

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

**ANTONIO DUARTE DO NASCIMENTO**

**IDENTIFICAÇÃO DE *Colletotrichum* spp. E *Neopestalotiopsis* spp., ASSOCIADAS  
A DOENÇAS FOLIARES DO CACAUEIRO.**

Rio Largo - AL

2019

**ANTONIO DUARTE DO NASCIMENTO**

**IDENTIFICAÇÃO DE *Colletotrichum* spp. E *Neopestalotiopsis* spp., ASSOCIADAS  
A DOENÇAS FOLIARES DO CACAUEIRO.**

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 para obtenção do grau de Doutor em Proteção de Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima.

Rio Largo - AL

2019

Catálogo na fonte  
Universidade Federal de  
Alagoas

Biblioteca Campus de Engenharias Ciências  
Agrárias

Bibliotecário: Erisson Rodrigues de Santana

N244i Nascimento, Antonio Duarte do.

Identificação de *Colletotrichum spp.* e *Neopestalotiopsis spp.*,  
associadas a doenças foliares do cacaueteiro.

72 f.; il; 33 cm

TESE (Tese de Doutorado – Proteção de plantas) - Campus de  
Engenharias e Ciências Agrárias, Programa de Pós-graduação em  
Proteção de Plantas, Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo,  
2019.

Orientador(a): Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima.

1. Malvaceae. 2. Antracnose. 3. Mancha foliar. 4. Inferência  
Bayesiana. I. Título.

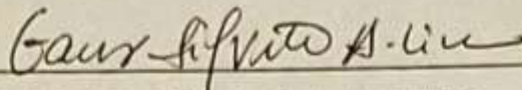
CDU: 633.74

ANTONIO DUARTE DO NASCIMENTO

IDENTIFICAÇÃO DE *Colletotrichum* spp. E *Neopestalotiopsis* spp., ASSOCIADAS  
A DOENÇAS FOLIARES DO CACAUEIRO.

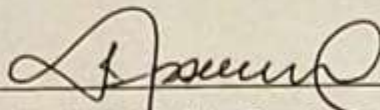
Tese submetida ao corpo docente do  
Programa de Pós-Graduação em Proteção  
de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias  
da Universidade Federal de Alagoas.

DEFESA: 28/02/2019

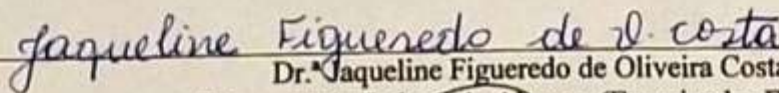


Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima  
Universidade Federal de Alagoas (Orientador)

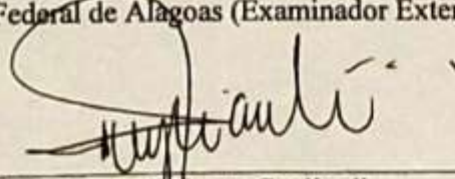
**Banca Examinadora:**



Prof.ª Dr.ª Iraíldes Pereira Assunção  
Universidade Federal de Alagoas (Examinador Interno)



Dr.ª Jaqueline Figueredo de Oliveira Costa  
Universidade Federal de Alagoas (Examinador Externo)



Prof. Dr. Paulo Roberto Gagliardi  
Universidade Federal de Sergipe (Examinador Externo)

Rio Largo - AL

2019

## Resumo

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é uma planta arbórea, originada da América do Sul, provavelmente nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco. No gênero *Theobroma*, o cacau é uma das poucas espécies utilizadas para fins econômicos, com potencial para produção de uma infinidade de subprodutos, dentre eles a manteiga de cacau e o chocolate. A cultura apresenta grande importância para mais de 50 países, dentre os quais o Brasil representa a sexta maior produção, com a maior parte concentrada no estado da Bahia. Embora seja uma cultura de grande importância, a produtividade do cacau tem sido limitada pela ocorrência de diversos problemas fitossanitários. Dentre os patógenos que acometem a cultura, fungos dos gêneros *Colletotrichum* e *Pestalotiopsis* podem representar ameaça caso sejam dispersos sob condições favoráveis. Espécies de *Colletotrichum* já foram relatadas causando antracnose no cacau em todos os países produtores da cultura. Nesta cultura, *Pestalotiopsis* spp. são relatadas principalmente como endofíticas, tendo sido observada causando manchas foliares em Cuba. Durante muito tempo, espécies de *Colletotrichum* e *Pestalotiopsis* foram caracterizadas somente através de caracteres morfoculturais, ocasionando diversas sobreposições e sinonímias. Os objetivos deste estudo foram caracterizar isolados de *Colletotrichum* e *Neopestalotiopsis* associados a doenças foliares no cacau. Folhas de cacau apresentando sintomas, foram coletadas nos municípios de Igrapiúna-BA, Boca da Mata-AL e Maceió-AL. No laboratório foram realizados isolamentos indiretos e obtenção de culturas monospóricas para posterior identificação. Essa identificação foi feita a partir de técnicas moleculares utilizando as regiões genômicas, GAPDH, TUB2, CHS, ACT e CAL, em conjunto com técnicas de caracterização morfocultural. Dentro deste gênero foi possível identificar as espécies, *C. fructicola*, *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. aeshynomenes*, *C. tropicale*, *C. karstii*, *C. limeticola* e *C. gigasporum* causando antracnose em folhas de cacau, sendo este o primeiro relato destas espécies na cacauicultura brasileira e o primeiro relato de *C. aeshynomenes*, *C. karstii* e *C. limeticola*, na cultura do cacau a nível mundial. Para *Neopestalotiopsis*, foram utilizados dados de sequência ITS,  $\beta$ -tub e EF1- $\alpha$ , que permitiu agrupar 5 isolados em duas espécies: *N. surinamensis* e *N. brasiliensis* sp. nov. Este é o primeiro relato de *N. surinamensis* na cultura do cacau e a primeira ocorrência dessa espécie no Brasil, enquanto que *N. brasiliensis* trata-se de uma nova espécie pertencente ao gênero *Neopestalotiopsis*.

**Palavras-Chave:** Malvaceae. Antracnose. Mancha foliar. Inferência Bayesiana.

## Abstract

The cacao (*Theobroma cacao* L.) is a tree plant, originated in South America, probably in the Amazon and Orinoco river basins. In the genus *Theobroma*, cocoa is one of the few species used for economic purposes, with potential for the production of a multitude of by-products, among them cocoa butter and chocolate. The culture is of great importance to more than 50 countries, among which Brazil represents the sixth largest production, with the bigger part concentrated in the state of Bahia. Although a crop of great importance, cocoa productivity has been limited by the occurrence of various phytosanitary problems. Among the pathogens that affect the crop, fungi of the genus *Colletotrichum* and *Pestalotiopsis* can pose a threat if dispersed under favorable conditions. Species of *Colletotrichum* have already been reported causing anthracnose in cacao in all crop producing countries. In this culture, *Pestalotiopsis* spp. are reported mainly as endophytic, having been observed causing leaf spot in Cuba. For a long time, species of *Colletotrichum* and *Pestalotiopsis* were characterized only by morpho-cultural characters, causing several overlaps and synonymy. Thus, the objectives of this study were to characterize isolates of *Colletotrichum* and *Neopestalotiopsis* associated with leaf diseases in cacao. For that, cocoa leaves presenting symptoms were collected in the municipalities of Igrapiúna-BA, Boca da Mata-AL and Maceió-AL. In the laboratory, were done indirect isolation and getting monosporic cultures for later identification. the *Colletotrichum* species were characterized was made from molecular techniques using the genomic regions, GAPDH, TUB2, CHS, ACT and CAL, together with morphocultural characterization techniques. Within this genus, it was possible to identify the species, *C. fructicola*, *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. aeschynomenes*, *C. tropicale*, *C. karstii*, *C. limeticola* and *C. gigasporum* causing anthracnose in cacao leaves. This is first report of these species in Brazilian cacaucultura and the first report of *C. aeschynomenes*, *C. karstii* and *C. limeticola*, in the cacao culture. For *Neopestalotiopsis* were used ITS,  $\beta$ -tub and EF1- $\alpha$  sequence data, which allowed grouping of 5 isolates into two species: *N. surinamensis* and *N. brasiliensis* sp. nov. This is the first report of *N. surinamensis* in cacao culture and the first occurrence of this species in Brazil, whereas *N. brasiliensis* its about a new species belonging to the genus *Neopestalotiopsis*.

**Keywords:** Malvaceae. Anthracnose. Leaf spot. Bayesian Inference.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Sintomas causados por <i>Colletotrichum</i> spp. em folhas de cacaueteiro ( <i>Theobroma cacao</i> ). .....	31
<b>Figura 2</b>	Sintomas causados por isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. em folhas de cacaueteiro oito dias após a inoculação com: A - Discos de BDA contendo micélio das espécies, B - Suspensão de esporos, C – Testemunha com discos de BDA e D – Testemunha com ADE. ....	37
<b>Figura 3</b>	Árvore filogenética de Inferência Bayesiana baseada nas sequências concatenadas dos genes ACT, CAL, CHS GAPDH e $\beta$ -tub. A árvore foi enraizada com <i>Colletotrichum truncatum</i> (out-group). Os isolados estudados no presente trabalho, estão marcados em negrito. ....	40
<b>Figura 4</b>	<b>Figura 4-</b> Características morfoculturais das espécies de <i>Colletotrichum</i> identificadas no presente estudo (Verso e reverso da colônia aos 7 dias de idade, conídios e apressórios). <b>ABC</b> - <i>C. tropicale</i> ; <b>DEF</b> - <i>C. aeshynomenes</i> ; <b>GHI</b> - <i>C. siamense</i> ; <b>JKL</b> - <i>C. fructicola</i> ; <b>MNO</b> - <i>C. theobromicola</i> ; <b>PQR</b> - <i>C. gigasporum</i> ; <b>STU</b> - <i>C. karstii</i> ; <b>VWX</b> - <i>C. limetticola</i> . ....	42
<b>Figura 5</b>	Sintomas causados por isolados de <i>Neopestalotiopsis</i> spp. em folhas de cacaueteiro oito dias após a inoculação com: A - Discos de BDA contendo micélio das espécies, B - Suspensão de esporos, C – Testemunha com discos de BDA e D – Testemunha com ADE. ....	61
<b>Figura 6</b>	Características morfoculturais de <i>N. surinamensis</i> . A1 - Verso da colônia aos sete dias de idade, cultivada em BDA sintético. A2 - Reverso da colônia aos sete dias de idade, cultivada em BDA sintético. B – Conodiosomas em acículas de pinheiro. C – Célula conidiogênica. D – Conídios. ....	62
<b>Figura 7</b>	Características morfoculturais de <i>N. surinamensis</i> . A1 - Verso da colônia aos sete dias de idade, cultivada em BDA sintético. A2 - Reverso da colônia aos sete dias de idade, cultivada em BDA sintético. B – Conodiosomas em acículas de pinheiro. C – Célula conidiogênica. D – Conídios. ....	63
<b>Figura 8</b>	Características morfoculturais de <i>N. brasiliensis</i> . A1 - Verso da colônia aos sete dias de idade, cultivada em BDA sintético. A2 - Reverso da colônia aos sete dias de idade, cultivada em BDA sintético. B – Conodiosomas em acículas de pinheiro. C e D – Célula conidiogênica e formação de conídios. E – Conídio imaturo. F – Conídios. ....	64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	“primers” usados para identificação de espécies pertencentes ao gênero <i>Colletotrichum</i> . .....	33
<b>Tabela 2</b>	Sequências de <i>Colletotrichum</i> spp. obtidas do GenBank e usadas nas análises filogenéticas. ....	34
<b>Tabela 3</b>	Características morfológicas e culturais das espécies de <i>Colletotrichum</i> identificadas neste estudo. ....	41
<b>Tabela 4</b>	“primers” usados para identificação de espécies pertencentes ao gênero <i>Neopestalotiopsis</i> . ....	58
<b>Tabela 5</b>	Códigos das culturas e números de acesso do GenBank de sequências de DNA de <i>Neopestalotiopsis</i> spp. utilizados na análise filogenética. ....	59



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>9</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>11</b>
<b>Cacaueiro .....</b>	<b>11</b>
<b>Taxonomia e origem.....</b>	<b>11</b>
<b>Descrição botânica e fisiológica.....</b>	<b>11</b>
<b>Importância social e econômica, principais usos e processamento .....</b>	<b>12</b>
<b>Antracnose.....</b>	<b>14</b>
<b>Gênero <i>Colletotrichum</i> .....</b>	<b>15</b>
<b>Complexos de espécies de <i>Colletotrichum</i>.....</b>	<b>16</b>
<i>Colletotrichum acutatum</i> .....	16
<i>Colletotrichum boninense</i> .....	17
<i>Colletotrichum gigasporum</i> .....	17
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	17
<i>Pestalotiopsis</i> spp.....	17
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>20</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>27</b>
<b>3 IDENTIFICAÇÃO DE <i>Colletotrichum</i> spp. ASSOCIADAS À ANTRACNOSE DO CACAUEIRO NOS ESTADOS DE ALAGOAS E BAHIA. ....</b>	<b>28</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>28</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
<b>Obtenção dos isolados. ....</b>	<b>30</b>
<b>Teste de patogenicidade .....</b>	<b>31</b>
<b>Caracterização molecular .....</b>	<b>31</b>
<b>Caracterização morfológica e cultural.....</b>	<b>35</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
<b>Obtenção dos isolados .....</b>	<b>36</b>
<b>Teste de patogenicidade .....</b>	<b>36</b>
<b>Caracterização molecular .....</b>	<b>37</b>
<b>Caracterização cultural e morfológica.....</b>	<b>39</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSÕES: .....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>53</b>
<b>4 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE <i>Neopestalotiopsis</i> ASSOCIADAS A MANCHAS FOLIARES NA CULTURA DO CACAU.....</b>	<b>54</b>

<b>Resumo</b> .....	<b>SUMÁRIO</b> .....	54
<b>INTRODUÇÃO</b> .....		55
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....		56
<b>Origem e obtenção dos isolados.</b> .....		56
<b>Teste de patogenicidade</b> .....		56
<b>Caracterização molecular</b> .....		57
<b>Caracterização cultural e morfológica</b> .....		59
<b>RESULTADOS</b> .....		59
<b>Obtenção dos isolados</b> .....		59
<b>Teste de patogenicidade</b> .....		60
<b>Caracterização molecular</b> .....		60
<b>Caracterização cultural e morfológica</b> .....		62
<b>DISCUSSÃO</b> .....		64
<b>CONCLUSÕES:</b> .....		67
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....		68

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O cacauero (*Theobroma cacao*) é originado da América do Sul, provavelmente nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco (SILVA NETO et al., 2001; OETTERER 2006; AFOAKWA 2010). Dentro do gênero *Theobroma*, esta é uma das poucas espécies utilizadas para fins econômicos, com potencial para produção de uma infinidade de subprodutos como a manteiga de cacau e o chocolate (ALVES 2002; SODRÉ 2007; ALMEIDA; VALLE 2007).

De acordo com dados da International Cocoa Organization (ICCO), em 2016 o Brasil produziu 230.000 toneladas de amêndoas, representando a sexta maior produção mundial. Na Bahia, estado brasileiro maior produtor da cultura, o cacau tem papel importante na manutenção da economia de mais de 100 municípios (SOUZA JUNIOR et al., 2011), no entanto a produtividade da cultura tem sido limitada pela ocorrência de diversos problemas fitossanitários (ALMEIDA et al., 2009; SIMÕES 2010). Doenças ocasionadas por fungos dos gêneros *Colletotrichum* e *Pestalotiopsis*, podem representar uma ameaça à cultura, sob condições favoráveis ao seu desenvolvimento (SFALSIN 2012).

Espécies do gênero *Colletotrichum* são responsáveis por causar a doença conhecida como antracnose em uma ampla gama de hospedeiros (DEAN et al., 2012; KUMAR et al., 2011). Na cultura do cacau, a antracnose já foi relatada em todos os países produtores do mundo (OLIVEIRA; LUZ 2005). No Brasil os sintomas são mais observados nos ramos e nas folhas, onde manchas escuras iniciam-se no ápice e evoluem através das margens por todo o limbo (OLIVEIRA 2017). A identificação de *Colletotrichum* é de fundamental importância para tomada de decisões no manejo da doença. Durante muito tempo a caracterização de espécies pertencentes a este gênero foi baseada em dimensões de conídios, índice de crescimento micelial e gama de hospedeiros (TALHILHAS et al., 2002; SUTTON 1992), no entanto a alta variabilidade dessas características tornaram essa metodologia, por si só, insuficiente para separação das espécies, sendo então necessário a utilização de técnicas moleculares (HYDE et al., 2009; LIMA 2013).

O gênero *Pestalotiopsis* está amplamente distribuído, podendo ser encontrado naturalmente, como endofíticos, saprófitas e patogênicos (JEEWON et al., 2004). A partir

de estudos filogenéticos conduzidos por Maharachchikumbura et al. (2014a), este gênero foi dividido em três: *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*. No cacauero, *Pestalotiopsis* spp. são encontrados principalmente como endofíticos (HANADA et al., 2010; RUBINI et al., 2005), no entanto, uma espécie deste gênero foi observada causando manchas foliares em Cuba (URTIAGA 1986). Até o presente momento, não existiam relatos de *Neopestalotiopsis* na cultura do cacau.

Assim como em *Colletotrichum*, espécies de *Pestalotiopsis*, eram identificadas com base em características culturais, morfológicas e gama de hospedeiro. No entanto para uma precisa identificação, atualmente se faz necessário a utilização de marcadores moleculares, sendo ITS, TUB e EF1- $\alpha$  (Fator de Elongação) os mais precisos (HYDE et al., 2009; PHOULIVONG et al., 2012; CANNON et al., 2012; LIMA et al., 2013; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2012, 2014a). Com base nestas técnicas, é possível que espécies anteriormente descritas em *Pestalotiopsis*, migrem para outros gêneros, tornando-se admissível que espécies de *Neopestalotiopsis* possam estar presentes na cultura do cacau.

O presente estudo teve como objetivo caracterizar isolados de *Colletotrichum* e de *Neopestalotiopsis* associados a cultura do cacau, por meio de análises multilocus e caracterização morfocultural.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### Cacaueiro

#### **Taxonomia e origem.**

O cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) está incluído na ordem Malvales, família Malvaceae (SOUNIGO et al., 2003; BORGES et al., 2014; SANTOS et al., 2017), que reúne aproximadamente 4200 espécies distribuídas em 250 gêneros (BAYER et al., 1999; GRINGS 2013). O gênero *Theobroma*, que agrupa cerca de 22 espécies, é um dos mais importantes por agrupar representantes como cacau e cupuaçu, plantas de alto potencial econômico (SODRÉ, 2007).

É uma planta originária da América do Sul, provavelmente das bacias dos rios Amazonas e Orinoco (SILVA NETO et al., 2001; OETTERER 2006; AFOAKWA 2010), onde é encontrado em condições naturais sob o dossel de grandes árvores das florestas tropicais. A espécie foi citada pela primeira vez na literatura botânica por Charles de L'Écluse, que a descreveu com o nome de *Cacao fructus*. Em 1737, foi reclassificada por Linneu como *Theobroma fructus*, que posteriormente a renomeou para *Theobroma cacao* (SILVA NETO et al., 2001). A palavra de origem grega “theobroma”, significa alimento dos deuses, em referência à origem divina atribuída ao cacaueiro pelos povos mesoamericanos (LOPES et al., 2011; EFRAIM 2009). Durante décadas a espécie foi se dispersando até chegar ao Norte da América do Sul e Central sendo cultivada pelos astecas e maias no México (MORORÓ 2012).

#### **Descrição botânica e fisiológica.**

De acordo com Muller (2012) o cacaueiro atinge até 20 metros de altura em condições ambientais de florestas sombreadas, e em condições de cultivo é mantida entre 3 e 5 metros de altura. A planta apresenta cauliflora e produz cerca de 100.000 flores/ano das quais 1 a 5% são fertilizadas e apenas 0,1% são frutificadas. Os frutos possuem formato ovóide ou alongado, sendo inseridos diretamente no caule apresentando coloração entre verde e amarelo ou roxo e laranja (PARENTE 2010; SILVA NETO et al., 2001). São sustentados por pedúnculos lenhosos e comportam de 30 a 40 semente de 2 a 3 centímetros de comprimento, com formato elipsoide ou ovoide (PARENTE 2010; SILVA NETO et al., 2001; SANTOS 2012).

