



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**Caracterização biológica, morfológica e molecular de
isolados de *Colletotrichum* spp. associados à antracnose
da cebola**

Luiz Henrique Rocha Lopes

Recife – PE

2015

LUIZ HENRIQUE ROCHA LOPES

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA, MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE
ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. ASSOCIADOS À ANTRACNOSE DA CEBOLA**

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Prof. Dr. Ailton Reis (UFRPE/CNPH) - Orientador

Prof. Dr. Leonardo Silva Boiteux (CNPH) – Co-orientador

RECIFE - PE

AGOSTO– 2015

Ficha catalográfica

L864c Lopes, Luiz Henrique Rocha.
Caracterização biológica, morfológica e molecular de isolados de
Colletotrichum spp. associados à antracnose da cebola / Luiz
Henrique Rocha Lopes. – Recife, 2015.
55 f.

Orientador(a): Ailton Reis
Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural
de Pernambuco) - Departamento de Fitossanidade. Recife, 2015.
Referência(s).

1. Antracnose. 2. Mal-de-sete-voltas. 3. *Allium Ap Mat*
4. Filogenia multilocus I. Reis, Ailton. II. Título.

CDD 632

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA, MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE
ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. ASSOCIADOS À ANTRACNOSE DA CEBOLA**

LUIZ HENRIQUE ROCHA LOPES

Dissertação defendida em: 27/07/2015

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Ailton Reis (UFRPE/CNPH)

EXAMINADORES:

Dra. Meiriana Xavier Vila Nova (UFPE)

Prof^a. Dra. Rosa Lima Ramos Mariano (UFRPE)

Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama (UFRPE)

RECIFE - PE

AGOSTO– 2015

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

Isaac Newton

Ao meu pai Luiz Lopes e à minha mãe Eliete Lopes, pelo amor, carinho, apoio, paciência e educação que me deram. Essa foi e sempre será a combinação perfeita para meu sucesso.

Aos meus queridos e amados irmãos Victor Lopes e Isabella Lopes, por estarem sempre ao meu lado.

DEDICO

A Deus, por toda a força e sabedoria concedida.
À vida, pelos amigos que ela me proporciona ter.
À minha tia Roselete Moura e ao meu grande amigo Lucas Moura, por todo o apoio, carinho, cumplicidade e amizade que para sempre irei lembrar.
Ao meu amor Danielly Reinert e sua família, por todo o apoio nesta caminhada.

AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por cuidar da minha vida, me proporcionando sempre momentos incríveis e por realizar sonhos que jamais imaginei serem realizados.

Sou grato a meus pais, Luiz Lopes e Eliete Lopes, por todo o esforço e amor que sempre tiveram para me educar. Pelo companheirismo e apoio me ajudando a seguir sempre em frente nos estudos.

Ao meu irmão Victor Lopes, por estar sempre ao meu lado nos momentos que mais precisei. A minha querida irmã Isabella Lopes pelos momentos de descontração vividos.

Sou muito grato aos amigos Rose, ou melhor, Tia Rose, por ter sido minha mãe durante um ano, me ajudando em tudo que precisei, pelos conselhos, as conversas agradáveis e pelos deliciosos pratos preparados sempre com muito amor e carinho. Aos grandes amigos Luccas Moura e Thiago Oya por toda a parceria e pelos momentos incríveis que passamos juntos. Valeu meus irmãos! Aproveito também para prestar uma homenagem especial para alguém que não está mais entre nós, mas tenho certeza que iria gostar muito de me ver tendo essa grande conquista acadêmica, o grande querido amigo Euclides Moura.

Aos antigos amigos da época de graduação, Sibebe, Alessandra, Moara, Claudeana e Michele por estarem sempre presentes comigo nos momentos de estudos e também de diversões. Aos grandes amigos que conquistei em Recife e em Brasília, em especial Emanuel, Letícia, Felipe, Djalma e Jana, família Noletto, Paulo Ayala e Helder, pessoas com quem posso contar para toda a vida.

A todos os amigos discentes da UFRPE que de alguma forma cooperaram para a minha formação e a Darcy pelos momentos agradáveis no lanche sagrado de todos os dias!

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia por todo o esforço e dedicação ajudando a todos os discentes. Em especial, aos professores Ailton Reis e Marcos Câmara por todo o ensinamento que me passaram e pelos momentos de descontração enquanto estávamos juntos.

A todos os amigos incríveis que fiz no CNPH. Rayane, Fabiana, Luana, Jefferson, Wagner, Amanda, Túlio, Michele, Celma, Cléia, Maurício e Fred por toda ajuda e pelos muitos momentos de descontração.

Muito obrigado a todos!

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	v
SUMÁRIO.....	vi
RESUMO GERAL.....	vii
GENERAL ABSTRACT.....	viii
CAPÍTULO I – Introdução geral.....	2
1. A cultura da cebola.....	2
2. Etiologia e sintomatologia da doença.....	5
3. Epidemiologia da doença.....	7
4. O gênero <i>Colletotrichum</i>	7
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
CAPÍTULO II – Caracterização biológica, morfológica e molecular de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. associados à antracnose da cebola.....	19
ABSTRACT.....	19
INTRODUÇÃO.....	20
MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
RESULTADOS.....	27
DISCUSSÃO.....	30
AGRADECIMENTOS.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
CONCLUSÕES GERAIS.....	55

RESUMO GERAL

Uma das principais doenças no cultivo de cebola no Brasil é a antracnose, causada por espécies do gênero *Colletotrichum*. Neste trabalho foram utilizados 42 isolados obtidos de plantas do gênero *Allium* com sintomas de antracnose de todas as regiões geográficas do Brasil e caracterizados com o auxílio de métodos morfológicos, moleculares e de características culturais. O método de análise de inferência Bayesiana foi utilizado para uma análise inicial envolvendo o gene β -tubulina (*tub2*). Um outro grupo, oriundo desta análise, foi seqüenciado para os genes parciais actina (*act*) e *ApMat*. Dois grupos de haplótipos foram gerados e analisados separadamente, um concatenando *tub2* e *act* e outro *tub2*, *act* e *ApMat*. A análise revelou juntamente com análises morfológicas que a antracnose em cebola é causada, por várias espécies inseridas dentro dos complexos *acutatum* e *gloesporioides*. Todos os isolados representativos usados no estudo foram patogênicos sendo capazes de induzir sintomas típicos de antracnose, sobretudo em bulbos de cebola com variação de agressividade. Todas as informações deste trabalho levam a crer que, a antracnose em cebola é causada por um conjunto de espécies, diferente do que se tem relatado até o momento.

Palavras chave: antracnose, mal-de-sete-voltas, *Allium*, *Apmat*, filogenia multilocus

GENERAL ABSTRACT

One of the main onion crop diseases in Brazil is anthracnose, caused by species of genus *Colletotrichum*. In this work it was used several *Colletotrichum* isolates obtained from plants do *Allium* genus with symptoms of anthracnose. The isolates were obtained from different regions of Brazil and characterized with the aid of morphological methods, molecular and cultural features. The Bayesian Analysis Method of inference was used for an initial analysis involving the genomic region β -tubulin (*tub2*). A representative group of isolates, selected in the first analysis, was sequenced for the partial region of actin (*act*) and *ApMat*. Two groups of haplotypes were generated and analyzed separately, one by concatenating *tub2* and *act* and Other *tub2*, *act* and *ApMat*. The analysis revealed along with morphological analyzes that onion anthracnose is probably caused by several *Colletotrichum* species belonging to complexes *acutatum* and *gloesporioides*. All the representative isolates used in this study were pathogenic on onion, being able to cause of induce typical symptoms of anthracnose, especially on bulbs with variable aggressiveness range. All the results obtained in this work lead us to believe that onion anthracnose is caused by several species different of what has been reported so far.

Keyword: anthracnose, onion twister , *Allium*, *ApMat*, multilocus phylogeny

CAPÍTULO I

Introdução Geral

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA, MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. ASSOCIADOS À ANTRACNOSE DA CEBOLA

INTRODUÇÃO GERAL

1. A cultura da cebola

A cebola possui um centro de origem incerto, uma vez que não foram encontradas espécies selvagens de *Allium cepa* (KIILL et al., 2007). Entretanto acredita-se que ela seja originária de regiões de clima temperado compreendendo países como Afeganistão, Irã e alguns países do sul da Antiga União Soviética. As espécies mais próximas são *A. galanthum*, *A. oschaninii* e *A. vavilovii*, as quais podem ser encontradas em estado silvestre em áreas da antiga União Soviética e no Afeganistão (GOLDMAN et al., 2000). Com registro de cultivos realizados a quatro mil anos atrás através dos egípcios, esta hortaliça é considerada uma das mais antigas cultivadas e domesticadas no mundo. Os Romanos, a partir dos Gregos, introduziram a cebola na Europa, sendo que diversas cultivares foram listadas em catálogos do século IX. Entretanto, foi somente no período medieval, que ela se tornou amplamente difundida no continente Europeu (FRISTSCH; FRIESEN, 2002).

Em 1753, Carl van Lineus registrou a primeira classificação botânica da cebola no seu livro intitulado “*Species Plantarum*”, como sendo pertencente à família Liliaceae e ao gênero *Allium*. Sua classificação botânica consiste em: Sub-Divisão – Angiospermae; Classe – Monocotyledoneae; Sub-classe – Liliidae; Ordem – Liliales; Família – Alliaceae; Gênero – *Allium* e Espécie – *Allium cepa* L. Dentro deste gênero estão também outras importantes espécies para a agricultura como o alho, o alho porró e a cebolinha (KIILL et al., 2007).

Quanto à morfologia, a cebola é tida como uma planta herbácea, com cerca de 60 cm de altura e que apresenta folhas longas dispostas alternadamente em duas fileiras, podendo ou não serem cerosas. Seu caule verdadeiro está localizado abaixo do solo, o qual se insere a parte comercial, um bulbo tunicado, podendo apresentar variação em formato, pungência, coloração e tamanho (FILGUEIRA, 2008). Gundim (2015), afirma que os bulbos de cebola podem apresentar quatro cores de casca, dois formatos, três tipos de sabores (pungência), quatro categorias de qualidade e sete classes de tamanho no comércio atual. Além disso, toda

essa variabilidade de coloração, tamanho e pungência devem-se ao provável fato de que a cebola apresenta origem incerta, sugerindo que existam diversos centros de origem.

A cebola é preferencialmente consumida *in natura* na forma de condimentos, temperos e saladas. Ela está entre as hortaliças mais importantes para economia mundial ocupando o quarto lugar em importância econômica e o terceiro em volume de produção. No Brasil, ela ocupa o terceiro lugar em termos de valor econômico, perdendo em posição somente para as culturas da batata e do tomate. O Brasil é o oitavo maior produtor de cebola, respondendo atualmente por 2% da produção mundial (FAO, 2013). No ano de 2012 o Brasil colheu aproximadamente 1.444.146 toneladas produzidas em 58.496 hectares com uma produtividade média de 24,68 toneladas por hectare. A Região Sul do país é a maior produtora alcançando aproximadamente 69% da cebola produzida em todo território brasileiro (IBGE, 2013).

A cebola foi introduzida no Brasil através de imigrantes açorianos que colonizaram as regiões de Rio Grande e Pelotas (RS) durante o século XVIII (FOUTORA, 1994). O cultivo da cebola ocorre em vários estados brasileiros, a saber: Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo, Minas Gerais e Paraná. No Nordeste, os estados da Bahia e Pernambuco são os grandes produtores de cebola, sobretudo na região do Vale do São Francisco. Municípios Belém do São Francisco e Cabrobó (PE) e Casa Nova, Juazeiro, Santo Sé, Mucugê e Irecê (BA) são importantes produtores de cebola. (SCHMITT, 2010).

No Brasil, a cebolicultura é uma atividade exercida principalmente pelo pequeno agricultor e sua importância socioeconômica vai além da rentabilidade, contribuindo também para a viabilização de pequenas propriedades e a fixação dos produtores no campo, reduzindo o êxodo rural (RESENDE; COSTA, 2007). Há estimativas que a cadeia produtiva da cebola gera mais de 250 mil empregos diretos no setor de produção (VILELA; HENZ, 2000).

O mercado da cebola no Brasil possui uma relativa homogeneidade na oferta ao longo do ano, devido à ampla variação nas condições climáticas das regiões produtoras e à existência de cultivares adaptadas aos diferentes ambientes de cultivo e níveis de tecnologias aplicadas na produção. Ainda assim, a produção apresenta por vezes oscilações ao longo e entre os anos, alternando excesso de oferta com períodos de escassez, relacionados principalmente a fatores climáticos. Nos meses de março a julho ocorrem períodos de escassez, que normalmente têm sido atendidos com a importação de cebola, principalmente da Argentina, Holanda e Espanha. Na maioria dos casos, a cebola importada resulta em oferta acima da demanda, provocando uma queda de preço do produto brasileiro, pelo fato do produto importado ter uma melhor padronização comercial e visual que a cebola produzida no

Brasil (BOEING, 2002). A produção brasileira sustenta somente o mercado interno, destinando-se basicamente ao consumo *in natura* e condimento em salada (SANTOS; OLIVEIRA, 2011).

A cebolicultura pode ser prejudicada por diversos fatores externos, como condições climáticas indesejáveis, pragas e doenças. A cultura da cebola é passível de doenças causadas por nematóides, fungos, bactérias e vírus, que podem atacar diversas partes da planta. Muitas dessas doenças tornam-se fatores limitantes ao cultivo se medidas de controle adequadas não forem adotadas. Dentre as doenças de origem fúngicas destacam-se: a queima-das-pontas, conhecida também como “sapecta” e é causada por *Botrytis* spp. Esta doença é de grande importância para a cultura da cebola por ocorrer na região Nordeste e nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, principais pólos de produção de cebola no Brasil. A raiz rosada, que é causada por *Pyrenochaeta terrestris* e é difundida mundialmente ocorrendo com maior frequência nas regiões subtropicais e tropicais do planeta, sendo bastante disseminada em todo o Brasil. A mancha púrpura causada por *Alternaria porri*, muito comum no Vale do São Francisco com ocorrência em todo o ano. A podridão basal, uma doença de ocorrência mundial causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, conhecida também como “bico branco” ou “fusariose” (GAVA; TAVARES 2007).

Dentre as doenças de origem bacterianas destacam-se: a podridão bacteriana causada por *Pectobacterium* spp. promovendo podridões aquosas do bulbo ou a “canela-preta” na haste das plantas e a podridão bacteriana das escamas causadas por *Burkholderia cepacia* (GAVA; TAVARES 2007).

Dentre as doenças causadas por nematóides destacam-se: as galhas, que são bastante frequentes no Vale do São Francisco (causadas por *Meloidogyne javanica*, *M. incognita*, *M. hapla*, *M. chitwoodi*) e infecções nas raízes (causadas por *Helicotylenchus dihystera*), bulbo e pseudocaule (causados por *Ditylenchus dipsaci*). Existem ainda doenças de etiologia viral, sendo as mais comuns a “sapecta” (causada pelo IYSV – *Iris yellow spot virus*) e o mosaico em faixas ou nanismo amarelo (causado por OYDV – *Onion yellow dwarf virus*) (GAVA; TAVARES 2007).

No Brasil e em diversos países tropicais produtores de cebola, uma das doenças principais, limitantes nos campos de produção é a Antracnose ou “mal-de-sete-voltas” causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *cepae* (GAVA; TAVARES 2007).

2. Etiologia e sintomatologia da doença

A antracnose foliar da cebola é atribuída ao fungo *Colletotrichum gloesporioides* f. sp. *cepae* e tem sido relatada na grande maioria das regiões que produzem cebola no Brasil, apesar de ter ocorrência fortuita e localizada (BOFF, 1993; MAFFIA et al., 2002).

Estudos realizados por Nunes e Kimati (1997) relatam que o agente causal da antracnose em cebola foi identificado pela primeira vez como *Colletotrichum chordanianum* Nolla o que seria uma sinonímia de *C. gloesporioides*. Bajungu (1979) caracterizou o patógeno com base na patogenicidade, fisiologia e sorologia de *C. gloesporioides* em cebola, e constatou haver uma especialização fisiológica do fungo, sendo necessário estabelecer uma *forma specialis* (sensu Arx, 1957), denominando o fungo como *C. gloesporioides* f. sp. *cepae*. Por outro lado, Ebenebe (1980) verificou similaridade do agente causal da antracnose em cebola, na Nigéria, com *C. gloesporioides* var. *minor*, descrita por Simmonds em 1965. Apesar de Bajungu ter observado especificidade de *C. gloesporioides* à cebola (*A. cepa*), Suhardi (1993) relata a ocorrência do mesmo patógeno em *Allium oschaninii*, e Sasaki & Cerezine (1995) relata a ocorrência também em *Allium schoenoprasum*. O fungo tem como teleomorfo *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld & Schrenk (sin. *Gnomoniopsis cingulata* Stonem.) da família Phyllachoraceae, ordem Polystigmatales (sin. Phyllachorales, classe Ascomycetes (sin. Euscomycetes), subdivisão Ascomycotina (Hawksworth et al., 1995).

