

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE DOUTORADO**

**ESTRUTURA GENÉTICA, PATOGENICIDADE E CONTROLE DE  
*Curvularia eragrostidis* E *Phyllosticta* spp. EM INHAME**

**DARCILÚCIA OLIVEIRA DO CARMO DE ALMEIDA**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
FEVEREIRO - 2013**

**ESTRUTURA GENÉTICA, PATOGENICIDADE E CONTROLE DE  
*Curvularia eragrostidis* E *Phyllosticta* spp. EM INHAME**

**DARCILÚCIA OLIVEIRA DO CARMO DE ALMEIDA**

Engenheira Agrônoma

Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, 2004.

Tese submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

**Orientador: Prof. Drº Jorge Teodoro de Souza**  
**Co-orientador: Prof. Drº Ricardo Franco Cunha Moreira**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA – 2013

## FICHA CATALOGRÁFICA

A447

Almeida, Darcilúcia Oliveira do Carmo de.

Estrutura genética, patogenicidade e controle de *Curvularia eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. em inhame / Darcilúcia Oliveira do Carmo de Almeida. \_ Cruz das Almas, 2013.  
91 f.; Il.

Orientador: Prof. Jorge Teodoro de Souza.

Co-orientador: Ricardo Franco Cunha Moreira

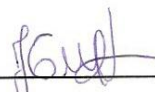
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1. Cultura do inhame – Doenças fúngicas. 2. Controle - Extratos vegetais. 3. Fungos fitopatogênicos - Variabilidade Genética. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título

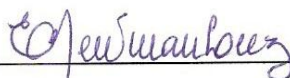
CDD: 632.2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE  
DARCILÚCIA OLIVEIRA DO CARMO DE ALMEIDA**



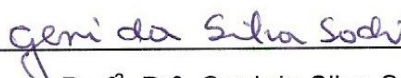
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza  
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB  
(Orientador)



\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Edna Dora Martins Newmam Luz  
Centro de Pesquisa da Lavoura Cacaueira - CEPLAC



\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Élide Barbosa Côrrea  
Universidade Estadual da Paraíba - UEPB



\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Geni da Silva Sodré  
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB



\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa  
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB

Tese homologada pelo Colegiado de Curso de Doutorado em Ciências Agrárias  
em.....  
Conferindo o Grau de Doutor em Ciências Agrárias em .....

À Jesus misericordioso e Maria Santíssima  
Ofereço

Meu pai Nelson (*in memória*), minha mãe Jaci, meus irmãos Nilvandro, Ana  
Angélica, Robson, Márcia e Cristiano.

A vocês eu dedico

Que Jesus não permita que eu perca o **OTIMISMO**, mesmo sabendo que o futuro que nos espera pode não ser tão alegre...

Que eu não perca a **VONTADE DE VIVER**, mesmo sabendo que a vida é, em muitos momentos, dolorosa...

Que eu não perca a vontade de **TER GRANDES AMIGOS**, mesmo sabendo que com as voltas do mundo, eles acabam indo embora de nossas vidas...

Que eu não perca o **EQUILÍBRIO**, mesmo sabendo que inúmeras forças querem que eu caia...

Que eu não perca o **AMOR POR MINHA FAMÍLIA**, mesmo sabendo que muitas vezes não posso fazer parte do seu convívio diário...

Que eu jamais esqueça que Jesus me ama infinitamente!

Francisco Cândido Xavier

## AGRADECIMENTOS

- A Jesus, pelo seu infinito amor e misericórdia derramada sempre em minha vida, a Ti meu Senhor toda honra e glória seja dada a todo instante. Jesus eu confio em vós!
- Aos meus pais Nelson (*in memória*) e Jaci pelo apoio incondicional. Agradeço imensamente pelo amor, dedicação, criação exemplar e pelo incentivo aos estudos que sempre foi dado;
- Aos meus irmãos: Nilvandro, Ana Angélica, Robson, Márcia, Cristiano e Nelsinho (*in memória*) pela dedicação e amizade. Louvo e agradeço a Deus por ter-los como família. Amo vocês!
- Ao meu esposo, Nailson, que esteve sempre comigo desde a época da graduação, escutando meus anseios, apoiando meus sonhos e aturando meus estresses... Muito obrigada meu amor!
- Ao Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza, meu orientador, que compartilhou comigo seus conhecimentos e experiências. Todo o meu respeito!
- Ao Prof. Dr. Ricardo Franco Silva Moreira, meu co-orientador, pela acessibilidade quando o procurei e ajuda nos momentos que mais precisei. Serei eternamente grata!
- A todos os técnicos do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da UFRB: Zozilene Teles (Chefe dos técnicos), Vitória Caroline, Luana Oliveira, Ronaldo Carvalho, Nara Katary pela amizade e por toda ajuda no desenvolvimento dos trabalhos, principalmente nos momentos mais difíceis.
- A Carol Yamamoto, exemplo de doação e amizade... e Patrícia Oliveira pela ajuda nas extrações de DNA e sequenciamentos.
- À professora Ana Cristina Fermino pela amizade, carinho e confiança em me deixar usar seu laboratório.
- Aos amigos e irmãos, Cristiano Oliveira, Márcia Oliveira, Eliane Candeias (Lica), Alda Reis, Ana Cláudia Santos, Emanuelle Burgos, Shirley Costa, Gilcilene Maciel, Ana Maria (Aninha), pela ajuda nas coletas de material em campo e isolamentos em laboratório.
- Aos meus amigos do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da UFRB de sempre e para sempre: Jerferson de Sá - amigo-irmão, Carol Damasceno, Eliane Silva, Josilda Damasceno, Erasto Gama, Valter Magalhães, Carla Sousa, Lydice

Meira, Rafael Mota, Jaqueline Macena, Juliana Fernandes... À Cássia Sousa que mesmo na Itália me ajudou muito no momento da entrega desta Tese. Por estarem sempre com os braços livres pra me erguer nas horas de sufoco. Pelos momentos compartilhados de alegrias, tristezas, brincadeiras e pelo apoio psicológico que me foi dado durante o período da pesquisa. Amigos pra todas as horas!

- A todos do Laboratório de Biologia Molecular da UFRB: Rafael Trocoli, Jéssica Lima, Adriana Almeida, Mariah Batista, Jaqueline Andrade, Adriana Neves, Diogo Alves, Adailson Feitosa, Franciane França, Eliane (Verinha), Eliana Rocha, Murilo Campos, Augusto, Vítor Miguez, Jaqueline Nascimento, Maria Luiza (Malu), Zayda... Pelo convívio diário.

- Aos colegas do Curso de Doutorado: Juliana Alves, Ângelo Gallotti, Lana Clarton, Maria Selma Diamantino, Vânia Oliveira... À amiga-irmã de todas as horas, Doutoranda da UEFS, Fabíola Rebouças Rodrigues. Por fazerem parte de momentos tão importantes na minha vida. Pelos laços que se formaram e pelos instantes que passamos juntos.

- Aos meus amigos do laboratório da CEPLAC: Cristiane Duarte, amiga-irmã... Marcos Vinícius e Nadja Vitória, pela ajuda nos cortes histológicos e análise morfológica das estruturas dos patógenos. Ao Dr. José Luíz Bezerra, exemplo de humildade no meio científico... Obrigada a vocês por TUDO!

- À Prodoc Elaine Cerqueira do Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia (NBIO) da UFRB e todos os auxiliares de pesquisa do Campo Experimental I da UFRB: Erivaldo, Alberico, Renato, Edson (Galego), Bruno, Gerson, Luiz Augusto (Malhado), Romir Fábio, Ademar (Foca), Jailton (Jai) e Carlos (Carlinhos) pela ajuda no plantio de inhame no campo, pulverizações e colheita.

- A todos que fizeram parte da banca examinadora de qualificação e defesa de Tese: Dr. José Luíz Bezerra, Dr. Carlos Ivan Aguilar Vildoso e Dr. Juan Anda Rocabado, Dr<sup>a</sup> Edna Dora Luz, Dr<sup>a</sup> Èlida Correa, Dr<sup>a</sup> Maria Angélica Costa e Dr<sup>a</sup> Geni Sodrê. Rogo a Jesus pela existência da vida de vocês. Eternamente grata!

- À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

- A todos os agricultores de inhame do Recôncavo Baiano que gentilmente me receberam em suas propriedades, disponibilizando material vegetal para execução deste trabalho.

- A todos, que mesmo sem saber contribuíram com a concretização desse trabalho.

A todos vocês, muito Obrigada...



## SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	1
<b>Capítulo I</b>	
MORFOLOGIA E ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICA DA POPULAÇÃO DE <i>Curvularia eragrostidis</i> E <i>Phyllosticta</i> spp. ASSOCIADA À CULTURA DO INHAME NO RECÔNCAVO BAIANO.....	19
<b>Capítulo II</b>	
PATOGENICIDADE DE <i>Curvularia eragrostidis</i> E <i>Phyllosticta</i> spp.....	44
<b>Capítulo II</b>	
USO DE EXTRATOS VEGETAIS NA PROTEÇÃO DE PLANTAS DE INHAME CONTRA <i>Curvularia eragrostidis</i> E <i>Phyllosticta</i> spp.....	57
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80

## **ESTRUTURA GENÉTICA, PATOGENICIDADE E CONTROLE DE *Curvularia eragrostidis* E *Phyllosticta* spp. EM INHAME**

Autora: Darcilúcia Oliveira do Carmo de Almeida

Orientador: Jorge Teodoro de Souza

Co-orientador: Ricardo Franco Cunha Moreira

**RESUMO:** A cultura do inhame (*Dioscorea rotundata*) vem se destacando no Nordeste do Brasil como uma alternativa promissora para os pequenos e médios produtores da região, devido ao seu grande potencial de exportação e consumo interno. As manchas foliares são doenças de alta incidência e severidade em todas as áreas de produção de inhame no Brasil. A inexistência de informações sobre epidemias causadas por *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. em plantios de inhame no Recôncavo da Bahia, dificulta o controle dessas doenças pelos produtores. O presente trabalho se constitui num estudo pioneiro sobre a queima das folhas no Recôncavo da Bahia, no que diz respeito aos seguintes estudos: diversidade genética e estrutura populacional de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. em inhame; patogenicidade de isolados de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. em inhame e outras plantas; controle da queima das folhas com extratos vegetais manipueira, sementes de nim (*Azadirachta indica*), folhas de juá (*Ziziphus joazeiro*) e folhas de velame (*Julocroton triqueter*) *in vitro*, casa de vegetação e campo. As populações dos dois patógenos avaliados possuem alta variabilidade genética, o que pode dificultar estratégias de manejo da queima foliar. Os resultados demonstram que outras plantas podem servir de fonte de inóculo de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. para plantações comerciais de inhame. *Curvularia* spp. e *Phyllosticta* spp. são patogênicos e endofíticos ao inhame. Experimentos conduzidos *in vitro*, casa-de-vegetação e campo demonstraram que os extratos vegetais de manipueira e folhas de juá usados neste estudo apresentam grande potencial a ser explorado no cultivo do inhame, interferindo nas suas características fisiológicas.

**PALAVRAS CHAVE:** *Dioscorea* spp., Queima das folhas, Diversidade genética, novos hospedeiros, controle alternativo

## **GENETIC STRUCTURE, PATHOGENICITY AND CONTROL OF *Curvularia eragrostidis* AND *Phyllosticta* spp. IN YAM**

Authora: Darcilúcia Oliveira do Carmo de Almeida

Advisor: Jorge Teodoro de Souza

Co-advisor: Ricardo Franco Cunha Moreira

**ABSTRACT:** Yam is a crop that has been viewed in the northeastern region of Brazil as a promising alternative for small and average farmers, due to its large potential for exportation and internal marketing. Yam leaf spot is a disease of high incidence and severity in all yam production areas in Brazil. The lack of information about the epidemics caused by *C. eragrostidis*, and *Phyllosticta* spp. in yam crop systems in the Recôncavo region of the State of Bahia, Brazil, hinders the disease control strategies by the farmers. The present work is a study sí pioneer about burning leaves in the Reconcavo de Bahia, with regard to the following studies: genetic diversity and population structure of *C. eragrostidis* and *Phyllosticta* spp. in yam; pathogenic isolates of *C. eragrostidis* and *Phyllosticta* spp. in yam and other plants; control of leaf blight with plant extracts cassava, neem seeds (*Azadirachta indica*) leaves juá (*Ziziphus joazeiro*) and leaf canopy (*Julocroton triqueter*) *in vitro*, greenhouse and field. The populations of both pathogens studied have high genetic variability, which may hinder management strategies leaf blight. The results demonstrate that other plants can serve as a source of inoculum of *C. eragrostidis* and *Phyllosticta* spp. for commercial plantations of yam. *Curvularia* spp. and *Phyllosticta* spp. are pathogenic and endophytic to yams. Experiments conducted *in vitro*, house-of-field and field demonstrated that the plant extracts cassava and leaves juá used in this study have great potential to be explored in the cultivation of yam, interfering in their physiological characteristics.