É uma cultura perene de clima tipicamente tropical (ALMEIDA; VALLE 2007), necessitando, entretanto, de um bom sombreamento para seu desenvolvimento e produção (SOMARRIBA; BEER 2010). Sendo assim, quanto menor a incidência de luz, maiores as taxas fotossintéticas e trocas gasosas, o que possibilita uma maior disponibilidade de fotoassimilados que são utilizados no crescimento e rotas metabólicas de defesa (BARROSO 2014; SANTOS et al., 2017). O sombreamento associado a sistemas de irrigação, sobretudo nos dois primeiros anos, garante um bom crescimento e desenvolvimento, favorecendo o sucesso da cultura. Nos anos iniciais de desenvolvimento, o cacauero ainda pode ser consorciado com outras culturas como seringueira, mamoeiro, bananeira ou mandioca (LEITE et al., 2010).

### **Importância social e econômica, principais usos e processamento.**

O cacauero apresenta grande importância econômica para mais de 50 países (SERENO et al., 2006), com participação relevante no comércio internacional nas importações e exportações de produtos agrícolas (GUYTON 2003). Os produtos finais de grãos de cacau, especialmente chocolate e bebidas, são considerados alimentos básicos em muitos países do mundo (NDUKWU et al., 2010).

De acordo com a International Cocoa Organization, os cinco maiores produtores de cacau na safra 2014/2015 foram: Costa do Marfim (1.796.000 toneladas), Gana (740.000 toneladas), Indonésia (325.000 toneladas), Equador (250.000 toneladas) e Camarões (232.000 toneladas), representando cerca de 80% da produção mundial. O Brasil, na década de 1980, chegou a ser o segundo maior produtor de cacau do mundo, com produção em torno de 400.000 toneladas, das quais aproximadamente 90% foram exportadas. Atualmente, ocupa a sexta posição do “ranking” internacional com aproximadamente 230.000 toneladas produzidas, cerca de 5% da produção mundial, concentradas principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país (BASTOS 1987; ALVES 2002; DEUS 2015; ICCO 2016).

O estado da Bahia é o maior produtor de cacau do país, contribuindo com cerca de 54% da produção nacional e 100% da produção do Nordeste. É seguido pelos estados do Pará, Espírito Santo e Rondônia, que contribuem respectivamente com 40%, 2,6% e 2,4% do total produzido no país (IBGE 2016).

O principal objetivo do cultivo do cacau está no aproveitamento de suas sementes (amêndoas) para produção de diversos produtos, destacando-se dentre eles o chocolate

(ALVES 2002). Este produto somente pode ser obtido a partir destas amêndoas fermentadas, secas e torradas, não havendo nenhuma forma de produção artificial. O desenvolvimento do sabor é influenciado diretamente pela constituição genética das sementes e pelas etapas de fermentação e torração (POSSIGNOLO 2010; DEUS 2015). Na fermentação ocorre uma diminuição do pH associado com aumento da temperatura (45 a 50°C), acarretando na morte do gérmen e a partir de então os grãos passam a ser chamados amêndoas (CRUZ 2002; AFOAKWA 2010). Com a morte da semente ocorrem mudanças estruturais e geração de precursores de sabor, como a hidrólise de proteínas, originando aminoácidos livres (BECKETT 1994). Após esta etapa as amêndoas apresentam em torno de 48 a 57% de gordura, 2,2 a 2,5% de nitrogênio total, 6,5 a 9% de carboidratos e 2,2 a 3,2% de fibras (BISPO 1999).

Na secagem, a fermentação é interrompida e o teor de umidade das amêndoas é reduzido tornando-as estáveis para o armazenamento. Esta etapa deve ser iniciada imediatamente após a fermentação (HANSEN et al., 1998; DEUS 2015). Já na torração ocorre um tratamento térmico fundamental para se obter as características de qualidade do produto final, através de reações químicas que fazem com que os aminoácidos livres e os açúcares redutores (precursores do sabor), produzidos na fermentação, sejam convertidos em produtos que conferem, sabor, cor e aroma típico do chocolate (DEUS 2015). Entretanto, cabe ressaltar que as variedades de cacau estão diretamente relacionadas com a qualidade e a intensidade do sabor do produto final, uma vez que a quantidade de precursores do sabor pode ser variável (POSSIGNOLO 2010).

Ainda das sementes extrai-se a manteiga, muito utilizada na indústria farmacológica e na fabricação de cosméticos. O processamento do cacau gera uma grande quantidade de subprodutos. A polpa que envolve as sementes é rica em açúcares, sendo utilizada na fabricação de geleia, vinho, licor, vinagre e suco, garantindo assim o potencial econômico da cultura (SILVA NETO et al., 2001; SANTOS 2012).

Embora constatada a importância econômica e social da cultura, devido seu potencial para produção de uma variedade de derivados, a cacauicultura brasileira tem passado por sérias dificuldades decorrentes de problemas fitossanitários, como doenças causadas por espécies de *Colletotrichum* e *Neopestalotipsis*.

### **Antracnose**

Embora seja dada maior atenção para vassoura de bruxa, a antracnose do cacauero pode representar uma ameaça caso seja disseminada e encontre condições favoráveis ao seu estabelecimento e desenvolvimento (OLIVEIRA 2017).

A antracnose é uma doença de grande importância mundial, podendo atacar uma ampla gama de hospedeiros incluindo cereais, gramíneas, leguminosas, hortaliças, culturas perenes e árvore frutíferas (DEAN et al., 2012; KUMAR et al., 2011). Na cultura do cacauero, a doença já foi relatada em todos os países produtores do mundo, apresentando maior importância econômica na Colômbia e nos países do oeste da África e sudeste da Ásia (BARROS 1981; OLIVEIRA; LUZ 2005; OLIVEIRA 2017). Os sintomas são observados nos ramos, folhas e frutos em qualquer fase de desenvolvimento da planta. No entanto, os danos verificados no Brasil são mais pronunciados nas folhas e nos ramos (OLIVEIRA 2017).

As folhas mais jovens são mais suscetíveis ao ataque da doença, onde os sintomas de manchas necróticas e escuras inicia-se no ápice e margens e evoluem para todo o limbo. É comum o enrolamento dessas áreas afetadas, podendo ocorrer ainda a queda prematura das folhas e, em alguns casos, a emissão de brotações laterais dando aos ramos o aspecto de superbrotamento (ALMEIDA 2001; OLIVEIRA 2017). Em frutos jovens os sintomas iniciam-se com o aparecimento de pontuações castanhas e úmidas que dão origem a lesões necróticas envolvidas por halos cloróticos. Com a evolução dos sintomas a necrose atinge as amêndoas causando deformação e retardamento no desenvolvimento dos frutos (OLIVEIRA 2017). Nos frutos adultos os sintomas aparecem como manchas escuras e deprimidas, isoladas e úmidas que coalescem e formam lesões maiores. Os maiores danos são observados em condições de viveiro quando há excesso de umidade (ALMEIDA 2001; OLIVEIRA 2017).

A doença é causada por fungos do gênero *Colletotrichum* presentes no mundo inteiro. Mais de quinze espécies deste gênero têm sido relatadas no cacau, das quais *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum theobromicola*, *Colletotrichum tropicale*, *Colletotrichum sloanei*, *Colletotrichum fructicola* e *Colletotrichum brachytrichum* são as mais citadas. No Brasil, apenas as espécies *Colletotrichum crassipes* e *C. gloeosporioides* foram relatadas (WILLIAMS; LIU 1976; MENDES et al., 1998; DIAO et al., 2017; WANG et al., 2017; HANADA et al., 2010; ROJAS et al., 2010; CHETANA et al., 2016; DEAN et al., 2012).



### **Gênero *Colletotrichum***

O gênero *Colletotrichum* foi introduzido inicialmente por Tode em 1790, quando recebeu a denominação de *Vermicularia*. No entanto, Corda em 1931 o reclassificou mudando sua denominação para *Colletotrichum* e em 1837 caracterizou o gênero como sendo, de maneira geral, fungos que apresentam conídio hialinos, retos, fusiformes ou curvados e acérvulos com setas (HYDE et al., 2009; SUTTON 1980, 1992). As características culturais desse gênero como a coloração das colônias, em meio de cultura, apresentam variações que vão do branco-gelo ao cinza escuro, enquanto que a quantidade de micélio aéreo é variável (SUTTON 1992).

Este gênero ocupa a oitava posição no ranking dos fungos fitopatogênicos mais importantes do mundo, mas podem ser encontrados também como saprófitos, endofíticos e até patógenos humanos. Ainda que não esteja causando doença, a fase endofítica pode preceder o desenvolvimento de lesões necróticas prejudiciais (DEAN et al., 2012; HYDE et al., 2009; DAMM et al., 2013; CANNON et al., 2012; PHOULIVONG 2011).

O fungo é capaz de sobreviver em restos culturais e pode ser disseminado através de sementes contaminadas, água da chuva e irrigação e pelo vento a longas distâncias. (NECHET; HALFELD-VIERA 2008). Espécies de *Colletotrichum* geralmente apresentam ciclo de vida hemibiotrófico (fase biotrófica seguida de necrotrófica). No processo infeccioso, o conídio depositado na superfície hospedeira, germina formando em sua extremidade o apressório. Este por sua vez segue com a formação do *peg* (hifa) de penetração, que entra diretamente no tecido hospedeiro (BAILEY et al., 1992; LIAO et al., 2012; PERFECT et al., 1999). Normalmente as colônias entram numa fase biotrófica por um a três dias (O'CONNELL et al., 2000). Em seguida o fungo inicia uma fase necrotrófica causando a morte das células e o surgimento de lesões necróticas na superfície do tecido infectado. (PRUSKY; PLUMBLEY 1992; MÜNCH et al., 2008; COSTA 2015).

A precisa identificação de espécies é de suma importância para tomada de decisões do controle de doenças de planta (TOZZE JÚNIOR et al., 2015). A caracterização de espécies de *Colletotrichum*, baseou-se por muito tempo, em caracteres descritivos clássicos como: dimensões de conídios, presença ou ausência de setas, índice de crescimento micelial e gama de hospedeiro (TALHINHAS et al., 2002; SUTTON 1992). Entretanto, a inespecificidade de hospedeiros, a alta variabilidade das características morfológicas e culturais, tornou esses critérios problemáticos e

insuficientes para a caracterização no nível de espécies (LIMA et al., 2013; PHOULIVONG et al., 2012; CAI et al., 2009; CANNON et al., 2012; DAMM et al., 2009; HYDE et al., 2009). Assim, as técnicas moleculares têm sido utilizadas em inferências de relações filogenéticas, permitindo uma maior confiabilidade na identificação de espécies (SHENOY; JEEWON; HYDE 2007; LIMA 2013).

Para destiguir espécies de *Colletotrichum*, as primeiras técnicas moleculares foram aplicadas por Mills et al. (1992) e Sreenivasaprasad et al. (1992), que observaram variações em sequências de DNA da região ITS entre seis espécies de *Colletotrichum*. No entanto, com o passar do tempo foram observadas limitações no uso desta região para separar espécies deste gênero, sendo necessário a utilização de genes adicionais e mais informativos (SILVA et al., 2012; SHARMA et al., 2013).

Atualmente, vários genes têm sido utilizados para este fim, incluindo, beta-tubulina (TUB2), actina (ACT), calmodulina (CAL), glutamina sintetase (GS), quitina sintase (CHS), histona (HIS), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), além da região ITS-rDNA (espaço interno transcrito) (DAMM et al., 2013, SHARMA et al., 2013; LIU et al., 2014; DIAO et al., 2017). Dentre estes, GAPDH tem sido muito utilizado, nos últimos anos, como medida inicial de diversidade de espécies deste gênero (LIMA et al., 2013; COSTA 2014). Através de abordagens polifásicas (análises multilocus em conjunto com dados morfológicos, fisiológicos e de patogenicidade), suas espécies foram separadas em quatorze complexos: *C. acutatum*, *C. boninense*, *C. caudatum*, *C. dematium*, *C. destructivum*, *C. dracaenophilum*, *C. gigasporum*, *C. gloeosporioides*, *C. graminicola*, *C. Magnum*, *C. orbiculare*, *C. orchidearum*, *C. spaethianum*, , *C. truncatum*, (CANNON et al., 2012; JAYAWARDENA et al., 2016; DAMM et al., 2019).

### **Complexos de espécies de *Colletotrichum***

#### *Colletotrichum acutatum*

Agrupando 34 espécies que causam frequentemente podridões em frutos, este complexo é caracterizado por produzir conídios com pelo menos uma extremidade aguda, na maioria dos representantes (DAMM et al., 2012b). De acordo com estes autores, para caracterização molecular em *C. acutatum* latu senso, é recomendado a utilização dos genes TUB2 e GAPDH.

*Colletotrichum boninense*

Incluindo *C. boninense*, este complexo agrupa 19 espécies em 3 subclados distintos. Dentre estas espécies, podem ser encontradas representantes patogênicas ou endofíticas, caracterizadas morfológicamente por apresentar conídios com uma cicatriz basal proeminente (DAMM et al., 2012a). Estes autores informam ainda que todos os representantes de *C. boninense* latu senso, podem ser diferenciados molecularmente apenas com a utilização do gene GAPDH.

*Colletotrichum gigasporum*

É composto por um grupo de 8 espécies, caracterizadas morfológicamente pela produção de grandes conídios (>20 µm) (LIU et al., 2014; DOUANLA-MELI; UNGER 2017). Estas espécies podem se comportar como patógenos ou endófitos e são identificadas molecularmente através da utilização de genes como ACT, CHS-1, GAPDH, ITS e TUB2 (LIU et al., 2014).

*Colletotrichum gloeosporioides*

Este complexo é considerado o maior do gênero *Colletotrichum* agrupando um coletivo de 38 espécies, das quais a maioria é patogênica a plantas (WEIR et al., 2012; JAYAWARDENA et al., 2016). Segundo Weir et al., 2012, os conídios deste complexo de espécies são cilíndricos com extremidades arredondadas. Para caracterização molecular destas espécies, os genes ACT, TUB2, CAL, CHS-1, GAPDH, juntamente com a região ITS, têm sido bastante utilizadas (WEIR et al., 2012; JAYAWARDENA et al., 2016).

*Pestalotiopsis* spp.

Com base em morfologia de conídios, o gênero inicialmente chamado *Pestalotia*, passou por um desmembramento, onde Steyaert (1949) o dividiu em três novos gêneros (*Pestalotia*, *Pestalotiopsis* e *Truncatella*). Na ocasião o autor agrupou em *Pestalotia*, as espécies que apresentavam conídios com seis células. *Pestalotiopsis* agrupou espécies com conídios divididos em cinco células e *Truncatella* agrupou as espécies com conídios de quatro células. Nos três gêneros, as células medianas apresentam coloração escura, entrepostas a duas células hialinas com apêndices simples ou ramificados.

Essa classificação de Steyaert (1949), gerou controvérsias entre vários autores (MOREAU 1949; GUBA 1961; DUBE; BILGRAMI 1965). No entanto, pesquisas de Sutton (1980) usando microscopia eletrônica para examinar a parede celular, apoiaram os estudos de Steyaert (1949), considerando a existência de três gêneros distintos em pestalotiídeos. A classificação é utilizada até os dias de hoje.

Até 1990, a identificação destes gêneros era realizada pelas características dos conídios, devido a estabilidade de traços como a pigmentação das células centrais. No entanto, a alta variabilidade de outras características morfoculturais, torna insuficiente o uso desses critérios, quando utilizados individualmente (EGGER 1995; HU et al. 2007). Assim as técnicas moleculares tornaram-se indispensáveis para diferenciar as espécies destes gêneros (SOLARTE et al., 2018). De acordo com Maharachchikumbura et al. (2012), as regiões genômicas mais precisas para distinguir essas espécies são, Espaço Interno Transcrito (ITS), Fator de alongação (EF1- $\alpha$ ) e  $\beta$ -tubulina (TUB).

A partir de estudos de Maharachchikumbura et al. (2014b), utilizando esses três marcadores, o gênero *Pestalotiopsis* passou por mais uma classificação, sendo dividido em três novos gêneros (*Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*). De acordo com os autores, a pigmentação das células centrais dos conídios se mostra mais concentrada em *Pestalotiopsis* enquanto que em *Neopestalotiopsis*, além da coloração mais clara, essas células apresentam-se versiculadas e essas características podem contribuir para diferenciação dos gêneros (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014b). Esses três gêneros pertencem a ordem Xylariales e suas espécies são conhecidas como fungos pestalotiídeos (Maharachchikumbura et al., 2014a).

São importantes agentes fitopatogênicos, causando uma série de doenças, incluindo doenças de tronco, clorose, manchas foliares, podridão de frutos e várias doenças pós-colheita podendo resultar em perdas econômicas consideráveis em uma série de culturas (ZHANG et al., 2013; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014a; JAYAWARDENE et al., 2015).

O gênero *Neopestalotiopsis*, é composto por cerca de 25 espécies espalhas no mundo inteiro, sendo relatadas como saprofíticas, endofíticas e patogênicas (SILVERIO et al., 2016). Como patógenos, podem causar lesões de coloração marrom, formato circular e bordos bem definidos. Com a evolução ocorre alteração na coloração e formação de áreas irregulares e necróticas (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). Dentre outros hospedeiros, o gênero é relatado causando doença em dendezeiro (*N. saprophytica* e *N. surinamensis*) em videira (*N. vitis*, *N. javaensis* e *N. asiatica*) e em

goiaba (*N. surinamensis* e *N. egyptiaca*) (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; ISMAIL et al., 2017; JAYAWARDENA et al., 2016; (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2016; SOLARTE et al., 2018).

Na cultura do cacau, há relatos de *Pestalotiopsis* causando manchas foliares apenas em cuba (URTIAGA 1986; WILLIAMS et al., 1976; GE et al., 2009). No Brasil há relatos de *Pestalotiopsis* spp. como endofítico em *T. cacao* e *T. grandiflorum* (HANADA et al., 2010). Cabe lembrar que fungos endófitos também podem vir a causar problemas, uma vez que podem mudar a qualquer momento seu estilo de vida para patogênico (PHOTITA et al., 2001; ROMERO et al., 2001).

Quanto a *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*, não há relatos na literatura de espécies pertencentes a esses gêneros, causando doença em plantas de cacau. No entanto, é possível que estes gêneros estejam presentes nessa cultura, uma vez que a maioria das espécies de *Pestalotiopsis* já descritas, foram identificadas com base na gama de hospedeiro e caracteres morfológicos. Assim, muitas dessas espécies provavelmente são sinônimas e a lista de verificação na literatura pode não refletir o que realmente ocorre (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2012; HYDE et al., 2014).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFOAKWA E. O. **Chocolate Science and Technology**. John Wiley and sons Ltd, 2010.

ALMEIDA L. C. Principais Doenças do Cacaueiro e Medidas de Controle. In: SILVA NETO P. J. et al. **Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira**. Belém: CEPLAC, 2001. 125 p.

ALMEIDA A. A. F.; VALLE, R.R. Ecophysiology of the cacao tree. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, p. 425-448. 2007

ALMEIDA C. M. V. C.; DIAS, L. A. S; SILVA, A. P. Caracterização agrônômica de acessos de cacau. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 44, n., p. 368-373, 2009.

ALVES S. A. M. **Epidemiologia da vassoura de bruxa (*Crinipellis perniciosa* (STAHEL) SINGER) em cacaueiros enxertados em Uruçuca, Ba**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2002. Dissertação 70 p.

BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. 1992. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. CAB International. 388 p.

BARROS N. O. 1981. Cacao. **Manual de Asistencia Técnica nº 23**. Instituto Colombiano Agropecuario, Bogotá. 286 p.

BARROSO; J. P. **Respostas de genótipos de cacau à intensidade de luz, avaliados por meio da fotossíntese, ultraestrutura e composição química foliar**. Ilhéus: UESC, 2014. Dissertação. 84p.

BASTOS E. 1987. **Cacau: a riqueza agrícola da América**. São Paulo: Ícone. 130p.

BAYER, C. et al. Support for an expanded family concept of Malvaceae within a recumscscribed order Malvales: a combined analysis of plastid atpB and rbcL DNA sequences. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 129, p. 267-303, 1999.

BECKETT S.T. 1994. **Fabricación y utilización industrial del chocolate**. Zaragoza: Editorial Acribica. 432 p.

BISPO E. S. **Processo de alcalinização do nibs de cacau (*Theobroma cacao* L.) e avaliação da qualidade do pó**. Campinas: Universidade de Campinas, 1999. Tese. 198p.

BORGES, M.S. et al. Impressões foliares Pleistocenas de Malvaceae na área de abrangência do aproveitamento hidroelétrico Jirau, Rondônia, Brasil. **Pesquisas em Geociências**, v. 41, n. 3, p. 243-255, 2014.

CAI L. et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**. n.1, v.39, p.183-204, 2009.