Dentro da espécie *C. gloesporioides* ocorre grande variabilidade com relação à patogenicidade de isolados. A morfologia dos conídios é predominantemente de formato cilíndrico, com ápice obtuso e base truncada, retos, hialinos ou de tonalidade rosada a salmão, quando em massa conidial, medindo de 12 a 17 µm por 3,5 a 6 µm (SUTTON, 1992). Os conidióforos possuem coloração variando de hialinos a marrons, em paliçada, unicelulares, formados sobre base estromática, subcuticular, do tipo acérvulo. Os acérvulos possuem setas pretas e por este motivo aparentam-se escuros com a evolução da doença. A conidiogênese é do tipo enteroblástica fialídica. As setas alcançam em torno de 200 µm com um a quatro septos, variando de marrom a preto, alargados na base e septadas no ápice. O ascostroma é do tipo peritécio, de parede fina e preta, sem material estromático. Em meio BDA (batata, dextrose e ágar) a colônia apresenta-se geralmente cinza, tornando-se verde escura a preta (WORDELL FILHO, 2006).

A antracnose em cebola é uma doença de clima tropical e subtropical, favorecida por frequentes precipitações, podendo causar perda total na produção de bulbos, quando são utilizadas variedades que são susceptíveis à doença. (GUPTA et al., 1994). Quando veiculado

pela semente, e se o ambiente for favorável, o patógeno pode causar severos danos no plantio (KOCH; MORAES, 1993).

Segundo Wordell Filho et al. (2006), os sintomas da antracnose são evidenciados em plantas de cebola de forma variada e complexa, alterando sua aparência de acordo com o estágio fenológico da planta. O início da doença se dá com pequenas lesões claras e deprimidas sobre a lâmina foliar, axila ou bainha, que vão aumentando de tamanho, apresentando-se ovaladas, com aparência rosada, evoluindo posteriormente para pontos escuros, com uma tonalidade clara no fundo. A aparência das manchas muda de coloração de rosado claro para pontos escurecidos com um fundo claro em decorrência do desenvolvimento de acérvulos do patógeno com setas negras. Observam-se também tombamentos de plântulas, quando o patógeno é veiculado pela semente, porém, no inverno, tal fato é pouco provável e o fungo permanece dormente ou se desenvolve lentamente até o aumento da temperatura.

Wordell Filho et al. (2006) esclarece ainda que, com a evolução dos sintomas, ocorre a formação de grandes áreas necrosadas fazendo com que as folhas tornem-se cloróticas, retorcidas e “enroladas”, sendo este o motivo da antracnose da cebola ser conhecida como mal-de-sete-voltas.

No bulbo ocorre a formação de manchas escurecidas nas escamas externas, com estromas verde-escuros a pretos abaixo da cutícula das escamas, causando deformações no bulbo deixando-o com formato de “charuto”. Infecções no início da bulbificação podem provocar redução da parte aérea, ocorrendo a emissão de novas raízes pela multiplicação do ponto de crescimento, fazendo com que as escamas rompam na altura da coroa. Neste caso, bulbos aparentemente saudáveis, mas que tiveram a estrutura de suas escamas alteradas pelo patógeno, são mais susceptíveis a infecção de outros microrganismos como bactérias, apodrecendo no campo ou na fase de armazenamento resultando no sintoma conhecido como “cachorro-quente” (WORDELL FILHO et al., 2006). Ademais, este patógeno causa podridão de bulbos na fase de armazenamento (REIS et al., 2009).

Além dos sintomas foliares supracitados, pode ocorrer também em alguns casos manchas foliares elípticas e marrons contendo um halo amarelo. Em sementeiras, a doença causa estiolamento, mela ou tombamento de mudas, seguido de apodrecimento e formação de uma massa rosada de esporos do fungo (WORDELL FILHO et al., 2006).

Em campos de produção de sementes ocorrem sintomas próximos a inflorescência da planta, facilitando desta forma a contaminação e disseminação da doença pela semente (NOGUES; LUZZARDI, 1983).

3. Epidemiologia da doença

Boff et al.(1995), relata que a principal fonte do inóculo inicial do patógeno em lavouras é a semente. Este também pode adentrar na lavoura através de máquinas, ferramentas, transporte de bulbos e terra. O fungo causador da antracnose em cebola sobrevive em sementes, nos restos de cultura ou em hospedeiros alternativos, que constituem fonte primária de inóculo. O umbuzeiro (*Spondias tuberosa*), no vale do São Francisco, Brasil (TAVARES et al., 1996) e *Euphorbia hypericifolia*, em Java (SUHARDI, 1993) tem sido relatados como hospedeiros alternativos.

A disseminação do patógeno e o grau de esporulação são determinados pela extensão do tecido que é afetado. Os esporos são liberados pela ação da água sobre os acérvulos, onde há a dissolução da mucilagem, sendo encaminhados para as partes inferiores da planta ou então caindo no solo, sendo assim disseminados por salpicos da chuva ou da água de irrigação. Em épocas de chuva a doença se desenvolve mais rapidamente. Através do vento, tem-se relativamente pouca disseminação. A sobrevivência na forma de conídio livre é extremamente curta, tendo sido observada até quatro meses (CHAWADA; RAJASAB, 1992); Entretanto, quando se tem a forma de estroma em restos culturais ou na semente ocorre a sobrevivência do patógeno com possíveis chances de ocorrer contaminação de um ciclo de plantio para o seguinte (WORDELL FILHO et al., 2006).

Os conídios germinam e infectam a planta da cebola quando a temperatura está entre 23 e 30°C. Inicialmente a aderência do esporo ao tecido é auxiliada por um polímero mucilaginoso secretado pela superfície do conídio umedecido. Os conídios, ao germinarem, formam apressórios e penetram no tecido através dos estômatos, ferimentos e diretamente pela cutícula. Durante a infecção, são produzidas fitotoxinas como metabólitos secundários e enzimas que ajudam a degradar a cutícula e a parede celular da planta de cebola (WORDELL FILHO et al., 2006).

4. O gênero *Colletotrichum*

Em 1837 o gênero *Colletotrichum* foi descrito por Corda como sendo um Ascomiceto (ordem Sordariales, família Glomerellaceae). Este gênero possui várias espécies, incluindo espécies fitopatogênicas, sendo *C. dematium* (Pers. e Fr.) Grove a espécie-tipo. Porém, anteriormente, em 1790, Tode introduziu inicialmente a denominação de *Vermicularia*. Corda, em outro trabalho alterou para a denominação vigente (SUTTON, 1980). Estes fungos

são caracterizados por apresentar micélio imerso, ramificado, septado, hialino, marrom pálido ou marrom escuro. Conídios hialinos, não septados (exceto no início da germinação), retos ou falcados, lisos, com parede fina, às vezes gutulados, não aristados ou com o ápice prolongado em um simples apêndice celular. Apressórios marrons, com margens contínuas ou irregulares, simples ou germinando repetidamente para formar colunas complexas de vários apressórios conectados (SUTTON, 1980). A coloração das colônias de *Colletotrichum* variam nos diferentes meios de cultura. A variação abrange tonalidades que vão do branco ao cinza escuro, podendo ocorrer ou não a presença de esclerócios ou de microesclerócios em algumas espécies (SUTTON, 1992).

O gênero *Colletotrichum* abriga fungos que são considerados os fitopatógenos de maior importância em todo o mundo, pelo fato de serem os agentes causais da antracnose, uma doença que afeta uma ampla gama de hospedeiros, incluindo cereais e gramíneas, leguminosas, hortaliças, culturas perenes e árvores frutíferas (CROUCH et al., 2009; KIM et al., de 2009; RATANACHERDCHAI et al., 2010). Dentre os fungos fitopatogênicos, o gênero *Colletotrichum* ocupa a oitava posição em importância fitopatológica e econômica no mundo todo (DEAN et al., 2012). As espécies pertencentes a este gênero possuem vários estilos de vida, como espécies endofíticas, epifíticas, saprofíticas, patogênicas a plantas, podendo ser patogênicas também ao homem (PRIHASTUTI et al., 2009; OGAWA et al., 2014).

Aproximadamente 900 espécies já foram descritas ou alocadas para o gênero *Colletotrichum* (BAILEY; JEGGER, 1992). Stoneman (1898) encontrou a forma ascógena em antracnose provocada por espécies de *Gloesporium*, colocando-as em um gênero único denominado então de *Gnomoniopsis*. Entretanto, o termo *Gnomoniopsis* já era utilizado para outro fungo catalogado por Berlese em 1892. (Von Arx, 1957). Von Scherenk e Spaulding (1903) reclassificaram a forma perfeita do fungo para *Glomerella*, contendo cinco espécies.

As estimativas do número de espécies segundo a literatura variam bastante. Baseando-se em caracteres morfológicos (morfologia dos conídios), relação com o estágio perfeito e patogenicidade, Von Arx (1957) reduziu o número de espécies relacionadas à *Colletotrichum*, de várias centenas (mais de 800 espécies que eram descritas e/ou atribuídas) a 11 espécies com 12 formas. Já Sutton (1980), considerou 22 espécies, onde a distinção de espécies foi baseada também em critérios taxonômicos de morfologia de conídios e apressórios, além de características culturais das colônias. Mais tarde, em 1992, Sutton aumentou esse número para 39 espécies “aceitas”, incluindo uma variedade e oito *formae speciales*, com base nos padrões utilizados no trabalho anterior e na especificidade do hospedeiro. Kirk et al. (2008) na 10ª

edição do Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi estimaram 60 espécies, enquanto que no site do Index Fungorum (acesso em: 30 jun. 2015), encontrou-se o registro de 808 nomes relacionados à *Colletotrichum*.

A caracterização de espécies de *Colletotrichum* foi realizada por muito tempo baseada somente em critérios descritivos clássicos, como dimensões dos conídios, presença ou ausência de setas e sua morfologia. No Brasil, a caracterização de *C. gloesporioides* f. sp. *cepae* realizada por Bajungo (1979) levou em consideração somente caracteres morfológicos, acrescido de testes de sorologia e fisiologia do patógeno. Ao longo do tempo, outros critérios foram inseridos como: gama de hospedeiros e os tipos de dano causados nos tecidos vegetais (SUTTON, 1980). No entanto, essas características culturais e morfológicas como um todo são pouco confiáveis por serem extremamente variáveis e plásticas, variando conforme os métodos e condições de experimentos, levando a uma imprecisão na classificação (CAI et al., 2009; HYDE et al., 2009). Classificações realizadas considerando a gama de hospedeiros também não são consistentes, pois taxóns como *C. acutatum*, *C. gloesporioides* e *C. graminicola* (Ces) Wils, dentre outros, infectam uma vasta gama de hospedeiros. Além disso, outro aspecto a se considerar é que grupos de isolados patogênicos e não patogênicos podem ser incluídos em uma única espécie, pelo conceito de espécie biológica (SUTTON, 1992).

No geral, parece haver poucas perspectivas para a elaboração de métodos morfológicos abrangentes para a identificação taxonômica para *Colletotrichum* ou seu teleomorfo. (CROUCH et al., 2009). Devido à taxonomia desenvolvida com base em características morfológicas para o gênero *Colletotrichum* não ser satisfatória, têm-se a necessidade da utilização de um estudo molecular polifásico para a identificação e caracterização correta, o que reflete na classificação de espécies e taxa sub-específicos dentro do gênero (SUTTON, 1992; CANNON et al., 2000). Essas abordagens moleculares estão sendo cada vez mais utilizadas para uma correta caracterização da diversidade dentro do gênero *Colletotrichum* (JOHNSTON; JONES 1997; MILLS et al., 1992; MORIWAKI et al., 2003, DU et al., 2005) e a utilização de análises filogenéticas multilocus e do conceito de espécies filogenéticas (TAYLOR et al., 2000) estão tornando-se cada vez mais um componente indispensável para o estudo taxonômico desse gênero.

Ao longo do tempo, diversas regiões genômicas têm sido utilizadas para a caracterização molecular de espécies fúngicas. Essas regiões são responsáveis em codificar proteínas essenciais a vida destes seres. A β -Tubulina é um gene que codifica proteína relacionada com participação direta na formação e composição de microtúbulos em células fúngicas. O gene ACT (actina) por sua vez codifica para uma proteína de congênere nome,

fundamental para a formação de microfilamentos que compõem o arcabouço celular dos fungos e de outros organismos eucariontes (HAROLD et al., 2002). Outros genes importantes usados para a caracterização molecular de fungos são: CAL (calmodulina) e o GAPDH que codifica para a enzima Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. A proteína codificada pelo gene CAL é responsável por intermediar a ligação do Ca^{2+} com diversas outras proteínas envolvidas em processos metabólicos celulares nos fungos, por sua vez a enzima GAPDH é essencial para as reações de glicólise e de gliconeogênese em fungos (BROETTO, 2010).

A região ITS (Internal Transcribed Spacer) do 5.8S rDNA é a mais utilizada para estudos de filogenia do gênero *Colletotrichum*, e por conta disso, *primers* baseados nessa região (MILLS et al., 1992) foram utilizados nos últimos 15 anos, como um *primer* específico para *C.gloesporioides*. Entretanto, sabe-se que a região ITS possui diversas limitações fazendo ser indispensável a busca de outras regiões, para uso em conjunto sempre que possível, em estudos filogenéticos do gênero *Colletotrichum* (SILVA et al., 2011).

Apesar de ainda não existir um consenso a respeito de quais regiões são mais úteis para diferenciar isolados dentro do gênero *Colletotrichum* (ROJAS et al., 2010), trabalhos importantes (CAI et al., 2009; DAMM et al., 2009; DAMM et al., 2013; SHARMA et al., 2013) mostram que os genes TUB2, GAPDH, CAL, ACT, CHS (quitina sintase), e EF1 α (fator de alongação), GS (glutamina sintetase), HIS (histona) têm sido importantes para determinar a separabilidade e a heterogeneidade entre isolados de *C. gloesporioides*. Trabalhos recentes (ROJAS et al., 2010; SILVA et al., 2012; DOYLE et al., 2013; SHARMA et al., 2013) mostram ainda que há um outro importante marcador o qual possui uma alta resolução para separar espécies de *C. gloesporioides sensu lato*, o Apn2 e Mat 1-2 igs (Apmat), que é uma região intergênica relacionada com o mating type de espécies de *C. gloesporioides*.

Abordagens filogenéticas dentro do gênero *Colletotrichum*, realizadas com a concatenação de diversas regiões genômicas associadas com dados de morfologia, fisiologia e patogenicidade são recomendadas, sobretudo, por possibilitarem o reconhecimento de clados consistentes (CAI et al., 2009). Abordagens como esta, permitiram juntar 119 espécies de *Colletotrichum* em nove clados distintos (*trucatum*, *spaethianum*, *orbiculare*, *graminicola*, *gloesporioides*, *destructivum*, *dematium*, *boninense* e *acutatum*) com espécies em cada clado muito próximas filogeneticamente. Sendo assim, esses estudos permitiram a separação das espécies anteriormente determinadas em complexo de espécies de *Colletotrichum* (CANNON et al., 2012) O número de espécies em cada complexo corresponde a 28 no *gloesporioides* (PENG et al., 2012; WEIR et al., 2012; DOYLE et al., 2013; PENG et al., 2013) oito espécies

no orbiculare, três no truncatum, cinco no spaethianum, 13 no graminicola, seis no destructivum, seis no dematium (DAMM et al., 2013; WEIR et al., 2012). Para o complexo boninense 18 espécies (DAMM et al., 2012a) e para o complexo acutatum existem 31 espécies (DAMM et al., 2012b).

Como até o momento o agente etiológico da antracnose em cebola foi somente caracterizado levando-se em conta caracteres morfoculturais, e sabendo-se da importância da caracterização molecular para a correta caracterização do patógeno, este trabalho teve como objetivo caracterizar e identificar a diversidade de espécies de *Colletotrichum* associados à *A. cepa* através de estudos de morfologia e patogenicidade, associados com o uso de técnicas moleculares, analisando a relação filogenética entre os isolados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, J. A.; JEGER, J. M. *Colletotrichum: biology, pathology control*. Oxford: British Society for Plant Pathology, 1992. 388p.
- BAJUNGU, H. E. **Caracterização patogênica, serológica e fisiológica de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. (Sensu Arx, 1957) f. sp. *cepa* n.c.1979**, 35 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1979.
- BOEING, G. Fatores que afetam a qualidade da cebola na agricultura familiar catarinense. **Instituto Cepa/SC**, Florianópolis. 85p, 2002.
- BOFF, P. Antracnose-foliar da cebola: diagnóstico e controle. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.6, n.2, p.34-37, 1993.
- BOFF, P.; STADNIK, M. J.; FERRARI, R.; SILVA, T. D. Estado sanitário de semente de cebola comercializada em Santa Catarina. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.17, n.2, p.165-170, 1995.
- BROETTO, L. **Caracterização funcional da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase na superfície celular do entomopatógeno *Metarhizium anisopliae***. 2010, 162 f. Tese (Doutorado em biologia celular e molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2010.
- CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; WALLER, J.; ABANG, M. M.; ZHANG, J. Z.; YANG, Y. L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z. Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R. G.; MCKENZIE, E. H. C.; JOHNSTON, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Kunming, v.39, p. 183-204, 2009.
- CANNON, P. F., DAMM, U., JOHNSTON, P. R., WEIR, B. S. *Colletotrichum* - current status and future directions. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, n. 1, p. 181-213, 2012.
- CANNON, P. F.; BRIDGE, P. D.; MONTE, E. Linking the Past, Present, and Future of *Colletotrichum* Systematics. In: PRUSKY D, FREEMAN S, DICKMAN M, editors. ***Colletotrichum*: Host specificity, Pathology, and Host-pathogen Interaction**. St. Paul, Minnesota: APS Press; pp. 1–20, 2000.
- CHAWDA, H. T.; RAJASAB, A. H. Epidemiological investigations on anthracnose and purple blotch of onion (*Allium cepa* L.), **Onion NL for Tropics**, v.4, p.65-66, 1992.
- CROUCH, J. A.; CLARKE, B. B.; WHITE, J. F. J.; HILLMAN, B. I. Systematic analysis of the falcate-spored gramminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species of the fungus from warm season grasses. **Mycologia**, New York, v. 101, n. 5 p. 717–732, 2009.
- DAMM, U.; WOUDEBERG, J. H. C.; CANNON, P. F.; CROUS, P. W. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, n.1, p. 45-87, 2009.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, n. 1, p. 1-36, 2012a.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, n. 1, p. 37-113, 2012b

DAMM, U.; CANNON, P. F.; LIU, F.; BARRETO, R. W.; GUATIMOSIM, E.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum orbiculare* species complex: important pathogens of field crops and weeds, **Fungal Diversity**, Kunming, v. 61, n.1, p. 29-59, 2013.