**KEYWORDS:** Dioscorea spp., Burning leaves, Genetic diversity, new hosts, alternative control.

## INTRODUÇÃO

### A cultura do inhame

O inhame (*Dioscorea* spp., Ordem Dioscoreales, Família Dioscoreaceae) constitui um dos principais alimentos em regiões tropicais (MAFRA, 1986). A Nigéria destaca-se como o maior produtor (29 milhões de ton), seguida por Gana (5,7 milhões de ton), enquanto o Brasil ocupa a décima segunda posição. O Brasil é o segundo maior produtor dessa hortaliça na América Latina com cerca de 230 mil ton/ano (FAO, 2011). A região Nordeste é responsável pela maior produção de inhame, com 47,3 mil t (SANTOS & MACEDO, 2002). Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Maranhão são os principais produtores dessa *Dioscoreaceae* no país. O Estado da Bahia é responsável pela quarta maior produção do país, com 13.259 toneladas (FAO, 2011). A cultura do inhame é um dos negócios agrícolas promissores na escala evolutiva da agricultura do Estado, sobretudo, pelo atual interesse de países do Mercado Comum Europeu – MCE (França e Portugal), América do Norte (Estados Unidos e Canadá) e Países Baixos. Na Bahia a área cultivada é em torno de 947 hectares, situada geograficamente na microrregião do Recôncavo, nos limites entre os Municípios de Cruz das Almas, São Felipe, Maragogipe e São Félix. (IBGE, 2011).

Entre as 600 espécies do gênero *Dioscorea*, estima-se que ocorram no Brasil entre 150 e 200, mas a maioria é pouco estudada (PEDRALLI, 2002). Segundo Souza & Resende (2003), dentro de cada espécie há uma variação entre os clones, principalmente nas formas dos rizóforos, na cor da polpa e na adaptação ecológica.



**Figura 1** – Parte aérea de quatro espécies do gênero *Dioscorea*: *D. rotundata* (A), *D. alata* (B), *D. bulbifera* e *D. trifida* (D) presentes no campo experimental da UFRB.

Dentre as espécies de inhame cultivadas (Figura 1), as mais importantes, por seus rizóforos comestíveis são: *D. cayennensis* (inhame amarelo), *D. rotundata* (inhame branco), *D. alata* (inhame água), *D. trifida* e *D. esculenta* (SANTOS, 1996).

Na Bahia, são encontradas as espécies *D. rotundata* e *D. cayennensis* (Boca funda) ocupando mais de 90% da área cultivada e em menor escala *D. alata* (São Tomé e Jibóia) e *D. trifida* (inhambu ou cará mimoso) além de *D. bulbifera* (inhame fígado), esporadicamente (CARVALHO et al, 2009).

No Brasil observa-se o consumo de todas as espécies acima referidas com exceção de *D. esculenta*. Deste grupo apenas *D. trifida* é originária do continente americano, tendo como provável centro de origem a América Central, embora o Brasil seja considerado centro de origem dessa espécie. Segundo Piperno et al (2000), a espécie *D. trifida* era consumida na América do Sul a 7 mil anos juntamente com outras espécies de tuberosas como a mandioca (*Manihot esculenta*) e taioba (*Xanthosoma sagittifolium*). As outras espécies de *Dioscorea* são originárias da África (*D. cayennensis* e *D. rotundata*), Índia Central (*D. alata* e *D. esculenta*) e região Indo Malaia (*D. bulbifera*) (MONTEIRO & PERESSIM, 2002).

O ciclo do inhame tem quatro estádios fenológicos: dormência, vegetativo, reprodutivo e maturação fisiológica (SANTOS, 1996). A dormência fisiológica corresponde ao período do plantio à brotação dos rizóforos-semente. O estágio vegetativo, que corresponde ao período da brotação ao início do florescimento, ocorre entre 20 e 180 dias após o plantio (DAP) e caracteriza-se por quatro fases morfológicas: brotação (20 a 80 DAP), surgimento das primeiras folhas (80 a 90 DAP), formação de ramos primários (90 a 120 DAP) e formação de ramos secundários (120 a 150 DAP). Entre o terceiro e o quarto mês de plantio, com o aparecimento dos ramos primários, inicia-se a tuberização, que se estende até o final do ciclo fisiológico da cultura. No estágio reprodutivo, período do início da floração ao secamento das flores (180 a 210 DAP), ocorre a maturação parcial do rizóforo, que pode ser colhido para fim comercial, por meio da “capação”, técnica tradicional para produção de rizóforos-semente. O estágio de maturação corresponde ao período do término da floração à colheita (210 a 270 DAP). Uma planta de inhame produz dois tipos de rizóforos: os comerciais, colhidos seis a sete meses após o plantio, e as sementes, colhidas dois meses após os comerciais (MAFRA, 1986).

O inhame é um produto agrícola de alto valor econômico para os mercados interno ou externo, que movimenta e beneficia a economia das zonas produtoras. Segundo Santos & Macedo (2002), a importância alimentar do inhame decorre do seu alto valor nutritivo e energético pois é rico em carboidratos e vitaminas do complexo B (MOURA, 2005), vitamina A, ácido ascórbico e amido.

### **Doenças foliares associadas à cultura do inhame**

A cultura do inhame está sujeita a várias doenças, entre as quais predominam as de origem fúngica, tanto na parte aérea, interferindo na fotossíntese, como nos rizóforos, causando perdas na pós-colheita. Entre os principais patógenos que causam doenças foliares na cultura, destacam-se *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia eragrostidis*, *Phyllosticta dioscoreaecola*, *Phyllosticta dioscoreae*, *Micosphaerella dioscoreaecola*, *Cercospora ubi* e *Pestalotiopsis cruenta* (VAN DER Aa, 1973).

### **Queima das folhas do inhame**

Na região do Recôncavo Baiano, a principal doença que ocorre em plantios de inhame (*Dioscorea rotundata*) é a queima das folhas causada pelo fungo *Curvularia eragrostides*. A alta incidência da doença vem ocasionando perdas de até 40% na produtividade (GARRIDO et al., 2003).

O sintoma primário da doença na planta é uma mancha foliar necrótica, de coloração marrom escura, frequentemente circundada por um halo amarelo. Essas manchas tendem para o formato circular e atingem em média 2 a 3 cm de diâmetro e são limitadas parcialmente pelas nervuras do limbo foliar. É comum a coalescência de manchas, formando grandes áreas necrosadas incidindo sobre plantas jovens, que possuem folhas em desenvolvimento. O crescimento é significativamente reduzido e as folhas retorcidas, apresentando um quadro típico de nanismo, resultando em grandes perdas na produção. Com menor frequência, aparecem lesões nos pecíolos e ramos, que resultam em um rápido colapso da folha, de sete a dez dias após o início da mesma. O sintoma secundário ou reflexo é o pequeno tamanho dos rizóforos comerciais e rizóforos-semente (SANTOS, 1996; MOURA, 2005). Maior incidência e severidade ocorrem em épocas chuvosas e em culturas irrigadas por aspersão Michereff et al. (1999), quando as perdas

podem atingir 100% caso medidas preventivas de controle não sejam aplicadas (MOURA, 2005).

Aplicações de fungicidas protetores são realizadas em outros Estados produtores com o propósito de reduzir as perdas de produção decorrentes da queima foliar. Atualmente, não existem fungicidas registrados para a cultura do inhame junto ao Ministério da Agricultura (AGROFIT, 2012). No entanto, o controle da doença no campo, em outras regiões produtoras, vem sendo realizado através das práticas de pulverizações com fungicidas à base de Iprodione, Maneb, Mancozeb, Triadimenzol e Tebuconazole (PAULA et al., 2000; MOURA, 2005). Observações quanto à sensibilidade de isolados de *C. eragrostidis* a mancozeb e iprodione foram realizadas e todos os isolados foram sensíveis a esses produtos, em testes realizados *in vitro* e *in vivo* (PAULA et al., 2000).

### **O gênero *Curvularia***

A classificação taxonômica do gênero *Curvularia* é: Reino: Fungi; Filo: Ascomycota; Classe: Euascomycetes; Ordem: Pleosporales; Família: Pleosporaceae; Gênero: *Curvularia*. (SUN et al., 2003).

O gênero *Curvularia* é composto por mais de 40 espécies que se distinguem por diferenças muitas vezes evidentes na morfologia dos conídios, número de septos e morfologia da colônia (HOSOKAWA et al., 2003; SIVANESAN et al., 2003; ZHANG-MENG, 2003; ZHANG-MENG et al., 2004). Apresenta características bem diferenciadas o que torna sua identificação por meio de características morfológicas relativamente simples (LIMA & FURTADO, 2007). Contudo, a identificação ao nível de espécie é dificultada pelas poucas descrições e ausência de ilustrações em trabalhos mais antigos, bem como pela diversidade de características morfológicas dos conídios, causada por diferentes condições de cultura, bem como pela sobreposição dos valores das medidas apresentadas por diferentes autores para essas espécies (TSUDA & UEYAMA, 1982; HOSOKAWA et al., 2003).

### **A espécie *Curvularia eragrostidis***

A espécie *Cochliobolus eragrostidis* (anamorfo: *Curvularia eragrostidis*) pertence ao Filo Ascomycota; Classe Loculoascomycetes; Ordem Pleosporales;

Família Pleosporaceae (Alexopoulos, 1996). Em meio de cultura, a fase anamórfica apresenta conidióforos com dimensões de 521 x 6 µm (MOURA, 2005), solitários ou em grupos, simples ou raramente ramificados, retos a flexuosos, algumas vezes geniculados, multiseptados, com coloração marrom, comprimento variável, com aproximadamente 6 µm de espessura. Os conídios têm forma elipsoidal ou ovóides, com dimensões de 18 – 37 x 11 – 20 µm, com três septos, sendo que o septo mediano apresenta-se com uma banda espessa e escura, as células centrais com coloração marrom escura e as células externas de coloração marrom pálida (SIVANESAN, 1987). Em meio de cultura BDA forma colônias circulares de aspecto cottonoso e de coloração negra (MOURA, 2005).

A fase teleomórfica, *Cochliobolus eragrostidis* tem sido observada apenas em condições de laboratório. Os ascomas são superficiais, globosos a subglobosos, escuros, com 375 – 750 µm de largura, com bico ostiolar protuberante, desenvolvendo sobre estroma colunar ou plano, firmemente aderido ao substrato na base; bico ostiolar com dimensões de 250 – 1125 x 85 – 190 µm e ápice hialino. Ascas bitunicadas, a maioria cilíndricas, com oito ascósporos, medindo 150 – 240 x 12,5 – 22 µm e pseudoparafises hialinas. Os ascósporos são hialinos, filiformes ou flageliformes, com 12 a 22 septos paralelamente a frouxamente espiralados nas ascas ou raramente espiralados em uma hélice, e têm dimensões de 175 – 240 x 3,8 – 6,3 µm, com ou sem uma fina camada mucilagínosa (SIVANESAN, 1990).

A dispersão dos esporos de *C. eragrostidis* ocorre principalmente pelo vento (SIVANESAN, 1990) e maior incidência e severidade ocorrem em épocas chuvosas e em culturas irrigadas por aspersão quando as perdas podem atingir 100%, caso medidas preventivas não sejam aplicadas (MOURA, 2002; MOURA, 2005). Os restos culturais e os rizóforos-semente infestados constituem as principais fontes de inóculo primário de *C. eragrostidis* na cultura do inhame (MIGNUCCI et al., 1985).

Além de *D. cayennensis*, *D. alata* e *D. rotundata* (MAFRA, 1986), *C. eragrostidis* tem sido constatada em espécies botânicas de outras famílias como sorgo (*Sorghum bicolor*), batata doce (*Ipomoea batatas*), amendoim (*Arachis hypogea*), abacaxi (*Ananas comosus*) e arroz (*Oryza sativa*) (RASHID, 2001). Fungos do gênero *Curvularia* são frequentemente encontrados como sapróbios, fitopatogenos ou endófitos em diferentes substratos vegetais (FERREIRA, 2010;



FURTADO, 2007). Causam manchas em culturas de grande importância como trigo, milho, arroz, sorgo, cevada, aveia e centeio (FERREIRA, 2010).

### O gênero *Phyllosticta*

O gênero *Phyllosticta* possui espécies endofíticas e fitopatogênicas que são isoladas de diversos hospedeiros vegetais. Compreende as formas anamorfas de espécies de *Guignardia* e de alguns outros gêneros relacionados de fungos. É descrito como um fungo que cresce nas folhas do hospedeiro, com formação de picnídios pequenos no tecido, apresentando conídios unicelulares, incolores. Cerca de 2000 espécies têm sido descritas do gênero *Phyllosticta* (VAN DER Aa, 1973).