CANNON, P.F. et al. *Colletotrichum* status and future directions. **Studies in Mycology**, v.73, p.181-213, 2012.

CHETHANA, C.S. et al. Molecular and phenotypic characterization revealed six *Colletotrichum* species responsible for anthracnose disease of small cardamom in South India. **European journal of plant pathology**, v. 146, p. 465-481, 2016.

COSTA J. F. O. **Caracterização e epidemiologia comparativa de espécies de *Colletotrichum* em anonáceas no estado de Alagoas**. Rio Largo: UFAL, 2014. Tese. 110p.

COSTA C. A. et al. **Diversidade de espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose em chuchuzeiro**. Recife: UFRPE, 2015. Dissertação. 47p.

CRUZ C. L. C. V. **Melhoramento do sabor de amêndoas de cacau através de tratamento térmico em forno convencional e de microondas**. Campinas: UNICAMP, 2002. Dissertação. 87p.

DAMM, U. et al. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 45-87, 2009.

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 orbiculare* species complex: important pathogens of field crops and weeds. **Fungal Diversity**, v. 61, n.1, p. 29-59, 2013.

DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414 – 430, 2012.

DEUS V. L. Influência dos métodos de secagem nas propriedades antioxidantes de cacau (*Theobroma cacao* L.). Salvador: UFBA, 2015. Dissertação. 45p.

DIAO, Y. Z. et al. *Colletotrichum* species causing anthracnose disease of chili in China. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 38, p. 20, 2017.

DOUANLA-MELI, C.; UNGER, J. G. Phylogenetic study of the *Colletotrichum* species on imported citrus fruits uncovers a low diversity and a new species in the *C. gigasporum* complex. **Fungal Biology**, v. 121, n. 10, p. 858-868, 2017.

DUBE, H. C.; BILGRAMI, K. S. *Pestalotia* or *Pestalotiopsis*?. **Mycopathologia et mycologia applicata**, v. 29, n. 1-2, p. 33-54, 1966.

EFRAIM, P. et al. Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, p.262-267, 2009.

EGGER K. N. Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 1415-1422, 1995.

GE, Q. 2009. **Flora fungorum sinicorum**. Science Press. 235p.

GRINGS, M.; BOLDRINI, I. I. O gênero *Pavonia* Cav. (Malvaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 3, p. 352-380, 2013.

GUBA E. F. **Monograph of Pestalotia and Monochaetia**. Cambridge: Harvard University Press, 1961.

GUYTON B. **Commodities – Cocoa Review**. New York: Issues, trends and performance of the chocolate and confectionery industries, 2003, 40 p.

HANADA, R. E. et al. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuacu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. **Fungal Biology**, v. 114, p. 901-910, 2010.

HANSEN, C. E.; DEL OLMO, M.; BURRI, C. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 77, n. 2, p. 273-281, 1998.

HU, H. L. et al. Phylogenetic diversity of endophytic *Pestalotiopsis* species in *Pinus armandii* and *Ribes* spp.: evidence from rDNA and  $\beta$ - tubulin gene phylogenies. **Fungal Diversity**, v. 24, p. 1–22, 2007.

HYDE K. D. et al. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**. v. 39, p. 1–17, 2009.

HYDE K. D. et al. One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic genera: I (2014). **Fungal Diversity**, v. 67, p. 21 e 125, 2014.

ICCO. **Produção Mundial de cacau (2016)**. Disponível em: <<https://www.icco.org/>> Acesso em: 20 jan. 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola 2016**. Disponível em: <<https://ww2.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=ba&tema=lavourapermanente2016>> Acesso em: 20 jan. de 2018.

JAYAWARDENA, R. S. et al. Identification and characterization of *Pestalotiopsis*-likefungi related to grapevine diseases in China. **Fungal Biology**, v. 119, n. 5, p. 348–61, 2015.

JAYAWARDENA, R. S. et al. Notes on currently accepted species of *Colletotrichum*. **Mycosphere**, v. 7, n. 8, p. 1192-1260, 2016.

JEEWON, R.; LIEW, E.C.Y.; HYDE K.D. Phylogenetic evaluation of species nomenclature of *Pestalotiopsis* in relation to host association. **Fungal Diversity**, n.17, p.39-55, 2004.



- 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.
- LEITE, J. B. V. et al. **Principais mitos que inibem a expansão do cultivo do cacau em regiões semi-áridas**. 2010.
- LIAO, C. Y. et al. Formation of highly branched hyphae by *Colletotrichum acutatum* within the fruit cuticles of *Capsicum* spp. **Plant Pathology**, v. 61, n. 2, p. 262-270, 2012.
- LIMA N. B. et al. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, p.75-88, 2013.
- LIU, F. L. et al. The *Colletotrichum gigasporum* species complex. **Persoonia**, v. 33, p. 83–97, 2014
- LOPES, U. V. et al. Cacao breeding in Bahia, Brazil - strategies and results. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, p. 73-81, 2011.
- MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. et al. A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species. **Fungal Diversity**, v. 56, n. 1, p. 95-129, 2012.
- MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. et al. *Pestalotiopsis* revisited. **Studies in Mycology** V. 79, p. 121 e 186, 2014a.
- MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. et al. Improving the backbone tree for the genus *Pestalotiopsis*; addition of *P. steyaertii* and *P. magna* sp. nov. **Mycological Progress**, v. 13, n. 3, p. 617–624, 2014b.
- MENDES, M. A. S. L. et al. 1998. **Fungos em Plantas no Brasil**. Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen. 555p.
- MENEZES, J. A. S.; CARMO-NETO, D. 1993. **A modernização do agribusiness cacau**. 2 ed. Campinas: Fundação Cargil. 180p.
- MILLS, P. R.; HODSON, A.; BROWN, A. E. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruits. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (eds.) ***Colletotrichum: biology, pathology and control***. Wallingford: CAB International. p 269–288, 1992.
- MOREAU, C. Micomycetes africains. I. Revue de Mycologie, **Suppliment Colonial**, v. 14, p. 15–22. 1949.
- MORORÓ R. C. Aproveitamento dos derivados, subprodutos e resíduos de cacau. In: VALLE, R. R. M. (Ed.), **Ciência, tecnologia e manejo do cacau**, Ilhéus: Ceplac. 2012.

- MÜLLER, M. W.; GAMA-RODRIGUES, A. C. Sistemas agroflorestais com o cacauero. In: VALLE, R. R. (Ed.). **Ciência, tecnologia e manejo do cacauero**. 2. ed. Ilhéus: CEPLAC, 2012. p. 246-271.
- MUNCH, S. et al. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. **Journal of plant physiology**, v. 165, n. 1, p. 41-51, 2008.
- NDUKWU M. C.; OGUNLOWO, A.S.; OLUKUNLE, O.J. Cocoa Bean (*Theobroma cacao* L.) Drying Kinetics. **Chilean journal of agricultural research**, v. 70, n. 4, p. 633-639, 2010.
- NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA. **Ocorrência e Manejo da mancha-café, causada pelo fungo *Colletotrichum truncatum*, na cultura do feijão-caupi em Roraima**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2008. 6p.
- O'CONNELL, R. J. et al. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Eds.). ***Colletotrichum: host specificity, pathology, and host pathogen interaction***. St. Paul: APS Press, 2000. p. 57-77.
- OETTERER, M. et al. 2006. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 612 p.
- OLIVEIRA M. L.; LUZ, E. D. M. N. **Identificação e manejo das principais doenças do cacauero no Brasil**. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC/SEFIT, 132p.
- OLIVEIRA M. L. Doenças do Cacauero. In: SODRÉ, G. A. **Cultivo do cacauero no estado da Bahia**. Ilhéus: MAPA/Ceplac/Cepec, 2017. 126 p.
- PARENTE V.M.; OLIVEIRA. JR.A.R.; COSTA A.M. **Projeto Potencialidades Regionais Estudo de Viabilidade Econômica. 2010 – Cacau**. Disponível em: <<http://www.suframa.gov.br>>. Acesso em: 20 nov. 2017.
- 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.
- PHOTITA, W. et al. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. **Mycological Research**, v. 105, p. 1508–1513, 2001.
- PHOULIVONG S. *Colletotrichum*, naming, control, resistance, biocontrol of weeds and current challenges. **Current Research in Environmental and Applied Mycology**, v. 1, n. 1, p. 53-73, 2011.
- PHOULIVONG S.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE K. D. Cross infection of *Colletotrichum* species; a case study with tropical fruits. **Current Research in Environmental & Applied Mycology**, v. 2, n. 2, p. 99 –111, 2012.
- POSSIGNOLO A. A. **Perfil protéico de sementes de acessos de cacauero no desenvolvimento do sabor de chocolate**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2010. Dissertação. 116p.

PRUSKY, D.; PLUMBLEY R. A. Quiescent infections of *Colletotrichum* in tropical and subtropical fruit. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.). ***Colletotrichum: biology, pathology and control***. Wallingford: Centre for Agriculture and Biosciences International, 1992. p. 289-307.

ROJAS, E. I. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. ***Mycologia***, v. 102, n. 6, p. 1318–1338, 2010.

ROMERO, A.; CARRIÓN, G.; RICO-GRAY, V. Fungal latent pathogens and endophytes from leaves of *Parthenium hysterophorus* (Asteraceae). ***Fungal Diversity***, v. 7, p. 81–87, 2001.

RUBINI, M.R. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. ***International Journal of Biological Sciences***, v.1, p.24-33, 2005.

SANTOS C. O. **Aproveitamento industrial de “mel” de cacau (*Theobroma cacao* L.) na produção de geléia sem adição de açúcar**. Salvador: UFBA, 2012. Dissertação. 92 p.

SANTOS R. R. et al. Avaliação de clones de cacau (*Theobroma cacao* L.) no Norte de Minas Gerais. ***Caderno de Ciências Agrárias***, v. 9, n. 2, p. 28-35, 2017.

SERENO, M.L. et al. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. ***Conservation Genetics***, v.7, p.13-24, 2006.

SFALSIN, E. **Caracterização morfológica e molecular de *Fusarium decemcellulare* agente etiológico da galha-floral do cacaueiro**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2012. Dissertação. 37p.

SHARMA, G.; PINNAKA, A.K.; SHENOY, B. D. ITS-based diversity of *Colletotrichum* from India. ***Current Research in Environmental & Applied Mycology***, v. 3, n. 2, p. 194–220, 2013.

SHENOY, B. D.; JEEWON, R.; HYDE K. D. Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. ***Fungal Diversity***, v. 26, n. 1, p. 1-54, 2007.

SILVA, S. D. V. M. et al. Resistência de progênies de cacaueiro à murcha-de-Ceratocystis. ***Tropical Plant Pathology***, v. 37, n. 3, p. 191-195, 2012.

SILVA NETO P. J. et al. 2001. **Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira**. Belém: CEPLAC, 125p.

SIMÕES, M.L.G. **Controle biológico de *Moniliophthora pernicioso*, agente causal da vassoura de bruxa do cacaueiro, por diferentes espécies e linhagens de *Trichoderma* spp.** Rio Claro: Universidade Estadual Paulista, 2010. Tese. 220p.

SODRÉ G. A. A espécie *Theobroma cacao*: novas perspectivas para a multiplicação de cacauero. **Revista Brasileira de Fruticultura.**, v. 29, n.2, 2007.

SOLARTE, A. F. et al. Diversity of *Neopestalotiopsis* and *Pestalotiopsis* spp., Causal Agents of Guava Scab in Colombia. **Plant Disease**, v. 102, n. 1, p. 49-59, 2018.

SOMARRIBA, E.; BEER, J. Productivity of *Theobroma cacao* agroforestry systems with timber or legume service shade trees. **Agroforestry Systems**, v. 81, n. 2, p. 109-121, 2010.

SOUNIGO, O. et al. Assessment of the value of doubled haploids as progenitors in cocoa (*Theobroma cacao* L.) breeding. **Journal of general and applied microbiology**, v. 49, n. 3, p. 339-354, 2003.

SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E.; MILLS, P. R. DNA sequence variation and interrelationship among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 41, n. 4, p. 265-281, 1992.

STEYAERT, R. L. Contributions à l'étude monographique de *Pestalotia* de Not. et *Monochaetia* Sacc. (*Truncatella* gen. nov. et *Pestalotiopsis* gen. nov.). **Bulletin du Jardin Botanique de l'État à Bruxelles**, v. 19, p. 285 – 354, 1949.

SUTTON B. C. 1980. **The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia Acervuli and Stomata**. Kew, England: Commonwealth Mycological Institute. 696p.

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

TALHINHAS, P. et al., Genetic and morphological characterisation of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. **Phytopathology**, v. 92, n. 9, p. 986-996, 2002.

TOZZE JÚNIOR, H. J. et al. Characterization of *Colletotrichum* spp. isolates associated with fruit trees in the state of São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 4, p. 270-280, 2015.

URTIAGA R. 1986. **Índice de enfermedades en plantas de Venezuela y Cuba**. Barquisimeto: Impresos en Impresos Nuevo Siglo. S.R.L. 202p.

WANG, Q. H. et al. Walnut anthracnose caused by *Colletotrichum siamense* in China. **Australasian Plant Pathology**, v. 46, n. 6, p. 585-595, 2017.

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

WILLIAMS, T. H.; LIU, P. S. W. A host list of plant diseases in Sabah, Malaysia. **Phytopathol.** v. 19, p. 1-67, 1976.

ZHANG, Y. M. et al. *Pestalotiopsis* species on ornamental plants in Yunnan Province, China. **Sydowia**, v. 65, n. 1, p. 113 e 128, 2013.

## **CAPÍTULO I**

**IDENTIFICAÇÃO DE *Colletotrichum* spp. ASSOCIADAS A ANTRACNOSE DO  
CACAUEIRO NOS ESTADOS DE ALAGOAS E BAHIA.**

### **3 IDENTIFICAÇÃO DE *Colletotrichum* spp. ASSOCIADAS A ANTRACNOSE DO CACAUEIRO NOS ESTADOS DE ALAGOAS E BAHIA.**

#### **Resumo:**

O cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) apresenta grande importância econômica para mais de 50 países. Contudo a cacauicultura brasileira tem passado por sérias dificuldades decorrentes de problemas fitossanitários, como a antracnose. Essa doença já foi relatada em muitos países, sempre associada a espécies do gênero *Colletotrichum*. No Brasil, os principais agentes etiológicos da doença são *C. gloeosporioides* e *C. crassipes*, no entanto, apenas dados morfológicos foram utilizados no processo de identificação, características consideradas insuficientes na separação de espécies pertencentes a esse gênero. O objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar espécies de *Colletotrichum* associados a antracnose do cacaueteiro. Folhas de cacaueteiro apresentando sintomas de antracnose, foram coletadas nos municípios de Igrapiúna-BA, Boca da Mata-AL e Maceió-AL. No laboratório foram realizados isolamentos indiretos e obtenção de culturas monospóricas. As identificações foram realizadas através de características morfoculturais e por filogenia utilizando sequências parciais das regiões genômicas, GAPDH, TUB2, CHS, ACT e CAL. As análises filogenéticas e morfológicas permitiram a identificação das espécies, *C. fructicola*, *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. aeshynomenes*, *C. tropicale*, *C. karstii*, *C. limeticola* e *C. gigasporum*. Esse é o primeiro relato dessas espécies associadas a antracnose em folhas de cacau no Brasil, além de ser o primeiro relato de *C. aeshynomenes*, *C. karstii* e *C. limeticola* causando antracnose na cultura do cacau no mundo.

**Palavras-Chave:** Cacauicultura. Doença foliar. Taxonomia. Filogenia.

## INTRODUÇÃO

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) apresenta grande importância econômica para muitos países do mundo (SERENO et al., 2006), tendo como principal produto comercializado, as sementes (ALVES 2002), que são processadas e utilizadas nas indústrias farmacológicas, cosmética e alimentícia, principalmente, na fabricação de chocolates (SILVA NETO et al., 2001).

De acordo com a International Cocoa Organization, os maiores produtores de cacau são, Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Equador e Camarões, contribuindo com cerca de 80% da produção mundial. O Brasil, ocupa a sexta posição desse ranking com aproximadamente 5% da produção, concentrada principalmente, nas regiões Norte e Nordeste, sendo o estado da Bahia o maior produtor (ICCO 2016; IBGE 2016).

A cultura é hospedeira de diversos patógenos que causam doenças capazes de ocasionar perdas significativas na produção de amêndoas. A antracnose do cacauieiro ocorre em todos os países produtores, causando grande perda de produtividade na Colômbia e alguns países da África e da Ásia (BARROS 1981; OLIVEIRA; LUZ 2005). No Brasil, a doença está associada a duas espécies do gênero *Colletotrichum*, contudo, as identificações foram realizadas apenas por dados morfológicos, considerados insuficientes na identificação de espécies desse gênero (MENDES et al., 1998; OLIVEIRA 2017).

Durante muito tempo espécies de *Colletotrichum* foram identificadas com base em caracteres morfoculturais e gama de hospedeiro. No entanto, a plasticidade dessas características e a inespecificidade dessas espécies quanto aos hospedeiros, tornaram essa metodologia insuficiente para a identificação precisa de espécies de *Colletotrichum*, tendo ocasionado diversas sinonímias (PHOULIVONG et al., 2012; CANNON et al., 2012; LIMA et al., 2013). As técnicas moleculares têm sido utilizadas de forma satisfatória, permitindo maior confiabilidade na identificação de espécies (JAYAWARDENA et al., 2016; WEIR et al., 2012; LIMA 2013).

Atualmente as regiões genômicas  $\beta$ -tubulina (TUB2), Actina (ACT), Calmodulina (CAL), Glutamina sintetase (GS), Quitina sintase (CHS), Histona (HIS), Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e o Espaço Interno Transcrito (ITS-rDNA), tem sido frequentemente utilizadas para identificação precisa das espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum* (DAMM et al., 2013, SHARMA et al., 2013; LIU et al., 2014)

Considerando a importância social e econômica dessa cultura para o Brasil, objetivou-se com esse estudo, identificar e caracterizar espécies de *Colletotrichum* associadas a antracnose do cacauero nos estados de Alagoas e Bahia.

## MATERIAL E MÉTODOS

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

### Obtenção dos isolados.

Folhas de cacauero (em diferentes estágios de maturação) apresentando lesões necróticas (Figura 1), foram coletadas nos municípios de Igrapiúna-BA, Boca da Mata-AL e Maceió-AL.



**Figura 1-** Sintomas causados por *Colletotrichum* spp. em folhas de cacauero (*Theobroma cacao* L.).

No Laboratório foram realizados isolamentos indiretos, a partir de fragmentos da área de transição entre o tecido sadio e o doente, os quais foram desinfestados com soluções de álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto, lavados em água destilada esterilizada (ADE) por 3 vezes, postos para secar em papel de filtro e posteriormente transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar). Após a formação das colônias, discos de meio de cultura com o crescimento micelial do patógeno, foram retirados das bordas das colônias e transferidos para novas placas de Petri contendo meio BDA e mantidos à temperatura de 25°C até o



surgimento das estruturas de reprodução do patógeno para posterior identificação e obtenção das culturas monospóricas.

### **Teste de patogenicidade e agressividade**

O teste de patogenicidade foi realizado em folhas assintomáticas destacadas de plantas de cacauzeiros cultivados em casa de vegetação do CECA/UFAL. As folhas foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio a 1% por cinco minutos, lavadas em água destilada e esterilizada (ADE) e secas à temperatura ambiente. Foram utilizados dois métodos de inoculação (suspensão de esporos e discos de BDA com estruturas do patógeno). Para ambos os métodos, as folhas foram feridas, com o auxílio de uma agulha esterilizada, em cinco pontos equidistantes.

No primeiro método, as inoculações foram realizadas através da aplicação de uma gota de 30µL de uma suspensão com  $10^6$  esporos mL<sup>-1</sup>, sobre cada ponto de inoculação, e no tratamento controle aplicou-se uma gota 30µL de ADE. No segundo método, um disco de BDA de 5mm contendo estruturas do patógenos, foi depositado sobre cada ponto de inoculação e no tratamento controle, foi depositado um disco de BDA sem estruturas do patógeno. Cada folha foi acondicionada em uma bandeja coberta por saco plástico contendo um chumaço de algodão umedecido com ADE para proceder a câmara úmida por 48 horas. O teste foi mantido por 7 dias a  $25 \pm 1$  ° C e fotoperíodo de 12 h. Com o objetivo de avaliar a agressividade dos isolados, as lesões foram medidas com auxílio de paquímetro digital em duas direções diametralmente opostas e as médias foram submetidas a análise de variância sendo os valores obtidos comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A partir das lesões foram realizados novos isolamentos, cumprindo-se assim os Postulados de Koch.