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

DOYLE V. P.; OUDEMANS, P. V.; REHNER, S. A.; LITT, A. Habitat and host indicate lineage identity in *Colletotrichum gloeosporioides* s. l. from wild and agricultural landscapes in North America. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, e62394, 2013.

DU, M.; SCHARDL, C. L.; NUCKLES, E. M.; VAILLANCOURT, L. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. **Mycologia**, New York, v. 97, p. 641–58, 2005.

EBENEBE, A. C. Onion twister disease caused by *Glomerella cingulata* in Northern Nigeria. **Plant disease**, Saint Paul, v.64, p.1030-1032, 1980.

FAO, Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura FAO Statistical Yearbook 2013 World Food and Agriculture. Disponível em: Acesso em: 24 de mai. 2013

FILGUEIRA F.A.R. **Novo manual de olericultura**. 3. ed. Viçosa: UFV, 421 p, 2008.

FONTOURA, L. F. M. **As relações de produção e a produção do espaço agrário em São José do Norte**. 1994, 126f. (Mestrado em Sociologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1994.

FRITSCH R. M.; FRIESEN N. Evolution, Domestication, and Taxonomy. In: RABINOWITCH H.D.; CURRAH L (eds). **Allium Crop Science: Recent Advances**. Wallingford, CAB International, p. 5-30, 2002.

GAVA, C. A. T; TAVARES, S. C. C. H. Cultivo de Cebola no Nordeste. Sistemas de produção, 3. ISSN 1807-0027. Nov. 2007.

GOLDMAN, L; HAVEY M. J.; SCHROECK G. History of public onion breeding programs and pedigree of public onion germplasm releases in the United States. **PlantBreeding Reviews**, Westport, v. 20, p. 67-103, 2000.

GUNDIM, L. F. Coloração da casca é atrativo para consumidores de cebola. Disponível em: <http://www.revistacampoenegocios.com.br/coloracao-da-casca-e-atrativo-para-consumidores-de-cebola/>. Acesso em: 04 mai. de 2015.

GUPTA, R. P.; SRIVASTAVA, K. J.; PANDEY, U. B. Diseases and insect pests of onion in India. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.358, p.265-269, 1994.

HANELT, P. Taxonomy, evolution and history. In: RABINOWITCH H. D.; BREWSTER J. L. (eds). **Onion and allied crops**. Boca Raton: CRC Press, v. 1, p.1-26, 1990.

HAROLD, F. M. Force and compliance: rethinking morphogenesis in walled cells. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 37, p. 271-282, 2002.

HAWKSWORTH, D. L.; SUTTON, B. C.; AINSWORTH, G. C. **Ainsworth & Bisby's dictionary of fungi**, 8.ed. Kew: CAB, p. 445, 1995.

HYDE, K. D.; CAI, L.; CANNON, P. F.; CROUCH, J. A.; CROUS, P. W.; DAMM, U.; GOODWIN, P. H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P. R.; JONES, E. B. G.; LIU, Z. Y.; MCKENZIE, E. H. C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S. R.; PFENNING, L. H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R. G.; TAN, Y. P.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z. *Colletotrichum* - names in current use. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, n. 1, p. 147-183, 2009.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. **Sistema IBGE de Recuperação Automática**: Tabela 1612: área plantada, área colhida, quantidade produzida e valor da produção da lavoura temporária, 2013. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. Acesso em 02 fevereiro 2015.

JOHNSTON, P. R.; JONES, D. Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit-rots assessed using rDNA sequences. **Mycologia**, New York, v. 89, p. 420–430, 1997.

KIILL, L. H. P.; RESENDE, G. M.; SOUZA, R. J.; SOUZA, SOUZA, R. J. **Cultivo da cebola no Nordeste**. 2007 Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cebola/CultivoCebolaNordeste/botanica.htm>. Acesso em: 01 jun. 2015.

KIM, H. R.; LIM, T. H.; KIM, J.; KIM, Y. H.; KIM, H. T. Potential of cross infection of *Colletotrichum* species causing anthracnose in persimmon and pepper. **Plant Pathology Journal**, Faisalabad, v. 25, n. 1, p. 13-20, 2009.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. **Dictionary of the Fungi**. 10th ed. Wallingford: CAB International, 2008. 771 p.

KOCH, E. F. A.; MORAES, M. H. D. Avaliação de métodos para detecção de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *cepae* e *Alternaria porri* em sementes de cebola (*Allium* sp.). **InformativoAbrates**, Curitiba, v.3, p.87, 1993.

MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G.; PEDROSA, R. A. Doenças da cebola. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 218, p. 75-87, 2002.

MILLS, R. R.; SREENIVASAPRSAD, S.; BROWN, A. E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR RAPD bind patterns of *Colletotrichum*

- isolates from banana from Australia. **FEMS Microbiology Letter**, Oxford, v. 98, p. 137-144, 1992.
- MORIWAKI, J.; SATO, T.; TSUKIBOSHI, T. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. Nov. from Japan. **Mycoscience**, Tokyo, v. 44, n. 1, p. 47-53, 2003.
- NOGUES, M. A.; LUZZARDI, G. C. Controle químico das doenças da cebola. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.8, p.555, 1983.
- NUNES, M. E. T.; KIMATI, H. Doenças do alho e da cebola (*Allium sativum* L. e *Allium cepa* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, p. 49-64, 1997.
- PENG L. J.; SUN T.; YANG Y. L.; CAI L.; HYDE K. D.; BAHKALI, A. H.; LIU, Z. Y. *Colletotrichum* species on grape in Guizhou and Yunnan provinces, China. **Mycoscience**, 54:29–41, 2013.
- PHOULIVONG, S. *Colletotrichum*, naming, control, resistance, biocontrol of weeds and current challenges. **Current Research in Environmental and Applied Mycology**, Chiang Rai, v. 1, n. 1, p. 53-73, 2011.
- PRIHASTUTI, H.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE E. H. C.; HYDE, K. D. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, p. 89-109, 2009.
- RATANACHERDCHAI, K.; WANG, H.; LIN, F.; SOYTONG, K. ISSR for comparison of cross- inoculation potential of *Colletotrichum capsici* causing chili anthracnose. **Microbiology Research**, Paris, v. 4, n. 1, p. 76–83, 2010.
- REIS, A.; LOPES, C. A.; HENZ, G. P. Doenças. In: OLIVEIRA, V. R.; BOITEUX, L. S. **Sistema de produção da cebola**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2009. Disponível em: <http://www.cnpq.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_da_cebola/doencas.html> Acesso em: 07 fev. 2015.
- RESENDE, G. M. de; COSTA, N. D. Socioeconomia. In: COSTA, N. D.; RESENDE, G. M. de. (Ed.). **Cultivo da cebola no Nordeste**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2007. (Sistemas de Produção, 3). Disponível em: <http://www.cnpq.embrapa.br/sistema_producao/spcebola/socioeconomia.htm>. Acesso em: 02 fev. 2015.
- ROJAS E. I.; REHNER, S. A.; SAMUELS G. J.; *Colletotrichum gloeosporioides* s. l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host associated pathogens from asymptomatic endophytes. **Mycologia** 102:1318–1338, 2010.
- SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R. Melhoramento genético de cebola no Brasil: avanços e desafios. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 51. **Horticultura Brasileira**, 29. Viçosa: ABH.S5726-S5743, 2011.

SASAKI, J. L. S.; CERZINE, P. C. Ocorrência do mal de sete voltas, *Colletotrichum gloeosporioides*, Penz. [sensuArx, 1957] em cebolinha, *Allium schoenoprasum*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.13, n. 1, p. 111, 1995.

SCHMITT, D. R. Cebola: produção e mercado nacional. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina** (2010-2011), Santa Catarina, 2010.

SHARMA, G.; KUMAR, N.; WEIR, B. S.; HYDE, K. D.; SHENOY, B. D. The ApMat marker can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 61, n. 1, p. 117-138, 2013.

SILVA, D. N.; TALHINAS, P.; VÁRZEA, V.; CAI, L.; PAULO, O. S.; BATISTA, D. Application of the Apn2/MAT locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: An example from coffee (*Coffea* spp.) hosts. **Mycologia**, Laurence, v. 104, p. 396-409, 2012.

SILVA, D. N.; TALHINHAS, P.; VÁRZEA, V.; CAI, L.; PAULO, O. S.; BATISTA, D. Application of the Apn2/MAT locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: an example from coffee (*Coffea* spp.) hosts. **Mycologia**, Laurence, 11-145, 2011.

SIMMONDS, J. H. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. **Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences**, v.22, p.437-459, 1965.

SUHARDI, H. A. Anthracnose on shallot (*Allium cepa* group *aggregatum*) in Java. **Onion NL for Tropics**, v.5, p.48-50, 1993.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A.; JAGER, M.J. (Eds.) **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: C. A. B, p.1- 26, 1992.

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes**. London: Common wealth Mycological Institute, p. 696, 1980.

TAVARES, S. C. C. de H.; AMORIN, L. R.; PEIXOTO, A. R.; KARASAWA, M.; COSTA, N. D. Influência do umbuzeiro na ocorrência da antracnose da cebola, no submédio São Francisco. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.14, p.124, 1996.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GEISER, D. M.; HIBBETT, D. S.; FISHER, M. C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetic and Biology**, Orlando, v. 31, p. 21-32, 2000.

VILELA, N. J.; HENZ, G. P. Situação atual da participação das hortaliças no agronegócio brasileiro e perspectivas futuras. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.17, n.1, p.71-89, 2000.

VON ARX, J. A. Revision der zu *Gloeosporium* gestellten pilze. **Natuurkunde**, Amsterdam, v.51, p. 1-153, 1957.

WEIR, B.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, n. 1, p. 115-180, 2012.

WORDELL FILHO, J. A.; ROWE, E.; GONÇALVES, P. A. de S.; DEBARBA, J. F.; BOFF, P.; THOMAZELLI, L. F. Manejo fitossanitário na cultura da cebola. **Epagri**, Florianópolis, p. 226, 2006.

CAPÍTULO II

Caracterização biológica, morfológica e molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. associados à antracnose da cebola

1 **Caracterização biológica, morfológica e molecular de isolados de *Colletotrichum* spp.**
2 **associados à antracnose da cebola.**

3
4 **Luiz Henrique R. Lopes¹, Maurício Rossato², Leonardo S. Boiteux³, Maria E. N.**
5 **Fonsenca³, Ailton Reis³**

6
7 ¹Área de Fitossanidade, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de
8 Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brasil.

9 ²Área de Fitopatologia, Instituto Biológico, Universidade de Brasília.

10 ³Embrapa Hortaliças, C.P. 218, 70770-901, Brasília, DF.

11 Autor de correspondência: Ailton Reis. E-mail: ailton.reis@embrapa.br

12 Número de telefone: 061 – 3385 - 9058

13 **ABSTRACT**

14 One of the main onion crop diseases in Brazil is anthracnose, caused by species of genus
15 *Colletotrichum*. In this work it was used several *Colletotrichum* isolates obtained from plants
16 of *Allium* genus with symptoms of anthracnose. The isolates were obtained from different
17 regions of Brazil and characterized with the aid of morphological methods, molecular and
18 cultural features. The Bayesian Analysis Method of inference was used for an initial analysis
19 involving the genomic region β -tubulin (*tub2*). A representative group of isolates, selected in
20 the first analysis, was sequenced for the partial region of actin (*act*) and *Apmat*. Two groups of
21 haplotypes were generated and analyzed separately, one by concatenating *tub2* and *act* and
22 other *tub2*, *act* and *ApMat*. The analysis revealed along with morphological analyzes that
23 onion anthracnose is probably caused by several *Colletotrichum* species belonging to
24 complexes *C. acutatum* and *C. gloesporioides*. All the representative isolates used in this
25 study were pathogenic on onion, being able to cause typical symptoms of anthracnose,
26 especially on bulbs with variable aggressiveness range. All the results obtained in this work
27 lead us to believe that onion anthracnose is caused by several species different of what has
28 been reported so far.

29 Keyword: antracnose, onion twister, *Allium*, *Apmat*, multilocus phylogeny

30 INTRODUÇÃO

31

32 Pertencente à família Liliaceae e ao gênero *Allium*, a cebola (*Allium cepa* L.) é uma
33 das mais antigas hortaliças consumidas e cultivadas em todo o mundo (Kill *et al.*, 2007). Seu
34 consumo é feito na maioria das vezes *in natura* através de condimentos, temperos e saladas.
35 No Brasil, ela tem importância na agricultura por ocupar o terceiro lugar em termos de valor
36 econômico, perdendo em posição somente para as culturas do tomate e da batata (FAO,
37 2013).

38 Durante o cultivo da cebola, são comuns infecções das plantas por diversos patógenos
39 como fungos, bactérias e vírus sendo relatados em todos os países produtores de cebola,
40 podendo reduzir a qualidade das sementes e de bulbos e conseqüentemente a produtividade
41 (Nunes & Kimati, 1997). A antracnose foliar ou mal-de-sete-voltas, causada por
42 *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *cepae*, está entre as doenças que mais causam perdas em
43 cultivos de cebola em todas as regiões produtoras no Brasil (Maranhão *et al.*, 1997).

44 A sintomatologia da antracnose em cebola é variada e complexa, sendo que os
45 sintomas variam de acordo com o estágio fenológico da planta, ocorrendo em alguns casos
46 lesões claras e deprimidas sobre a folha, axila ou bainha, que podem aumentar de tamanho e
47 tornarem-se ovaladas com tonalidade rosada, evoluindo posteriormente para manchas
48 pontuadas de coloração escura. Quando o patógeno é veiculado pela semente, tombamentos
49 de plântulas podem ser observados. Além disso, as folhas tornam-se enroladas em alguns
50 casos. No bulbo, pode ocorrer a formação de estromas verde-escuro a pretos favorecendo ao
51 longo do tempo uma deformação conhecida como “charuto” ou ainda a deformação conhecida
52 como “cachorro-quente”, que ocorre quando há sucessivas infecções concomitantes por
53 diversos patógenos. Ambas as deformações inviabilizam a produção comercial de bulbo de
54 cebola (Wordell Filho *et al.*, 2006).

55 Dean *et al.* (2012) ranquearam os mais importantes fungos fitopatogênicos do mundo
56 colocando o gênero *Colletotrichum* na oitava posição. Isso se deve à sua importância
57 econômica para a fitopatologia e pelo fato de espécies desse gênero serem agentes causais da
58 antracnose, doença que acomete diversas hospedeiras como árvores frutíferas, culturas
59 perenes, hortaliças, cereais e gramíneas. Durante um longo período, a caracterização de
60 espécies de *Colletotrichum* foi realizada somente com base em critérios descritivos clássicos
61 como a dimensão de conídios, presença ou ausência de setas e morfologia da colônia (Cannon

62 *et al.*, 2012), bem como a gama de hospedeiros e a tipologia de danos causados nos tecidos
63 das plantas (Sutton, 1980).

64 Por serem extremamente variáveis e plásticas, as caracterizações baseadas nos critérios
65 supracitados, não são confiáveis para a correta descrição de espécies do gênero
66 *Colletotrichum* (Cai *et al.*, 2009; Hyde, 2009). Portanto o que é sugerido para descrição e
67 identificação de espécies de *Colletotrichum* são análises filogenéticas envolvendo várias
68 regiões genômicas, associadas com estudos das características fenotípicas como morfologia e
69 patogenicidade (Cai *et al.*, 2009) Nesse sentido, muitas espécies deste gênero estão sendo
70 identificadas (Weir *et al.*, 2012; Cannon *et al.*, 2012; Damm *et al.*, 2013; Doyle *et al.*, 2013;
71 Hyde *et al.*, 2014; Vieira *et al.*, 2014), indicando que estes estudos levam a uma compreensão
72 e identificação mais precisa para tal gênero (Damm *et al.*, 2012).