*Phyllosticta* está associado a manchas foliares de gengibre (*Zingiber officinale*), goiabeira (*Psidium guajava*), macieira (*Malus sylvestris*) e cajueiro (*Anacardium occidentale*) (EMBRAPA, 1991; KIMATI et al., 1997). *Phyllosticta* sp. é endofítica em folhas de *Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa* e *Avicennia nitida* (COSTA, 2003).

Perez et al (2004) identificaram a presença de *Phyllosticta* spp. causando manchas foliares no inhame, em áreas de produção no Recôncavo da Bahia. *Phyllosticta* spp. isolado do inhame apresenta colônias com micélio de coloração negra com picnídios de paredes delgadas e imersos no substrato. Conídios ovais, exsudam dos poros dos picnídios germinando de forma radial até a formação do tubo germinativo.

Observou-se uma baixa severidade da mancha foliar causada por esse patógeno, sugerindo que o mesmo possa ter importância secundária para a cultura do inhame. Deve-se destacar que não se conhece a origem do inóculo de *Phyllosticta* spp. que vem gerando essas epidemias e o seu início na região. Nas observações em campo, constatou-se que o patógeno infecta principalmente as folhas novas. Não se têm informações sobre estudos epidemiológicos de *Phyllosticta* spp. e sua interação com *C. eragrostidis* em cultivos de inhame no Brasil.

*Phyllosticta* spp. é bastante sensível a variações climáticas (VAN DER Aa, 1973) e pouco se sabe sobre o seu comportamento nos plantios de inhame no Brasil. No Estado de Pernambuco, já foram conduzidos estudos sobre a severidade

da queima das folhas do inhame, causada por *C. eragrostidis*, em sistemas de cultivo irrigado e em sequeiro (MICHEREFF et al., 1999), mas não com *Phyllosticta*.

### **Estrutura genética de populações de fitopatógenos**

Alguns fatores ecológicos e evolutivos, como seleção natural, deriva genética e mutação, podem influenciar a distribuição da variabilidade genética dentro e entre as populações, trazendo inferências significativas na estrutura genética (HAMRICK, 1989).

A distribuição da variabilidade genética está associada à forma como os genótipos e alelos estão distribuídos no tempo e espaço, seja entre populações distintas geograficamente, ou dentro de um grupo local, ou mesmo em grupos de progênes (LOVELESS & HAMRICK, 1984). Desse modo, o comportamento da distribuição da variabilidade genética caracteriza a sua estrutura genética, a qual corresponde à forma como a variabilidade genética é distribuída (BROWN, 1978).

Ecologicamente, a estrutura genética populacional é afetada pela densidade populacional, natureza das relações entre indivíduos e o ambiente, e interações entre indivíduos e populações locais. Geneticamente, é caracterizada pela variabilidade morfológica e quantitativa existente entre os indivíduos, pelo sistema reprodutivo, pelos padrões de fluxo gênico e por estratégias adaptativas aos ambientes locais (MARTINS, 1987).

A estrutura genética de populações de fitopatógenos refere-se à quantidade de variabilidade genética existente e à sua distribuição dentro de e entre populações (MCDONALD, 1999). O conhecimento da estrutura genética é componente essencial no estudo da biologia de populações de fitopatógenos. A variação genética é importante para o processo evolutivo, por essa razão, a compreensão dos mecanismos evolutivos que atuam na população de patógenos é o objetivo comum em estudos de biologia de populações. Uma vez compreendidas as maneiras como populações de fitopatógenos mantêm a variabilidade genética, é possível inferir sobre a taxa com a qual estas populações evoluem e sobre a durabilidade de medidas de controle (MCDONALD & LINDE, 2002).

Para patógenos que se reproduzem predominantemente de forma assexuada, como *C. eragrostidis*, a taxa de mutação desempenha papel importante na evolução das populações ao criar variantes resistentes e que poderão ser

selecionadas com a aplicação de fungicidas (GISI & SIEROTZKI, 2008). No Brasil, as informações na literatura sobre a sensibilidade de *C. eragrostidis* aos principais fungicidas empregados para o controle da queima das folhas, são limitadas. Até o presente, não há fungicida sistêmico registrado no Ministério da Agricultura para controlar a queima das folhas do inhame, causada por *C. eragrostidis*.

O estudo da dinâmica da variabilidade genética de populações de fitopatógenos é necessário para conhecer como as populações evoluem e quais as implicações para a durabilidade das medidas de controle de doenças (MCDONALD et al., 1999). Para compreensão da variação espacial e temporal na resistência e virulência, torna-se necessário combinar métodos de diferentes áreas de pesquisa como, por exemplo, análises moleculares acopladas com análises estatísticas de genética de populações e evolução, pois essas variações são de grande interesse para o desenvolvimento de estratégias de manejo bem sucedidas (STUKENBROCK & MCDONALD, 2009).

### **Utilização de extratos vegetais no controle de fitopatógenos**

O controle da queima das folhas em plantios no campo é praticamente inexistente nas condições da região do Recôncavo da Bahia e não existem estudos com produtos químicos ou alternativos (SOARES et al, 2008). Estudos devem ser desenvolvidos sobre doenças fúngicas do inhame na busca de novas comprovações científicas e alternativas de controle, sem agressão ambiental (SANTOS, 2008).

A utilização de extratos de plantas com propriedades antifúngicas destaca-se também como alternativa potencial para substituir a proteção tradicional com fungicidas químicos, podendo ser agregada às demais práticas de manejo integrado de doenças, contribuindo para atender a crescente demanda internacional e nacional por produtos orgânicos (CARVALHO et al., 2002). Apesar de promissoras, estas práticas ainda necessitam de comprovação de eficácia em condições de campo, em larga escala espaço-temporal.

Considerando o contexto sócio-econômico de exploração da cultura do inhame na região Nordeste do Brasil, é necessário controlar a queima foliar sem depender da aplicação de fungicidas ou com quantidades mínimas destes compostos. O plantio de variedades resistentes é a medida de controle mais eficiente para o manejo da queima foliar. Porém, para que programas de

melhoramento sejam bem sucedidos é necessário conhecer a estrutura genética da população de *C. eragrostidis*.

As pesquisas com métodos alternativos eficientes, que ofereçam menos riscos que os fungicidas químicos convencionais, determinam o uso de produtos naturais, obtidos de diversas partes da planta, e constituem-se numa perspectiva bastante promissora ao manejo integrado de doenças e pragas (PENTEADO, 1999; INNECCO, 2004). Existem no Brasil, atualmente, extratos de plantas comercializados tais como o Bioalho<sup>®</sup>, Neemazal<sup>®</sup>, Ecolife-40<sup>®</sup>, etc. (BETTIOL et al., 2006).

O nim (*Azadirachta indica*), originário da Índia e pertencente à família Meliaceae, tem sido estudado por diversos autores para controle de fitopatógenos (MELLO et al., 2005; PIGNONI & CARNEIRO, 2005; CARNEIRO, 2003; NEVES et al., 2003). A azadiractina é o principal composto da planta com capacidade de controle de fitopatógenos, sendo biodegradável e de persistência curta no meio ambiente (MARTINEZ, 2002).

Velame (*Julocroton triqueter*) é uma planta da família Euphorbiaceae encontrada desde a região norte até a região sudeste do Brasil. A planta apresenta folhas simples, revestidas de tricomas que apresentam a mesma abundância adaxial e abaxial (LORENZI, 2000). Existem poucos estudos sobre essa espécie, muito embora já tenham sido identificados alcalóides no gênero *Julocroton* (SUAREZ et al., 2004).

Pertencente a família Rhamnaceae, o gênero *Ziziphus* possui cerca de 100 espécies amplamente distribuídas no globo. *Ziziphus joazeiro*, é uma planta do Nordeste brasileiro, típica da Caatinga e dos Sertões, além de também aparecer no Agreste. É vulgarmente conhecida por vários nomes, sendo os mais comuns: juá de espinho, juazeiro ou laranjeira-do-vaqueiro (CARVALHO, 2007). Em relação à composição química a cera epicuticular das folhas de *Z. joazeiro* é rica em n-alcanos que retêm água na planta, além de triterpenóides (lupeol, beta-amirina, epifriedelinol e ácido ursólico) (OLIVEIRA & SALATINO, 2000; 2003). A planta é espinhenta de 5-10m de altura com tronco curto de 30-50 cm de diâmetro. Copa globosa densa e muito característica, quase encostando seus ramos e folhas no solo. Folhas rígido-membranáceas, glabras. Apresentando-se útil para extração de madeira, alimentação animal e produção de cosméticos (LORENZI, 2000).

A manipueira é líquido resultante da prensagem da mandioca ralada para a fabricação de farinha. A manipueira é composta de goma (5 a 7%), glicose e outros açúcares, proteínas, células descamadas, linamarina e derivados cianogênicos (ácido cianídrico, cianetos e aldeídos), substâncias diversas e diferentes sais minerais, muitos dos quais fontes de macro e micronutrientes para as plantas (MAGALHÃES, 1993). O uso da manipueira pura ou mesmo água + manipueira na proporção de 1:1 pode ser recomendado como nematicida, acaricida, inseticida, fungicida, herbicida e fertilizante (PONTE, 1999).

Os defensivos alternativos, destinados a auxiliar no controle de doenças de plantas não são prejudiciais à saúde humana. Entretanto, a manipueira se ingerida pode ser prejudicial (PONTE, 1999). O uso desses produtos tanto propicia a redução do uso de agrotóxicos nos cultivos convencionais, como possibilita a utilização em sistemas orgânicos de produção, favorecendo a obtenção de produtos com menos ou nenhum resíduo químico e, portanto, mais saudáveis para o consumidor final (SANTOS et al, 1998).

Poucas informações existem sobre *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. em plantios de inhame no Recôncavo da Bahia, dificultando os trabalhos de melhoramento genético e controle da doença. Conhecimentos sobre a diversidade e estrutura genética das populações de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. nesta região serão importantes na geração de informações para o programa de melhoramento genético do inhame que vem sendo conduzido na UFRB, visando a obtenção de variedades resistentes a essas doenças. A presente tese foi dividida em três capítulos, de acordo com a sequência abaixo:

No **Capítulo I** foi avaliada a caracterização morfológica e diversidade genética de populações de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. obtidos de cinco áreas de produção de inhame no Recôncavo Baiano. Foram realizadas medições de estruturas reprodutivas e cortes histológicos em folhas lesionadas para cada patógeno. Amostras de DNA de cada isolado foram amplificadas pela técnica BOX-PCR. Isolados de *Curvularia* spp. e *Phyllosticta* spp. foram sequenciados pela região ITS para a identificação molecular.

No **Capítulo II** foi verificada a patogenicidade de isolados de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. em diferentes espécies de inhame e em outras plantas.

No **Capítulo III** foi avaliado o efeito de produtos alternativos no controle de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. Foram testados *in vitro*, casa de vegetação e

campo, produtos alternativos como manipueira, sementes de nim (*Azadirachta indica*), folhas de juá (*Ziziphus joazeiro*) e folhas de velame (*Julocroton triqueter*) no controle da queima das folhas na cultura do inhame.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. (Setembro, 2012). [http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)

BETTIOL, W.; GHINI, R. MORANDI, M. A. B. Alguns métodos alternativos para o controle de doenças de plantas disponíveis no Brasil. In: VEZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG/CTZM: UFV, p.163-183, 2006.

BROWN, A. H. D. Isozymes, plant populations genetics structure and genetic conservation. Theoretical and Applied Genetics, New York, v. 52, n. 4, p. 145- 157, 1978.

CARNEIRO, S. M. T. P. G. Efeito de extratos de folhas e de óleo de nim sobre o oídio do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 29, p.262-265, 2003.

CARVALHO, R. A.; LACERDA, J. T.; OLIVEIRA, E. F.; SANTOS, E. S. 2002. Extratos de plantas medicinais como estratégia para o controle de doenças fúngicas do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste. In: II Simpósio Nacional sobre as culturas do inhame e do taro, 2, 2002. João Pessoa. **Anais...** João Pessoa, PB: EMEPA – PB, V. 1. p. 99 – 112, 2002.

CARVALHO, P.E.R. 2007. Juazeiro - *Ziziphus joazeiro*. <http://www.cnpf.embrapa.br/publica/cirtec/edicoes/Circular139.pdf> (acesso em 28/09/2012).

CARVALHO, P. C. L.; TEIXEIRA, C. A. Diversidade Genética em *Dioscorea* spp. no Recôncavo da Bahia Genetic diversity in *Dioscorea* spp. Recôncavo Bahia. **Revista Brasileira de Agroecologia**, 2009, v. 4, n. 2, p.4104-4106, 2009.

