infection and resistance in lupins. ***Australasian Plant Pathology***, v. 37, n. 1, p. 35-39, 2008.

VASCONCELOS, A. G. V. et al. Seleção de clones de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius* sp). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 5, p. 827-831, 2009.