73 Phoulivong (2011) relata que a correta identificação e caracterização de espécies de
74 *Colletotrichum* é essencial para o desenvolvimento de estratégias de controle no campo,
75 favorecendo uma compreensão mais exata da epidemiologia da doença. Entretanto, não
76 existem relatos na literatura de estudos envolvendo caracterização de isolados de *C.*
77 *gloesporioides* associados à cebola, através de filogenia multilocus juntamente com estudos
78 de morfologia. No Brasil, houveram apenas dois estudos envolvendo a caracterização de
79 *Colletotrichum* associado à cebola, um utilizando somente características morfológicas e
80 sorológicas (Bajungo, 1979) e outro utilizando a técnica Random Amplified Polymorphic Dna
81 –RAPD e região ITS do rDNA para estudos de diversidade genética de isolados no estado de
82 Pernambuco (Vila Nova, 2004).

83 Pelo fato de até o presente momento a caracterização do agente etiológico da
84 antracnose em cebola ter sido realizada utilizando somente características morfoculturais,
85 sorológicas e analisando somente uma região genômica, este trabalho teve o objetivo de
86 caracterizar e identificar a diversidade de espécies de *Colletotrichum* de diversos locais do
87 Brasil associados ao gênero *Allium* através de estudos de análise multilocus, analisando a
88 relação filogenética entre os isolados em associação com estudos de morfologia e
89 patogenicidade.

90

91

92

93 MATERIAL E MÉTODOS

94

95 **Isolados de *Colletotrichum***

96 Foram utilizados 42 isolados monospóricos associados ao gênero *Allium* oriundos de
97 diversas cidades em vários estados Brasileiros (Figura 1) que estavam preservados na coleção
98 de fungos fitopatogênicos da Embrapa Hortaliças. As culturas estão armazenadas segundo
99 metodologia de Castellani (1939) em câmara fria a 10°C na ausência de luz. Os isolados
100 foram recuperados com o cultivo em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-
101 Ágar).

102

103 **Extração do DNA**

104 Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA durante uma
105 semana a temperatura de 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Após esse período uma porção
106 de micélio aéreo foi retirada de cada placa e o DNA genômico foi extraído segundo
107 metodologia de Boiteux (1999). As concentrações de DNA foram estimadas de duas formas,
108 uma visualmente através de eletroforese utilizando gel de agarose a 1,5% comparando a
109 intensidade das bandas com o marcador de DNA 1kb (Axygen) e outra através da
110 quantificação em nanodrop (NanoDrop Lite, Thermo Scientific®, USA).

111

112 **Amplificação e sequenciamento de regiões genômicas**

113 Inicialmente, todos os isolados utilizados no estudo foram amplificados para o gene β -
114 tubulina (*tub2*) a fim de analisar a diversidade genética. Em seguida, foram separados 12
115 haplótipos através do software DnaSP v.5 (Librado; Rozas, 2009), para representar o total de
116 isolados do estudo. Os isolados representativos foram amplificados para as regiões *act* e
117 ApMat. Todas as regiões foram amplificadas utilizando a reação em cadeia da polimerase
118 (PCR). Informações sobre as regiões genômicas utilizadas no estudo encontram-se na tabela
119 1.

120 Para a amplificação das regiões genômicas ACT, TUB2 e Apmat foram utilizados os
121 iniciadores ACT512F e ACT783R (Carbone; Kohn, 1999), Bt2a e Bt2b (Glass; Donaldson,
122 1995), CgDI-F6 e CgMAT1-F2 (Rojas *et al.*, 2010) respectivamente. A reações de PCR foram

123 realizadas com um volume final de 20 µL contendo 11,1 µL de água Milli-Q, 1 µL de dNTP
124 (Invitrogen TM), 1,5 µL de cada iniciador, 2 µL de PCR buffer 10x, 0,6 µL de MgCl₂, 0,3 µL
125 de Taq DNA polimerase (Invitrogen TM) e 2 µL de DNA genômico. As reações foram
126 realizadas em um termociclador MyCycler TM Thermal Cycler (BIORAD). Os ciclos para a
127 região ACT consistiram em desnaturação a 94°C por 2', seguido por 35 ciclos a 94°C por 45",
128 60°C por 45", 72°C por 45" e um ciclo final de 72°C por 10'. Os ciclos para a região TUB2
129 consistiram em desnaturação a 94°C por 5', seguido de 34 ciclos a 94°C por 30", 52°C por
130 30", 72°C por 1' e ciclo final a 72°C por 10'. Para a região *ApMat* os ciclos foram de 95°C
131 por 3', 10 ciclos (função Step Down) de 95°C por 45", 60°C por 45" (reduzindo 1°C a cada
132 ciclo), 72°C por 1', 35 ciclos de 95°C por 45", 50°C por 45", 72°C por 1' e extensão final a
133 72°C por 10'. Somente para alguns poucos isolados foram utilizadas alterações na
134 temperatura de anelamento por conta de ampliações não específicas.

135 Os produtos de PCR foram separados em eletroforese utilizando gel de agarose a 1,5%
136 em 1x Tris-Acetato ácido EDTA (TAE) e foram revelados e fotografados em luz UV após
137 serem corados com brometo de etídio (0,5 µg ml⁻¹) por 5 min. Os produtos de PCR foram
138 purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) seguindo
139 protocolo do fabricante. Os sequenciamentos correspondente às regiões genômicas *tub2*,
140 *ApMat* e *act* foram realizadas pela Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul).

141

142 **Análises filogenéticas**

143 Todas as análises iniciais como, montagem das sequencias e alinhamentos, foram
144 realizadas no software Geneious R8 (Drummon *et al.*, 2011). As sequências de *tub2* foram
145 analisadas inicialmente e quando necessário, foram utilizados ajustes manuais no alinhamento
146 das sequências. Por possuir significativas vantagens quando comparado com os métodos
147 máxima verossimilhança e máxima parcimônia, o método de análise de inferência Bayesiana
148 (IB), foi utilizado para calcular a distância das árvores (Archibald *et al.*, 2003). O programa
149 MEGA 6.0 foi utilizado para realizar a seleção do modelo mais adequado segundo critério
150 *Bayesian Criterium Information* (BIC).

151 As sequências do estudo foram comparadas com sequências de referências obtidas no
152 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) (Tabela 2). Verificações iniciais, utilizando a região
153 genômica TUB2, constataram que os isolados utilizados neste estudo tinham similaridade
154 com espécies de dois complexos de espécies de *Colletotrichum*. Por conta disso, uma árvore

155 prévia foi gerada com todos os isolados utilizados neste estudo junto com referências de
156 espécies tanto do complexo *C. gloesporioides* quanto do complexo *C. acutatum*. A partir
157 desta análise e com a formação de 12 haplótipos gerados através do software DnaSP v.5
158 (Librado; Rozas, 2009), uma árvore foi gerada contendo referências de ambos os complexos
159 envolvidos (Figura 2), dividida em dois grupos. Os isolados representativos correspondentes a
160 cada um dos 12 haplótipos (Tabela 3) foram selecionados e usados para a confecção de mais
161 duas árvores, uma utilizando as regiões genômicas *tub2* e *act* (árvore 1- Figura 3) e outra
162 utilizando *tub2*, *act* e *ApMat* (árvore 2- Figura 4). Destes 12 isolados, 5 não amplificaram para
163 a região genômica *ApMat*, por conta disso, esses 5 isolados foram analisados em uma árvore
164 distinta dos demais isolados representativos que foram amplificados para esta região
165 genômica. A árvore que inseriu esses 5 isolados foi gerada utilizando referências de espécies
166 do complexo *acutatum*, com a concatenação dos genes *tub2* e *act*. A árvore que inseriu os 7
167 isolados restantes foi gerada utilizando referências do complexo *gloesporioides*, concatenando
168 as regiões genômicas *tub2*, *act* e *ApMat*.

169 Cada agrupamento dos isolados representativos com as espécies de referências das
170 duas árvores geradas para cada complexo de espécies foi analisada pelo percentual de
171 similaridade para detectar quantos por cento cada isolado representativo possui de
172 similaridade a nível genômico com as espécies de referência.

173

174 **Caracterização morfológica das espécies de *Colletotrichum***

175 Com base nos resultados das análises filogenéticas, foi analisado um isolado
176 representativo de cada um dos 12 haplótipos de *Colletotrichum* sendo caracterizados pela
177 coloração, morfologia da colônia e de conídios. Discos de 4 mm de diâmetro foram retirados
178 das bordas das colônias com cinco dias de crescimento e foram colocadas em placas contendo
179 meio BDA, sendo feito três repetições para cada um dos doze isolados representativos
180 utilizados. As placas foram incubadas a 25°C em um fotoperíodo de 24 h. O diâmetro de cada
181 isolado foi aferido durante sete dias de crescimento. Ao final de sete dias, a coloração e a
182 textura da colônia de cada isolado foram avaliadas, e posteriormente, separadas em
183 morfogrupos. O diâmetro da colônia foi aferido com o auxílio de um paquímetro digital em
184 milímetros em duas direções perpendiculares. O crescimento micelial das colônias foi
185 expresso em mm.dia^{-1} . Após cinco dias, foi realizada a preparação microscópica em lâminas
186 utilizando lactofenol e as imagens foram produzidas através de uma câmera Nikon® DS-Ri1

187 acoplada a um microscópio Nikon[®] eclipse 80i. O comprimento e a largura de cinquenta
188 conídios por isolado foram aferidos com o auxílio do software Motic Image Plus v. 2.0 (Motic
189 Group Co., Beijing, China).

190 Para determinar a diferença entre as dimensões dos conídios das espécies de
191 *Colletotrichum* e as médias de crescimento micelial, os dados obtidos foram submetidos à
192 análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott
193 (1974), à significância de 5% no software Sisvar V. 5.4 (Build 80).

194

195 **Teste de patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum* em cebola**

196 **Inoculação em bulbos**

197 Os bulbos foram desinfestados conforme metodologia de Vila Nova (2004). Os ISR
198 cresceram em meio BDA a temperatura de 25°C em um fotoperíodo de 24 h durante cinco
199 dias. Após esse período de crescimento, discos de micélio de cada isolado foram retirados das
200 bordas das colônias e foram colocados em contato com bulbos de cebola com auxílio de
201 palitos de dente previamente autoclavados. Cada isolado foi inoculado em cinco cebolas,
202 sendo cada uma, testada com dois discos de micélio em posições simétricas (Figura 6a),
203 totalizando dez repetições para cada isolado. As testemunhas foram tratadas de modo similar,
204 no entanto os discos utilizados eram compostos somente por discos formados de meio de
205 cultura BDA. Os bulbos inoculados foram então mantidos em câmara úmida em bandejas
206 forradas com papel toalha autoclavado e umedecidos com água destilada autoclavada, e as
207 bandejas por fim, permaneceram envolvidas com sacos plásticos durante 7 dias, à luz e
208 temperaturas ambientes (20±5°C) em sala destinada para o experimento, sendo realizada uma
209 avaliação das lesões com 24 horas e outra com 14 dias. O delineamento experimental
210 utilizado foi inteiramente casualizado, com dez repetições para todos os isolados.

211

212 **Inoculação em folhas de cebola**

213 Os conídios foram retirados de placas de petri com meio aveia-ágar contendo os
214 isolados utilizados no estudo depois de serem incubados por duas semanas em temperatura de
215 25°C e fotoperíodo de 24 horas.

216 Para o preparo da suspensão foi adicionando em cada placa de petri 25 ml de solução
217 0,01% de Tween 20. Em seguida, o micélio foi dissolvido com o auxílio de uma escova de
218 cerdas macias sendo em seguida filtrado em gaze dupla autoclavada para a obtenção da
219 suspensão de conídios. A suspensão foi quantificada com o auxílio de um hemacitômetro e
220 foram realizadas diluições para a obtenção de concentração final de 10^5 conídios/ml.

221 Plantas de cebola da cultivar riza, foram cultivadas em sementeiras em casa de
222 vegetação utilizando substrato para planta (Rohrbacher[®]). Quando as plantas apresentaram no
223 mínimo três folhas, foi realizado o transplântio para vasos de 1,5 L contendo substrato
224 elaborado pela mistura de solo, casca de arroz carbonizada e esterco bovino na proporção
225 3:1:1, enriquecido com 8 g de uma mistura de N-P-K (formulação 4-30-16) e 7,5 g de calcário
226 dolomítico, sendo que cada vaso continha 4 plantas.

227 Cinquenta dias após a semeadura, quando as plantas apresentaram no mínimo três
228 folhas definitivas, pulverizou-se sobre a parte área e no colo das plantas, até o ponto de
229 escorrimento, uma suspensão de 10^5 conídios/ml dos isolados utilizados no experimento,
230 contendo 0,01% de Tween 20. Cada planta foi pulverizada com cerca de 2,5 ml de suspensão
231 e em seguida os vasos foram mantidos em câmara úmida por 48 horas a fim de estimular os
232 sintomas da doença. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com
233 três repetições, cada uma com quatro plantas. As testemunhas consistiram de plantas tratadas
234 de forma idêntica, utilizando-se apenas água destilada autoclavada.

235

236 **Avaliação da patogenicidade dos isolados utilizados no estudo em bulbos de cebola e** 237 **plantas de cebola**

238 Os isolados utilizados foram avaliados quanto à patogenicidade através do surgimento
239 de sintomas característicos da antracnose em bulbos de cebola, 14 dias após a inoculação. A
240 agressividade da doença foi estimada mediante escala de notas que variou de 0 a 4 conforme
241 relatado por Lima (1996), com adaptação de Vila Nova (2004), onde, a nota 0 representava a
242 ausência de sintomas, sendo classificada com não agressiva. A nota 1 representava lesões que
243 possuíam de 1 a 5 mm de diâmetro, sendo classificada como fracamente agressiva. A nota 2
244 representava lesões que possuíam de 6 a 15 mm de diâmetro, sendo classificada como
245 medianamente agressiva. A nota 3 representava lesões que possuíam de 16 a 25 mm de
246 diâmetro, sendo classificada como agressiva. A nota 4 representava lesões que possuíam 25
247 mm ou mais de diâmetro, sendo classificada como altamente agressiva.

248 Nas plantas de cebola, foi avaliada ao final de doze dias a patogenicidade dos isolados
249 testados, sendo analisado o surgimento de sintomas típicos das lesões causadas por
250 *Colletotrichum* nas folhas. A agressividade da antracnose foi aferida conforme escala de
251 notas, de 0 a 4, adaptado segundo metodologia proposta por Assunção (1997), onde, a nota 0
252 representava a ausência de sintomas. A nota 1 representava uma folha com sintomas. A nota 2
253 representava duas folhas com sintomas. A nota 3 representava três folhas com sintomas e a
254 nota 4 representava o tombamento da planta.

255 Os dados obtidos nos tratamentos para todos os testes de patogenicidade realizados
256 foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste
257 de Skott-Knott, à significância de 5% de probabilidade, utilizando o software Sisvar V. 5.4
258 (Build 80).

259

260 **RESULTADOS**

261 **Análise Filogenética**

262 Com a análise inicial da região genômica *tub2*, foi constatada a presença de possíveis
263 espécies participantes de dois complexos: o complexo *C. acutatum*, e o *C. gloesporioides*. Os
264 42 isolados utilizados no estudo foram separados em doze haplótipos (Tabela 3). Nesta
265 análise filogenética prévia para a região *tub2*, cinco haplótipos (Hap 1, Hap2, Hap3, Hap 4,
266 Hap5) agruparam com referências de espécies do complexo *C. acutatum* e sete haplótipos
267 (Hap 6, Hap, 7, Hap 8, Hap 9, Hap 10, Hap 11, Hap 12) agruparam com referências do
268 complexo *C. gloesporioides*. Primers utilizados para a região *ApMat* não conseguiram
269 amplificar em cinco isolados representativos oriundos dos haplótipos que agruparam com
270 referências de espécies do complexo *C. acutatum*, no entanto, estes primers conseguiram
271 amplificar tal região em todos os isolados restantes. Todos os isolados obtiveram sucesso
272 quando realizada ampliações para região genômica *act*. A árvore 1 (Figura 3) apresentou
273 agrupamentos dos isolados testados com referências do complexo *C. acutatum* em clados bem
274 suportados com altos valores de probabilidade posterior indicando que possivelmente todos os
275 isolados utilizados nesta árvore pertencem ao complexo *acutatum*. O isolado representativo
276 Coll 39 teve percentual de similaridade de 100% com *C. tamarilloi*, já o isolado Coll 231 teve
277 99,34% de similaridade com *C. melonis*, o isolado Coll 734 teve 100% de similaridade com
278 *C. nymphaeae*. Os isolados representativos Coll 20 e Coll 23 apresentaram percentuais de

279 similaridade de 100% e 99,67% respectivamente, tanto para *C. scovillei* quanto para *C.*
280 *guajavae*.