COSTA, H.; VENTURA, J.A.; ARLEU, R.K.J. & AGUILAR-VILDOSO, C.I. Ocorrência da pinta preta (*Guignardia citricarpa*) em citros no Estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.205, 2003.

FAO. **FAOSTAT** - Agricultural statistics database. Rome: World Agricultural Information Centre, 2011. <http://faostat.fao.org/default.aspx> (dezembro, 2011).

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Caju, Fortaleza. Programa Nacional de Pesquisa de Caju, Fortaleza. EMBRAPA-CNPCA, 1991. 59 p. (EMBRAPA. CNPCA. Documentos, 05).

FERREIRA, A. B.; MING, L. C.; CHECHETTO, F.; PINTO, R. A. Dioscoráceas cultivadas por agricultores da Baixada Cuiabana em Mato Grosso –Brasil. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 6, p.201-208, 2010.

FURTADO, D. C. de M.; AMORIM, E. P. da R.; GALVÃO, A. L. B.; CARNAÚBA, J. P.; OLIVEIRA, M. N. de. Ocorrência de *Curvularia lunata* e *Curvularia eragrostidis* em *Tapeinochilus ananassae* no estado de Alagoas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 201, 2007.

GISI, U.; SIEROTZKI, H. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *Eur. J. Plant Pathology* p. 157-167, 2008.

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. The genetic structure of tropical tree populations: associations with reproductive biology. In: BOCK, J. H.; LINHART, Y. B. (Ed.). *The evolutionary ecology of plants*. Boulder: Westview Press, p. 129-146, 1989.

HOSOKAWA, M., TANAKA, C.; TSUDA, M. Conidium morphology of *Curvularia geniculata* and allied species. **Mycoscience**, p. 227-237, 2003.

IBGE. **SIDRA** - Sistema IBGE de recuperação automática. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Unidade Estadual – AL. Supervisão Estadual de Pesquisas Agropecuárias. <http://www.sidra.ibge.gov.br> (Julho, 2011).

INNECCO, R. Controle alternativo de patógenos de sementes. 2004. In: VIII Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes, 8, 2004, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa, PB. João Pessoa: EMEPA – PB, 2004. v.1, p.12-15, 2004.

KIMATI, H.L. AMORIM, A. BERGAMIN FILHO, L.E.A. CAMARGO, J.A.M. REZENDE. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2. 705 p., 1997.

LIMA, A.; FURTADO, M. *Curvularia* species (anamorphic fungi: Hyphomycetes) from Santiago island, Cape Vert. **Portugaliae Acta Biologic**. v.22, p.145-156, 2007.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**, vol.1., 3 ed. Nova Odessa: Editora Plantarum. p 299. 2000.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 15, p. 65, 1984.

MARTINEZ, S. S. Composição do nim. In: MARTINEZ, S. S. **O Nim – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: Instituto Agronômico do Paraná, p. 23-30, 2002..

MAFRA, R. C. **Recomendações técnicas para o cultivo do cará**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 15p., 1986.

MAGALHÃES, C. P.; **Estudos sobre as bases bioquímicas da toxicidade da manipueira a insetos, nematóides e fungos**. 1993. 117p. Tese (Mestrado) Centro de ciências, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.



MARTINS, P. S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação “in situ”. **IPEF**, Piracicaba, v. 35, p. 71-78, abr. 1987.

MCDONALD, B. A.; ZHAN, J.; BURDON, J. J. Genetic structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia. **Annual Review of Phytopathology**, v. 89, p. 639-645, 1999.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 349-379, 2002.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, v. 124, p. 163–180, 2002.

MELLO, A. F. S.; LOURENÇO, S. A. de; AMORIM, L. Alternative products in the in vitro inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 2, p. 179-183, 2005.

MICHEREFF, S.J.; PEDROSA, R.A.; NORONHA, M. A.; MARTINS, R.B. Influencia de la irrigacion em em atizonamiento de lãs hojas de ñame (*Dioscorea cayennensis*) por *Curvularia eragrostidis* em el N.E. de Brasil. **Boletín Micológico**, v.14, n.1-2. p.49-56, 1999.

MIGNUCCI, J.S.; GARCIA, M.C.; VIADÉ, H.C. Enfermedades, plagas y deficiências nutricionales de las plantas de ñame. **Mayagüez**: Universidad de Puerto Rico. 24p., 1985.

MOURA, R. M. Doenças do Inhame-da-Costa. In: Kimati H, Amorim L, Bergamin Filho A, Camargo LEA, Rezende JAM. (Eds.) (2005) Manual de Fitopatologia. Vol. 2. Doenças das Plantas Cultivadas. 4ª Ed. São Paulo SP. Ceres, 2005.

MOURA, R.M. Problemas fitossanitários do inhame no Nordeste e proposta para um sistema integrado de controle. In: SANTOS, E.S. (Coord.) **Simpósio Nacional sobre as culturas do Inhame e do Taro**. João Pessoa, v.2, p.68-72, 2002.

MONTEIRO, D. A.; PERESSIN, V. A. Cultura do inhame. In: CEREDA, M. P. (Ed.). Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas. São Paulo: Fundação Cargil, p. 511-522, 2002.

NEVES, B. P. da; OLIVEIRA, I. P. de; MOHN, J. C. **Cultivo e Utilização do Nim Indiano**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 12 p., 2003. (Circular Técnica 62).

OLIVEIRA, A. F.; MEIRELLES, S.T.; SALATINO, A. . **Ann. Braz. Acad. Sci.**, v. 75, p. 431, 2003.

OLIVEIRA, A.F.M.; SALATINO, A; BIOSCI, C. A. J. Zeitschrift fur Naturforschung, v. 55, p. 88, 2000.

PAULA, H.; MICHEREFF, S. J.; COSTA, V. S. O.; LARANJEIRA, D.; OLIVEIRA, S. M. A. Variabilidade de aislamientos de *Curvularia eragrostidis* que causan atizonamiento de las hojas de ñame (*Dioscorea cayennensis*) en Pernambuco, Brasil. Boletim Micológico, v. 11, p. 85-92, 2000.

PEDRALLI, G. Dioscoreaceae e Araceae: Aspectos taxonômicos, Etnobotânicos e Espécies nativas com Potencial para Melhoramento Genético. In: II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, **Anais...** João Pessoa, PB: EMEPA-PB, p.39-53, 2002.

PENTEADO, S. R. **Defensivos alternativos e naturais para uma agricultura saudável**. Campinas: Ed. D'Áurea, 79p., 1999.

PEREZ, J. O.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. da S.; SILVA, D. S. da; ALMEIDA, N. S. de; SANTOS, A. P. dos S.; SOUSA, C. da S. Ocorrência de *Phyllosticta* sp. em inhame nos municípios de Cruz das Almas e Maragogipe–BA. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, (suplemento), p.120, 2004.

PIGNONI, E.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Severidade da antracnose em feijoeiro e pinta preta em tomateiro sob diferentes concentrações de óleo de nim em casa de

vegetação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 1, p. 68-72, 2005.

PONTE, J. J.; Cartilha da manipueira. **Uso do composto como insumo agrícola**. Governo do Estado do Ceará. Secretaria da Ciência e Tecnologia (SECITECE). Fortaleza, CE, 1999.

RASHID, M. M. Detection of *Curvularia* species on boro rice seeds of Dinajpur. **Online Journal of Biological Sciences**, v.1, n.7, p.591-592, 2001.

SANTOS, E. S. **Inhame (*Dioscorea* spp): aspectos básicos da cultura**. João Pessoa: EMEPA-PB, SEBRAE, 158p., 1996.

SANTOS, E. S.; MACÊDO, L. S.; MATIAS, E. C.; MELO, A. S. **Contribuição tecnológica para a cultura do inhame no Estado da Paraíba**. João pessoa, PB: EMEPA-PB/MMA-PRONAF, 84p. (EMEPA-PB. Documentos, 23), 1998.

SANTOS, E. S; MACÊDO, L. S. Tendências e perspectivas da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DE INHAME E TARO, 2. Anais... João Pessoa: EMEPA-PB. p. 19-32. 2002.

SANTOS, E. S. **Manejo sustentável da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do Brasil**. Disponível em: <[http://www.emepa.org.br/inhame\\_manejo.php](http://www.emepa.org.br/inhame_manejo.php)>. Acesso em: 19 de julho de 2008.

SIVANESAN, A., JOHN, L., ALCORN, J. & SHIVAS, R.. Three new graminicolous species of *Curvularia* (anamorphic fungi) from Queensland, Aust. Syst. Bot. v. 16, p.275- 278, 2003.

SIVANESAN, A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. Mycological Papers. V. 158, p.1-261, 1987.

SIVANESAN, A. *Cochliobolus eragrostidis*. (CMI Descriptions of Fungi and Bacteria, 1002). **Mycopathologia**, Dordrecht, v.111, p.113-114, 1990.

SOUZA, J. L. de; RESENDE, P. **Manual de horticultura orgânica**. Viçosa: Aprenda Fácil, 564p., 2003.

SOARES, A. C. F.; PEREZ, J. O.; SOUSA, C. S.; GARRIDO, M. S.; ALMEIDA, N. S. Eficiência do acibenzolar-S-methyl na proteção de plantas de inhame à *Curvularia eragrostidis*. **Caatinga**, v.21, n.1, p.147-151, 2008.

STUKENBROCK, E. H.; MCDONALD, B. A. Population genetics of fungal and Oomycete effectors involved in gene-for-gene interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, p.371–380, 2009.

SUAREZ, A.I.; BLANCO, Z.; DELLE MONACHE, F.; COMPAGNONE, R. S.; ARVELO, F. Three new glutarimide alkaloids from *Croton cuneatus*. **Natural product research**, v. 18, p. 421-426, 2004.

SUN, G.; OIDE, S.; TANAKA, E.; SHIMIZU, K.; TANAKA, C.; TSUDA, M. Species separation in *Curvularia* “geniculata” group inferred from Brn1 gene sequences. **Mycoscience**, v. 44, p. 239-244, 2003.

TSUDA, M.; UEYAMA A. *Pseudocochliobolus verruculosus* and variability of conidium morphology. **Mycologia**, v. 74, p. 563-568, 1982.

VAN DER Aa, H. A. Studies in *Phyllosticta*. **Studies in Mycology**, n.5, 110p., 1973.

ZHANG-MENG ; ZHANG-TIAN, Y. A new species of *Curvularia* from China. **Mycosystema**, v. 22, p. 357-358, 2003.

ZHANG-MENG; ZHANG-TIAN, Y.; WU-YUE, M. A new name and a new variety in *Curvularia*. **Mycosystema**, v. 23, p. 177-178, 2004.

## CAPÍTULO I

### MORFOLOGIA E ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE *Curvularia eragrostidis* E *Phyllosticta* spp. ASSOCIADAS À CULTURA DO INHAME NO RECÔNCAVO BAIANO

---

1 Artigo a ser ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Tropical Plant Pathology, em versão na língua inglesa.

## MORFOLOGIA E ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE *Curvularia eragrostidis* E *Phyllosticta* spp. ASSOCIADAS À CULTURA DO INHAME NO RECÔNCAVO BAIANO

Autora: Darcilúcia Oliveira do Carmo de Almeida

Orientador: Jorge Teodoro de Souza

Co-orientador: Ricardo Franco Cunha Moreira

**RESUMO:** *Curvularia eragrostidis* é a principal espécie causadora de queima das folhas em *Dioscorea rotundata*. O fungo *Phyllosticta* spp. foi encontrado causando manchas nas folhas em áreas de produção de inhame no Recôncavo da Bahia. A estrutura populacional de 60 isolados de *C. eragrostidis* das áreas de produção de inhame de Batatan, Maragogipe e Cruz das Almas e 79 isolados de *Phyllosticta* spp. das áreas de produção de Batatan, Maragogipe, São Felipe, São Félix e Cruz das Almas foram quantificadas por meio de BOX PCR. O coeficiente de correlação estimado com o teste de Mantel para *C. eragrostidis* foi significativo a 5% de probabilidade para Cruz das Almas x Maragogipe ( $r = -0,229$ ). O teste de Mantel para *Phyllosticta* sp. foi significativo a 5% de probabilidade para São Felipe x Maragogipe ( $r = -0,417$ ) e São Felipe x São Félix ( $r = -0,293$ ). As AMOVAS revelaram maior variação genética dentro (98,74% e 92,29%) do que entre (1,26% e 7,71%) as populações dos patógenos, respectivamente. Os isolados não agruparam conforme origem geográfica. As populações dos dois patógenos possuem alta variabilidade genética, o que pode dificultar estratégias de manejo da queima foliar, sendo o uso de variedades resistentes um método bastante promissor.