### **Caracterização molecular**

Na caracterização molecular realizou-se a extração de DNA, seguindo o protocolo CTAB adaptado de Doyle & Doyle (1987), a partir de colônias crescidas em meio líquido de L-asparagina durante cinco dias. Inicialmente as amplificações foram realizadas utilizando o par de primer GDR/GDF, específico para o gene que codifica para proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Tabela 1). Os produtos das amplificações foram enviados para purificação e sequenciamento na empresa Macrogen (Seul, Coreia do Sul). Com base nesta primeira análise, representantes de cada espécie

tiveram seu DNA utilizado em outras reações utilizando os pares de “primers” T1/T2, ACACT-783R/T-512F, CL1C/CL2C e CHS-345R/CHS-79F, visando à amplificação dos genes  $\beta$ -tubulina (TUB), actina (ACT), calmodulina (CAL) e quitina sintase (CHS), respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1** - “primers” usados para identificação de espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum*.

Gene	Primer	Sequências (5' - 3')	Referências
GAPDH	GDR	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	Guerber et al., 2003
	GDF	GGGTGGAGTCGTACTTGAGCATGT	
TUB	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	O'Donnell; Cigel'nik 1997
	T2	TAGTGACCCTTGGCCCAGTTG	
ACT	ACACT-783R	ATGTGCAAGGCCGTTTCGC	Carbone; kohn 1999
	T-512F	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	
CAL	CL1C	GAATTCAAGGAGGCCTTCTC	Weir et al., 2012
	CL2C	CTTCTGCATCATGAGCTGGAC	
CHS	CHS-345R	TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG	Carbone; kohn 1999
	CHS-79F	TGGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG	

As sequências de nucleotídeos obtidas, foram montadas com o software Codon Code Aligner v. 6.0.2, e analisadas visualmente. O arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas, foram corrigidos por comparação das sequências nos sentidos senso e anti-senso. Inicialmente as análises foram feitas com o algoritmo BLAST $n$  (ALTSCHUL et al., 1990) e o banco de dados não-redundantes GenBank. Sequências de referência para várias espécies de *Colletotrichum* foram obtidas a partir do GenBank (Tabela 2) e utilizadas para reconstrução da árvore filogenética.

Alinhamentos múltiplos para sequências nucleotídicas foram obtidos usando o algoritmo MUSCLE (EDGAR 2004) no programa MEGA v. 6 (TAMURA et al., 2013). As filogenias de Inferência Bayesiana (BI) para os conjuntos de dados GAPDH, B-TUB, ACT, CAL e CHS (individuais e concatenados) foram reconstruídas no portal CIPRES (MILLER et al., 2017) usando MrBayes v. 3.2.3 (RONQUIST et al., 2012). O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi determinado para cada região genômica usando MrModeltest v. 2.3 (POSADA; BUCKLEY 2004) de acordo com o Akaike Information Criterion (AIC). Análises foram rodadas por 10 milhões de gerações usando quatro cadeias e amostrando a cada 1.000 gerações, para um total de 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas como uma fase de “burn-in”. Probabilidades

posteriores (RANNALA; YANG 1996) foram determinadas 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](http://ztree.bio.ed.ac.uk/software/figtree)) e Inkscape (<https://inkscape.org/pt/>).

**Tabela 2** - Sequências de *Colletotrichum* spp. obtidas do GenBank e usadas nas análises filogenéticas.

Espécies	Cultura	Nº de acesso no GenBank				
		GAPDH	TUB	ACT	CAL	CHS
<i>Colletotrichum acutatum</i>	CBS 126521	JQ948697	JQ950017	JQ949687	-	JQ949027
<i>C. acutatum</i>	IMI223120	JQ948684	JQ950004	JQ949674	-	JQ949014
<i>Colletotrichum aenigma</i> *	C1253.4	JX010044	JX010389	JX009443	JX009683	JX009774
<i>C. aenigma</i>	C1256.6	JX009913	JX010390	JX009519	JX009684	JX009789
<i>C. aeshynomenes</i> *	ICMP17673	JX009930	JX010392	JX009483	JX009721	JX009799
<i>C. aeshynomenes</i> **	COUFAL0174	-	-	-	-	-
<i>C. aeshynomenes</i> **	COUFAL0175	-	-	-	-	-
<i>C. aeshynomenes</i> **	COUFAL0176	-	-	-	-	-
<i>Colletotrichum alatae</i> *	C1275.5	JX009990	JX010383	JX009471	JX009738	JX009837
<i>C. alatae</i>	C1276.6	JX010011	JX010449	JX009470	JX009739	JX009846
<i>Colletotrichum alienum</i> *	C824	JX010028	JX010411	JX009572	JX009654	JX009882
<i>C. alienum</i>	C1189	JX010018	JX010385	JX009580	JX009664	JX009754
<i>Colletotrichum annellatum</i> *	CBS 129826	JQ005309	JQ005656	JQ005570	JQ005743	JQ005396
<i>Colletotrichum arxii</i> *	CBS 132511	KF687843	KF687881	KF687802	KF687819	KF687780
<i>C. arxii</i>	CBS 169.59	KF687824	KF687868	KF687784	-	KF687781
<i>Colletotrichum asianum</i> *	C1315.4	JX010053	JX010406	JX009584	FJ917506	JX009867
<i>C. asianum</i>	C1187	JX009915	JX010384	JX009576	JX009723	JX009753
<i>Colletotrichum boninense</i>	CBS 128547	JQ005246	JQ005593	JQ005507	JQ005680	JQ005333
<i>C. boninense</i>	CBS 123756	JQ005241	JQ005589	JQ005502	JQ005675	JQ005328
<i>Colletotrichum brasiliense</i> *	CBS 128501	JQ005322	JQ005669	JQ005583	JQ005756	JQ005409
<i>C. brasiliense</i>	CBS 128528	JQ005321	JQ005668	JQ005582	JQ005755	JQ005408
<i>Colletotrichum chrysanthemi</i>	CBS126519	JQ948602	JQ949923	JQ949593	-	JQ948933
<i>Colletotrichum clidemiae</i> *	C1317.1	JX009989	JX010438	JX009537	JX009645	JX009877
<i>C. clidemiae</i>	C1254.10	JX009909	JX010439	JX009476	JX009639	JX009777
<i>Colletotrichum constrictum</i> *	CBS 128504	JQ005325	JQ005672	JQ005586	JQ005759	JQ005412
<i>C. constrictum</i>	CBS 128503	JQ005324	JQ005671	JQ005585	JQ005758	JQ005411
<i>Colletotrichum cosmi</i> *	CBS 853.73	JQ948604	JQ949925	JQ949595	-	JQ948935
<i>Colletotrichum costaricense</i> *	CBS 330.75	JQ948510	JQ949831	JQ949501	-	JQ948841
<i>C. costaricense</i>	CBS 211.78	JQ948511	JQ949832	JQ949502	-	JQ948842
<i>Colletotrichum cuscutae</i> *	IMI304802	JQ948525	JQ949846	JQ949516	-	JQ948856
<i>Colletotrichum dacrycarpi</i> *	CBS 130241	JQ005323	JQ005670	JQ005584	JQ005757	JQ005410
<i>Colletotrichum fioriniae</i>	CBS 125396	JQ948629	JQ949950	JQ949620	-	JQ948960

Continua...

**...Continuação**

<i>C. fioriniae</i>	IMI 324996	JQ948631	JQ949952	JQ949622	-	JQ948962
<i>Colletotrichum fruticola</i> *	C1316.21	JX010032	JX010409	JX009581	JX009674	JX009874
<i>C. fruticola</i>	C1266.9	JX009997	-	JX009469	JX009668	JX009820
<i>C. fruticola</i>	C1276.4	JX010041	JX010401	JX009436	JX009670	JX009844
<i>C. fruticola</i>	C1216.5	JX009946	-	JX009529	JX009680	JX009762
<i>C. fruticola</i> **	COUFAL0177	-	-	-	-	-
<i>C. fruticola</i> **	COUFAL0178	-	-	-	-	-
<i>C. fruticola</i> **	COUFAL0179	-	-	-	-	-
<i>C. fruticola</i> **	COUFAL0180	-	-	-	-	-
<i>C. fruticola</i> **	COUFAL0181	-	-	-	-	-
<i>C. gigasporum</i>	CBS 124947	KF687828	KF687871	KF687786	KF687810	KF687763
<i>C. gigasporum</i>	CBS 125731	KF687837	KF687879	KF687794	KF687818	KF687771
<i>C. gigasporum</i> **	COUFAL0182	-	-	-	-	-
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> *	IMI356878	JX010056	JX010445	JX009531	JX009731	JX009818
<i>C. gloeosporioides</i>	DYHY2	KY454842	KY454844	KY454841	KY454845	KY454843
<i>Colletotrichum guajavae</i> *	IMI350839	JQ948600	JQ949921	JQ949591	-	JQ948931
<i>Colletotrichum hippeastri</i>	CBS 241.78	JQ005319	JQ005666	JQ005580	JQ005753	JQ005406
<i>C. hippeastri</i>	CBS 125377	JQ005317	JQ005664	JQ005578	JQ005751	JQ005404
<i>Colletotrichum karstii</i>	CBS 128500	JQ005289	JQ005636	JQ005550	JQ005723	JQ005376
<i>C. karstii</i>	CBS 128550	JQ005306	JQ005653	JQ005567	JQ005740	JQ005393
<i>C. karstii</i> **	COUFAL0183	-	-	-	-	-
<i>C. karstii</i> **	COUFAL0184	-	-	-	-	-
<i>Colletotrichum limetticola</i> *	CBS 114.14	JQ948523	JQ949844	JQ949514	-	JQ948854
<i>C. limetticola</i> **	COUFAL0185	-	-	-	-	-
<i>Colletotrichum lupini</i> *	CBS 109225	JQ948485	JQ949806	JQ949476	-	JQ948816
<i>C. lupini</i>	CBS 129944	JQ948508	JQ949829	JQ949499	-	JQ948839
<i>Colletotrichum magnisporum</i> *	CBS 398.84	KF687842	KF687882	KF687803	-	KF687782
<i>Colletotrichum melonis</i> *	CBS 159.84	JQ948524	JQ949845	JQ949515	-	JQ948855
<i>Colletotrichum novae-zelandiae</i> *	CBS 128505	JQ005315	JQ005662	JQ005576	JQ005749	JQ005402
<i>C. novae-zelandiae</i>	CBS 130240	JQ005316	JQ005663	JQ005577	JQ005750	JQ005403
<i>Colletotrichum nupharicola</i> *	C1275.25	JX009972	JX010398	JX009437	JX009663	JX009835
<i>C. nupharicola</i>	C1275.26	JX010031	JX010399	JX009582	JX009662	JX009836
<i>Colletotrichum nymphaeae</i> *	CBS100064	JQ948554	JQ949875	JQ949545	-	JQ948885
<i>C. nymphaeae</i>	CBS100065	JQ948555	JQ949876	JQ949546	-	JQ948886
<i>Colletotrichum parsonsiae</i> *	CBS 128525	JQ005320	JQ005667	JQ005581	JQ005754	JQ005407
<i>Colletotrichum pseudomajus</i> *	CBS 571.88	KF687826	KF687883	KF687801	KF687807	KF687779
<i>Colletotrichum queenslandicum</i> *	ICMP 1778	JX009934	JX010414	JX009447	JX009691	JX009899
<i>C. queenslandicum</i>	C956.1	JX010036	JX010412	JX009490	JX009694	JX009890
<i>Colletotrichum radicis</i> *	CBS 529.93	KF687825	KF687869	KF687785	KF687806	KF687762
<i>Colletotrichum salsolae</i> *	C1314	JX009916	JX010403	JX009562	JX009696	JX009863
<i>C. salsolae</i>	C1257.6	JX009917	-	JX009559	JX009695	JX009791
<i>Colletotrichum scovillei</i> *	CBS 126529	JQ948597	JQ949918	JQ949588	-	JQ948928
<i>C. scovillei</i>	CBS 126530	JQ948598	JQ949919	JQ949589	-	JQ948929

Continua...

**...Continuação**

<i>Colletotrichum siamense</i>	C1263.1	JX010058	-	JX009446	JX009706	JX009804
<i>C. siamense</i>	C1254.6	JX009922	-	JX009482	JX009710	JX009782
<i>C. siamense</i>	C1254.9	JX009996	-	JX009435	JX009712	JX009784
<i>C. siamense</i>	C1263.13	JX009984	-	JX009461	JX009704	JX009806
<i>C. siamense**</i>	COUFAL0186	-	-	-	-	-
<i>C. siamense**</i>	COUFAL0187	-	-	-	-	-
<b>Continuação</b>						
<i>C. siamense**</i>	COUFAL0188	-	-	-	-	-
<i>C. siamense**</i>	COUFAL0189	-	-	-	-	-
<i>Colletotrichum sp.</i>	CBS 129823	JQ948522	JQ949843	JQ949513	-	JQ948853
<i>Colletotrichum sp.</i>	GM77	KC506411	KC512202	KC512181	KC512223	KC512160
<i>Colletotrichum tamarilloi*</i>	CBS 129814	JQ948514	JQ949835	JQ949505	-	JQ948845
<i>C. tamarilloi</i>	CBS 129811	JQ948515	JQ949836	JQ949506	-	JQ948846
<i>Colletotrichum thailandicum*</i>	MFUCC110113	JN050231	JN050248	JN050220	-	-
<i>C. thailandicum</i>	CMSP34/LC0958	JN050232	JN050249	JN050221	-	KF687759
<i>Colletotrichum theobromicola*</i>	C1262.14	JX009953	JX010376	JX009496	JX009593	JX009801
<i>C. theobromicola</i>	C1262.15	JX010029	JX010374	JX009449	JX009594	JX009802
<i>C. theobromicola</i>	C1254.2	JX009957	-	JX009493	JX009588	JX009778
<i>C. theobromicola**</i>	COUFAL0190	-	-	-	-	-
<i>C. theobromicola**</i>	COUFAL0191	-	-	-	-	-
<i>C. theobromicola**</i>	COUFAL0192	-	-	-	-	-
<i>C. theobromicola**</i>	COUFAL0193	-	-	-	-	-
<i>Colletotrichum tropicale*</i>	5101	JX010007	JX010407	JX009489	JX009719	JX009870
<i>C. tropicale</i>	C1272.16	JX010020	JX010396	JX009480	JX009722	JX009826
<i>C. tropicale</i>	C1316.12	JX010014	-	JX009570	JX009720	JX009868
<i>C. tropicale**</i>	COUFAL0194	-	-	-	-	-
<i>C. tropicale**</i>	COUFAL0195	-	-	-	-	-
<i>Colletotrichum vietnamense*</i>	CBS 125478	KF687832	KF687877	KF687792	KF687816	KF687769
<i>C. vietnamense</i>	CBS 125477	KF687831	KF687876	KF687791	KF687815	KF687768
<i>Colletotrichum xanthorrhoeae*</i>	C1271	JX009927	JX010448	JX009478	JX009653	JX009823
<i>C. xanthorrhoeae</i>	C1266.10	JX010008	-	JX009479	JX009652	JX009814
<i>Colletotrichum walleri*</i>	CBS 125472	JQ948605	JQ949926	JQ949596	-	JQ948936
<i>Colletotrichum truncatum</i>	COUFAL0058	KY319104	KY319113	KY319125	KY319128	KY319131

**\*espécies ex-tipo utilizadas no trabalho; \*\*espécies identificadas no presente estudo**

### Caracterização morfológica e cultural

A caracterização morfológica das espécies baseou-se no tamanho e forma dos conídios e apressórios de cada espécie de *Colletotrichum*, previamente identificadas na análise multilocus. Tais estruturas foram visualizadas em microscópio de luz (Olympus CKX41) com o auxílio da câmera Olympus SC30 e mensurados no software CellSenses Standard. O formato e o tamanho de 50 conídios e apressórios foram avaliados de acordo

com a chave de identificação proposta por Sutton (1992). Para caracterização cultural, as colônias fúngicas foram cultivadas em BDA sintético e SNA e incubadas em B.O.D. a 25 °C, onde realizou-se avaliações diárias em duas direções diametralmente opostas com o auxílio de um paquímetro digital durante sete dias para calcular o índice de crescimento micelial - ICM ( $\text{mm dia}^{-1}$ ).

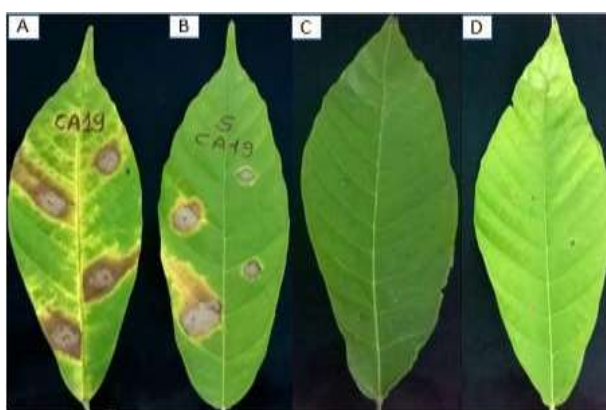
## RESULTADOS

### Obtenção dos isolados

Quarenta e cinco isolados foram obtidos partir das três regiões de coleta, sendo quarenta isolados provenientes do município de Igrapiúna/BA, quatro isolados do município de Boca da Mata/AL, e um isolado do município de Maceió/AL.

### Teste de patogenicidade

Todos os isolados causaram lesões necróticas nas folhas de cacaueteiro, tanto nas inoculações com discos de BDA contendo estruturas do patógeno, quanto nas inoculações feitas a partir de suspensão de esporos (Figura 2). As menores lesões foram causadas pela espécie *C. aeshynomenes*, não diferindo estatisticamente das lesões observadas para as espécies, *C. tropicale*, *C. siamense*, *C. fructicola*, *C. theobromicola*, *C. gigasporum* e *C. karstii*. Já as maiores lesões foram observadas na espécie *C. limetticola*, que não diferiu de *C. siamense*, *C. gigasporum* e *C. karstii* (Tabela 3).



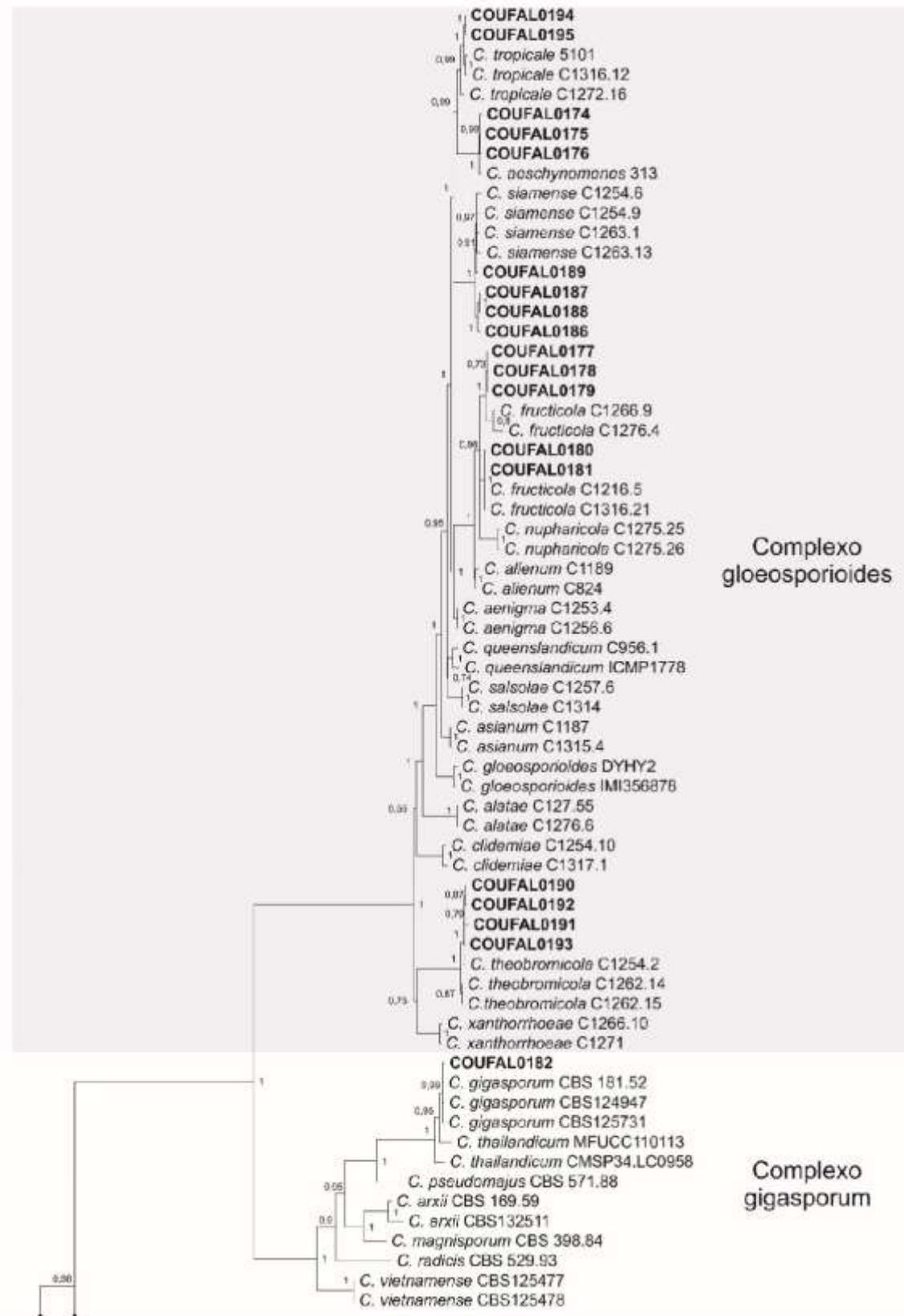
**Figura 2-** Sintomas causados por isolados de *Colletotrichum* spp. em folhas de cacaueteiro oito dias após a inoculação com: A - Discos de BDA contendo micélio das espécies, B - Suspensão de esporos, C – Testemunha com discos de BDA e D – Testemunha com ADE.