281 A árvore 2 (figura 4) também apresentou agrupamento dos isolados representativos
282 com referências do complexo *gloesporioides* em clados bem suportados com altos valores de
283 probabilidade posterior. Os isolados Coll 35, Coll 374, Coll 997 e Coll 70 formaram um clado
284 associado com referência de *C. theobromicola* (syn. *C. fragariae*), com respectivos
285 percentuais de similaridade: 99,31%, 99%, 98,92% e 98,62%. O isolado Coll 269 agrupou
286 com *C. fructicola* com 99,92% de similaridade. O isolado Coll 26 agrupou com 99,56% de
287 similaridade junto ao *C. theobromicola* e o isolado Coll 29 apresentou similaridade de
288 99,23% com *C. fructicola*.

289

290 **Caracterização morfológica**

291 Com base na morfologia das colônias, os isolados representativos de *Colletotrichum*
292 foram separados em oito diferentes morfogrupos. Os morfogrupos 1, 2, 3, 5, 6 e 8 incluíram
293 os isolados Coll 35, Coll 23, Coll 39, Coll 29, Coll 269 e Coll 20, respectivamente. O
294 morfogrupo 4 agrupou os isolados Coll 231 e Coll 997, já o morfogrupo 7 agrupou os isolados
295 Coll 26, Coll 70 e Coll 374. O isolado representativo Coll 734 teve sua análise morfológica
296 comprometida por conta de sucessivas contaminações nesta fase do trabalho. O morfogrupo 1
297 apresentou colônia cotonosa de coloração cinza claro, com o reverso verde escuro e ausência
298 de conidiomatas. O morfogrupo 2 apresentou colônia pouco cotonosa de coloração laranja
299 pálido com presença de poucas conidiomatas de cor laranja, e reverso também de cor laranja
300 pálido. O morfogrupo 3 apresentou colônia cotonosa de coloração oliva com ausência de
301 conidiomatas, e reverso de coloração variando de branco a oliva. O morfogrupo 4 apresentou
302 colônia cotonosa de coloração variando de cinza a branco, o reverso de coloração variando de
303 branco a laranja pálido e ausência de conidiomatas. O morfogrupo 5 apresentou colônia
304 feltrosa de coloração branca com reverso de coloração laranja pálido e ausência de
305 conidiomatas. O morfogrupo 6 apresentou colônia muito cotonosa de coloração cinza e
306 reverso variando de cinza a branco com ausência de conidiomatas. O morfogrupo 7
307 apresentou colônia com bordas irregulares e muito cotonosa de coloração cinza claro e o
308 reverso variando de cinza a verde escuro e ausência de conidiomatas. O morfogrupo 8
309 apresentou colônia pouco cotonosa de coloração oliva com numerosas conidiomatas de cor
310 laranja e o reverso de coloração variando de laranja a oliva. (Figura 5).

311 As taxas de crescimento micelial apresentaram diferenças estatísticas significativas
312 entre os isolados analisados no estudo, apresentando quatro grupos distintos de médias
313 (Tabela 4). Os isolados Coll 269 e Coll 997 obtiveram maior média de crescimento (10,5
314 mm.dia⁻¹) já o isolado Coll 26 obteve a menor média de crescimento. Os isolados Coll 20,
315 Coll 231, Coll 29, Coll 35, Coll 70 e Coll 23 apresentaram média de 9,46 mm.dia⁻¹ e os
316 isolados Coll 374 e Coll 39 apresentaram média de 8,53 mm.dia⁻¹. Em relação ao diâmetro da
317 colônia aferido ao final de sete dias, todos os isolados apresentaram distribuição de médias
318 idênticas às distribuições das médias da taxa de crescimento micelial diário, agrupando-se de
319 modo igual em quatro grupos.

320 Os isolados Coll 29, Coll 269, Coll 997, Coll 26, Coll 35 e Coll 374 apresentaram
321 conídios de forma oblonga com ambas as extremidades obtusas, variando em dimensões de
322 9,57 µm – 12,88 µm no comprimento e de 3,62 µm – 4,53 µm na largura. Os isolados Coll
323 231, Coll 23, Coll 20 e Coll 39 apresentaram conídios fusiformes (por vezes oblongos) com
324 uma ou em alguns casos, ambas as extremidades agudas, variando em dimensões de 12,69 µm
325 – 15,02 µm no comprimento e de 3,65 µm – 4,44 µm na largura.

326 O isolado Coll 70, em meio BDA, apresentou formação de um micélio cottonoso
327 estéril, impossibilitando as aferições dos comprimentos e larguras dos conídios.

328

329 **Patogenicidade dos isolados em bulbos de cebola**

330 Todos os isolados inoculados, com exceção do Coll 734 foram patogênicos,
331 provocando lesões características de antracnose nos bulbos de cebola sete dias após a
332 inoculação. Houve lesões de dois aspectos, uma de aspecto firme, outra de aspecto
333 aquosa, ambas com sinais do patógeno. (Figura 6b e Figura 6c). Houve diferença estatística
334 significativa entre as médias que expressaram a agressividade dos isolados utilizados neste
335 estudo. Os isolados Coll 23, Coll 231, Coll 20, Coll 29 foram fracamente agressivos e os
336 isolados Coll 39, Coll 997, Coll 70, Coll 269, Coll 35, Coll 374 e Coll 26 foram
337 medianamente agressivos. (Tabela 5).

338

339 **Agressividade e incidência em folhas de cebola**

340 Todos os isolados testados causaram doença em plantas de cebola, entretanto as
341 médias de agressividade não apresentaram diferença estatística significativa. A agressividade

342 da doença foi classificada com “nota 1”, indicando baixo índice de agressividade em folhas de
343 cebola durante o período de avaliação do experimento. Não houve diferença estatística
344 significativa para a agressividade da doença.

345

346 **DISCUSSÃO**

347 Esta é uma pesquisa pioneira a nível nacional e mundial na tentativa de caracterizar
348 espécies do gênero *Colletotrichum* associados à antracnose da cebola oriunda das cinco
349 regiões geográficas do Brasil, utilizando análises morfológicas associadas com análises
350 multilocus. Com a análise de morfologia, notou-se que a coloração e textura dos morfogrupos
351 1, 5, 6 e 7 são congruentes com as espécies de referências utilizadas por Weir *et al.* (2012),
352 inclusas por sua vez dentro do complexo *C. gloesporioides* de espécies. O desenvolvimento
353 de micélio de colorações brancas, cinzas e olivas também foram relatadas em outros trabalhos
354 como sendo característicos de *C. gloesporioides* (Bernstein *et al.* 1995; Gunnel, 1992; Swart,
355 1999). A ocorrência, porém, de colônias com colorações rosadas a laranja e com o reverso
356 variando de branco a rosa são características de espécies do complexo *C. acutatum* (Damm *et*
357 *al.* 2012; Sutton, 1992; Bernstein *et al.* 1995) sugerindo portanto que os morfogrupos 2, 3, 4 e
358 8 sejam compostos de espécies pertencentes a este complexo. As diferenças nos formatos de
359 conídios observadas seguem em congruência com os dados de morfologia de colônia para a
360 maioria dos isolados. Os isolados inclusos em cada morfogrupo, com presença de colônia
361 característica de espécies inclusas no complexo *C. gloesporioides*, também apresentaram
362 conídios típicos de espécies deste complexo, sem variações no formato. Entretanto, para os
363 isolados inclusos nos morfotipos 2, 3, 4 e 8 não houve constância na conformação dos
364 conídios. Damm *et al.* (2012) verificaram também uma variação de formatos de conídios
365 dentro de espécies do complexo *C. acutatum*, sendo que tal fato pode ter diversas causas, uma
366 delas é a de que, fungos preservados durante longo período, e quando subcultivados diversas
367 vezes, podem estar mais propensos a variações na aparência dos conídios quando comparados
368 com isolados que foram submetidos a repetidas subculturas (Buddie *et al.* 1999). Além de
369 influenciar no formato dos conídios, neste caso, o sucessivo subcultivo e a preservação
370 durante longos períodos de isolados de *Colletotrichum* promovem alterações na textura da
371 colônia, deixando-as mais densas, cotonosas e uniformes na aparência e cor, tendo
372 considerável perda na produção de esporos (Damm *et al.* 2012). Esta condição pode explicar
373 o fato de os isolados Coll 70 e Coll 734 apresentarem micélio estéril, o que não descarta a
374 possibilidade de ainda serem patogênicos, uma vez que o isolado Coll 70 está entre os

375 isolados mais agressivos (em bulbos de cebola) (Tabela 5). As variações das dimensões dos
376 conídios e do crescimento micelial de todos os isolados deste estudo foram similares com as
377 médias descritas para espécies de *Colletotrichum*. Weir *et al.* (2012), analisando 10 dias de
378 crescimento da colônia, obteve valores de dimensões dos conídios similares aos obtidos neste
379 trabalho, isso indica que o período de 7 para 10 dias pode não influenciar tanto nas dimensões
380 dos conídios.

381 Diferenças observadas neste estudo em termos de indução de sintomas em bulbos de
382 cebola foram também demonstradas por Vila Nova (2004) com isolados de *C. gloesporioides*.
383 Dois aspectos de lesões foram observados (Figura 6b e Figura 6c), sendo que a de aspecto
384 aquoso indica ação de atividade de enzimas pectinolíticas extracelulares produzidas pelo
385 patógeno, uma vez que não houve colonização dos bulbos por bactérias pectinolíticas, pois
386 estas não foram detectadas em testes a partir do tecido afetado. De acordo com Bailey *et al.*
387 (1992), estas enzimas que degradam tecidos atuam no estabelecimento de infecções de
388 espécies de *Colletotrichum* sendo importantes portanto, para entender as divergências da
389 agressividade do patógeno. A variação na agressividade entre isolados constitui uma
390 informação profícua para que seja utilizada futuramente em programas de seleção de plantas
391 de cebola resistentes a antracnose (Reis & Oliveira, 2009). Assunção (1997), Vila Nova
392 (2004), constataram disparidades na patogenicidade em folhas de cebola, diferenciando com
393 resultados deste estudo, que não detectou diferença de agressividade entre os isolados
394 testados. Entretanto, estes mesmos isolados, Coll 20, Coll 23, Coll 26, Coll 35, Coll 39, Coll
395 70 haviam sido altamente agressivos em plantas de cebola quando avaliados por Reis &
396 Oliveira, (2008). Esta diferença provavelmente se deve ao longo tempo de armazenamento
397 dos isolados na coleção do CNPH, que pode tê-los levado a uma perda de agressividade.

398 Durante muito tempo a taxonomia de espécies de *Colletotrichum* vem sendo discutida
399 e tem enfrentado problemas por conta de não ter relativa uniformidade de critérios para
400 caracterizar espécies deste gênero (Hibbett & Taylor, 2013). Além disso, caracterizações
401 morfológicas nem sempre são exatas, pois lidam com características variáveis e plásticas.
402 Alterações na composição do meio, tempo de armazenamento e quantidade de vezes que um
403 isolado foi repicado são exemplos claros de fatores que alteram resultados de análises
404 morfológicas, levando a uma caracterização imprecisa. (Weir *et al.*, 2012; Caiet *al.*, 2009;
405 Hyde 2009). Os resultados da análise filogenética demonstram que os isolados patogênicos
406 testados pertencem supostamente a dois complexos de espécies, os complexos *C. acutatum* e
407 *C. gloesporioides*, fato ainda não relatado na literatura. A informação de que os isolados

408 agruparam com espécies pertencentes a esses dois complexos é de extrema importância para o
409 melhor entendimento da diversidade de espécies patogênicas de *Colletotrichum* associadas à
410 antracnose da cebola no Brasil.

411 Ao contrário das incongruências supracitadas que podem ocorrer entre morfologia e
412 filogenia, dois isolados mostraram similaridade entre essas duas análises. Os isolados Coll 70
413 e o Coll 374 além de terem sido agrupados no mesmo clado, foram agrupados no mesmo
414 morfogrupo (morfogrupo 7), indicando serem filogeneticamente próximos entre si, e similares
415 a *C. theobromicola*, embora tenham origens de duas localidades bem distintas, Pelotas-RS e
416 Cristalina-GO. Apesar de ter sido realizado uma análise multilocus neste estudo, não se pode
417 afirmar com certeza a identidade dos isolados, pois existem recomendações e demonstrações
418 de que para se ter cladogramas bem suportados e maior certeza na caracterização de espécies de
419 *Colletotrichum* são necessários o uso de determinados genes de acordo com o complexo de
420 espécies envolvido. Para investigações envolvendo espécies do complexo *C. acutatum* Dean
421 *et al.*, (2012) demonstram claramente que dois genes são suficientes para obter cladogramas bem
422 suportados e com maior certeza de caracterização de espécies, tais regiões são a *tub2* e *gapdh*.
423 Já para o complexo *C. gloesporioides* sabe-se que a região *ApMat* é crucial (associada com
424 outras regiões genômicas como *cal*, *chs*, *efl1a*, *gs* e *his*) para se obter uma precisa
425 caracterização de isolados (Rojas *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012; Doyle *et al.*, 2013; Sharma *et*
426 *al.*, 2013). Por tais motivos, não é possível afirmar a quais espécies com certeza pertencem os
427 isolados, o que não impossibilita relatar que a antracnose em cebola é causada não somente
428 por espécies do complexo *C. gloesporioides*, dado que os isolados que foram patogênicos e
429 que agruparam com referências do complexo *C. acutatum*, não amplificaram para a região
430 *ApMat*, indicando não fazerem parte do complexo *C. gloesporioides*.

431 As espécies de referência que agruparam com os isolados testados na análise
432 filogenética têm sido registradas no Brasil em diversas culturas. A espécie *C. tamarilloi* tem
433 sido relatado como uma das principais causadoras de antracnose em frutos de jiló (Pereira *et*
434 *al.*, 2012). Bragança (2013) utilizando análise multilocus, caracterizou isolados
435 *Colletotrichum* spp. e constatou a presença de diversas espécies do complexo *C.*
436 *gloesporioides* e complexo *C. acutatum* atacando frutos no Brasil, entre elas algumas
437 possíveis espécies detectadas neste estudo, tais como *C. acutatum* e *C. fruticola*.

438 Os resultados deste trabalho apontam que não existe somente uma espécie
439 responsável por causar a antracnose em cebola no Brasil. A diversidade de supostas espécies
440 de *Colletotrichum* relatadas nesta pesquisa vai de encontro com os estudos apresentados por

441 Bajungo (1979), não sendo mais adequado, portanto, o uso da nomenclatura proposta por ele
442 para o agente etiológico da antracnose em cebola (*C. gloesporioides* f. sp. *cepae*).

443 Estudos multilocus complementares envolvendo os genes com alto poder de resolução
444 na caracterização de possíveis espécies pertencentes ao complexo *C. gloesporioides* e ao
445 complexo *C. acutatum*, são recomendados, e essenciais para uma caracterização mais exata e
446 um melhor entendimento da etiologia e, por consequência, da epidemiologia da antracnose da
447 cebola no Brasil.

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467 **AGRADECIMENTOS**

468

469 A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio
470 financeiro ofertado durante a pesquisa e à Universidade Federal Rural de Pernambuco –
471 UFRPE e a Embrapa Hortaliças/DF pelo apoio técnico-científico.

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

493

494 ARCHIBALD JK; MORT ME; CRAWFORD DJ. 2003. Bayesian inference of phylogeny: a
495 non-technical primer. *Taxon* 52: 187–191.

496 ASSUNÇÃO IP. 1997. *Identificação de fontes de resistência em culturas de cebola (Allium*
497 *Cepa.L) e análise da variabilidade Colletotrichum gloeosporioides (Penz) Penz. et Sacc*
498 *(Sensu Arx, 1957) assistida por marcadores moleculares. UFRPE, Recife PE. 85 p.*
499 *(Dissertação de mestrado).*

500 BAILEY AJ; JEGER JM. *Colletotrichum: biology, pathology and PATOGENICIDADE*
501 *CAUSADA PELO FUNGO Colletotrichum gloeosporioides (Penz) EM DIFERENTES ES-*
502 *PÉCIES FRUTÍFERAS. Rev. Bras. Frutic* 133: 131-133.

503 BAJUNGU HE. 1979. *Caracterização patogênica, serológica e fisiológica de Colletotrichum*
504 *gloeosporioides Penz. (Sensu Arx, 1957) f. sp. cepae n.c. Piracicaba: USP-ESALQ. 35p*
505 *(Dissertação de mestrado).*

506 BERNSTEIN B; ZEHR EI; DEAN RA. 1995. Characteristics of *Colletotrichum* from peach,
507 apple, pecan, and other hosts. *Plant Disease* 79: 478-482.

508 BOITEUX LS; FONSECA MEN; SIMON PW. 1999. Effects of plant tissue and DNA
509 purification method on RAPD-based genetic fingerprinting analysis in carrot (*Daucus carota*
510 *L.*). *Journal of American Society for Horticultural Science* 124, p.32-38.

511 BRAGANÇA CAD. 2013. *Molecular characterization of Colletotrichum spp. Associated with*
512 *fruits in Brazil. Piracicaba: USP-ESALQ. 69p (Tese de doutorado).*

513 BUDDIE A; MARTINEZ-CULEBRAS P; BRIDGE P; GARCÍA M; QUEROL A; CANNON
514 P, MONTE E. 1999. Molecular characterization of *Colletotrichum* strains derived from
515 strawberry. *Mycological Research* 103:385–394.

516 CARBONE I; KOHN LM. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in
517 filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553–556.