**Palavras chave:** Polimorfismo, Variabilidade genética, Origem geográfica, *Dioscorea* spp.

## **MORPHOLOGY AND GENETIC STRUCTURE ANALYSIS OF *Curvularia eragrostidis* AND *Phyllosticta* spp. POPULATIONS ASSOCIATED TO THE YAM CROP IN THE RECÔNCAVO**

Authora: Darcilúcia Oliveira do Carmo de Almeida

Advisor: Jorge Teodoro de Souza

Co-advisor: Ricardo Franco Cunha Moreira

**ABSTRACT:** *Curvularia eragrostidis* is considered the main species causing leaf blight in *Dioscorea rotundata*. The fungus *Phyllosticta* spp. was found causing leaf spots in areas of yam production in the Reconcavo of Bahia. The population structure of 60 isolates of *C. eragrostidis* production areas yam Batatan, Maragogipe and Cruz das Almas and 79 isolates of *Phyllosticta* spp. production areas of Batatan, Maragogipe, San Felipe, San Felix and Cruz das Almas were quantified using BOX PCR. The correlation coefficient estimated using the Mantel's test for *C. eragrostidis* was significant at the 5% probability Cruz das Almas x Maragogipe ( $r = -0.229$ ). The Mantel test for *Phyllosticta* spp. was significant at the 5% probability to San Felipe x Maragogipe ( $r = -0.417$ ) and San Felipe x San Félix ( $r = -0.293$ ). The AMOVAS revealed greater genetic variation within (98.74% and 92.29%) than among (1.26% and 7.71%) populations of pathogens, respectively. The isolates were grouped according to geographical origin. The populations of both pathogens have high genetic variability which can impede management strategies leaf blight, and the use of resistant varieties a method very promising.

**Keywords:** Polymorphism, Genetic variability, Geographical origin, *Dioscorea* spp.

## INTRODUÇÃO

O inhame (*Dioscorea rotundata*) é cultura tropical cultivada principalmente na África, mas tem grande importância na região Nordeste do Brasil (MESQUITA, 2002). Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Maranhão são os principais produtores dessa *Dioscoreaceae* no país. O Estado da Bahia é responsável pela quarta maior produção do país. Neste Estado a área cultivada é em torno de 947 hectares, situada geograficamente na microrregião do Recôncavo, nos limites entre os Municípios de Cruz das Almas, São Felipe, Maragogipe e São Félix (IBGE, 2011).

Além de sua importância na dieta, a produção de rizóforos constitui fonte de recursos financeiros para agricultores de baixa renda. Na Nigéria, Costa do Marfim e Gana, maiores produtores de inhame, grande parte da produção é destinada à exportação aos grandes mercados consumidores: Japão e Estados Unidos. A produtividade da cultura no Nordeste é reduzida pela ocorrência de doenças. Entre os principais patógenos que causam doenças foliares na cultura, destacam-se *Curvularia eragrostidis*, *Phyllosticta dioscoreaecola*, *Phyllosticta dioscoreae*. (BAUDIN, 2008; VAN DER Aa, 1973).

*Curvularia eragrostidis* é considerada a principal espécie causadora de queima das folhas do inhame. No entanto, Perez et al. (2004) identificaram a presença de *Phyllosticta* spp. causando manchas foliares no inhame, em áreas de produção no Recôncavo da Bahia. Observou-se uma baixa severidade da mancha foliar causada por esse patógeno, sugerindo que o mesmo possa ter importância secundária para a cultura. Não se têm informações sobre estudos epidemiológicos de *Phyllosticta* spp. e sua interação com *C. eragrostidis* em cultivos de inhame em outros estados produtores.

A separação de espécies de *Curvularia* e *Phyllosticta* é baseada principalmente em aspectos da morfologia conidial (SIVANESAN, 1987; VAN DER Aa, 1973). Dois fatores dificultam a correta identificação do agente causal: (1) a subjetividade de algumas características morfológicas de importância taxonômica, como, por exemplo, a protuberância do hilo; além do fato de essa característica ser pouco informativa filogeneticamente (SUN et al., 2003); e (2) a alta variabilidade constatada entre isolados do patógeno (PAULA, 2000).

Até o momento, os estudos de populações de *C. eragrostidis* objetivaram determinar principalmente a variabilidade fisiológica e, alguns poucos, a



variabilidade genética. A variabilidade presente em populações de patógenos pode determinar diferenças na severidade da doença, pois reflete o potencial de adaptação do organismo às condições adversas (BROWN, 1998). Diversas técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para determinar a diversidade genética e estrutura de populações de fitopatógenos (VISSER et al., 2009). Uma técnica, baseada em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e que fornece valiosas informações para estudos ambientais e de ecologia fúngica é denominada Box-PCR. Um único *primer* pode ser suficiente para gerar polimorfismo de DNA (VERSALOVIC et al., 1991, 1994; RADEMAKER et al., 1998).

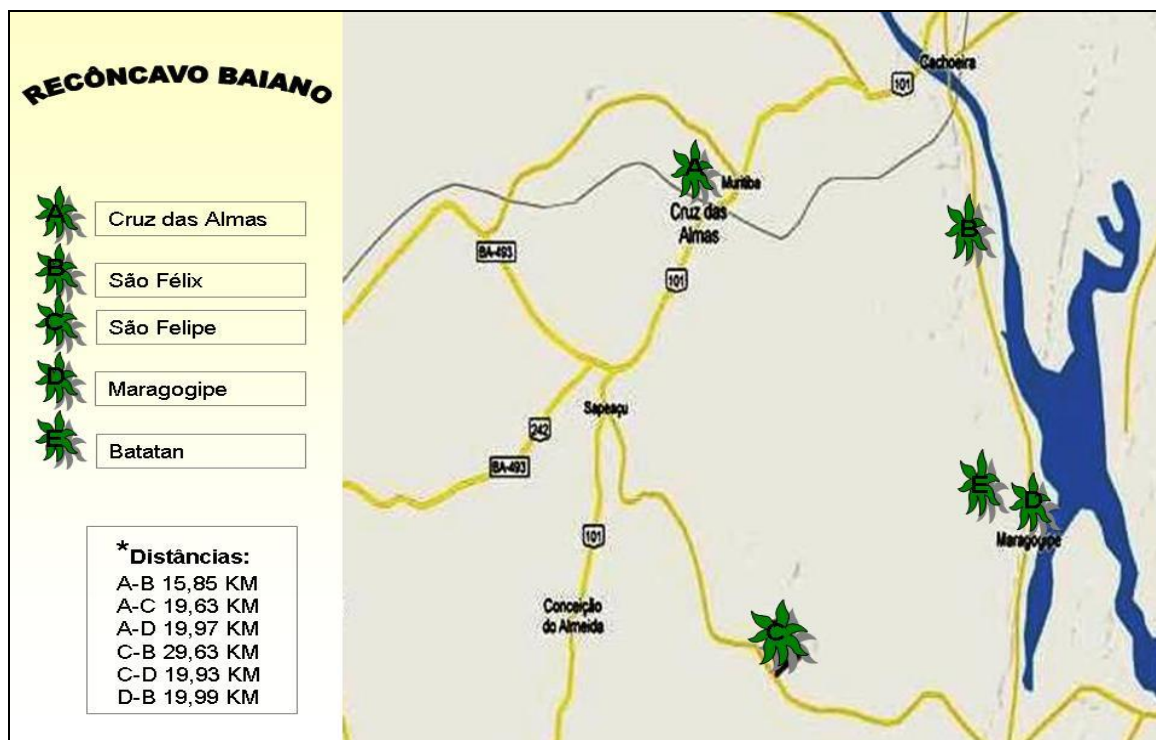
O conhecimento detalhado do agente causal de determinada doença é essencial para que estudos epidemiológicos possam resultar em desenvolvimento de estratégias eficientes de manejo. Especificamente, busca-se conhecer as espécies comumente associadas à doença, bem como compreender o relacionamento filogenético do patógeno e a estrutura de suas populações (KOHN, 2004; JEGER & PAUTASSO, 2008). Do ponto de vista aplicado, tais estudos são importantes para subsidiar programas de melhoramento visando obtenção de variedades resistentes, estratégia de suma relevância para culturas de importância sócio-econômica em regiões carentes de países em desenvolvimento (DANIAL et al., 2007).

O entendimento da estrutura populacional destes fungos e os processos que afetam sua mudança são importantes para desenvolver estratégias satisfatórias no controle desta doença e no desenvolvimento de cultivares resistentes. O presente trabalho teve como objetivo determinar a estrutura genética das populações de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. associadas à queima das folhas do inhame no Recôncavo Baiano por meio de BOX-PCR.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Obtenção dos isolados**

Foram utilizados 60 isolados de *C. eragrostidis* e 79 isolados de *Phyllosticta* spp. obtidos de folhas com sintomas da doença, coletadas em cinco áreas de produção do Recôncavo Baiano: Cruz das Almas, São Félix, São Felipe, Maragogipe e Batatan (Figura 1).



**Figura 1.** Mapa das cinco áreas de produção de inhame do Recôncavo Baiano onde foram coletados isolados para realização do estudo de estrutura populacional de *C. eragrostidis* e de *Phyllosticta* sp. \*Distância em linha reta, calculada com base em GPS; não indica a quilometragem exata percorrida.

Cada folha lesionada foi lavada com água corrente e sabão neutro e em seguida fragmentos de 5 mm de tecidos vegetais da região de transição entre as áreas lesionadas e sadias foram obtidos com um bisturi esterilizado.

Foi realizada a desinfestação superficial dos tecidos em álcool 70% (1 min.), solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 1,5% (1 min.) e enxaguados em água destilada esterilizada. Após a desinfestação, em câmara asséptica, cinco fragmentos foliares (em triplicata) foram transferidos para placas de Petri, contendo meio BDA 20% (Batata, 40g; Dextrose, 4g; e Ágar, 17g), a 26°C sendo examinadas diariamente, por  $\pm$  15 dias.

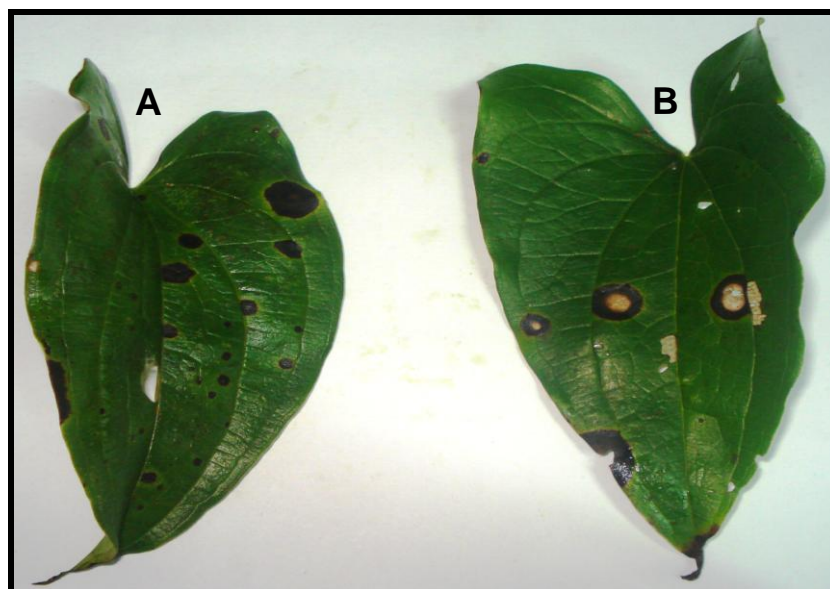
A medida que foi ocorrendo a formação de micélio nos bordos dos fragmentos, porções do meio de cultura com o micélio foram transferidos para outra placa de Petri, contendo meio BDA 20%. Depois de purificadas, as colônias foram transferidas para tubos tipo penicilina contendo meio BDA e óleo mineral.

### Caracterização morfológica

A caracterização morfológica de 25 isolados de *C. eragrostidis* e 25 de *Phyllosticta* spp. foi realizada visualizando ao microscópio, fotografando e

medindo com o software “Motic Images Plus 2.0” os conídios formados em colônias crescidas em BDA 20% por 7 dias, a 26°C, sob regime de escuro. Foram determinados comprimento e largura de 50 conídios, picnídios e apêndices de cada isolado e estes valores foram utilizados para a identificação da espécie baseada em chave para espécies de *Curvularia* (SIVANESAN, 1987) e *Phyllosticta* (VAN DER Aa, 1973).

Folhas com sintomas da doença causadas por *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp., foram utilizadas para realização de cortes histológicos de fragmentos de tecido exibindo pontuações negras (Figura 2). Os cortes histológicos depositados em lâminas foram cobertos com lamínula de vidro e observados ao microscópio óptico.