## Caracterização molecular

A árvore filogenética construída para os dados individuais das sequências de GAPDH, permitiu a atribuição preliminar de oito espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, dentre os 45 isolados obtidos no presente estudo. Constatando a presença de sequências haplóticas para este gene, 22 isolados foram selecionados para compor a filogenia com a adição das regiões genômicas ACT, CAL, CHS e TUB.

Na reconstrução da árvore filogenética de inferência Bayesiana, os seguintes modelos evolutivos GTR+I+G, GTR+I+G, SYM+I+G, HKY+I+G e GTR+G foram utilizados para os alinhamentos de sequências nucleotídicas de forma concatenada para os dados de ACT, CAL, CHS, GAPDH e TUB, respectivamente. *Colletotrichum truncatum* (CBS: 120709) foi utilizado como ““outgroup”” na árvore filogenética.

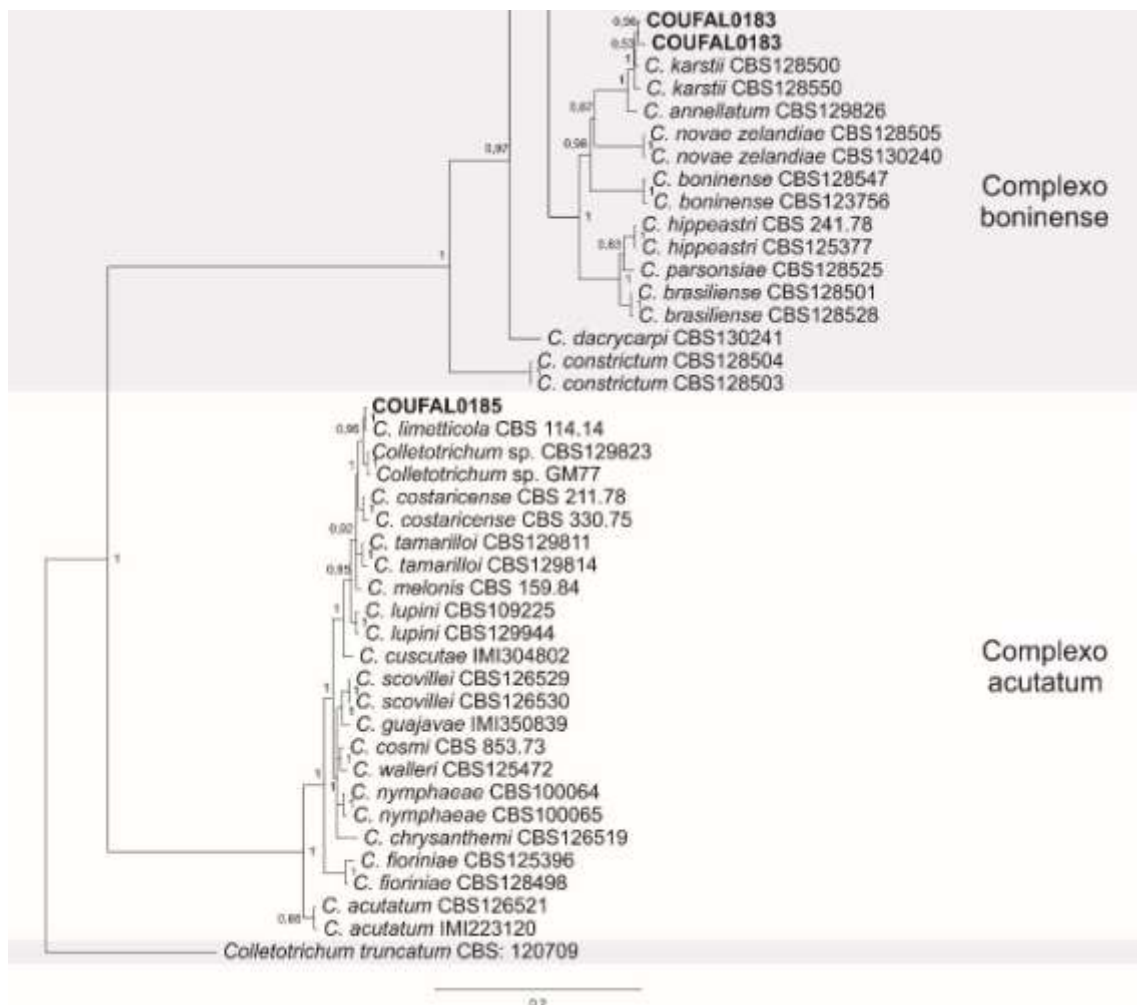
A árvore de inferência Bayesiana para os dados combinados (GAPDH, TUB, ACT, CAL e CHS) revelaram oito espécies que se agruparam em quatro complexos do gênero *Colletotrichum* formando grupos bem suportados, confirmando os resultados observados na análise preliminar feita a partir das sequências de GAPDH (figura 3). Na árvore filogenética é possível observar que dentre os 22 isolados utilizados para compor a filogenia, 18 agruparam no complexo *C. gloeosporioides* com cinco espécies identificadas: *C. fructicola* (COUFAL0177, COUFAL0178, COUFAL0179, COUFAL0180 e COUFAL0181), *C. siamense* (COUFAL0186, COUFAL0187, COUFAL0188 e COUFAL0189), *C. theobromicola* (COUFAL0190, COUFAL0191, COUFAL0192 e COUFAL0193), *C. aeshynomenes* (COUFAL0174, COUFAL0175 e COUFAL0176) e *C. tropicale* (COUFAL0194 e COUFAL0195), dois isolados se agruparam no complexo *C. boninense* com a espécie *C. karstii* (COUFAL0183 e COUFAL0184), um isolado no complexo acutatum agrupado com a espécie *C. limeticola* (COUFAL0185) e um isolado no complexo gigasporum agrupando com a espécie: *C. gigasporum* (COUFAL0182).



Continua...



...Continuação



**Figura 3** – Árvore filogenética de Inferência Bayesiana baseada nas sequências concatenadas dos genes ACT, CAL, CHS, GAPDH e  $\beta$ -tub. A árvore foi enraizada com *Colletotrichum truncatum* (out-group). Os isolados estudados no presente trabalho, estão marcados em negrito.

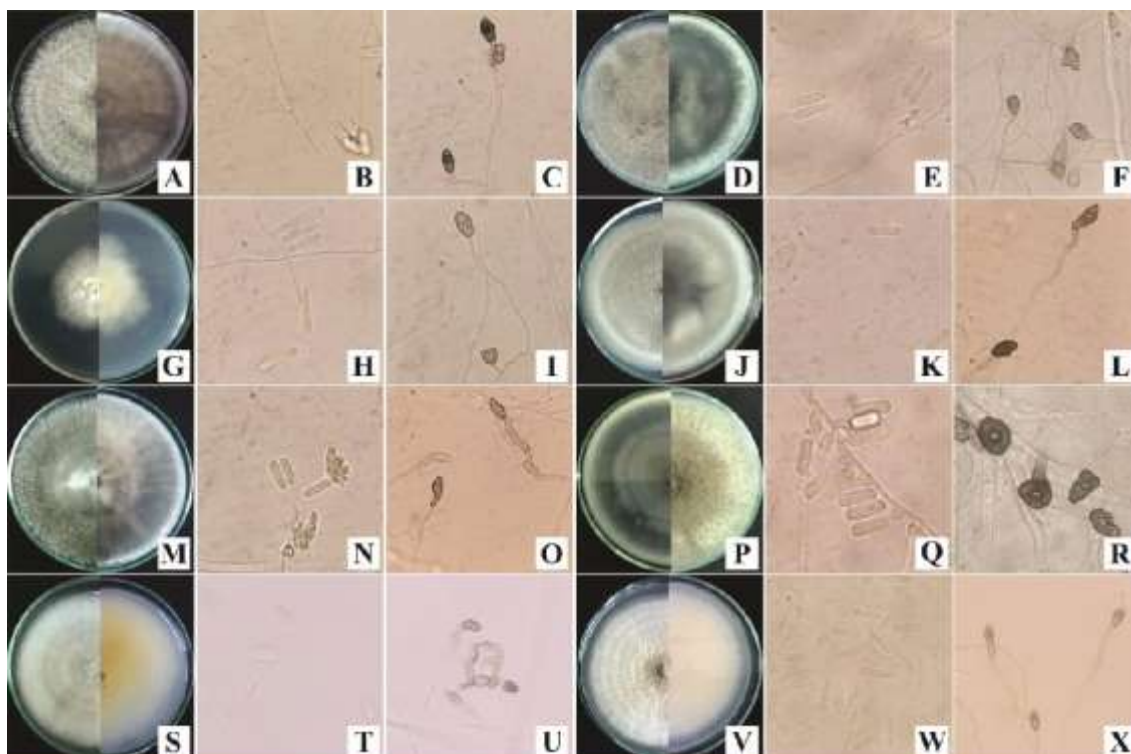
### Caracterização cultural e morfológica

Os dados culturais e morfológicos estão de acordo com a caracterização filogenética para as respectivas espécies identificadas no presente estudo: *C. aeshynomenes*, *C. fructicola*, *C. gigasporum*, *C. karstii*, *C. limetticola*, *C. siamense*, *C. theobromicola* e *C. tropicale* (Tabela 3; Figura 4).

**Tabela 3** - Características morfológicas e culturais das espécies de *Colletotrichum* identificadas neste estudo.

Espécies	Conídios (µm)					Apressórios (µm)				ICM*	Características da Colônia (Verso/Reverso)	D.L. (mm)
	BDA		SNA		Forma	BDA		SNA				
	Comp.	Larg.	Comp.	Larg.		Comp.	Larg.	Comp.	Larg.			
<i>C. tropicale</i> <sup>1</sup>	(12,24-16,65)	(3,35-5,44)	(13,79-19,80)	(4,20-6,72)	Cilíndrico	(7,86-14,71)	(5,00-8,12)	(7,64-14,22)	(4,64-9,62)	11,39	Cinza claro/Cinza esverdeado	10,02 <sup>a</sup>
<i>C. aeshynomenes</i> <sup>1</sup>	(13,04-18,95)	(3,4-5,39)	(13,21-23,08)	(3,39-6,94)	Cilíndrico	(8,01-14,02)	(5,02-7,89)	(8,59-16,58)	(4,6-9,62)	5,78	Cinza claro/Cinza escuro com bordas brancas	8,58 <sup>a</sup>
<i>C. siamense</i> <sup>1</sup>	(10,56-16,40)	(2,53-5,43)	(19,87-20,00)	(4,18-6,28)	Fusiforme	(8,92-12,60)	(4,39-8,94)	(12,02-15,88)	(3,49-6,18)	9,12	Cinza claro/Cinza escuro	10,43 <sup>ab</sup>
<i>C. fructicola</i> <sup>1</sup>	(10,00-14,04)	(4,12-7,08)	(7,02-14,93)	(4,44-7,96)	Cilíndrico	(9,7-15,98)	(6,60-10,5)	(7,8-17,23)	(5,28-10,2)	6,57	Cinza claro com bordas brancas/Cinza escuro com bordas brancas	9,7 <sup>a</sup>
<i>C. theobromicola</i> <sup>1</sup>	(10,37-14,40)	(2,95-5,49)	(11,48-20,59)	(4,75-7,64)	Cilíndrico	(7,40-15,43)	(4,81-8,78)	(---)	(---)	10,74	Cinza claro/Cinza esverdeado	9,78 <sup>a</sup>
<i>C. gigasporum</i> <sup>2</sup>	(19,03-27,11)	(6,23-8,33)	(---)	(---)	Cilíndrico	(18,87-28,43)	(7,22-16,24)	(18,16-38,53)	(9,68-12,78)	8,26	Cinza escuro/Cinza escuro	10,18 <sup>ab</sup>
<i>C. karstii</i> <sup>3</sup>	(11,71-18,49)	(5,50-8,00)	(---)	(---)	Cilíndrico	(8,50-16,58)	(5,20-9,94)	(---)	(---)	6,46	Branco/Branco alaranjado	10,73 <sup>ab</sup>
<i>C. limetticola</i> <sup>4</sup>	(11,32-17,45)	(3,67-5,46)	(12,09-21,73)	(3,85-7,00)	Cilíndrico	(10,59-20,80)	(5,19-9,34)	(12,09-19,8)	(3,85-4,95)	6,85	Cinza claro com massa alaranjada/Salmão	12,35 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> espécies pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides*; <sup>2</sup> espécie pertencente ao complexo *C. gigasporum*; <sup>3</sup> espécie pertencente ao complexo *C. boninense*; <sup>4</sup> espécie pertencente ao complexo *C. acutatum*; \* índice de crescimento micelial em mm dia<sup>-1</sup>; D.L.- média do diâmetro das lesões (as médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade).



**Figura 4-** Características morfoculturais das espécies de *Colletotrichum* identificadas no presente estudo (Verso e reverso da colônia aos 7 dias de idade, conídios e apressórios). **ABC** - *C. tropicale*; **DEF** - *C. aeshynomenes*; **GHI** - *C. siamense*; **JKL** - *C. fructicola*; **MNO** - *C. theobromicola*; **PQR** - *C. gigasporum*; **STU** - *C. karstii*; **VWX** - *C. limetticola*.

## DISCUSSÃO

O gênero *Colletotrichum* é considerado um dos mais importantes grupos de fungos fitopatogênicos do mundo, distribuído principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (DEAN et al., 2012; CANNON et al., 2012). As espécies deste gênero são distribuídas em quatorze complexos, nos quais se agrupam por compartilharem características morfológicas e culturais semelhantes e serem filogeneticamente, muito próximas (DAMM et al., 2012a; DAMM et al., 2012b. DAMM et al., 2013; WEIR et al., 2012).

No presente estudo foram identificadas cinco espécies pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides*: *C. fructicola*, *C. Theobromicola*, *C. siamense*, *C. tropicale* e *C. aeshynomenes*. Este complexo é considerado o mais relevante, por agrupar número maior de espécies e causar doença em muitos hospedeiros de importância econômica (JAYAWARDENA et al., 2016). *Colletotrichum fructicola*, *C. Theobromicola* e *C.*

*siamense*, apresentam ampla gama de hospedeiros estando associadas a aproximadamente 26, 19 e 45 gêneros de plantas, respectivamente (USDA, 2018). No Brasil, *C. fructicola* já foi relatado nas culturas da mandioca (*Manihot esculenta*), maçã (*Malus domestica*), manga (*Mangifera indica*), feijão fava (*Phaseolus lunatus*), palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*), cajueiro (*Anacardium* spp.), maracujazeiro (*Passiflora edulis*), orquídea (*Cyrtopodium cardiochilum*), romã (*Punica granatum*) e *Annona* spp. (COSTA et al., 2017; MUNIR et al., 2016; JOA et al., 2016; BRAGANCA et al., 2016; LIMA et al., 2013; CONFORTO et al., 2017, OLIVEIRA 2016; VELOSO et al., 2018; BATISTA 2016; LIMA 2012; ITO et al., 2017; SOUZA et al., 2018; ).

*Colletotrichum theobromicola*, teve sua primeira ocorrência no Brasil em 2014 na cultura do eucalipto (*Eucalyptus* sp.) (RODRIGUES et al., 2014) sendo posteriormente identificada em outros hospedeiros como acerola (*Malpighia emarginata*), cambuci (*Campomanesia phaea*), alho (*Allium sativum*), carnaúba (*Copernicia prunifera*), mandioca (*Manihot esculenta*), sapoti (*Manilkara zapota*), romã (*Punica granatum*), seringueira (*Hevea brasiliensis*) e *Annona* sp. (BRAGANCA et al., 2014; SANTOS et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018; ARAÚJO et al., 2018; MARTINS et al., 2018; COSTA et al., 2014; BATISTA 2016; MATOS et al., 2017). Já a espécie *C. siamense*, foi identificada nas culturas do morango (*Fragaria x Ananassa*), café (*Coffea* spp.), goiaba (*Psidium guajava*), pimentão (*Capsicum annuum*), Palma Forrageira (*Nopalea cochenillifera*), seringueira (*Hevea brasiliensis*), caju (*Anacardium* spp.), alpínia (*Alpinia purpurata*) *Manihot* spp., e *Annona* sp. (USDA, 2018; SARMIENTO 2013; CONFORTO et al., 2017, OLIVEIRA 2016; SILVA et al., 2017; VELOSO et al., 2018; CHAVES et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018; COSTA et al., 2014).

As espécies *C. tropicale* e *C. aeshynomenes* apresentam gama de hospedeiro mais restrita. A primeira já foi relatada em oito gêneros de plantas distribuídos em quatro países incluindo o Brasil, onde causa antracnose em caju (*Anacardium occidentale*), carnaúba (*Copernicia prunifera*), *Mangifera indica*, *Annona* sp., *Capsicum* spp. e *Manihot* spp. (VELOSO et al., 2018; ARAÚJO et al., 2018; VIEIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016; SILVA et al., 2017; COSTA et al., 2014; USDA 2018). A espécie *C. aeshynomenes* foi relatada em apenas dois hospedeiros: *Aeshynomene virginica*, nos Estados Unidos (WEIR et al., 2012; USDA 2018) e em *Manihot esculenta*, na Tailândia (SANGPUEAK et al., 2018).

No cacaueteiro, algumas espécies do complexo *C. gloeosporioides*, já foram relatadas em diversos países como: *C. fructicola* e *C. tropicale* no Panamá, *C. siamense* na

Austrália, e *C. theobromicola* na Cuba, Nigéria e Panamá (DIAO et al., 2017; SHIVAS et al., 2016; HANADA et al., 2010; WANG et al., 2017). No Brasil, até o presente momento, as espécies *C. gloeosporioides* e *C. crassipes* eram as únicas associadas a antracnose do cacauero, sendo identificadas apenas por dados morfológicos (MENDES et al., 1998; OLIVEIRA 2017). Este estudo, no entanto, comprova a existência de outras espécies do complexo *C. gloeosporioides* (*C. fructicola*, *C. Theobromicola*, *C. siamense*, *C. tropicale* e *C. aeschynomenes*) associadas a esta doença na cacauicultura brasileira, sendo o primeiro relato da espécie *C. aeschynomenes* nesta cultura.

A espécie *C. gigasporum* pertence ao complexo *C. gigasporum* que é composto por oito espécies: *C. arxii*, *C. magnisporum*, *C. pseudomajus*, *C. radialis*, *C. vietnamense*, *C. gigasporum*, *Colletotrichum* sp. e mais recentemente, descrita em 2017 na China, a espécie nomeada *C. citri-maximae* (LIU et al., 2014; DOUANLA-MELI; UNGER 2017). *Colletotrichum gigasporum* foi relatada em diversos hospedeiros como *Acacia auriculiformis*, na Tailândia; *Centella asiatica*, em Madagascar; *C. arabica*, no México; *Coffea* sp., no Vietnã; *Diospyros kaki*, no Japão; *Musa* sp., no México; *Solanum betaceum*, na Nova Zelândia; *Trichilia tuberculata*, *Virola surinamensis* além de *T. cacao*, no Panamá (LIU et al., 2014; CRISTOBAL-MARTINEZ et al., 2017).