518 CAI L; HYDE KD; TAYLOR PWJ; WEIR BS; WALLER J; ABANG MM; ZHANG JZ;
519 YANG YL; PHOULIVONG S; LIU ZY; PRIHASTUTI H; SHIVAS, RG; McKENZIE, EHC;

- 520 JOHNSTON PR. 2009 A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity*
521 39:183-204.
- 522 CANNON PF., DAMM U, JOHNSTON PR, WEIR BS. 2012. *Colletotrichum* - current status
523 and future directions. *Studies in Mycology* 73: 181-213.
- 524 CASTELLANI A. 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of*
525 *Tropical Medicine & Hygiene* 24: 270-276.
- 526 DAMM U; CANNON PF; LIU F; BARRETO RW; GUATIMOSIM E; CROUS PW. 2013. The
527 *Colletotrichum orbiculare* species complex: important pathogens of field crops and weeds.
528 *Fungal Diversity* 61: 29-59.
- 529 DAMM U; CANNON P F; WOUDEBERG JHC; CROUS PW. 2012. The *Colletotrichum*
530 *acutatum* species complex. *Stud Mycol* 73: 37-113.
- 531 DEAN R., VAN KAN JAL., PRETORIUS ZA, HAMMOND-KOSACK KE, DI PIETRO A,
532 PIETRO DS, RUDD JJ, DICKMAN M, KAHMANN R, ELLIS J, FOSTER GD. 2012. The
533 Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol* 13: 414–430.
- 534 DOYLE VP; OUDEMANS PV; REHNER SA; LITT A. 2013. Habitat and host indicate
535 lineage identity in *Colletotrichum gloeosporioides* s. l. from wild and agricultural landscapes
536 in North America. *PLoS One* 8: e62394.
- 537 FAO, Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura FAO Statistical
538 Yearbook. 2013. *World Food and Agriculture*. Disponível em
539 <http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e.PDF/>. Acessado em 24 de maio de 2015.
- 540 GLASS NL; DONALDSON G. 1995. Development of primer sets designed for use with PCR
541 to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* 61:1323–
542 1330.
- 543 GUNNELL PS; GUBLER WD. 1992. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species
544 pathogenic to strawberry. *Mycologia* 84:157-165.
- 545 HIBBETT DS; TAYLOR JW. 2013. Fungal systematics: is a new age of enlightenment at
546 hand? *Nat Rev Microbiol* 11:129–133.
- 547 HYDE KD; CAI L; CANNON PF; CROUCH JA; CROUS PW; DAMM U; GOODWIN P.H;
548 CHEN, H; JOHNSTON, PR; JONES, EBG; LIU ZY; MCKENZIE EHC; MORIWAKI J;

- 549 NOIREUNG P; PENNYCOOK S.R; PFENNING, L.H; PRI-HASTUTI, H; SATO T;
 550 SHIVAS, RG; TAN YP; TAYLOR PWJ; WEIR B.S; YANG YL; ZHANG, JZ. 2009.
 551 *Colletotrichum* - names in current use. *Fungal Diversity* 39:147-183.
- 552 HYDE KD; NILSSON RH; ALIAS SA; ARIYAWANSA H A; BLAIR JE; CAI L; COCK A;
 553 WA M; DISSANAYAKE AJ; GLOCKLING SL; GOONASEKARA ID; GORCZAK M;
 554 HAHN M; JAYAWARDENA R S; VAN KAN JAL; LAURENCE MH; LÉVESQUE CA; LI
 555 X; LIU JK; MAHARACHCHIKUMBURA SS N; MANAMGODA DS; MARTIN FN;
 556 MCKENZIE EHC; MCTAGGART AR; MORTIMER PE; NAIR PVR; PAWŁOWSKA J;
 557 RINTOUL TL; SHIVAS RG; SPIES CF; SUMMERELL BA; TAYLOR PWJ; TERHEM
 558 RB; UDAYANGA D; VAGHEFI N; WALTHER G; WILK M; WRZOSEK M; XU, JC;
 559 YAN J; ZHOU N. 2014. One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic
 560 genera: I (2014). *Fungal Diversity* 67: 21-125.
- 561 KIILL LHP; RESENDE GM De; SOUZA RJ De; SOUZA SOUZA RJ De. 2007. *Cultivo da*
 562 *cebola no Nordeste*. 3 ed. Petrolina: Embrapa Semi-Árido. Disponível em
 563 <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cebola/CultivoCebolaNordeste/b>
 564 [otonica.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cebola/CultivoCebolaNordeste/b). Acessado em 01 junho de 2015.
- 565 LIMA JAS. 1996. *Caracterização patogênica, fosoplogica, cultural e isoesterásica de*
 566 *isolados de Botryodiplodia theobromae Pat., agente causal da morte descendente da*
 567 *mangueira (Mangifera indica L.)*. Recife: UFRPE. 128p (Dissertação de mestrado).
- 568 MARANHÃO EH DE A; CAVALCANTE VALB; CANDEIA JA; MARANHÃO EA DE A;
 569 LYRA FILHO HP; RODRIGUES VJLB. 1997. Avaliação do controle químico do "mal-de-
 570 sete-voltas" em cebola, causado pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Pens, no estado
 571 de Pernambuco. *Horticultura Brasileira* 15: 230p.
- 572 NUNES MET; KIMATI H. Doenças do alho e da cebola (*Allium sativum* L. e *Allium cepa*
 573 L.). In: KIMATI H; AMORIM L; BERGAMIN FILHO A; CAMARGO LEA; REZENDE
 574 JAM. 1997. *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. São Paulo: 49-64.
- 575 PEREIRA AV da S; MARTINS RB; MICHEREFF SJ; SILVA MB; CÂMARA MPS. 2012.
 576 Sensitivity of *Lasiodyplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to MBC and DMI
 577 fungicides. *European Journal of Plant Pathology* 132: 489-498.
- 578 PHOULIVONG S. 2011. *Colletotrichum*, naming, control, resistance, biocontrol of weeds
 579 and current challenges. *Current Research in Environmental and Applied Mycology* 1: 53-73.

- 580 REIS A; LOPES CA; HENZ GP. Doenças e métodos de controle. In: OLIVEIRA VR;
581 BOITEUX LS. Sistema de produção da cebola. Disponível em [http://www.cnph.embrapa.](http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_da_cebola/doencas.html)
582 [br/paginas/sistemas_producao/cultivo_da_cebola/doencas.html](http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_da_cebola/doencas.html). Acessado em 07 de fevereiro
583 de 2015.
- 584 ROJAS EI; REHNER SA; SAMUELS GJ; VAN BAELE SA; HERRE EA; CANNON A;
585 CHEN R; PANG J; WANG R; ZHANG Y; PENG Y; SHA T. 2010. *Colletotrichum*
586 *gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus
587 phylogenies distinguish host associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia*
588 102: 1318–1338.
- 589 SCOTT AJ; KNOTT M. 1974. A Cluster analysis method for grouping means in the analysis
590 of variance. *Biometrics* 30: 507-512.
- 591 SHARMA G; KUMAR N; WEIR BS; HYDE KD; SHENOY BD. 2013. The ApMat marker
592 can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*. *Fungal Diversity* 61:
593 117-138.
- 594 SILVA DN; TALHINAS P; VÁRZEA V; CAI L; PAULO, OS; BATISTA D. 2012.
595 Application of the Apn2/MAT locus to improve the systematics of the *Colletotrichum*
596 *gloeosporioides* complex: An example from coffee (*Coffea* spp.) hosts. *Mycologia* 104: 396–
597 409.
- 598 SUTTON BC. 1980. *The Coelomycetes*. Commonwealth Mycological Institute: 696p.
- 599 SWART GM. 1999. Comparative study of *Colletotrichum gloeosporioides* from avocado and
600 mango. Pretoria: University of Pretoria. (tese de doutorado).
- 601 VIEIRA WAS; MICHEREFF SJ; MORAIS JR MA; HYDE KD; CÂMARA MPS. 2014.
602 Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. *Fungal*
603 *Diversity* 67: 181-202.
- 604 VILA NOVA MX. 2004. *Patogenicidade à Cebola (Allium cepa L.) e Análise da*
605 *Diversidade Genética de Isolados de Colletotrichum gloeosporioides do Estado de*
606 *Pernambuco, Brasil, por RAPD e Região ITS do rDNA*. Recife: Universidade Federal de
607 Pernambuco. 71p. (Dissertação de mestrado).
- 608 WEIR B; DAMM U; JOHNSTON PR. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species
609 complex. *Studies in Mycology* 73: 115-180.

610 WORDELL FILHO JA; ROWE E; GONÇALVES PAS; DEBARBA JF; BOFF P;
611 THOMAZELLI LF. 2006. Manejo Fitossanitário na Cultura da Cebola. Florianópolis: Epagri.
612 226p.

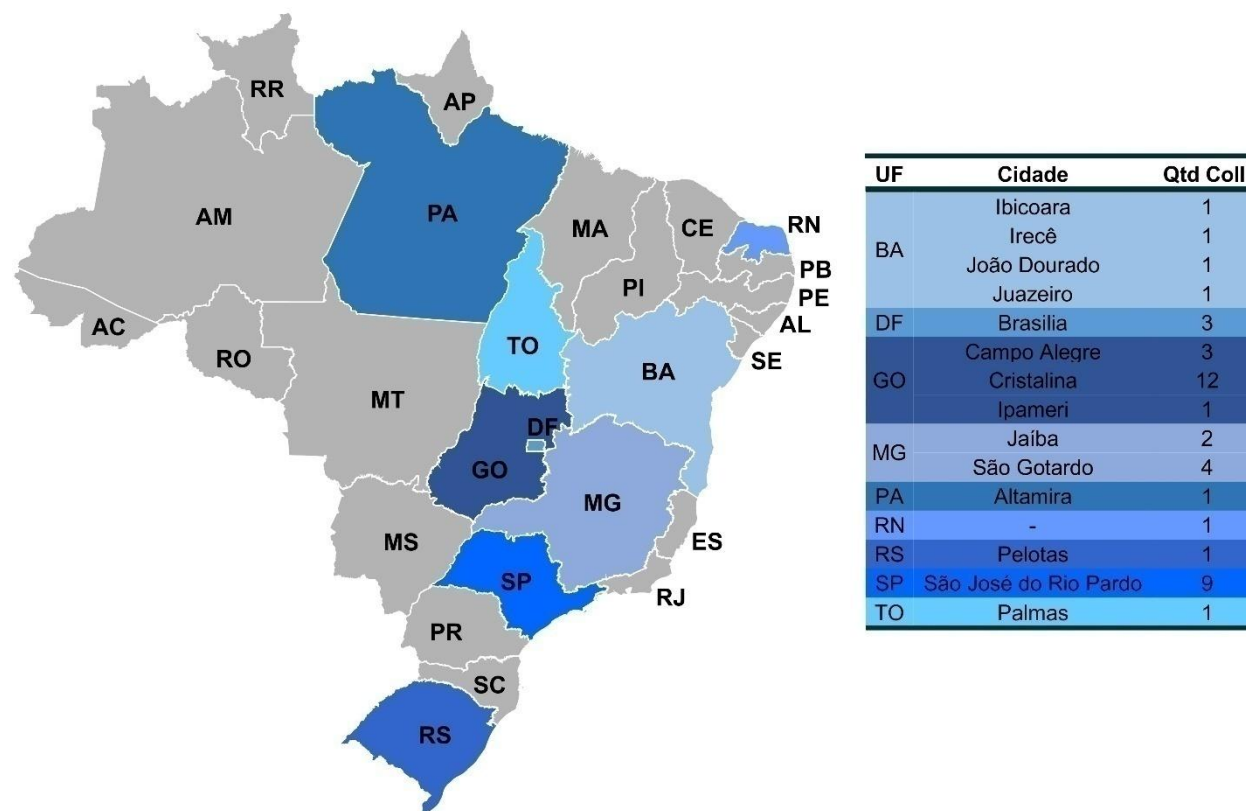


Figura 1: Representatividade no território brasileiro dos isolados utilizados neste estudo com demonstração da quantos foram utilizados de cada cidade de origem.

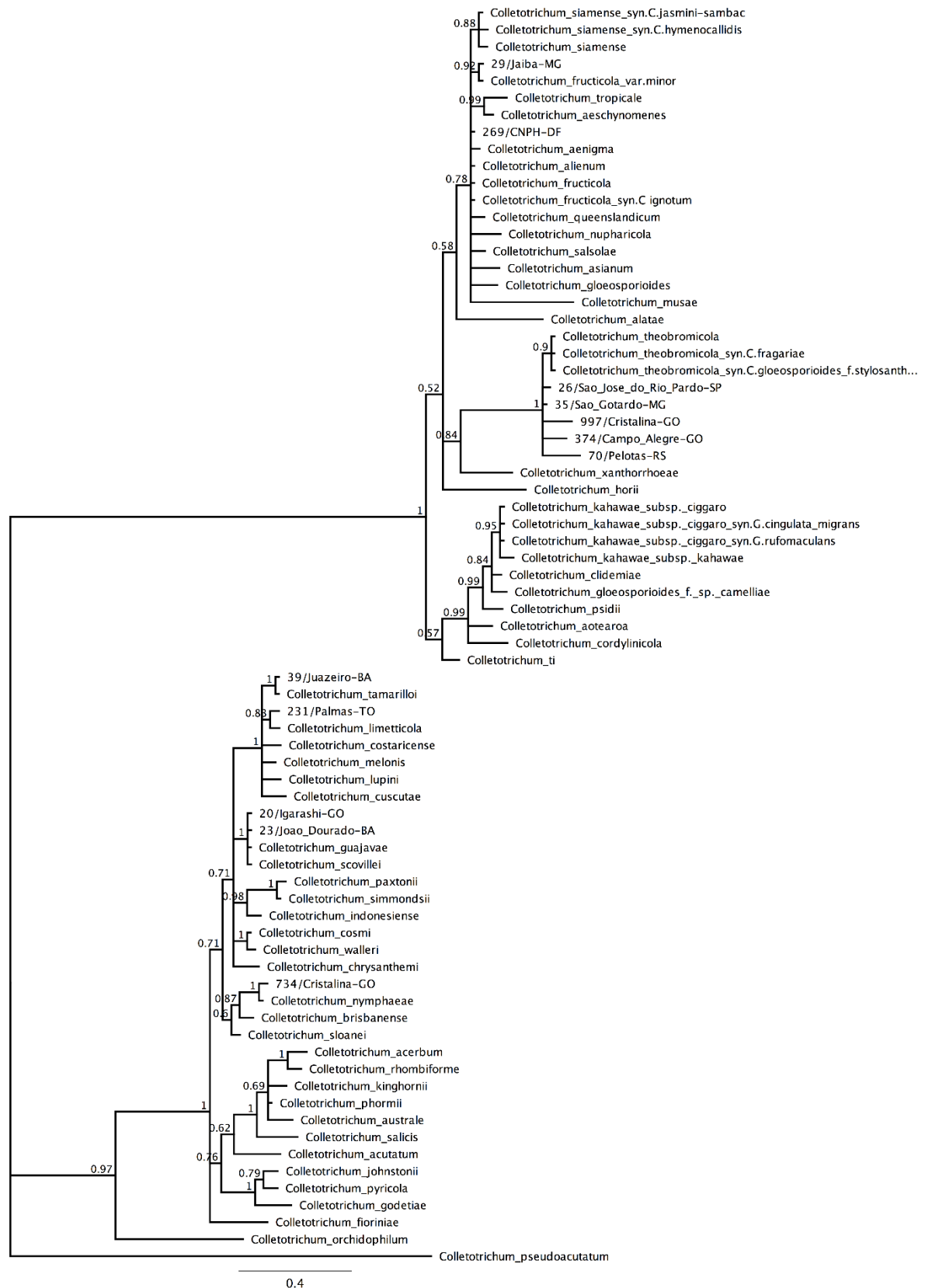


Figura 2: Árvore filogenética apresentando valores bem suportados de probabilidade posterior e gerada através de inferência bayesiana utilizando a região genômica *tub2*, contendo os 12 isolados representativos e as referências dos complexos *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*.