**Figura 2.** Sintomas de *Curvularia eragrostidis* (A) e *Curvularia eragrostidis* + *Phyllosticta* spp. em folhas de inhame (B).

### Extração de DNA

O DNA total de 60 isolados fitopatogênicos de *Curvularia* spp. e 79 de *Phyllosticta* spp. foi extraído a partir de micélio previamente liofilizado por 24 h e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , empregando-se o método CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) proposto por Doyle & Doyle (1990). Todos os isolados foram cultivados em meio líquido (Batata – 200g; Dextrose – 40g) durante 7 dias.

Cerca de 100 mg de micélio liofilizado foram macerados em nitrogênio líquido em eppendorfs de 2,0 mL e transferidos para microtubos de 1,5 mL

contendo 650  $\mu\text{L}$  de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8,0; 1,4 M NaCl; 2% CTAB; 1% PVP; 0,2% mercaptoetanol; 50  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Proteinase K). O conteúdo dos tubos foi misturado por inversão e incubados a 55°C por 1 h em banho-maria, agitando-se a cada 15 min. Em seguida, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente, e um volume 650  $\mu\text{L}$  de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) foi adicionado. A mistura foi agitada manualmente por 2 min e em seguida centrifugada a 12.000  $g$  por 5 min. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, e um volume igual de isopropanol gelado (cerca de 600  $\mu\text{L}$ ) foi acrescentado. A solução foi incubada a -20°C por 4h. Posteriormente procedeu-se a centrifugação a 12.000  $g$  por 5min, descartando-se em seguida a fase líquida. O DNA que já se encontrava aderido ao fundo do tubo, foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70%. O *pellet* foi ressuspensão em 5  $\mu\text{L}$  de TE (10 mM Tris HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA), contendo 10  $\text{g}/\text{mL}$  RNase A (1mg/ml) (SAMBROOK et al., 1989) e incubado a 37°C por 2h. Uma alíquota do DNA extraído foi aplicada em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio a 1,5% para visualização e quantificação usando fago lambda como padrão de peso molecular. A intensidade das bandas foram visualmente analisadas após eletroforese. O DNA extraído foi armazenado a -20°C.

### **Amplificação e sequenciamento**

O DNA genômico dos isolados de *Curvularia* spp. e *Phyllosticta* spp. foram submetidos a amplificação das regiões ITS1 e ITS4. Os *primers* utilizados foram respectivamente ITS1 (5' - TCC GTA GGT GAA CCT GCG – 3') descrito por O' Donnell e Cigelnik, (1997) combinado com ITS4 (5' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GGC – 3') descrito por Glass & Donaldson, (1995). As reações de PCR foram preparadas em um volume total de 25 $\mu\text{L}$  composta por, 5 $\mu\text{L}$  de tampão 5x, 2,0 $\mu\text{L}$  de dNTPs, 2,0 $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 0,75 $\mu\text{L}$  de cada *primer*, 0,4 $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase, 2,0 $\mu\text{L}$  de DNA e 12,1 $\mu\text{L}$  de água miliQ autoclavada. A reação de PCR foi realizada em um termociclador (peqSTAR 96 universal gradiente) programado para um ciclo inicial de 94°C por 2 min, seguido de 15 ciclos de 94°C por 2min, 65°C por 30 s, 72°C por 1 min, 35 ciclos de 94°C por 30s, 48°C por 30s, 72°C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 10 min. Posteriormente, as amostras foram submetidas à reação de sequenciamento.

O sequenciamento das amostras ocorreu de acordo com o método de Sanger et al., (1977) e os *primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos das regiões ITS foram os citados anteriormente. Foram preparadas as reações em um volume final de 10 µL, composto por, 4,1µL de água ultrapura, 2,0µl do tampão de seqüenciamento 5X (Applied biosystems), 0,4µL de *primer* (10 pM/µL), 2,5µL de DNA da amostra e 1,0µL de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems). As amplificações ocorreram em um termociclador (peqSTAR 96 universal gradiente), de acordo com o seguinte programa: desnaturação inicial a 96°C por 1 min, seguida de 35 ciclos de três etapas: desnaturação (96°C, 10s), anelamento (50°C, 5s) e extensão (65°C, 4min). As etapas seguintes foram: a precipitação com a adição de 40µl de isopropanol 65 %, centrifugando a 4.000 rpm por 40 min. Em seguida o DNA foi lavado com 200µl de etanol 60%, após a lavagem o DNA foi ressuspensionado em 10 µL de formamida e aquecido a 93°C por 3 min, resfriado rapidamente em freezer -20°C. Posteriormente, as amostras foram submetidas à eletroforese em seqüenciador do tipo ABI prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

### **Reação BOX PCR**

O elemento BOX foi amplificado através do *primer* BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG - 3'). A reação total de 25µL foi a seguinte: 5 µL de tampão 5X, 6µL de MgCl<sub>2</sub>, 7,1µL de dNTPs, 0,4 µL de Taq DNA polimerase, 5µL de *primer* e 1,5µL de DNA. A amplificação iniciou com uma desnaturação de 95°C por 5 min, seguida por 10 ciclos de um 1 min a 94°C, 30 s a 40°C, 72°C por 1 min, 30 ciclos de 1 min a 90°C, 30 s a 48°C, 1 min a 72°C e uma extensão final de 10 min a 72°C.

A reação ocorreu em um termociclador (peqSTAR 96). Os fragmentos amplificados por BOX foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio 1µg/mL, com a velocidade de corrida de 50V em tampão TAE, durante 7h. O marcador de 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen) foi utilizado. Os géis foram fotografados em um fotodocumentador (Loccus biotechnology).

A análise de agrupamento foi feita com o programa FREE TREE (HAMPL et al., 2001), foi usado o método UPGMA e coeficiente de Jaccard.

## **Análise dos dados**

A análise do perfil das bandas visualizadas no gel gerou uma matriz de presença e ausência, a existência de banda é representada por 1 e ausência representada por 0. Cada área de produção foi considerada como uma população de patógenos e análises intrapopulacionais foram realizadas com a avaliação da variação na frequência alélica para cada loco e diversidade gênica em cada área de produção. A diversidade gênica na população total ( $H_t$ ) e dentro das subpopulações ( $H_s$ ), o coeficiente de diferenciação genética ( $G_{st}$ ) e a intensidade de fluxo gênico ( $N_m$ ) entre as populações dos diferentes municípios foram calculados usando a estatística de Nei ( $h$ ) (NEI, 1973) no programa POPGENE versão 1.32 (YEH et al., 1997). Análise interpopulacional foi conduzida com a construção de um dendrograma baseado na distância de Jaccard para estimar a distância genética usando UPGMA (Unweighted Pair Group Method of Averages) no programa MEGA (TAMURA et al, 2011). A AMOVA foi usada para estimar a variância genética presente dentro e entre as populações, utilizando o programa Arlequin 3.1 (EXCOFFIER et al., 2005). O relacionamento entre diversidade genética e distância geográfica foi estimado pelo teste de Mantel (MANTEL, 1967), usando o programa GENES (CRUZ, 2006). A distância genética foi estimada pelo coeficiente de Jaccard e a significância da correlação foi estimada com base em 1000 permutações.

## **RESULTADOS**

### **Caracterização morfológica**

Vinte e cinco isolados de *Curvularia* spp. e de *Phyllosticta* spp. foram analisados quanto à morfologia.

Os isolados apresentaram características típicas de *C. eragrostidis*, *C. clavata* e *C. lunata*, conforme a descrição de Ellis (1971). Os vinte e um isolados de *C. eragrostidis*, apresentaram conídios castanho escuro, retos, quatro células, septo central espesso, medindo em média 19,2 - 46,4  $\mu\text{m}$  de comprimento e 13,9 - 28,6  $\mu\text{m}$  de largura. Os dois isolados de *C. clavata*, apresentaram conídios castanho claro, 3-4 septos, sendo um deles maior e com um lado mais desenvolvido, medindo em média 16,6 - 34,0  $\mu\text{m}$  de comprimento e 8,8 - 18,8  $\mu\text{m}$  de largura. Os dois isolados de *C. lunata*, apresentaram conídios de coloração escura, três septos, sendo o central tipicamente não mediano, com a segunda

célula mais larga e escura que as demais; conídio curvado medindo em média 3,9 – 20,6µm de comprimento e 2,2 – 8,5 µm de largura.

Os isolados de *Phyllosticta* spp. apresentaram características típicas do gênero conforme a descrição de Van Der Aa (1973). Conídios unicelulares arredondados, medindo cerca de 5,6 -14,3, µm de comprimento e 4,1 – 7,4 µm de largura, com apêndice medindo 2,0 – 8,6 µm. Os picnídios vagamente espalhados, solteiros, globosos ou um pouco deprimido, arredondados ou irregulares com comprimento de 70 – 700 µm e largura variando de 10 – 350 µm.

Os cortes histológicos realizados em folhas permitiram identificar estruturas de frutificação dos dois patógenos que causam queima em folhas de inhame. Em cortes histológicos realizados em manchas foliares de coloração marrom escuro identificou-se apenas estruturas de *C. eragrostidis*.

Vale salientar que em outras lesões com coloração marrom claro estavam presentes os dois fungos: *C. eragrostidis* + *Phyllosticta* spp. Na parte marrom escuro da lesão identificou-se estruturas de *C. eragrostidis* e no meio marrom claro desta mesma lesão estavam estruturas de *Phyllosticta* spp.

### **Amplificação e sequenciamento da região ITS**

As sequências de ITS dos isolados utilizados no presente estudo apresentaram alta identidade com sequências de *C. eragrostidis*, *C. clavata* e *C. lunata* depositadas nos bancos de dados públicos (JQ7308521, JQ7308521 e GQ3288521). Os resultados da análise da região ITS indicam que treze isolados de *Phyllosticta* spp. obtidos de lesões de folhas de inhame pertencem a espécie, *P. mangiferae*. Um isolado foi identificado como *P. fallopiae* e outro como *P. vaccini*. Não foram encontradas sequências de ITS disponíveis para *P. dioscorea* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Análise da região ITS de isolados de *Curvularia* spp. e *Phyllosticta* spp. para identificação da espécie.

Isolados	Espécie	% Identidade genética	Cód. acesso Genbank
CBII1 - BT	<i>C. eragrostidis</i>	99%	JQ7308521
CBIII4 -BT	<i>C. clavata</i>	98%	JQ7308521
CMT3 - MR	<i>C. lunata</i>	97%	GQ3288521
PBIII4 - BT	<i>P. mangiferae</i>	100%	Presente trabalho
PEJ1 – Sfe	<i>P. fallopiae</i>	100%	Presente trabalho
PCA5 - CA	<i>P. vaccini</i>	100%	Presente trabalho

As letras após a identificação dos isolados oriundos deste trabalho correspondem à área de produção de coleta: BT – Batatan; MR – Maragogipe; CA – Cruz das Almas; SFe – São Félix.

### Análise da variabilidade genética

Os valores de diversidade gênica para as populações de *C. eragrostidis* nas áreas de produção de Batatan, Maragogipe e Cruz das Almas foram  $h = 0,34$  (s.d.  $\pm 0,18$ ),  $h = 0,38$  (s.d.  $\pm 0,12$ ) e  $h = 0,37$  (s.d.  $\pm 0,13$ ) respectivamente. Os valores de diversidade gênica para as populações de *Phyllosticta* spp. nas áreas de produção de Cruz das Almas, São Félix, Batatan, Maragogipe e São Felipe, foram  $h = 0,25$  (s.d.  $\pm 0,19$ ),  $h = 0,37$  (s.d.  $\pm 0,16$ ),  $h = 0,36$  (s.d.  $\pm 0,18$ ),  $h = 0,28$  (s.d.  $\pm 0,20$ ), e  $h = 0,30$  (s.d.  $\pm 0,22$ ), respectivamente.

Os Índices de Shannon (I) de *C. eragrostidis* nas áreas de produção de Batatan, Maragogipe e Cruz das Almas foram  $I = 0,49$  (s.d.  $\pm 0,23$ ),  $I = 0,56$  (s.d.  $\pm 0,14$ ) e  $I = 0,55$  (s.d.  $\pm 0,18$ ) respectivamente. Os valores de diversidade gênica para as populações de *Phyllosticta* spp. nas áreas de produção de Cruz das Almas, São Félix, Batatan, Maragogipe e São Felipe, foram  $I = 0,38$  (s.d.  $\pm 0,26$ ),  $I = 0,54$  (s.d.  $\pm 0,21$ ),  $I = 0,53$  (s.d.  $\pm 0,25$ ),  $h = 0,42$  (s.d.  $\pm 0,29$ ), e  $I = 0,43$  (s.d.  $\pm 0,30$ ), respectivamente.