Foi descrita como uma nova espécie do gênero *Colletotrichum* em 2013, utilizando a região ITS-rDNA e o gene  $\beta$ -tubulina. Os isolados identificados foram obtidos de folhas assintomáticas de *Centella asiática*, *Stylosanthes guianensis* e *Coffea arábica*, provenientes de Madagascar, México e Colômbia, respectivamente (RAKOTONIRIANA et al., 2013). Na ocasião recebeu o nome *C. gigasporum*, onde o epíteto específico refere-se ao comprimento dos conídios, que são longos e retos (RAKOTONIRIANA et al., 2013). No Brasil esta espécie já foi relatada causando antracnose em folhas de gravioleiras e pinheiras no estado de Alagoas (COSTA et al., 2019)

Embora este seja o primeiro relato de *C. gigasporum* na cacauicultura brasileira, é possível que essa espécie já ocorresse, uma vez que no passado, erros de taxonomia levaram a confundi-la com a espécie *C. crassipes*, que pertence ao complexo *C. gloeosporioides*, por esta apresentar conídios alongados semelhantes ao de *C. gigasporum* (LIU et al., 2014).

Pertencente ao complexo *C. boninense*, a espécie *C. karstii* já foi relatada em diferentes regiões do mundo, causando antracnose em uma ampla gama de hospedeiros. No Brasil, há relatos em graviola (*Annona muricata*), manga (*Mangifera indica*), mamão

(*Carica papaya*), maçã (*Malus domestica*), seringueira (*Hevea brasiliensis*), palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*) e mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) (BELISARIO et al., 2018; OLIVEIRA 2016, LIMA et al., 2013; VELHO et al., 2014, RIOS et al., 2015; USDA 2018).

Por fim, a espécie *C. limetticola* que pertence ao complexo *C. acutatum*, conhecido por agrupar espécies que são altamente destrutivas para uma série de frutíferas como morango, maçã e citrus (GARRIDO et al. 2009; LEE et al. 2007; PERES et al. 2008; DAMM et al., 2012a). Esta espécie foi identificada pela primeira vez por Clausen em 1912 causando antracnose em folhas e hastes de *Citrus aurantifolia*, no Estados Unidos, sendo posteriormente identificada em folhas e caules de *C. aurantifolia* var. *acida*, *C. limetta* e *C. limon* em Cuba (DAMM et al., 2012a).

No Brasil, *C. limetticola* foi relatada associada a antracnose na cultura da seringueira nos estados da Bahia e Mato Grosso. Sua identificação foi realizada a partir de análises multilocus, utilizando a região ITS-rDNA e os genes parciais que codificam para as proteínas GAPDH,  $\beta$ -tubulina, ACT e CHS (SARMIENTO 2013), as mesmas utilizadas neste estudo. De acordo com DAMM et al., 2013, a espécie *C. limetticola* se distingue mais efetivamente das outras do mesmo complexo, pelo gene  $\beta$ -tubulina (TUB2), corroborando com as observações feitas neste estudo, para as árvores construídas individualmente.

As espécies *C. theobromicola*, *C. siamense*, *C. karstii* e *C. limetticola*, identificadas no presente estudo, já foram relatadas em seringueira no estado da Bahia (SARMIENTO 2013). Esta cultura é comumente cultivada em consórcio com cacau neste estado, sendo possível sugerir que estas espécies tenham migrado de uma cultura para outra, tornando-se um grande problema para cacauicultura desta região.

Em relação aos resultados das análises morfológicas de conídios e apressórios observados em meio BDA, as espécies, *C. fructicola*, *C. siamense*, *C. tropicale*, *C. aeshynomenes* e *C. karstii*, apresentaram dados consonantes com outros trabalhos citados na literatura (PRIHASTUTI et al., 2009; YANG et al., 2009; ROJAS et al., 2010; DAMM et al., 2012a). Para *C. theobromicola*, Rojas et al. (2010) encontraram medidas de conídios superior ao que foi verificado. Embora as dimensões de conídios de *C. limetticola* e *C. gigasporum* tenham se mostrado semelhantes ao que foi verificado em outros estudos (DAMM et al., 2012b; RAKOTONIRIANA et al., 2013), as dimensões dos apressórios foram superiores para as respectivas espécies. As dimensões de conídios e apressórios cultivados em meio SNA, foram semelhantes as observadas na literatura

(PRIHASTUTI et al., 2009; ROJAS et al., 2010; YANG et al., 2009). *Colletotrichum tropicale* apresentou conídios mais estreitos do que foi observado por Rojas et al. (2010) e *C. siamense* apresentou conídios maiores que em estudos realizados por Weir et al. (2012), enquanto que as espécies, *C. limeticola* e *C. gigasporum*, apresentaram apressórios maiores quando comparado ao estudo feito por Damm et al. (2012b) e Rakotoniriana et al. (2013) respectivamente. As espécies, *C. karstii* e *C. gigasporum*, não produziram conídios em SNA, enquanto *C. theobromicola* e *C. karstii*, não produziram apressórios neste meio de cultura.

Vários autores relatam que as condições ambientais e de meios de culturas são fatores que influenciam nas características morfoculturais (SUTTON 1992; FREEMAN et al., 1998), justificando as diferenças observadas entre as espécies caracterizadas neste estudo e os dados disponibilizados na literatura. Além disso, espécies de *Colletotrichum* apresentam grande diversidade fenotípica, fator que limita a identificação dessas espécies, baseando-se apenas nesses caracteres. A caracterização molecular feita através de análise multilocus, constitui-se uma importante ferramenta na identificação de espécies de *Colletotrichum*, oferecendo dados confiáveis para o entendimento das relações evolutivas (ALMEIDA 2015).

A maioria dos isolados identificados no presente trabalho pertencem ao complexo *C. gloeosporioides*, no entanto, outros três complexos agruparam isolados de *Colletotrichum*, revelando uma alta diversidade genética entre as espécies identificadas. De acordo com Almeida (2015), esta diversidade pode estar relacionada com a baixa especificidade da maioria das espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, associando-se ao cultivo de diferentes frutíferas geograficamente próximas. Esta diversidade pode dificultar o controle da doença, uma vez que as espécies podem apresentar sensibilidade diferenciada aos fungicidas (TOZZE JÚNIOR et al., 2010). Assim, a precisa identificação das espécies de *Colletotrichum*, realizada no presente estudo, além de permitir um melhor entendimento da epidemiologia da doença, é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficientes de controle (ANDRADE et al., 2007).

**CONCLUSÕES:**

1. As espécies, *C. fructicola*, *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. aeshynomenes*, *C. tropicale*, *C. karstii*, *C. limetticola* e *C. gigasporum*, estão associadas a antracnose da cultura do cacau no Brasil.
2. Esta é a primeira ocorrência destas espécies na cultura do cacau, no Brasil;
3. Este é o primeiro relato das espécies, *C. aeshynomenes*, *C. karstii* e *C. limetticola*, associados a cultura do cacau no mundo.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA C. A. Diversidade e caracterização de espécies de *Colletotrichum* associadas a *Annona* spp. Lavras:UFLA, 2015. Dissertação. 75 p.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ALVES S. A. M. Epidemiologia da vassoura de bruxa (*Crinipellis perniciosa* (STAHEL) SINGER) em cacauzeiros enxertados em Uruçuca, Ba. Piracicaba: Universidade de São Paulo. Dissertação. 2002. 70 p.
- ANDRADE, E.M. et al. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, N. 1, p. 021-031, 2007.
- ARAUJO, M. B. M. First report of *Colletotrichum theobromicola* and *C. tropicale* causing anthracnose on fruits of carnauba palm in Brazil. **Plant Disease**, v. 102, n. 1, p. 244, 2018.
- BARROS N. O. 1981. Cacao. **Manual de Asistencia Técnica nº 23**. Instituto Colombiano Agropecuario, Bogotá. 286 p.
- BATISTA, L. R. L. Caracterização de *Colletotrichum* spp. agente causal da antracnose nas culturas do maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg) e da romãzeira (*Punica granatum* L.) na região Nordeste do Brasil. Rio Largo: UFAL. Tese. 84 p.
- BELISARIO, R.; BORGES, L. S.; FURTADO, G.Q. First report of *Colletotrichum karstii* causing anthracnose on *Annona muricata* in Brazil. **Plant Disease**. V. 102, n. 11, p. 2372-2373, 2018.
- BRAGANCA, C.A.D. et al. First report of anthracnose caused by *Colletotrichum theobromicola* on Barbados cherry (*Malpighia emarginata*) in Brazil. **Plant Disease**, v. 98, n.9, p. 1272, 2014.
- BRAGANCA, C.A.D. et al. First report of *Colletotrichum fructicola* causing anthracnose in cassava (*Manihot esculenta*) in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, n. 4, p. 857-858, 2016.
- CANNON, P.F. et al. *Colletotrichum* status and future directions. **Studies in Mycology**, v.73, p.181-213, 2012.
- CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, p. 553–556, 1999.
- CHAVES, T. P. et al. First detection of *Colletotrichum siamense* causing anthracnose on *Alpinia purpurata*. **Journal of Plant Pathology**, p. 1-1, 2018.

CLAUSEN, R. E. A new fungus concerned in whiter tip of varieties of *Citrus medica*. *Phytopathology*, v. 2, p. 217–236, 1912.

CONFORTO, C. et al. First Report of *Colletotrichum siamense* and *C. fructicola* Causing Cladode Brown Spot in *Nopalea cochenillifera* in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 99, n. 3, p. 812, 2017.

COSTA J. F. O. et al. First report of *Colletotrichum fructicola* causing anthracnose on *Annona* leaves in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 2, p. 386 – 387, 2017.

COSTA J. F. O. Caracterização e epidemiologia comparativa de espécies de *Colletotrichum* em anonáceas no estado de Alagoas. Rio Largo: UFAL, 2014. Tese. 110 p.

COSTA J. F. O et al. Species diversity of *Colletotrichum* infecting *Annona* spp. in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 153, n. 1, p. 169-180, 2019.

CRISTOBAL-MARTINEZ, A. L. et al. Diversity of *Colletotrichum* species in coffee (*Coffea arabica*) plantations in Mexico. **European Journal of Plant Pathology**, v. 147, n. 3, p. 605-614, 2017.

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 orbiculare* species complex: important pathogens of field crops and weeds. **Fungal Diversity**, v. 61, n.1, p. 29-59, 2013.

DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414-430, 2012.

DIAO, Y. Z. et al. *Colletotrichum* species causing anthracnose disease of chili in China. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 38, p. 20, 2017.

DOUANLA-MELI, C.; UNGER, J. G. Phylogenetic study of the *Colletotrichum* species on imported citrus fruits uncovers a low diversity and a new species in the *C. gigasporum* complex. **Fungal Biology**, v. 121, n. 10, p. 858-868, 2017.

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 Bioinformatics**, v. 5, p. 1–19, 2004.

FREEMAN, S. et al. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, v. 82, p. 596-605. 1998.

- GARRIDO, C. et al. Phylogenetic relationships and genome organisation of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose in strawberry. **European Journal of Plant Pathology**, v. 125, p. 397–411, 2009.
- GUERBER, J. C. et al. Characterization of diversity of *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.
- HANADA, R. E. et al. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuacu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. **Fungal Biology.**, v. 114, p. 901-910, 2010.
- ICCO. **Produção Mundial de cacau (2016)**. Disponível em: <<https://www.icco.org/>> Acesso em: 20 jan. 2018.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola 2016**. Disponível em: <<https://ww2.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=ba&tema=lavourapermanente2016>> Acesso em: 20 jan. de 2018.
- ITO, M. F. et al. *Colletotrichum fructicola*, patógeno causador de severa desfolha em romãzeiras e manchas necróticas em folhas e frutos. **Summa Phytopathologica**, v. 43, ISSN:198M729, 2017.
- JAYAWARDENA, R. S. et al. Notes on currently accepted species of *Colletotrichum*. **Mycosphere**, v. 7, n. 8, p. 1192-1260, 2016.
- JOA, J. H. et al. First report of *Colletotrichum fructicola* causing anthracnose on mango in Korea. **Plant Disease**, v. 100, n. 8, p. 1793, 2016.
- LEE, D. H. et al. Molecular and cultural characterization of *Colletotrichum* spp. causing bitter rot of apples in Korea. **Plant Pathology Journal**, v. 23, p. 37–44, 2007.
- LIMA B. V. Subsídios para o manejo cultural e fitopatológico *Cyrtopodium cardiochilum* (Orchydaceae). Viçosa: UFV. Dissertação. 102 p.
- LIMA N. B. et al. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, p.75-88, 2013.
- LIU, F. L. et al. The *Colletotrichum gigasporum* species complex. **Persoonia**, v. 33, p. 83–97, 2014.
- MARTINS, M. V. V. First report of *Colletotrichum theobromicola* causing leaf spot in sapote (*Manilkara zapota*) seedlings in Brazil. **Plant Disease**, v. 102, n. 12, p. 2641-2642, 2018.
- MATOS, K.S. et al. First report of anthracnose on welsh onion (*Allium fistulosum*) in Brazil caused by *Colletotrichum theobromicola* and *C. truncatum*. **Plant Disease**, v. 101, n. 6, p. 1055-1056, 2017.

MENDES, M. A. S. L. et al. **Fungos em Plantas no Brasil**. Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998. 555 p.

MILLER, M. A. et al. **The CIPRES Portals**. Disponível em: <[http://www.phylo.org/sub\\_sections/portal](http://www.phylo.org/sub_sections/portal)>. Acesso em: 6 jun. 2017.

MUNIR, M. et al. Characterization of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in Kentucky orchards. **Plant Disease**, v. 100, n. 11, p. 2194-2203, 2016.

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, n.1, p. 103-116, 1997.

OLIVEIRA M. L.; LUZ, E. D. M. N. **Identificação e manejo das principais doenças do cacaueteiro no Brasil**. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC/SEFIT, 2005. 132p.

OLIVEIRA S. A. S.; BRAGANCA, C. A. D.; SILVA, L. L. First report of *Colletotrichum tropicale* causing anthracnose on the wild cassava species *Manihot dichotoma* and *M. epruinosa* in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, n. 10, p. 2171-2172, 2016.

OLIVEIRA M. L. Doenças do Cacaueteiro. In: SODRÉ, G. A. **Cultivo do cacaueteiro no estado da Bahia**. Ilhéus: MAPA/Ceplac/Cepec, 2017. 126 p.

OLIVEIRA S. A. S. First report of *Colletotrichum theobromicola* and *C. siamense* causing anthracnose on cultivated and wild cassava species in Brazil. **Plant Disease**. V. 102, n. 4, p. 819, 2018.

PEREZ, G. R. M.; MITCHELL, S.; VARGAS, S. R. *Psidium guajava*: a review of its traditional 464 uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacol.**, v. 117, p. 1–27, 2008.

PHOULIVONG S.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE K. D. Cross infection of *Colletotrichum* species; a case study with tropical fruits. **Current Research in Environmental & Applied Mycology**, v. 2, n. 2, p. 99 –111, 2012.

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.

RAKOTONIRIANA, E. F. et al. *Colletotrichum gigasporum* sp. nov. a new species of *Colletotrichum* producing long straight conidia. **Mycological Progress**, v. 12, n. 2, p. 403–412, 2013.

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.

RIOS, J. A. et al. First report of *Colletotrichum karstii* causing anthracnose on blueberry leaves in Brazil. **Plant Disease**, v. 99, n. 1, p. 157-157, 2015.

RODRIGUES, A.L. et al. *Colletotrichum theobromicola* causes defoliation, stem girdling and death of mini-cuttings of *Eucalyptus* in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 4, p. 326-330, 2014.

ROJAS, E. I. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. **Mycologia.**, v. 102, p. 1318–1338, 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.

SANGPUEAK, R., PHANSAK, P., BUENSANTEAI, N. Morphological and molecular identification of *Colletotrichum* species associated with cassava anthracnose in Thailand. **Journal of Phytopathology**, 166(2): 129-142. (51597), 2018.

SANTOS R.F. et al. First report of *Colletotrichum theobromicola* causing anthracnose leaf and twig spot in Cambuci (*Campomanesia phaea*) in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 3, p. 506, 2017.

SARMIENTO, S. S. et al. Identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose foliar da seringueira. 2013.

SERENO, M.L. et al. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. **Conservation Genetics**, v.7, p.13-24, 2006.

SHARMA, G.; PINNAKA, A.K.; SHENOY, B. D. ITS-based diversity of *Colletotrichum* from India. **Current Research in Environmental & Applied Mycology**, v. 3, n. 2, p. 194–220, 2013.

SHIVAS, R. G. et al. *Colletotrichum* species in Australia. **Australasian Plant Pathology.**, v. 45, n. 5, p. 447-464, 2016.

SILVA NETO P. J. et al. **Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira**. Belém: CEPLAC, 2001. 125p.

SILVA, J. R. A et al. Molecular and morpho-cultural characterization of *Colletotrichum* spp. associated with anthracnose on *Capsicum* spp. in northeastern Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n. 4, p. 315-319, 2017.

SOUSA, E. S. et al. *Colletotrichum* species causing anthracnose on lima bean in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 1, p. 78-84, 2018.

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

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TOZZE JÚNIOR, H. J. et al. First report of *Colletotrichum boninense* infecting yellow passion fruit (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 5, p. 70-72, 2010.

USDA – United States Department Of Agriculture. Disponível em: < <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm>>. Acesso em: 6 jan. 2018.

VELHO, A.C., et al. First Report of *Colletotrichum karstii* Causing Glomerella Leaf Spot on Apple in Santa Catarina State, Brazil. **Plant Disease**. V. 98, p. 157, 2014.

VELOSO, J. S. et al. 2018. Why species delimitation matters for fungal ecology: *Colletotrichum* diversity on wild and cultivated cashew in Brazil. **Fungal Biology**.v. 122, p. 677-691, 2018.

VIEIRA, W. A. S. et al. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, v. 67, p. 181-202, 2014.

WANG, Q. H. et al. Walnut anthracnose caused by *Colletotrichum siamense* in China. **Australasian Plant Pathology**, v. 46, n. 6, p. 585-595, 2017.

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

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

## **CAPÍTULO II**

### **IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Neopestalotiopsis* ASSOCIADAS A MANCHAS FOLIARES NA CULTURA DO CACAU.**

#### 4 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Neopestalotiopsis* ASSOCIADAS A MANCHAS FOLIARES NA CULTURA DO CACAU.

##### **Resumo:**

O cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) é uma cultura de grande importância social e econômica para população mundial. No Brasil o estado da Bahia é o maior produtor, contribuindo com cerca de 54% da produção nacional. A cultura é hospedeira de diversos agentes fitopatogênicos que são responsáveis por causarem manchas necróticas em folhas. Algumas espécies são consideradas patógenos secundário, como espécies fúngicas pertencentes ao gênero *Pestalotiopsis*. No Brasil, espécies deste gênero são relatadas como endofíticas em cacauzeiros. No entanto, fungos endofíticos podem ser considerados patógenos latentes, causando sintomas em plantas sob condições de estresse ou quando o hospedeiro inicia seu processo de senescência. A identificação de fungos deste gênero com base em estudos moleculares, permitiu seu desmembramento em três novos gêneros (*Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*), pertencentes a um complexo - Pestalotioid. Desta forma é possível que outros gêneros deste complexo estejam causando mancha foliares na cultura do cacau. Assim sendo, o objetivo deste trabalho é identificar e caracterizar espécies de *Neopestalotiopsis* associadas a manchas foliares na cultura do cacau. Folhas de cacauzeiro apresentando lesões necróticas, foram coletadas a partir de plantio comercial no município Boca da Mata-AL. No laboratório foram realizados isolamentos indiretos e obtenção de culturas monospóricas para posterior identificação. Para caracterização molecular foram feitas análises filogenéticas utilizando a região ITS-rDNA e os genes TUB e EF1. Foram identificadas duas espécies de *Neopestalotiopsis*: *N. surinamensis* e *N. brasiliensis* causando manchas necróticas em folhas de cacauzeiro, sendo este o primeiro relato de *N. surinamensis* na cultura do cacau, além se ser a primeira ocorrência desta espécie no Brasil. *N. brasiliensis*, trata-se de uma possível nova espécie.

**Palavras-Chave:** Cacauzeiro. Amphisphaeriaceae. *Theobroma cacao*. Análises multilocus.



## INTRODUÇÃO

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.), é uma planta perene e arbórea que tem em suas sementes o potencial para fabricação de diversos produtos como a manteiga de cacau e o chocolate, apreciado em todo o mundo (MENEZES; CARMONETO 1993; ALMEIDA; VALLE 2007). No Brasil, o maior produtor de cacau é o estado da Bahia, único produtor do Nordeste, seguido dos estados do Pará, Espírito Santo e Rondônia (IBGE 2016).