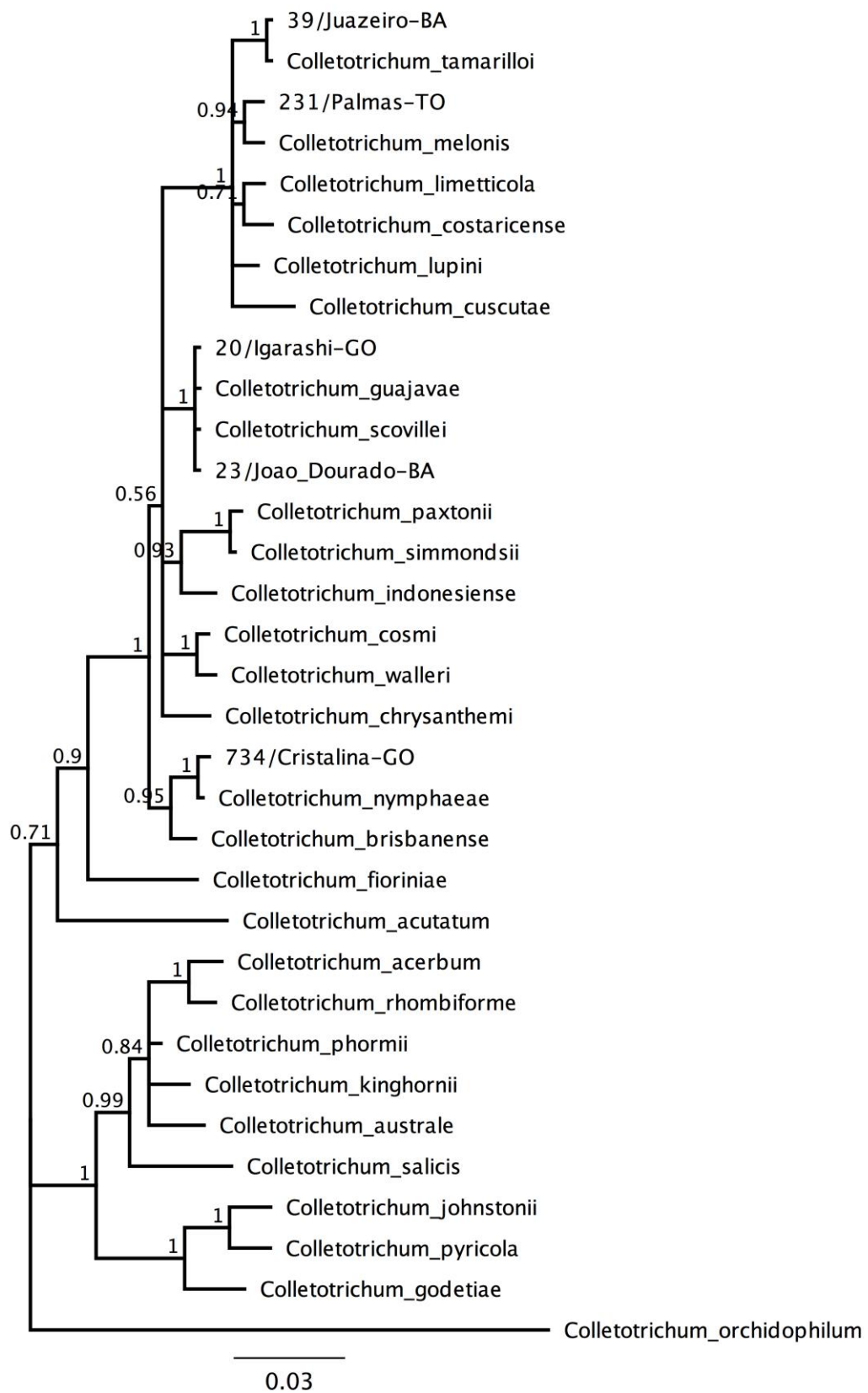


Figura 3: Árvore gerada através de inferência bayesiana, com concatenamento dos genes *tub2* e *act*, contendo cinco isolados representativos mais referências do complexo *C. acutatum* apresentando valores bem suportados de probabilidade posterior.

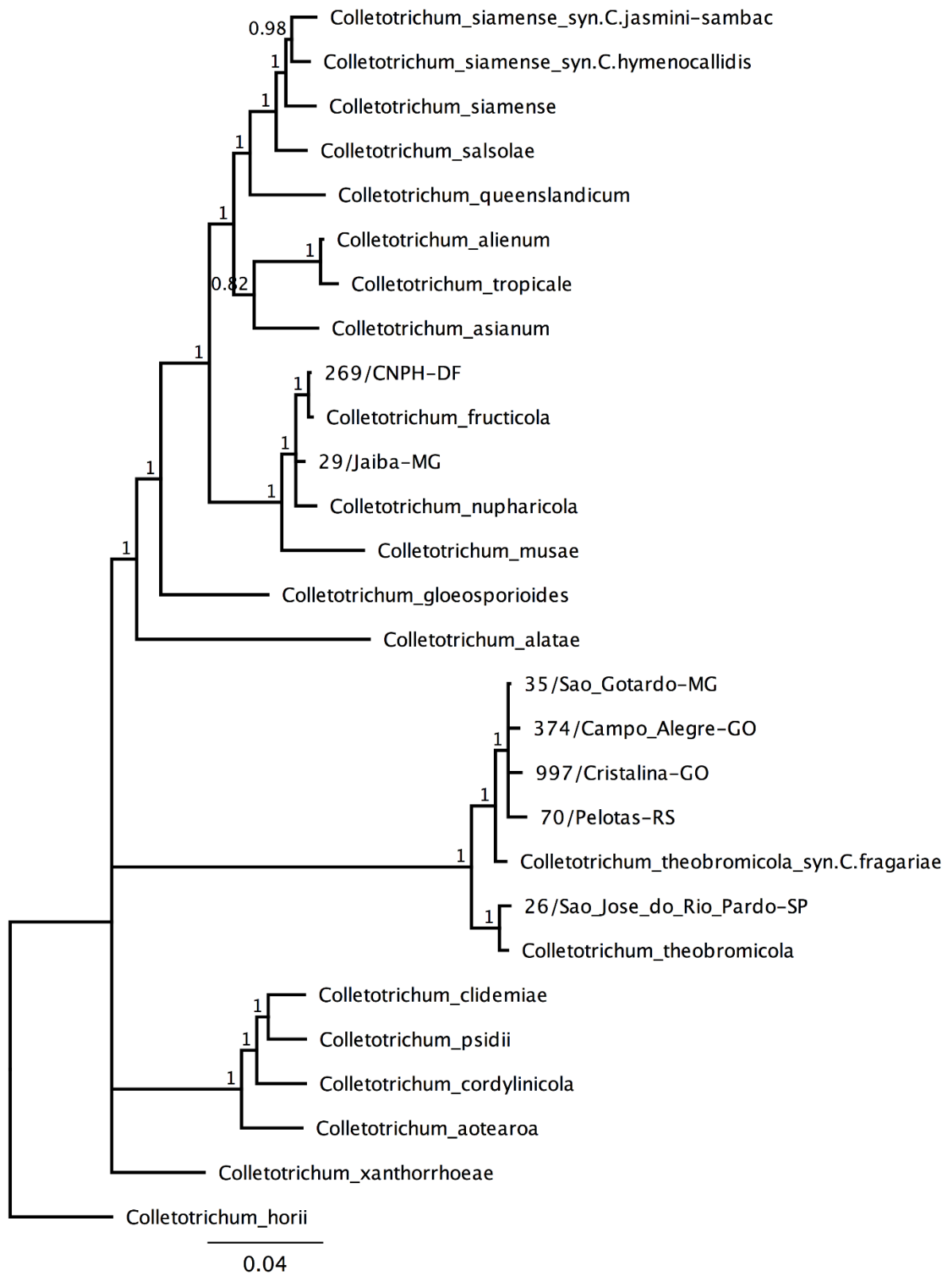


Figura 4: Árvore gerada através de inferência bayesiana, com concatenamento dos genes *tub2*, *act* e *ApMat* contendo sete isolados representativos mais referências do complexo *C. gloeosporioides* apresentando valores bem suportados de probabilidade posterior.

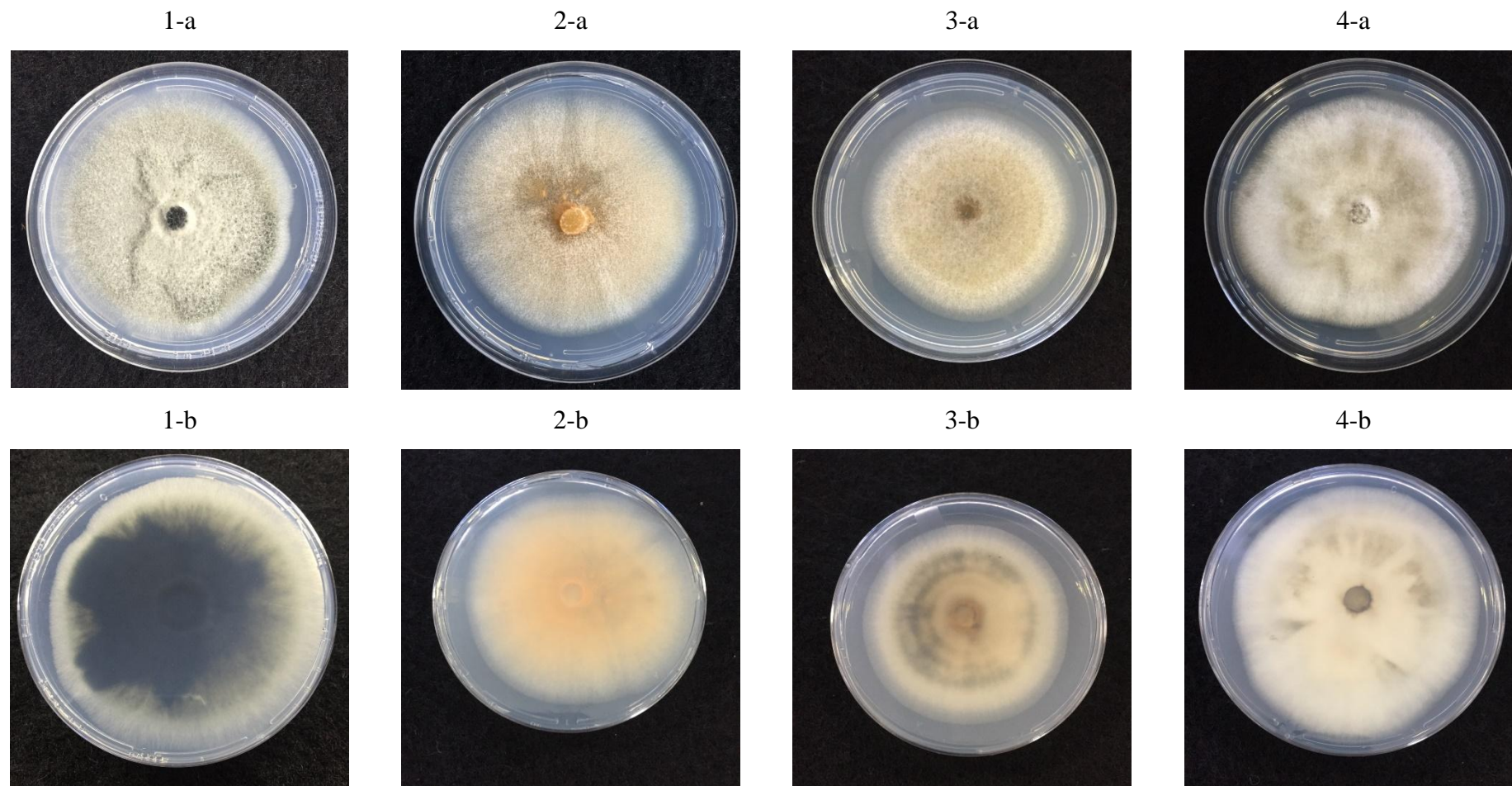


Figura 5.1: Morfogrupos de 1 a 4 (a – frente; b – reverso).

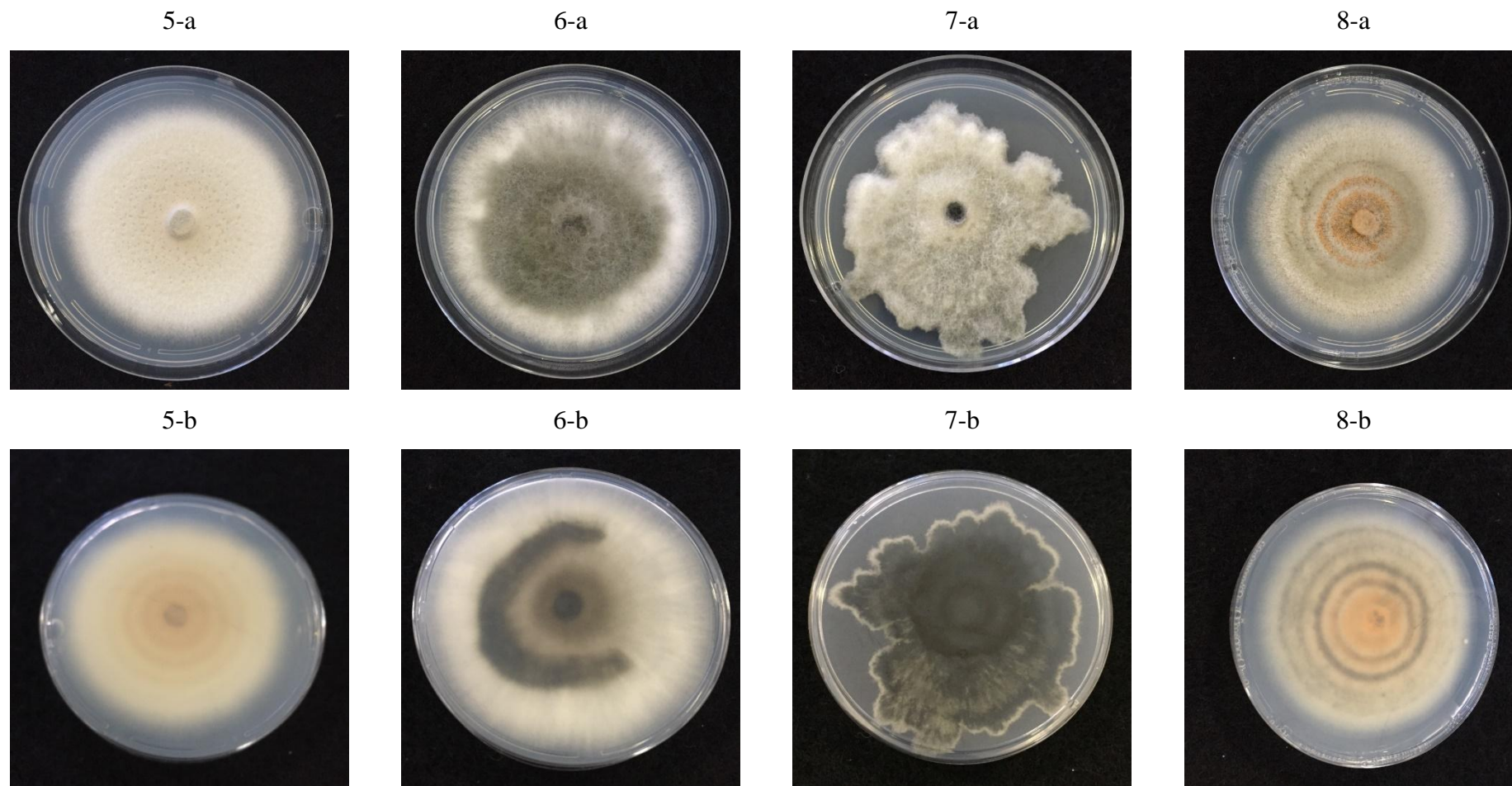


Figura 5.2: Morfogrupos de 5 a 8 (a – frente; b – reverso)

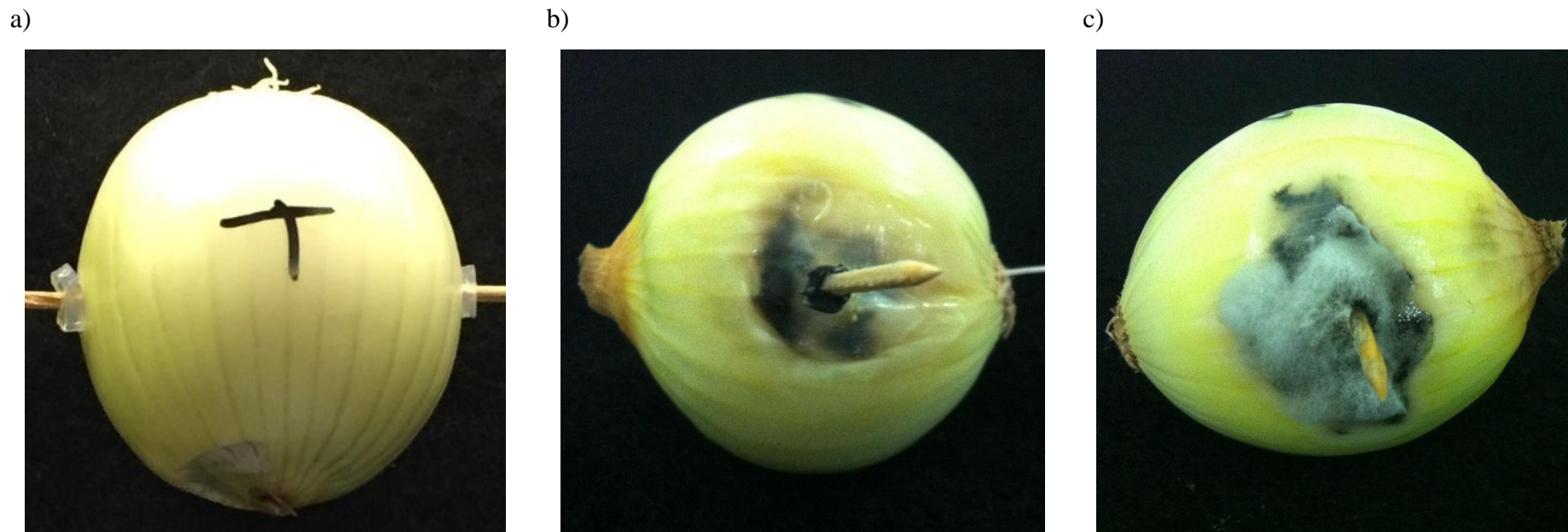


Figura 6: Testes de agressividade em Bulbos de Cebola. a) Testemunha. Exemplo de como o bulbo de cebola foi utilizado no teste de agressividade; b) lesão aquosa; c) lesão firme com presença expressiva de um micélio contonoso.