Alta identidade genética e baixa distância genética foram observadas entre as populações dos dois patógenos (Tabela 2 e 3).



**Tabela 2.** Identidade genética (diagonal superior) e distância genética (diagonal inferior) de Nei (1973) entre as populações de *Curvularia eragrostidis*.

POPULAÇÃO	Batatan	Maragogipe	Cruz das Almas
Batatan	****	0,9569	0,9617
Maragogipe	0,4410	****	0,9690
Cruz das Almas	0,0391	0,0315	****

**Tabela 3.** Identidade genética (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) de Nei (1973) entre as populações de *Phyllosticta* sp.

POPULAÇÃO	Cruz das Almas	São Felipe	São Félix	Batatan	Maragogipe
Cruz das Almas	****	0,8323	0,9070	0,9121	0,8985
São Félix	0,1836	****	0,9748	0,9354	0,9353
Batatan	0,0976	0,0256	****	0,9636	0,9583
Maragogipe	0,0920	0,0668	0,0371	****	0,9130
São Felipe	0,1070	0,0669	0,0426	0,0910	****

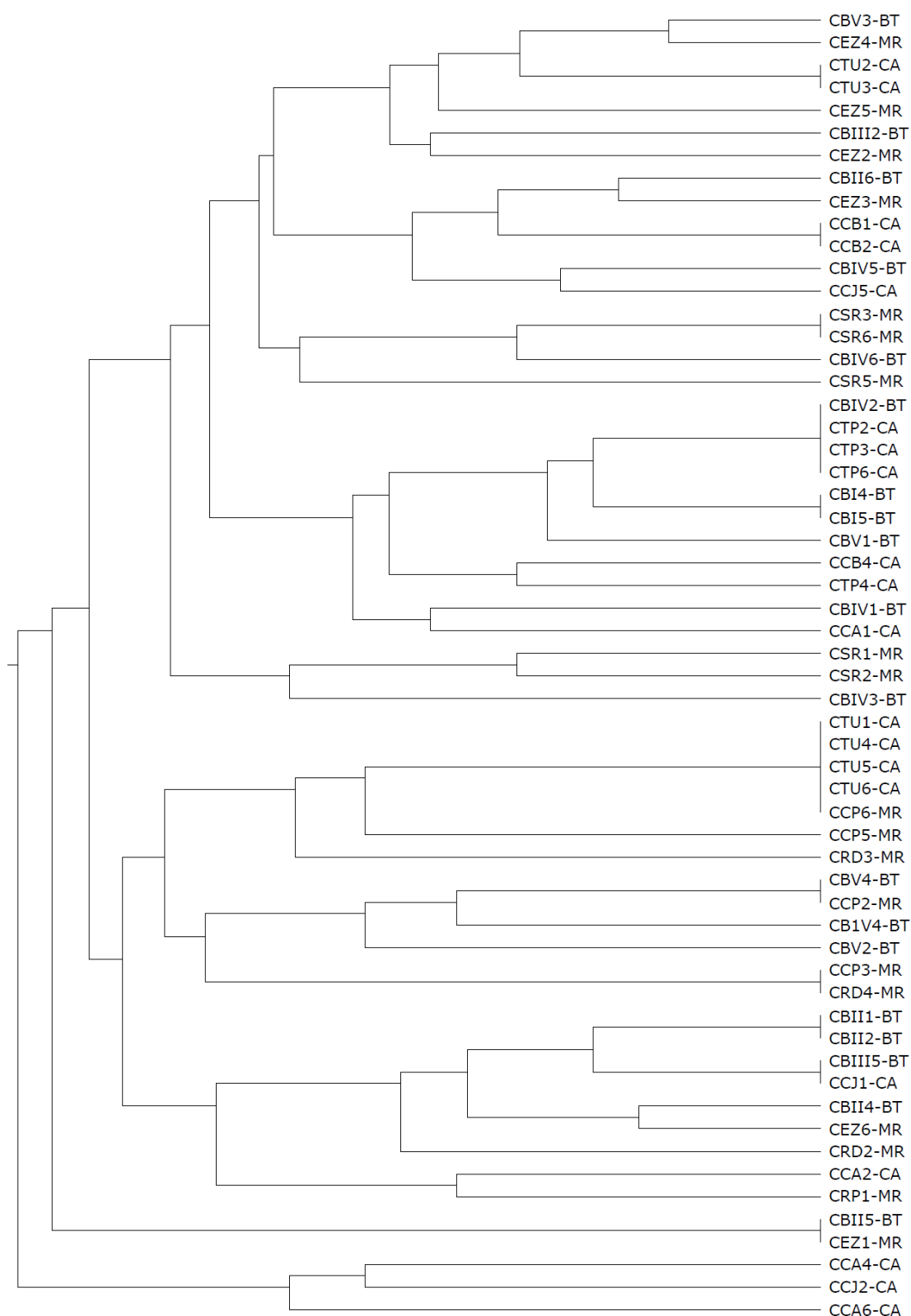
As AMOVAS (Tabela 4) revelaram maior variação genética dentro (98,74% e 92,29%) do que entre (1,26% e 7,71%) as populações dos patógenos, respectivamente.

**Tabela 4.** Análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro das populações de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* sp. oriundos de três áreas de produção de inhame do Recôncavo da Bahia

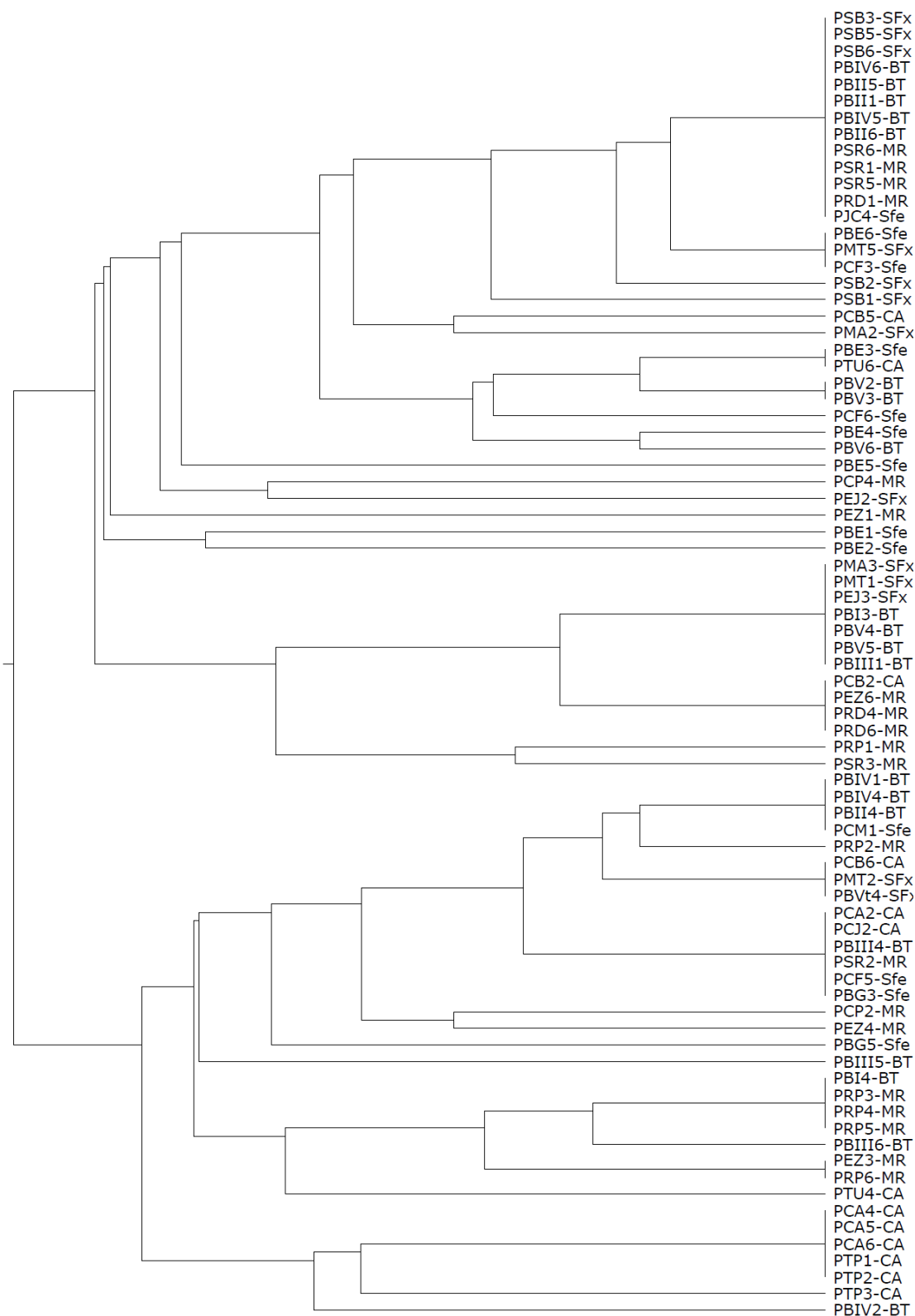
Patógeno	Fonte de variação	GL	CV	% variância total
<b>C. eragrostidis</b>	Entre populações	2	0,03	1,26
	Dentro das populações	57	2,49	98,74
	<b>TOTAL</b>	59	2,52	
	FST 0,01264			
<b>Phyllosticta</b> sp.	Entre populações	4	0,21	7,71
	Dentro das populações	74	2,54	92,29
	<b>TOTAL</b>	78	2,75	
	FST 0,07708			

GL = grau de liberdade; CV = componente de variância

Na análise de agrupamento, os isolados de *C. eragrostidis* e de *Phyllosticta* sp. não foram agrupados conforme origem geográfica (Figura 3 e 4).



**Figura 3.** Dendrograma gerado por UPGMA baseado no coeficiente de Jaccard da análise de BOX PCR de 60 isolados de *Curvularia eragrostidis* do Recôncavo Baiano. As letras ao final da identificação de cada isolado correspondem à origem geográfica (CA: Cruz das Almas, MA: Maragogipe e BT: Batatan).



**Figura 4.** Dendrograma gerado por UPGMA baseado no coeficiente de Jaccard da análise de BOX PCR de 79 isolados de *Phyllosticta* spp. do Recôncavo Baiano. As letras ao final da identificação de cada isolado correspondem à origem geográfica (CA: Cruz das Almas; MA: Maragogipe; SFx: São Félix; SFe: São Felipe e BT: Batatan).

O fluxo gênico estimado nas três áreas de produção entre as populações de *C. eragrostidis* ( $Nm = 11,3$ ) foi mais alto do que nas cinco áreas de produção para as populações de *Phyllosticta* spp. ( $Nm = 3,6$ ). A diferenciação genética estimada pela média  $Gst$  foi baixa ( $Gst = 0,04$  e  $Gst = 0,12$ ) para cada patógeno respectivamente.

A diversidade alélica ( $H_s$ ) variou entre as populações de *Phyllosticta* spp. e *C. eragrostidis* de 0,32 (s.d.  $\pm 0,26$ ) a 0,36 (s.d.  $\pm 0,17$ ), assim como a diversidade genética total ( $H_T$ ), variou de 0,35 (s.d.  $\pm 0,34$ ) a 0,36 (s.d.  $\pm 0,17$ ), respectivamente.