A cultura do cacau é hospedeira de diversos agentes fitopatogênicos que causam principalmente manchas foliares. Alguns desses agentes são considerados patógenos secundário, como espécies fúngicas pertencentes ao gênero *Pestalotiopsis* (PHOTITA et al., 2001, ROMERO et al., 2001). Fungos desse gênero estão amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados no solo, sementes, frutos e folhas de plantas, como parasitas, endofíticos ou saprófitas (JEEWON et al., 2004; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2013; HU et al., 2007).

No cacauieiro, há relato apenas de *Pestalotiopsis* sp. causando manchas foliares em cuba (URTIAGA 1986). No Brasil espécies desse gênero, até o presente momento foram relatadas como endofíticas na cultura (HANADA et al., 2010; RUBINI et al., 2005). Porém, fungos endofíticos podem ser considerados patógenos latentes, causando sintomas em plantas sob condições de estresse ou quando o hospedeiro inicia seu processo de senescência (HYDE et al., 2014; SOYTONG 2008). Mesmo não causando danos expressivos, esses patógenos podem representar ameaças para as culturas, caso sejam disseminados e encontrem condições favoráveis ao seu desenvolvimento e estabelecimento (SFALSIN 2012).

A identificação de fungos desse gênero é realizada com base em estudos moleculares, o que permitiu que o gênero *Pestalotiopsis* fosse desmembrado em três gêneros distintos, *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*. Esses gêneros fazem parte de um complexo Pestalotioid ((MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). Com isso, é possível que outros gêneros deste complexo estejam causando mancha foliares na cultura do cacau. Sendo possível também que a espécie relatada em cuba não pertença ao gênero *Pestalotiopsis*, uma vez que sua identificada tenha sido realizada por características morfológicas.

Atualmente, o uso de análises filogenética multilocus são indispensáveis para caracterizar estas espécies, sendo a região ITS, associada com os genes Fator de

Alongamento (EF1- $\alpha$ ) e  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -tub), as mais precisas para este fim (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; HYDE et al., 2014).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho é identificar e caracterizar espécies de *Neopestalotiopsis* associadas a manchas foliares na cultura do cacau.

## **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).

### **Origem e obtenção dos isolados.**

Folhas de cacau apresentando lesões necróticas (Figura 1), foram coletadas em regiões produtoras da cultura, nos municípios de Igrapiúna-BA e Boca da Mata-AL, além de amostras provenientes de árvores de cacau no município de Maceió-AL. No Laboratório, as folhas foram lavadas e secas naturalmente. Foram realizados isolamentos indiretos, retirando fragmentos da área de transição entre o tecido sadio e o doente, os quais foram desinfestados com soluções de álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto, lavados em água destilada esterilizada (ADE) por 3 vezes, postos para secar em papel de filtro e posteriormente transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar). Após a formação das colônias, discos de meio de cultura contendo o crescimento micelial do patógeno, foram retirados das bordas das colônias e transferidos para novas placas de Petri contendo meio BDA e mantidos à temperatura de 25°C até o surgimento das estruturas de reprodução do patógeno para posterior identificação e obtenção das culturas monospóricas.

### **Teste de patogenicidade**

O teste de patogenicidade foi realizado em folhas assintomáticas, adultas, destacadas de plantas de cacau cultivados em casa de vegetação do CECA/UFAL. As folhas foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio a 1% por cinco minutos, lavadas em água destilada e esterilizada (ADE) e secas à temperatura ambiente. Foram utilizados dois métodos de inoculação (suspensão de esporos e discos contendo estruturas do patógeno) para confirmação da patogenicidade dos isolados. Para ambos os métodos,

as folhas foram feridas, com o auxílio de uma agulha flambada, em cinco pontos de inoculação equidistantes, sendo um a testemunha.

No primeiro método, as inoculações foram realizadas através da aplicação de uma gota de 30µL de uma suspensão com  $10^6$  esporos mL<sup>-1</sup>, sobre cada ponto de inoculação, e na testemunha aplicou-se uma gota 30µL de ADE. No segundo método, um disco de BDA de 5mm contendo estruturas do patógenos, foi depositado sobre cada ponto de inoculação e na testemunha depositou-se um disco de BDA sem estruturas do patógeno. Cada folha foi acondicionada em uma bandeja de plástico, contendo um chumaço de algodão umedecido com ADE e coberta por saco plástico para proceder a câmara úmida por 48 horas. O teste foi mantido por 7 dias a  $25 \pm 1$  ° C e fotoperíodo de 12 h.

### Caracterização molecular

Para caracterização molecular realizou-se a extração de DNA, seguindo o protocolo CTAB adaptado de Doyle & Doyle (1987), a partir de colônias crescidas em meio líquido de L-asparagina durante cinco dias. As reações para ampliações foram realizadas utilizando os pares de “primers” ITS1/ITS4, T1/T2 e 526F/1567R que codifica para a região ITS-rDNA e para os genes  $\beta$ -tubulina e TEF1, respectivamente (Tabela 4). Os produtos de amplificação foram enviados para purificação e sequenciamento diretamente na empresa Macrogen (Seul, Coreia do Sul).

**Tabela 4** - “primers” usados para identificação de espécies pertencentes ao gênero *Neopestalotiopsis*.

Gene	Primer	Sequências (5' - 3')	Referências
$\beta$ -tub	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	O'Donnell; Cigelnik, 1997
	T2	TAGTGACCCTTGGCCCAGTTG	
ITS	ITS1	TCCGTAGGTCAACCTGCGG	White et al., 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
TEF	526F	GTCGTYGTYATYGGHCA YGT	Rehner, 2001
	1567R	ACHGTRCCRATAACCACCRATCTT	

As sequências de nucleotídeos obtidas, foram montadas com o software Codon Code Aligner v. 6.0.2, e analisadas visualmente. O arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas, foram corrigidos por comparação das sequências nos sentidos senso e anti-senso. Inicialmente as análises foram feitas com o algoritmo BLAST<sub>n</sub> (ALTSCHUL et al., 1990) e o banco de dados não-redundante GenBank. Sequências de referência para

várias espécies de *Neopestalotiopsis* foram obtidas a partir do GenBank (Tabela 5) e utilizadas para reconstrução da árvore filogenética.

**Tabela 5** - Códigos das culturas e números de acesso do GenBank de sequências de DNA de *Neopestalotiopsis* spp. utilizados na análise filogenética.

Espécies	Código da cultura	Nº de acesso no GenBank		
		ITS	TUB	TEF
<i>Neopestalotiopsis asiática*</i>	MFLUCC 12-0286	JX398983	JX399018	JX399049
<i>Neopestalotiopsis chrysea*</i>	MFLUCC 12-0261	JX398985	JX399020	JX399051
<i>N. chrysea</i>	MFLUCC 12-0262	JX398986	JX399021	JX399052
<i>Neopestalotiopsis clavispora*</i>	MFLUCC 12-0281	JX398979	JX399014	JX399045
<i>N. clavispora</i>	MFLUCC 12-0280	JX398978	JX399013	JX399044
<i>Neopestalotiopsis ellipospora*</i>	MFLUCC 12-0283	JX398980	JX399016	JX399047
<i>N. ellipospora</i>	MFLUCC 12-0284	JX398981	JX399015	JX399046
<i>Neopestalotiopsis eucalypticola*</i>	CBS 264.37	KM199376	KM199431	KM199551
<i>Neopestalotiopsis foedans*</i>	CGMCC 3.9123	JX398987	JX399022	JX399053
<i>N. foedans</i>	CGMCC 3.9178	JX398989	JX399024	JX399055
<i>N. foedans</i>	CGMCC 3.9202	JX398988	JX399023	JX399054
<i>Neopestalotiopsis honoluluana*</i>	CBS 114495	KM199364	KM199457	KM199548
<i>N. honoluluana</i>	CBS 111535	KM199363	KM199461	KM199546
<i>Neopestalotiopsis mesopotâmica*</i>	CBS 336.86	KM199362	KM199441	KM199555
<i>N. mesopotamica</i>	CBS 299.74	KM199361	KM199435	KM199541
<i>Neopestalotiopsis piceana*</i>	CBS 394.48	KM199368	KM199453	KM199527
<i>N. piceana</i>	CBS 254.32	KM199372	KM199452	KM199529
<i>Neopestalotiopsis rosae*</i>	CBS 101057	KM199359	KM199429	KM199523
<i>N. rosae</i>	CBS 124745	KM199360	KM199430	KM199524
<i>Neopestalotiopsis samarangensis*</i>	CBS 115451	KM199430	KM199447	KM199556
<i>Neopestalotiopsis saprophytica*</i>	MFLUCC 12.0282	JX398982	JX399017	JX399048
<i>N. saprophytica</i>	CBS 115452	KM199345	KM199433	KM199538
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	CBS 266.37	KM199349	KM199459	KM199547
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	CBS 323.76	KM199350	KM199458	KM199550
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	CBS 361.61	KM199355	KM199460	KM199549
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	CBS 119.75	KM199356	KM199439	KM199531
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	CBS 164.42	KM199367	KM199434	KM199520
<i>Neopestalotiopsis surinamensis*</i>	CBS 450.74	KM199351	KM199465	KM199518
<i>N. surinamensis**</i>	COUFAL0248	-	-	-
<i>N. surinamensis**</i>	COUFAL0249	-	-	-
<i>Neopestalotiopsis brasiliensis**</i>	COUFAL0245	-	-	-
<i>N. brasiliensis**</i>	COUFAL0246	-	-	-
<i>N. brasiliensis**</i>	COUFAL0247	-	-	-
<i>Pestalotiopsis adusta</i>	ICMP 6088	JX399006	JX399037	JX399070

\*espécies ex-tipo utilizadas no trabalho; \*\*espécies identificadas no presente estudo.

Alinhamentos múltiplos para sequências nucleotídicas foram obtidos usando o algoritmo MUSCLE (EDGAR 2004) no programa MEGA v. 6 (TAMURA et al., 2013). As filogenias de Inferência Bayesiana (BI) para os dados de sequências de ITS, TUB e TEF, foram construídas individualmente 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 cada região genômica usando MrModeltest v. 2.3 (POSADA; BUCKLEY 2004) de acordo com o Akaike Information Criterion (AIC). Análises foram rodadas por 10 milhões de gerações, usando quatro cadeias e amostrando a cada 1.000 gerações, para um total de 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas como uma fase de “burn-in”. Probabilidades posteriores (RANNALA; YANG 1996) foram determinadas 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](http://ztree.bio.ed.ac.uk/software/figtree)) e Inkscape (<https://inkscape.org/pt/>).

### **Caracterização cultural e morfológica**

Para caracterização cultural as colônias fúngicas foram cultivadas em BDA sintético e incubadas em B.O.D. a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, onde realizou-se avaliações diárias em duas direções diametralmente opostas com o auxílio de um paquímetro digital durante sete dias para calcular o índice de crescimento micelial - ICM (mm dia<sup>-1</sup>). A morfológica foi baseada no tamanho dos conídios, coloração das células centrais e número de apêndices, que foram visualizados em microscópio de luz (Olympus CKX41) com o auxílio da câmera Olympus SC30 e mensurados no software CellSenses Standard.

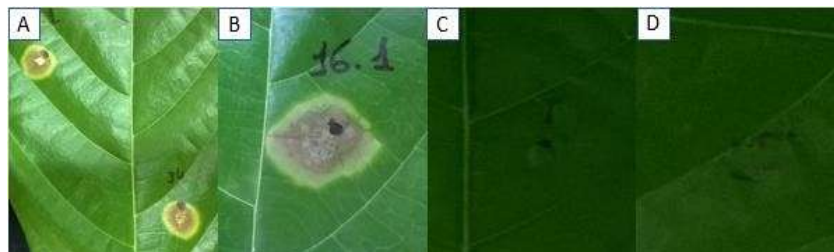
## **RESULTADOS**

### **Obtenção dos isolados**

Cinco isolados (COUFAL0245, COUFAL0246, COUFAL0247, COUFAL0248, COUFAL0249) foram obtidos a partir de folhas coletadas em plantio comercial no município de Boca da Mata-AL.

### Teste de patogenicidade

Nos testes de patogenicidade, observou-se que todos os isolados obtidos causaram lesões necróticas na superfície de folhas de cacauero, através de inoculações com discos de BDA contendo estruturas do patógeno e com suspensão de conídios (Figura 4).

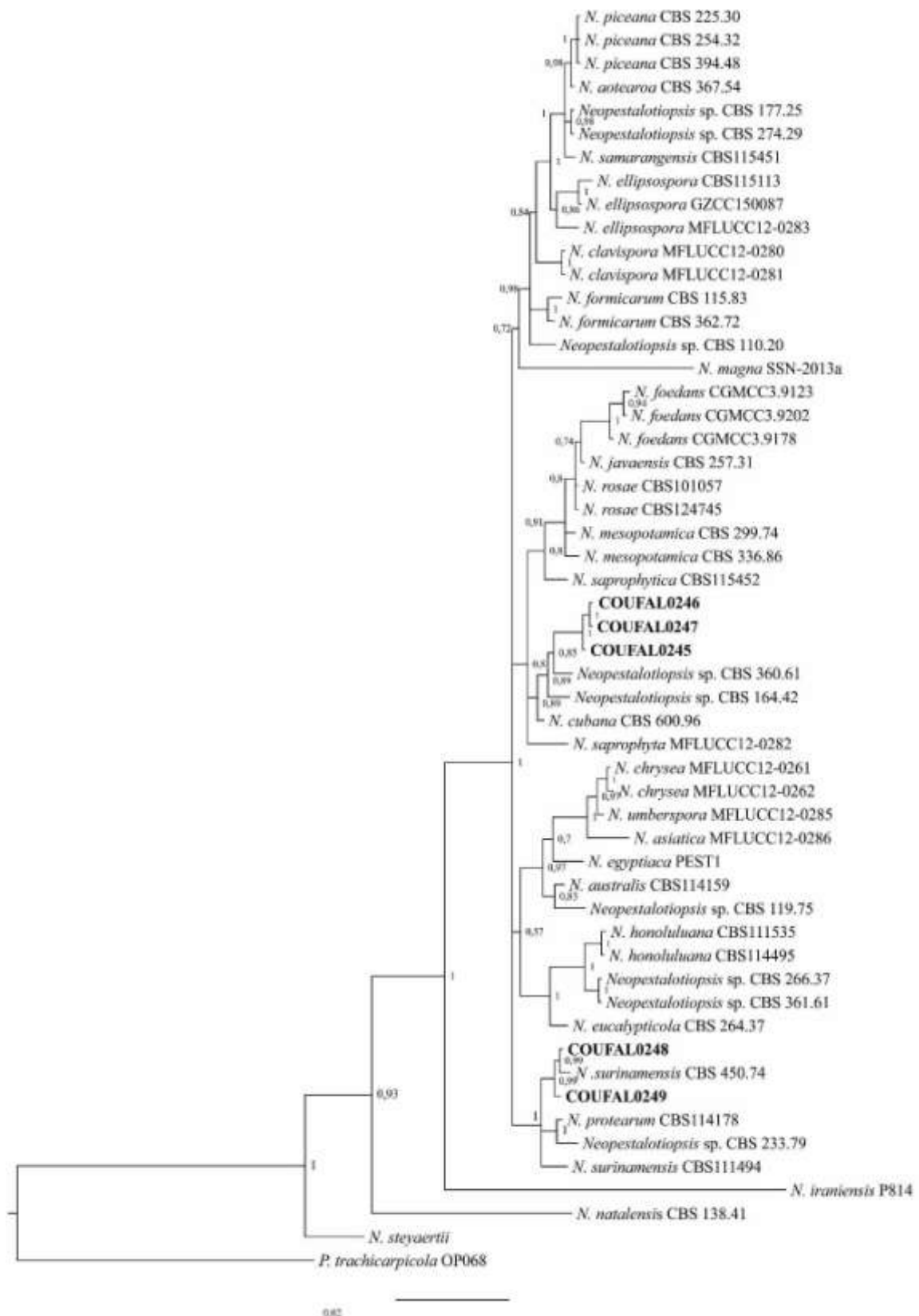


**Figura 5-** Sintomas causados por isolados de *Neopestalotiopsis* spp. em folhas de cacauero oito dias após a inoculação com: A - Discos de BDA contendo micélio das espécies, B - Suspensão de esporos, C – Testemunha com discos de BDA e D – Testemunha com ADE.

### Caracterização molecular

Na construção da árvore filogenética, utilizou-se os modelos evolutivos GTR+I+G (ITS-rDNA) e HKY+G (TEF e TUB) para os alinhamentos de sequências nucleotídicas de forma concatenada. A espécie *P. adusta* (ICPM6028) foi utilizada como “outgroup”.

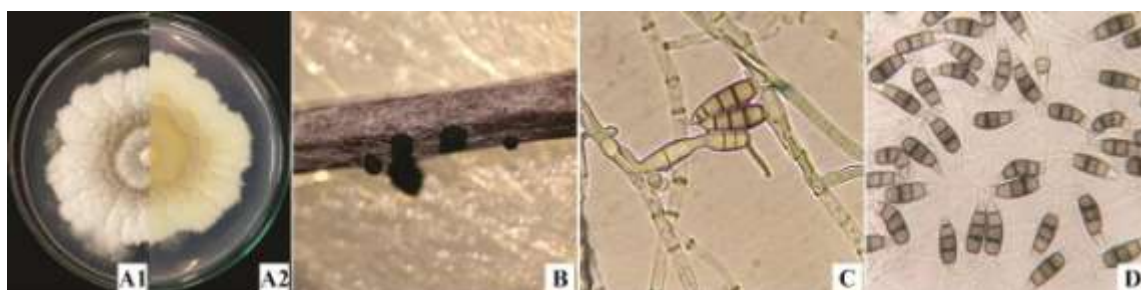
Na árvore de inferência Bayesiana para os dados combinados da região ITS e dos genes TUB e EF1 (Figura 5), é possível observar que dos cinco isolados obtidos, dois se agruparam com a espécie *N. surinamensis* (COUFAL0248 e COUFAL0249) e três (COUFAL0245, COUFAL0246 e COUFAL0247) formaram um clado juntamente com *Neopestalotiopsis* sp. (CBS 360.61), *Neopestalotiopsis* sp. (CBS 164.42) e a espécie *N. cubana* (CBS 600.96) e como não se agruparam com estes isolados/espécie foi considerado no presente estudo como uma nova espécie pertencente ao gênero *Neopestalotiopsis*: *Neopestalotiopsis brasiliensis* sp. nov.



**Figura 6**– Árvore filogenética de Inferência Bayesiana baseada nas sequências concatenadas de ITS, TUB e TEF1. A árvore foi enraizada com *Pestalotiopsis trachicarpicola* (“out-group”).

### Caracterização cultural e morfológica

Na caracterização cultural e morfológica, os isolados estudados apresentaram características do gênero *Neopestalotiopsis*. Os isolados identificados como *N. surinamensis*, apresentaram os seguintes dados morfoculturais: Coloração do verso colônia (branco com cinza escuro e Reverso amarelo alaranjado com bordas brancas); índice de crescimento micelial (ICM) ( $7,27 \text{ mm dia}^{-1}$ ); comprimento dos conídios ( $23,6\text{-}29,8 \mu\text{m}$ ); largura dos conídios ( $6,51\text{-}8,64 \mu\text{m}$ ); células basais ( $4,84\text{-}7,8 \mu\text{m}$ , com um apêndice); comprimento das três células medianas ( $14,89\text{-}18,48 \mu\text{m}$ ); células apicais ( $4,12\text{-}5,95 \mu\text{m}$ , apresentando dois a três apêndices); apêndices basais ( $4,7\text{-}7,17 \mu\text{m}$ ); e apêndices apicais ( $16,2\text{-}28,94 \mu\text{m}$ ) (Figura 6).



**Figura 7-** Características morfoculturais de *N. surinamensis*. A1 - Verso da colônia aos sete dias de idade, cultivada em BDA sintético. A2 - Reverso da colônia aos sete dias de idade, cultivada em BDA sintético. B – Conidiomas em acículas de pinheiro. C – Célula conidiogênica. D – Conídios.

Enquanto que os três isolados de *Nepestalotiopsis brasiliense* sp. nov apresentaram as seguintes características:

*Neopestalotiopsis brasiliensis* Nascimento, A. D.; Feijó, F. M; Lima, G. S. A., sp. nov.