Tabela 1: Iniciadores utilizados no estudo, com as sequências e referências.

Gene	Produto	Iniciador	Sentido	Sequencia (5'- 3')	Referência
ACT	Actina	ACT-512F	Forward	ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC	Carbone & Kohn (1999)
ACT	Actina	ACT-783R	Reverse	TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT	Carbone & Kohn (1999)
TUB2	Tubulina	Bt2a	Forward	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC	Glass & Donaldson (1995)
TUB2	Tubulina	Bt2b	Reverse	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	Glass & Donaldson (1995)
3'-APN2/MAT 12igs	APMAT	CgDL_F6	Forward	AGTGGAGGTGCGGGACGTT	Rojas <i>et al.</i> (2010)
3'-APN2/MAT 12igs	APMAT	CgMAT1_F2	Reverse	TGATGTATCCCGACTACCG	Rojas <i>et al.</i> (2010)

Tabela 2: Referências de espécies-tipo dos complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*

Espécies	Cultura	Hospedeiro	País	Número de acesso no GenBank		
				APMAT	ACT	TUB2
<i>C. aenigma</i>	ICMP 18608	<i>Persea americana</i>	Israel	--	JX009443	JX010389
<i>C. aeschynomenes</i>	ICMP 17673, ATCC 201874	<i>Aeschynomene virginica</i>	USA	--	JX009483	JX010392
<i>C. alatae</i>	CBS 304.67, ICMP 17919	<i>Dioscorea alata</i>	India	KC888932	JX009471	JX010383
<i>C. alienum</i>	ICMP 12071	<i>Malus domestica</i>	Nova Zelândia	KC888927	JX009572	JX010411
<i>C. aotearoa</i>	ICMP 18537	<i>Coprosma</i> sp.	Nova Zelândia	KC888930	JX009564	JX010420
<i>C. asianum</i>	ICMP 18580, CBS 130418	<i>Coffea arabica</i>	Tailândia	FR718814	JX009584	JX010406
<i>C. boninense</i>	MAFF 305972, ICMP 17904, CBS 123755	<i>Crinum asiaticum</i> var. <i>sinicum</i>	Japão	--	JX009583	--
<i>C. clidemiae</i>	ICMP 18658	<i>Clidemia hirta</i>	USA, Hawaii	KC888929	JX009537	JX010438
<i>C. cordylinicola</i>	MFLUCC 090551, ICMP 18579	<i>Cordyline fruticosa</i>	Tailândia	JQ899274	HM470235	JX010440
<i>C. fructicola</i>	ICMP 18581, CBS 130416	<i>Coffea arabica</i>	Tailândia	JQ807838	FJ907426	JX010405
<i>C. fructicola</i> (syn. <i>C. ignotum</i>)	CBS 125397, ICMP 18646	<i>Tetragastris panamensis</i>	Panama	JQ807839	JX009581	JX010409
<i>C. fructicola</i> (syn. <i>Glomerella cingulata</i> var. <i>minor</i>)	CBS 238.49, ICMP 17921	<i>Ficus edulis</i>	Alemanha	--	JX009495	JX010400
<i>C. gloeosporioides</i>	IMI 356878, ICMP 17821, CBS 112999	<i>Citrus sinensis</i>	Itália	JQ807843	JX009531	JX010445
<i>C. gloeosporioides</i> (syn. <i>Gloeosporium pedemontanum</i>)	CBS 273.51, ICMP 19121	<i>Citrus limon</i>	Itália	--	JX009558	--
<i>C. hippeastri</i>	CBS 241.78, ICMP 17920	<i>Hippeastrum</i> sp.	Holanda	--	JX009485	--
<i>C. horii</i>	NBRC 7478, ICMP 10492	<i>Diospyros kaki</i>	Japão	JQ807840	JX009438	JX010450
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>Ciggaro</i>	ICMP 18539	<i>Olea europaea</i>	Austrália	--	JX009523	JX010434
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i> (syn. <i>Glomerella cingulata</i> var. <i>migrans</i>)	CBS 237.49, ICMP 17922	<i>Hypericum perforatum</i>	Alemanha	--	JX009450	JX010432
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i> (syn. <i>Glomerella rufomaculans</i> var. <i>vaccinii</i>)	CBS 124.22, ICMP 19122	<i>Vaccinium</i> sp.	USA	--	JX009536	JX010433
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>Kahawae</i>	IMI 319418, ICMP 17816	<i>Coffea arabica</i>	Quênia	JQ899282	JX009452	JX010444
<i>C. musae</i>	CBS 116870, ICMP 19119	<i>Musa</i> sp.	USA	KC888926	JX009433	HQ596280

<i>C. nupharicola</i>	CBS 470.96, ICMP 18187	<i>Nuphar lutea</i> subsp. <i>polysepala</i>	USA	JX145319	JX009437	JX010398
<i>C. psidii</i>	CBS 145.29, ICMP 19120	<i>Psidium</i> sp.	Itália	KC888931	JX009515	JX010443
<i>C. queenslandicum</i>	ICMP 1778	<i>Carica papaya</i>	Austrália	KC888928	JX009447	JX010414
<i>C. salsolae</i>	ICMP 19051	<i>Salsola tragus</i>	Hungria	KC888925	JX009562	JX010403
<i>C. siamense</i>	ICMP 18578, CBS 130417	<i>Coffea arabica</i>	Tailândia	JQ899289	FJ907423	JX010404
<i>C. siamense</i> (syn. <i>C. hymenocallidis</i>)	CBS 125378, ICMP 18642	<i>Hymenocallis americana</i>	China	JQ807842	GQ856775	JX010410
<i>C. siamense</i> (syn. <i>C. jasmini-sambac</i>)	CBS 130420, ICMP 19118	<i>Jasminum sambac</i>	Vietnã	JQ807841	HM131507	JX010415
<i>C. theobromicola</i>	CBS 124945, ICMP 18649	<i>Theobroma cação</i>	Panamá	KC790726	JX009444	JX010447
<i>C. theobromicola</i> (syn. <i>C. fragariae</i>)	CBS 142.31, ICMP 17927	<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>	USA	JQ807844	JX009516	JX010373
<i>C. theobromicola</i> (syn. <i>C. gloeosporioides</i> f. <i>stylosanthis</i>)	MUCL 42294, ICMP 17957, CBS 124251	<i>Stylosanthes viscosa</i>	Austrália	--	JX009575	JX010380
<i>C. ti</i>	ICMP 4832	<i>Cordyline</i> sp.	Nova Zelândia	--	JX009520	JX010442
<i>C. tropicale</i>	CBS 124949	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá	KC790728	JX009489	JX010407
<i>C. xanthorrhoeae</i>	BRIP 45094	<i>Xanthorrhoea preissii</i>	Austrália	KC790689	JX009478	JX010448
<i>Glomerella cingulata</i> "f.sp. <i>camelliae</i> "	ICMP 10643	<i>Camellia</i> × <i>williamsii</i>	Reino Unido	--	JX009540	JX010436
<i>C. acerbum</i>	CBS 128530, ICMP 12921, PRJ 1199.3	<i>Malus domestica</i> , bitter rot of fruit	Nova Zelândia	--	JQ949780	JQ950110
<i>C. acutatum</i>	CBS 112996, ATCC 56816, STE-U 5292	<i>Carica papaya</i>	Austrália	--	JQ005839	JQ005860
<i>C. australe</i>	CBS 116478, HKUCC 2616	<i>Trachycarpus fortunei</i>	África do Sul	--	JQ949776	JQ950106
<i>C. brisbanense</i>	CBS 292.67, DPI 11711	<i>Capsicum annuum</i>	Austrália	--	JQ949612	JQ949942
<i>C. chrysanthemi</i>	IMI 364540, CPC 18930	<i>Chrysanthemum coronarium</i> , leaf spot	China	--	JQ949594	JQ949924
<i>C. cosmi</i>	CBS 853.73, PD 73/856	<i>Cosmos</i> sp., seed	Holanda	--	JQ949595	JQ949925
<i>C. costaricense</i>	CBS 330.75	<i>Coffea arabica</i> , cv. <i>Typica</i> , Berry	Costa Rica	--	JQ949501	JQ949831
<i>C. cuscutae</i>	IMI 304802, CPC 18873	<i>Cuscuta</i> sp.	Dominica	--	JQ949516	JQ949846
<i>C. fioriniae</i>	CBS 125396, GJS 08-140 ^a	<i>Malus domestica</i> , fruit lesion	USA	--	JQ949620	JQ949950
<i>C. godetiae</i>	CBS 133.44	<i>Clarkia hybrida</i> , cv. <i>Kelvon</i> Glory, seed	Dinamarca	--	JQ949723	JQ950053

<i>C. guajavae</i>	IMI 350839, CPC 18893	<i>Psidium guajava</i> , fruit	India	--	JQ949591	JQ949921
<i>C. indonesiense</i>	CBS 127551, CPC 14986	<i>Eucalyptus</i> sp.	Indonésia	--	JQ949609	JQ949939
<i>C. johnstonii</i>	CBS 128532, ICMP 12926, PRJ 1139.3	<i>Solanum lycopersicum</i> , fruit rot	Nova Zelândia	--	JQ949765	JQ950095
<i>C. kinghornii</i>	CBS 198.35	<i>Phormium</i> sp.	Reino Unido	--	JQ949775	JQ950105
<i>C. laticiphilum</i>	CBS 112989, IMI 383015, STE-U 5303	<i>Hevea brasiliensis</i>	India	--	JQ949940	JQ949610
<i>C. limetticola</i>	CBS 114.14	<i>Citrus aurantifolia</i> , young twig	USA, Florida	--	JQ949514	JQ949844
<i>C. lupini</i>	CBS 109225, BBA 70884	<i>Lupinus albus</i>	Ucrânia	--	JQ949476	JQ949806
<i>C. melonis</i>	CBS 159.84	<i>Cucumis melo</i> , peel of fruit	Brasil	--	JQ949515	JQ949845
<i>C. nymphaeae</i>	CBS 515.78	<i>Nymphaea alba</i> , leaf spot	Holanda	--	JQ949518	JQ949848
<i>C. orchidophilum</i>	CBS 632.80	<i>Dendrobium</i> sp.	USA	--	JQ949472	JQ949802
<i>C. paxtonii</i>	IMI 165753, CPC 18868	<i>Musa</i> sp.	Santa Lucia	--	JQ949606	JQ949936
<i>C. phormii</i>	CBS 118194, AR 3546	<i>Phormium</i> sp.	Alemanha	--	JQ949767	JQ950097
<i>C. pseudoacutatum</i>	CBS 436.77	<i>Pinus radiata</i>	Chile	--	JQ949801	JQ950131
<i>C. pyricola</i>	CBS 128531, ICMP 12924, PRJ 977.1	<i>Pyrus communis</i> , fruit rot	Nova Zelândia	--	JQ949766	JQ950096
<i>C. rhombiforme</i>	CBS 129953, PT250, RB011	<i>Olea europaea</i>	Portugal	--	JQ949778	JQ950108
<i>C. salicis</i>	CBS 607.94	<i>Salix</i> sp., leaf, spot	Holanda	--	JQ949781	JQ950111
<i>C. scovillei</i>	CBS 126529, PD 94/921-3, BBA 70349	<i>Capsicum</i> sp.	Indonésia	--	JQ949588	JQ949918
<i>C. simmondsii</i>	CBS 122122, BRIP 28519	<i>Carica papaya</i> , fruit	Austrália	--	JQ949597	JQ949927
<i>C. sloanei</i>	IMI 364297, CPC 18929	<i>Theobroma cacao</i> , leaf	Malásia	--	JQ949608	JQ949938
<i>C. tamarilloi</i>	CBS 129814, T.A.6	<i>Solanum betaceum</i> , fruit, anthracnose	Colômbia	--	JQ949505	JQ949835
<i>C. walleri</i>	CBS 125472, BMT(HL)19	<i>Coffea</i> sp., leaf tissue	Vietnã	--	JQ949596	JQ949926

Tabela 3: Haplótipos e os isolados que os compõem com respectivas localidades de origem.

	Haplótipo	Localidade	
Hap 1	Coll 20	Cristalina	GO
	Coll 21	Jaiba	MG
	Coll 38	São José do Rio Pardo	SP
	Coll 22	Ibicoara	BA
	Coll 1	CNPH	DF
	Coll 155	São José do Rio Pardo	SP
Hap 2	Coll 28	São José do Rio Pardo	SP
	Coll 34	--	RN
	Coll 39	Juazeiro	BA
	Coll 36	São Gotardo	MG
Hap 3	Coll 231	Palmas	TO
	Coll 1006	Altamira	PA
Hap 4	Coll 734	Cristalina	GO
Hap 5	Coll 23	João Dourado	BA
Hap 6	Coll 15	São José do Rio Pardo	SP
	Coll 976	Cristalina	GO
	Coll 35	São Gotardo	MG
	Coll 975	Campo Alegre	GO
	Coll 1004	Cristalina	GO
	Coll 1000	Cristalina	GO
	Coll 40	São José do Rio Pardo	SP

	Coll 163	São Gotardo	MG
	Coll 1014	São José do Rio Pardo	SP
	Coll 1010	Irece	BA
	Coll 37	São Gotardo	MG
	Coll 1002	Cristalina	GO
	Coll 42	São José do Rio Pardo	SP
	Coll 703	CNPH	DF
	Coll 41	São José do Rio Pardo	SP
	Coll 1001	Cristalina	GO
	Coll 996	Cristalina	GO
	Coll 999	Cristalina	GO
	Coll 998	Cristalina	GO
	Coll C2	Cristalina	GO
	Coll CI		GO
	Coll 1003	Cristalina	GO
Hap 7	Coll 26	São José do Rio Pardo	SP
Hap 8	Coll 997	Cristalina	GO
Hap 9	Coll 374	Campo Alegre	GO
Hap 10	Coll 29	Jaiba	MG
Hap 11	Coll 269	CNPH	DF
Hap 12	Coll 70	Pelotas	RS

Tabela 4: Caracterização morfológica dos isolados

Isolado	Cor da Colônia		Textura	Comprimento dos conídios (µm)	Largura dos conídios (µm)	Taxa de Crescimento (mm/d)	Diâmetro da Colônia (mm)
	Frente	Verso					
Coll 26	cinza claro	cinza a verde escuro	muito cotonosa	12,30 b	3,77 a	6,03 a	42,16 a
Coll 374	cinza claro	cinza a verde escuro	muito cotonosa	11,83 b	4,53 d	8,53 b	59,66 b
Coll 39	oliva	branco a oliva	cotonosa	12,79 c	4,45 d	8,56 b	60 b
Coll 20	oliva	laranja a oliva	pouco cotonosa	15,02 d	4,11 c	9,26 c	64,83 c
Coll 231	cinza a branco	branco a laranja pálido	cotonosa	12,69 c	3,65 a	9,4 c	65,83 c
Coll 29	branco	Laranjapálido	feltrosa	12,88 c	4,45 d	9,46 c	66,16 c
Coll 35	cinza claro	verde escuro	cotonosa	11,9 b	3,90 b	9,66 c	67,66 c
Coll 70	cinza claro	cinza a verde escuro	muito cotonosa	*	*	9,76 c	68,5 c
Coll 23	laranja pálido	laranjapálido	pouco cotonosa	13,35 c	3,99 b	9,76 c	68,5 c
Coll 997	cinza a branco	branco a laranja pálido	cotonosa	9,57 a	3,62 a	10,36 d	72,66 d
Coll 269	cinza	cinza a branco	muito cotonosa	11,81 b	3,67 a	10,5 d	73,33 d

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de significância.

Tabela 5: Agressividade dos isolados nos bulbos de cebola

Isolado	Agressividade
Coll 734	0,00 a
Coll 23	1,00 b
Coll 231	1,10 b
Coll 20	1,10 b
Coll 29	1,40 b
Coll 39	1,80 c
Coll 997	1,80 c
Coll 70	2,00 c
Coll 269	2,10 c
Coll 35	2,10 c
Coll 374	2,20 c
Coll 26	2,70 c

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de significância.

CONCLUSÕES GERAIS

- A antracnose da cebola no Brasil é causada por diversas espécies de *Colletotrichum*;
- Apesar de possuir alta resolução para separar espécies do complexo *C. Gloesporioides*, o gene *ApMat* utilizado no estudo deve ser utilizado em pesquisas futuras junto com uma maior quantidade de genes para se ter certeza da correta caracterização de espécies de *Colletotrichum* envolvidas na epidemiologia da antracnose.
- Estudos complementares devem ser realizados para confirmar a ocorrência de espécies do complexo *C. acutatum*, causando antracnose em cebola, através da junção dos genes *tub2* e *gapdh*;
- Os testes de patogenicidade elucidaram que os isolados utilizados são patogênicos à cebola;