Descrição: Colônias em BDA sintético com  $74,5\text{-}84,8 \mu\text{m}$  de diâmetro após o sétimo dia a  $25^{\circ}\text{C}$ , ICM= 8,83, coloração branco-acinzentado com reverso amarelo-alaranjado, bordas lobadas. Conidiomas (em acículas de pinheiro) globosos, escuros e picnidial. Células conidiogênicas indistintas dos conidióforos. Conídios com  $24,52\text{-}(28,25)\text{-}32,49 \times 6,72\text{-}(8,29)\text{-}9,4 \mu\text{m}$ , fusiformes, retos a ligeiramente curvados, com 4 septos. Três Células medianas  $15,95\text{-}(18,08)\text{-}21,47 \mu\text{m}$ , versicolor, marrom-escuro, septo entre a  $3^{\circ}$  e  $4^{\circ}$  mais escuro e largo em relação as demais células. Segunda célula a partir da base com  $3,82\text{-}6,99 \mu\text{m}$  de comprimento, marrom-claro. Terceira célula a partir da base com

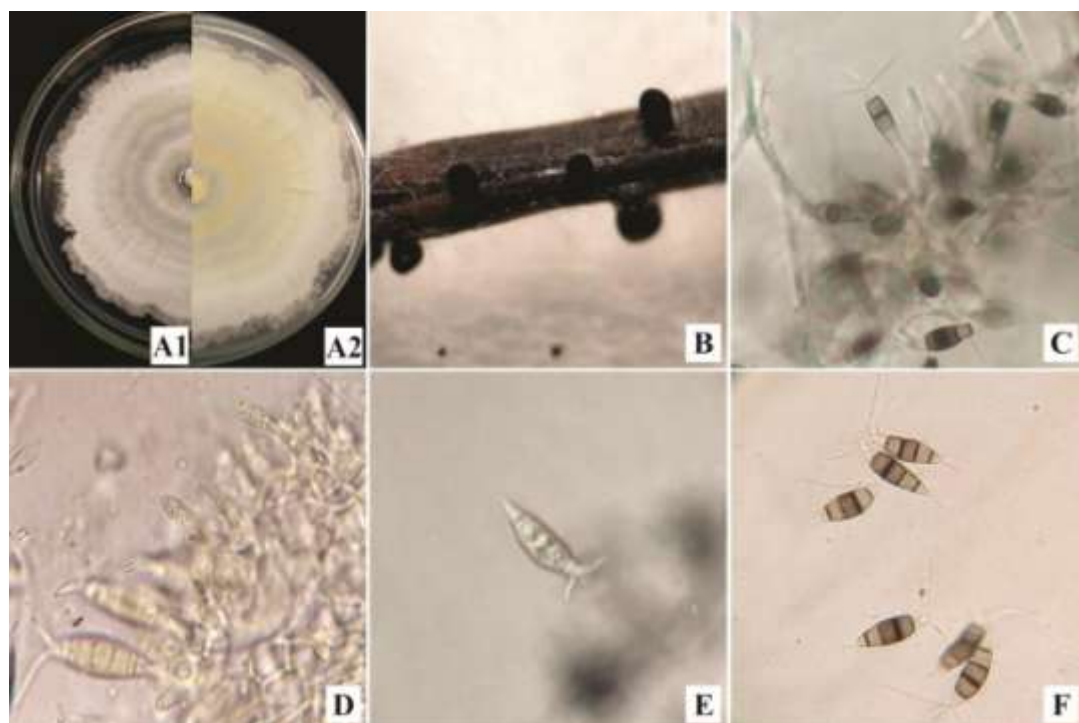


4,2-8,81  $\mu\text{m}$  de comprimento, marrom-escuro. Quarta célula a partir da base com 3,81-5,92  $\mu\text{m}$  de comprimento, marrom. Célula apical com 4,37-6,65  $\mu\text{m}$  de comprimento, hialina, 2-4 apêndices (raramente 4). Apêndices apicais 25,09- (33,05) -39,7  $\mu\text{m}$  de comprimento, surgindo a partir do ápice apical, não ramificado. Célula basal 4,02-6,4  $\mu\text{m}$  de comprimento, cônica e hialina. Apêndice basal 3,2- (5,08) -6,83  $\mu\text{m}$  de comprimento, único, cêntrico, não ramificado.

Material examinado: Brasil: Alagoas, Boca da Mata. Plantio comercial. Fazenda Bento Moreira, Km 6. Em folhas de *Theobroma cacao* (Malvaceae). Novembro, 2018.

Tipo: Brasil, Alagoas, municípios de Boca da Mata, em folhas de *Theobroma cacao*, 2017, coletado por A. D. Nascimento, Holótipo URM XXXX, cultura seca em acículas de pinheiro e cultivada em meio de cultura, ex-type cultura URM XXXX.

Notas: *Neopestalotiopsis brasiliensis* agrupou em um clado com *Neopestalotiopsis* sp. (CBS 360.61), *Neopestalotiopsis* sp. (CBS 164.42) e *N. cubana* (CBS 600.96). A espécie que apresentou maior proximidade foi *N. cubana* com diferenças nos três marcadores estudados, sendo 08 nucleotídeos em  $\beta$ -tubulina, 03 nucleotídeos em TEF1 e 01 nucleotídeo em ITS-rDNA. (Figura 7).



**Figura 8-** Características morfo culturais de *N. brasiliensis*. A1 - Verso da colônia aos sete dias de idade, cultivada em BDA sintético. A2 - Reverso da colônia aos sete dias de idade, cultivada em BDA sintético. B – Conodiosmas em acículas de pinheiro. C e D – Célula conidiogênica e formação de conídios. E – Conídio imaturo. F – Conídios.

## DISCUSSÃO

A caracterização de espécies pertencentes ao gênero *Neopetalotiopsis* utilizando apenas dados morfológicos ou pelo uso de regiões genômicas que não forneçam informações precisas sobre seu posicionamento taxonômico podem levar a erros no processo de identificação. Utilizando dados de sequências da região ITS e dos genes TUB e EF1, este estudo identificou duas espécies, *N. surinamensis* e *Neopetalotiopsis brasiliensis* associadas a manchas necróticas em folhas de cacau, sendo este, o primeiro relato destas espécies na cultura do cacau, além de ser a primeira ocorrência da espécie *N. surinamensis* no Brasil.

A identificação de espécies do complexo Pestalotioid (*Neopetalotiopsis*, *Pestalotiopsis* e *Pseudopetalotiopsis*) tem sido algo desafiador, devido ao desacordo sobre a importância de caracteres morfológicos na taxonomia, sendo mais fácil e preciso o uso de técnicas moleculares para este fim (GUBA 1961; SUTTON 1980). Inicialmente a região genômica ITS, foi bastante utilizada na caracterização de espécies fúngicas (MILLS et al., 1992; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2011). No entanto, há uma discussão em curso sobre a precisão desta região, quando utilizada isoladamente, na identificação de espécies, não apenas do complexo Pestalotioid, como também de outros grupos de fungos (SCHOCH et al., 2012; STIELOW et al., 2015).

De acordo com Hu et al. (2007) e Liu et al. (2010), dentro do complexo Pestalotioid, a região ITS é informativa para distinguir apenas espécies com conídios de diferentes tipos de pigmentação, no entanto não conseguiram separar os táxons com alto suporte apenas com esse marcador. Os autores informam ainda que, para caracterização molecular no complexo Pestalotioid, se faz necessário o uso de no mínimo dois marcadores ( $\beta$ -tubulin e ITS). Porém, estudos realizados para a caracterização de espécies desse complexo, afirmaram que a utilização da região ITS e do gene  $\beta$ -tubulin em conjunto, não foram suficientes para identificar todos os isolados utilizados (LAZAROTTO et al., 2014), se fazendo necessário a adição do gene TEF1.

*Neopetalotiopsis* é um dos três novos gêneros inseridos por Maharachchikumbura et al. (2014), e possui aproximadamente 25 espécies que já foram relatadas em várias culturas, dentre elas, *Vitis vinifera* L. (França, China e Índia), *Cocos nucifera*, (Tailândia, Indonésia e Turquia) e *Mangifera indica* (Egito) (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014, 2016; CROUS et al., 2015). No Brasil esse gênero foi observado nas culturas da goiabeira, jambeiro, dendezeiro, macadâmia e acácia

(SOUZA, 2017; SANTOS 2016; DUIN et al., 2017; QUADROS et al., 2015; LEITE et al., 2017).

A espécie *N. surinamensis* apresenta gama de hospedeiro bastante restrita, sendo relatada em *Elaeis guineensis* (dendezeiro), no Suriname, *Protea eximia* (arbusto da família Proteaceae), no Zimbabwe e *Psidium guajava* L. (goiaba), na Colômbia (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; SOLARTE et al., 2018). No presente estudo, esta espécie foi isolada a partir de folhas de cacau cultivados em consórcio com açaizeiros, cultura onde espécies do gênero *Pestalotiopsis* são relatadas como endofíticas (RUBINI et al., 2005), no entanto, não há levantamento de fungos associados a cultura do açaí no município de Boca da Mata-AL, onde os isolados de cacau foram obtidos.

A espécie *N. brasiliensis* foi descrita neste trabalho como uma nova espécie pertencente ao gênero *Neopestalotiopsis*, principalmente por apresentar características genéticas distintas em relação a *N. cubana*, que filogeneticamente é a espécie mais próxima. Essa distinção pode ser observada pelo número de nucleotídeos que diferem em cada marcador utilizado no estudo, sendo 08 nucleotídeos em  $\beta$ -tubulina, 03 nucleotídeos em TEF1 e 01 nucleotídeo na região ITS. De acordo com Solarte et al. (2018), a diferenciação molecular entre duas espécies pode estar em um único par ou em poucos pares de nucleotídeos entre as regiões genômicas utilizadas na identificação de espécies do complexo Pestalotioid.

A espécie *N. cubana* foi encontrada por Maharachchikumbura et al. (2014) em resto de cultura, em Cuba. De acordo com os autores, esta espécie forma um clado irmão com os isolados CBS 164.42 e CBS 360.61, considerados *Neopestalotiopsis* sp. A topologia foi confirmada por Solarte et al. (2018) e corrobora com os dados encontrados no presente estudo. Nesse caso comparamos também a espécie aqui identificada com os isolados presente no clado e observamos que *N. brasiliensis* difere molecularmente de *Neopestalotiopsis* sp. (CBS 360.61) em 10 nucleotídeos da sequência de  $\beta$ -tubulina, 01 nucleotídeo em TEF1 e 01 nucleotídeo na região ITS. Em relação a *Neopestalotiopsis* sp. (CBS 164.42) foi observado diferenças em 09 e 7 nucleotídeos, nas sequências de  $\beta$ -tubulina e ITS respectivamente. O uso conjunto desses marcadores são bastante utilizados na caracterização molecular de fungos pestalotiídes (HYDE et al., 2014; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; LEITE et al., 2017; SOLARTE et al., 2018), sendo a região ITS menos precisa para separação a nível de espécie (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014), justificando assim o menor número de

nucleotídeos diferentes, sobretudo em relação a *N. cubana* e *Neopestalotiopsis* sp. (CBS 360.61).

De acordo com Maharachchikumbura et al. (2014), os isolados de *Neopestalotiopsis* sp. (CBS 360.61 e CBS 164.42), apresentam semelhanças morfológicas com a espécie *N. cubana*, que difere de *N. brasiliensis* por apresentar menor diâmetro da colônia, observado após 7 dias de idade (30-40 mm), conídios menores (19-27 µm de comprimento) e conseqüentemente menores dimensões das células conidiais.

Em outros países, espécies do complexo Pestalotioid têm causado significativas perdas econômicas em uma ampla gama de culturas podendo ocasionar diversas doenças, cujos sintomas variam de acordo com o hospedeiro e o tecido vegetal infectado. (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; JAYAWARDENE et al., 2015). Na cultura do cacau, existe apenas um relato de *Pestalotopsis* sp. causando manchas foliares em cuba (URTIAGA 1986).

No Brasil, espécies de *Pestalotiopsis* spp. foram identificadas apenas como endofíticas em plantas do gênero *Theobroma* (cacau e cupuaçu), em estudos realizados na Amazônia e na Bahia (HANADA et al., 2010). No entanto, fungos endofíticos podem ser considerados patógenos latentes, ou seja, capazes de causar sintomas em plantas sob condições de estresse ou quando o hospedeiro inicia seu processo de senescência (HYDE et al., 2014; SOYTONG 2008). Com isso, podemos supor que estes fungos identificados anteriormente como endofíticos, possam ser encontrados como patogênicos na cultura do cacau, fora isso é possível também que as espécies identificadas como *Pestalotiopsis* tenham sido reclassificados e inseridos em outros gêneros do complexo Pestalotioid (*Neopesstalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*) uma que a criação desse complexo tenha ocorrido posteriormente ao trabalho de Hanada et al. (2010).

Fungos pertencentes a este complexo têm despertado pouco interesse dos pesquisadores no Brasil, principalmente no tocante a identificação de espécies e suas respectivas associações as doenças, não só no cacau, mas também em outras culturas de importância econômica. Com isso é possível supor que além das espécies identificadas no presente estudo, outras possam está presentes no Brasil inclusive na cultura do cacau, mas para isso, precisaríamos de uma amostragem maior para obtenção de mais isolados.

No presente estudo também foi observado que os isolados obtidos de *Neopesstalotopsis* foram provenientes de sintomas característicos de antracnose, corroborando com as observações feitas por SOUZA (2017), que relatou que fungos do complexo Pestalotioid tem sido frequentemente isolado a partir de lesão com sintomas

típicos de antracnose na Colômbia. Esse pode ser um dos motivos para a escassez de estudos realizados para esse grupo fúngico na cultura do cacau, uma vez que o microrganismo alvo nesse caso pertence ao gênero *Colletotrichum*.

Por fim, esse estudo representa uma importante contribuição para a etiologia de manchas foliares associadas ao complexo Pestalotioid na cacauicultura brasileira podendo ainda auxiliar em pesquisas voltadas a epidemiologia a ponto de oferecer informações relevantes para o desenvolvimento de estratégias que possam ser utilizadas em programas de manejo de doenças. Para tanto, é necessário uma amostragem maior para que se possa ter a real diversidade de espécies pertencentes a este complexo associadas a cultura do cacau.

#### **CONCLUSÕES:**

4. Este é o primeiro relato do gênero *Neopestalotiopsis* na cultura do cacau;
5. As espécies, *N. surinamensis* e *N. brasiliensis*, estão associadas a manchas necróticas em folhas de cacaueteiro e a primeira ocorrência da espécie *N. surinamensis* no Brasil;
6. *Neopestalotiopsis brasiliensis* é considerada uma nova espécie do gênero *Neopestalotiopsis*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA A. A. F.; VALLE, R.R. Ecophysiology of the cacao tree. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, p. 425-448. 2007

ARAÚJO, J.C.A.; GASPAROTTO, L de; GARCIA, M.V.B. Epidemiologia de *Pestalotiopsis* spp. em dendzeneiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.16, n.2, p.33, 1991.

CARDOSO, G. D. Etiologia e progresso da mancha de pestalotia do coqueiro (*Cocos nucifera* L.), em São Gonçalo, Paraíba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.2, p.335-336, 2003.

CROUS, P. W.; HAWKSWORTH, D. L.; WINGFIELD, M. J. Identifying and Naming Plant-Pathogenic Fungi: Past, Present, and Future. **Annual Review of Phytopathology**. V. 53, p. 247–267, 2015.

DUIN, I.M. et al. Etiologia e possíveis fontes de inóculo para a ocorrência da podridão de miniestacas de acácia-negra. **Summa Phytopathologica**, V.43, n.4, p.297-302, 2017.

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

GUBA E.F. **Monograph of *Monochaetia* and *Pestalotia***. Harvard University Press, Cambridge, USA, pp 342, 1961.

HANADA, R. E. et al. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuacu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. **Fungal Biology**, v. 114, p. 901-910, 2010.

HU, H. L. et al. Phylogenetic diversity of endophytic *Pestalotiopsis* species in *Pinus armandii* and *Ribes* spp.: evidence from rDNA and  $\beta$ - tubulin gene phylogenies. **Fungal Diversity**, v. 24, p. 1–22, 2007.

HYDE K. D; SOYTONG. The fungal endophyte dilema. **Fungal Diversity**, v. 33, p. 163-173, 2008.

HYDE K. D. et al. One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic genera: I (2014). **Fungal Diversity**, v. 67, p. 21 e 125, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola 2016**. Disponível em: <<https://ww2.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=ba&tema=lavourapermanente2016>> Acesso em: 20 jan. de 2018.

JAYAWARDENE, R. S. et al. Identification and characterization of *Pestalotiopsis*-likefungi related to grapevine diseases in China. **Fungal Biology**, v. 119, n. 5, p. 348–61, 2015.

- JEEWON, R.; LIEW, E.C.Y.; HYDE K.D. Phylogenetic evaluation of species nomenclature of *Pestalotiopsis* in relation to host association. **Fungal Diversity**, n.17, p.39-55, 2004.
- LIU A. R. et al. Cultural studies coupled with DNA based sequences analyses and its implication on pigmentation as phylogenetic marker in *Pestalotiopsis* taxonomy. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. V. 57, P. 528–535, 2010.
- MAHARACHCHIKUMBURA S. S. N. et al. *Pestalotiopsis*–morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. **Fungal Diversity**. V. 50, p. 167–187, 2011.
- MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. et al. Improving the backbone tree for the genus *Pestalotiopsis*; addition of *P. steyaertii* and *P. magna* sp. nov. **Mycological progress**, v. 13, n. 3, p. 617-624, 2013.
- MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. et al. *Pestalotiopsis* revisited. **Studies Mycology** V. 79, p. 121 e 186, 2014.
- MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. et al. Characterization of *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis* and *Truncatella* species associated with grapevine trunk diseases in France. **Phytopathologia Mediterranea**. V. 55, n. 3, p. 380-390, 2016.
- MEDEIROS, P. S. **Caracterização de fungos associados à vegetação de Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro e alguns fungos endofíticos “dark septate” provenientes de Roraima, RR**. 2015. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015
- MENEZES, J. A. S.; CARMO-NETO, D. **A modernização do agribusiness cacau**. 2 ed. Campinas: Fundação Cargil, 1993. 180p.
- MILLER, M. A. et al. **The CIPRES Portals**. Disponível em: <[http://www.phylo.org/sub\\_sections/portal](http://www.phylo.org/sub_sections/portal)>. Acesso em: 6 jun. 2017.
- MISRA, A. K. Guava diseases - their Symptoms, causes and management. In: NAQVI, S. A. M. H. Diseases of fruits and vegetables. Netherlands: Springer 2004. v.2, p. 81-119.
- 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, n. 1, p. 103-116, 1997.
- PHOTITA, W. et al. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. **Mycological Research**, v. 105, p. 1508–1513, 2001.
- 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.

- QUADROS, A. F. F. et al. Diversidade genética de fungos da família Amphisphaeriaceae na palma de óleo. In: **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 19.;
- 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.
- ROMERO, A.; CARRIÓN, G.; RICO-GRAY, V. Fungal latent pathogens and endophytes from leaves of *Parthenium hysterophorus* (Asteraceae). **Fungal Diversity**, v. 7, p. 81–87, 2001.
- RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. **Systematic Biology Advance Access**, 2012.
- RUBINI, M.R. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**, v.1, p.24-33, 2005.
- SANTOS C. C. **Caracterização Morfológica, Molecular e Inibição do Crescimento Micelial, Pelo Fosfito de Potássio, do Agente Causal da Mancha Foliar da *Macadamia Integrifolia***. 2016. Dissertação – Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, Bahia, 2016.
- SCHOCH C.L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 2012.
- SEMINÁRIO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 3., 2015, Belém, PA. Anais. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2015.
- SFALSIN, E. **Caracterização morfológica e molecular de *Fusarium decemcellulare* agente etiológico da galha-floral do cacauzeiro**. 2012. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- SOLARTE, F. et al. Diversity of *Neopestalotiopsis* and *Pestalotiopsis* spp., Causal Agents of Guava Scab in Colombia. **Plant Disease**, v. 102, n. 1, p. 49-59, 2018.
- SOUZA, L. N. **Complexo *Pestalotioid* associado a doenças em mangueiras e goiabeiras: abordagem filogenética e patogênica**. 2017. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, São Paulo, 2017.
- STIELOW J.B. et al. One fungus, which genes? Development and assessment of universal “primers” for potential secondary fungal DNA barcodes. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**. V. 35, P. 242–263, 2015.
- SUTTON B.C. **The Coelomycetes**. Commonwealth Mycological Institute, UK, **Kew, Surrey, England** p. 696, 1980.



TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

URTIAGA R. Índice de enfermedades en plantas de Venezuela y Cuba. Barquisimeto: Impresos en Impresos Nuevo Siglo. S.R.L., 1986, 202 p.

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**, New York, USA: p. 315-322, 1990.