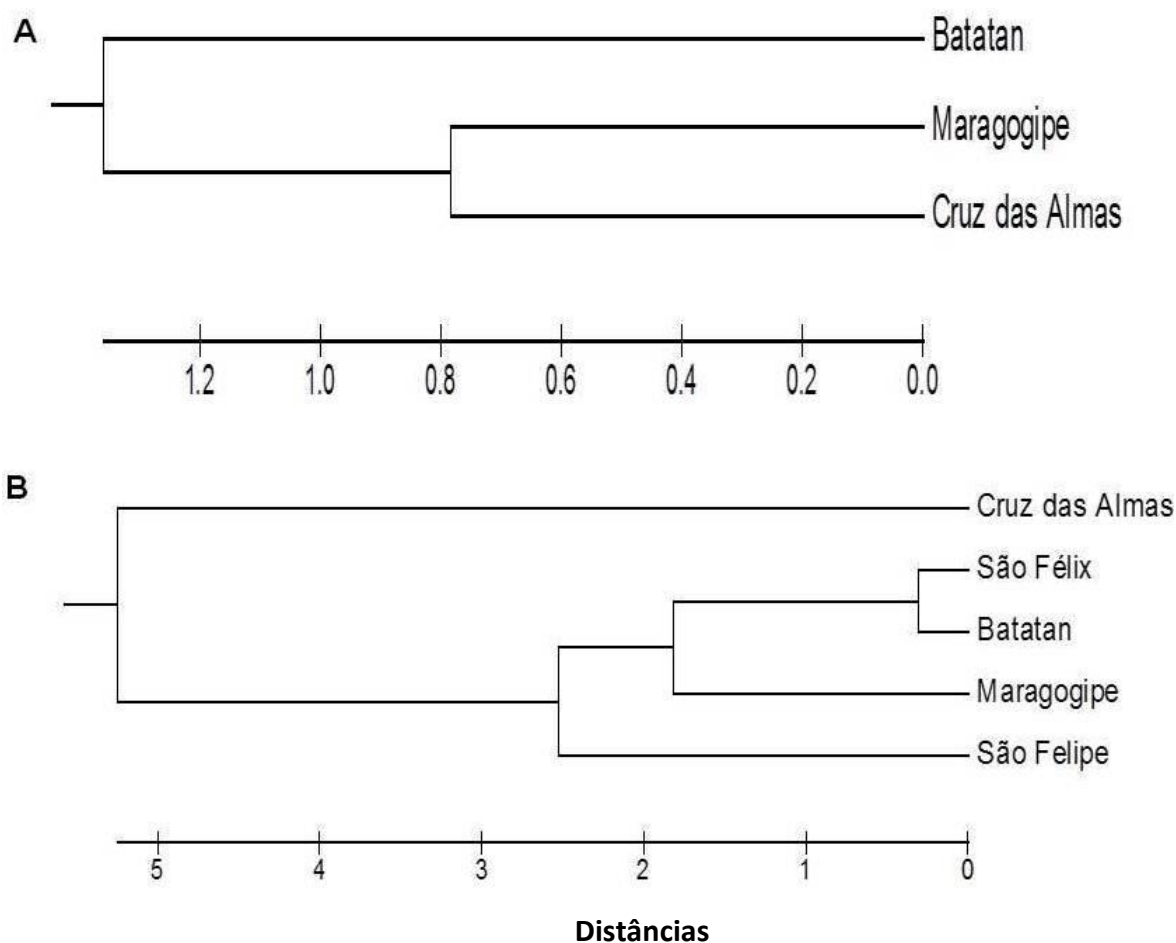
O índice de fixação ( $F_{ST}$ ) foi baixo entre as populações de *C. eragrostidis* ( $F_{ST} = 0,01$ ) e de *Phyllosticta* spp. ( $F_{ST} = 0,08$ ). Houve uma correlação negativa significativa entre distância genética e distância geográfica para os dois patógenos em algumas áreas do estudo. O coeficiente de correlação estimado com o teste de Mantel para *C. eragrostidis* foi significativo a 5% de probabilidade para Cruz das Almas x Maragogipe ( $r = -0,229$ ) e não significativo para as áreas Cruz das Almas x Batatan ( $r = -0,119$ ) e Maragogipe x Batatan ( $r = -0,072$ ). O teste de Mantel para *Phyllosticta* spp. foi significativo a 5% de probabilidade para São Felipe x Maragogipe ( $r = -0,417$ ) e São Felipe x São Félix ( $r = -0,293$ ) e não significativo para as demais áreas: São Felipe x Cruz das Almas ( $r = -0,089$ ) e São Felipe x Batatan ( $r = -0,074$ ).

A distância geográfica entre as áreas de Cruz das Almas x Maragogipe para as populações de *C. eragrostidis* é de 19,97 quilômetros entre si. Para as populações de *Phyllosticta* spp. a menor similaridade ocorreu entre as áreas de São Felipe x São Félix, distantes 29,63 quilômetros entre si, enquanto a maior similaridade foi registrada entre São Felipe x Maragogipe, distantes 19,93 metros entre si (Figura 1).

A análise de agrupamento efetuada com isolados das populações de *C. eragrostidis* (Figura 5A) com base nas frequências fenotípicas permitiu visualizar a proximidade das populações de Maragogipe e Cruz das Almas e o distanciamento das populações de Batatan.

A análise das populações de *Phyllosticta* spp. com base nas frequências fenotípicas permitiu visualizar a proximidade das populações de São Félix, Maragogipe, São Felipe e Batatan e o distanciamento das populações de Cruz das

Almas (Figura 5B).



**Figura 5.** Representação gráfica da análise de agrupamento, baseada nas distâncias genéticas de três populações de *C. eragrostidis* (A) e distâncias genéticas de cinco populações de *Phyllosticta* spp. (B), pelo método UPGMA, utilizando BOX PCR.

## DISCUSSÃO

A espécie *C. eragrostidis* é o agente causal da queima foliar do inhame nos principais municípios produtores do Recôncavo da Bahia. O fungo *Phyllosticta* spp. foi encontrado causando manchas nas folhas em áreas de produção de inhame no Recôncavo da Bahia. Este estudo representa a primeira análise de estrutura genética de populações de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. de inhame baseado em BOX PCR.

Sequências da região ITS do DNA ribossomal são comumente empregadas em análises filogenéticas conduzidas para auxiliar na taxonomia de fungos (GLASS & DONALDSON, 1995). A identificação de isolados de *Curvularia* spp. e

*Phyllosticta* spp. em nível de espécie é de grande relevância, uma vez que possibilita a detecção de potenciais patógenos vegetais em inhame no Brasil. Contudo, existe uma grande dificuldade em se trabalhar com as sequências destes gêneros, pois são escassas no NCBI. Comparando-se as sequências obtidas com as depositadas no banco de dados NCBI (Tabela 1) os isolados deste estudo apresentaram maior identidade genética com *C. eragrostidis*, *C. clavata*, *C. lunata* e *P. mangiferae*, *P. fallopiae* e *P. vaccini*. *Curvularia* spp. e *Phyllosticta* spp. são endofíticos e patogênicos a *D. rotundata*.

Conhecer a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações é essencial para a adoção de estratégias preventivas e mais eficientes em programas de melhoramento de inhame visando resistência a doenças. A variabilidade genética dentro das populações de *C. eragrostidis* e de *Phyllosticta* spp. foi alta, porém houve baixa diferenciação entre as populações. Devido à proximidade geográfica entre os pontos amostrados para obtenção dos isolados, a alta variabilidade observada nestas populações não era esperada. Além disso, o modo de reprodução de *C. eragrostidis* implica em baixa variabilidade na população, pois a reprodução assexuada caracteriza uma população com estrutura clonal. Neste caso, uma provável explicação encontra-se na taxa de mutação dentro de cada população representando o mecanismo evolutivo mais significativo para gerar variabilidade.

Outra consideração importante e que pode ter influenciado a alta variabilidade constatada nas populações é a mistura de espécies de *Curvularia* e de *Phyllosticta*. A identificação de *Curvularia* spp. e *Phyllosticta* spp. é subjetiva e baseada principalmente na morfologia conidial (SIVANESAN, 1987; VAN DER Aa, 1973). Segundo Sun et al. (2003), essa forma de identificação é passível de equívoco, devido à inconsistência e variabilidade que ocorrem dentro do isolado e entre isolados dependendo das condições de cultivo. Lourenço Jr. et al (2009) observaram alta variabilidade ao estudar a estrutura genética de populações de *Alternaria solani* associadas à batateira e tomateiro de diversos campos de produção do Brasil. Esses autores detectaram a formação de dois grupos de isolados geneticamente distintos, parcialmente relacionados ao seu hospedeiro de origem. Assim, a mistura de isolados de diferentes espécies pode ser a causa da alta variabilidade genética nas populações de *C. eragrostidis* e de *Phyllosticta* spp. no Recôncavo da Bahia.

Neste estudo, a análise de agrupamento revelou alto polimorfismo entre os isolados de *Curvularia* spp. e *Phyllosticta* spp. permitindo a formação de 11 e 12 grupos para cada patógeno respectivamente.

Não foi detectada estruturação da população conforme as áreas de produção mostrando mais uma vez o quão as populações estão “misturadas”. Possíveis eventos evolutivos, como o efeito “fundador”, também podem explicar esta estrutura, visto que isolados de um local podem ter sido levados para outra população, tornando-a similar em suas frequências alélicas a população de origem com o passar do tempo. No presente estudo, a ausência de estrutura se deve mais provavelmente à alta variabilidade genética detectada.

Foi encontrada maior diversidade alélica ( $H_S$ ) nas populações de *C. eragrostidis* ( $H_S = 0,36$ ) em relação às populações de *Phyllosticta* spp. ( $H_S = 0,32$ ). Sugere-se, portanto, que nas áreas de produção de inhame as populações dos fitopatógenos são as mais diversas, havendo maior frequência de diferentes alelos, podendo estar atuando processos evolucionários como mutação, seleção ou barreiras genéticas (genetic drift) (McDONALD, 2004).

A diversidade genética total ( $H_T$ ), variou de 0,35 (s.d.  $\pm$  0,34) a 0,36 (s.d.  $\pm$  0,17), nas populações de *C. eragrostidis* e de *Phyllosticta* sp., respectivamente. Isto indica boa adaptação destes patógenos às condições ambientais e ao hospedeiro nas áreas de produção de inhame. Atualmente, a queima das folhas ocorre em todas as áreas produtoras de inhame no Recôncavo Baiano, ocasionando perdas de 40 a 100% na produção, somando-se a este fato, o controle da doença por meio de variedades resistentes, não despertou interesse nesta região.

Neste estudo, a diferenciação genética interpopulacional expresso em valores de  $F_{ST}$ , foi de 0,012 para *C. eragrostidis* e 0,077 para *Phyllosticta* spp., Em outros patossistemas de fungos, índice de diferenciação de populações acima de 0,25 tem sido interpretado como indicativo de alta diferenciação genética entre populações (KUBISIAK et al., 2004; PARRENT et al., 2004). No caso de *C. eragrostidis* e de *Phyllosticta* spp., isto implica que quando estes patógenos encontram condições de clima e hospedeiro suscetível nas diferentes áreas de produção, favorece uma ampla adaptação e disseminação da doença.

Foi encontrado em populações de *C. eragrostidis* e de *Phyllosticta* spp. do Recôncavo Baiano, baixos níveis de variação genética dentro de populações

(GST= 0,042 e GST= 0,12). Vale salientar que os propágulos infectivos de *C. eragrostidis* e de *Phyllosticta* spp. são transportados pelo ar e principalmente têm grande facilidade de se dispersarem pelo vento. Quando atingem plantas suscetíveis em uma localidade ou região, a erradicação do patógeno é dificultada pela alta adaptabilidade.

A análise de Mantel revelou correlação negativa significativa entre distância genética e geográfica, indicando que isolados de áreas diferentes foram distintos geneticamente. A correlação negativa entre a similaridade de distância genética e a distância geográfica entre as áreas de produção de inhame no Recôncavo Baiano ajusta-se ao estimado pela Teoria da Neutralidade (HUBBELL, 2001), que prediz que a similaridade de espécies em uma comunidade diminui com o aumento da distância geográfica entre locais, independente de diferenças ambientais. A densidade de algumas espécies tende a ser semelhante em locais próximos aos seus centros de dispersão, e sua densidade vai diminuindo à medida que a distância geográfica das áreas fonte aumenta. É evidente, no entanto, que quanto menor a taxa de dispersão das espécies, maior será a influência da distância geográfica em variações locais e regionais (HUBBELL, 1999), porque há um decréscimo nas trocas de indivíduos entre locais geograficamente mais distantes.

O fluxo gênico está contribuindo para a estrutura populacional encontrada em *C. eragrostidis* no Recôncavo Baiano. O número de migrantes de *Phyllosticta* spp. das áreas de produção de Cruz das Almas, São Félix, Batatan, Maragogipe e São Felipe (3,63) foi menor que aqueles encontrados entre as populações *C. eragrostidis* das áreas de produção de Batatan, Maragogipe e Cruz das Almas (11,34). Assim, as populações de *C. eragrostidis* receberam muito mais migrantes das áreas produtoras de inhame, do que as populações de *Phyllosticta* spp. As áreas de produção de Batatan e Maragogipe são as maiores produtoras de inhame, sendo assim o fluxo gênico pode estar ocorrendo com maior frequência devido a venda e transporte de materiais propagativos contaminados entre essas localidades. Além disso, esses dados corroboram com os resultados encontrados pelo GST, uma vez que a diferenciação entre essas duas áreas assumiram os menores valores.

O número de migrantes indica o fluxo gênico entre as populações, portanto quanto menor o número de migrantes, menor o fluxo gênico. Esse mecanismo é responsável pela introdução de novas variantes de um patógeno em um



determinando local, podendo alterar as relações em um patossistema. Um exemplo claro seria a introdução de novos alelos que conferem virulência para um isolado numa cultivar inicialmente resistente. Para McDonald & Linde (2002), o fluxo gênico é um processo em que alelos específicos ou indivíduos são trocados entre populações separadas geograficamente. E, em organismos com reprodução assexuada, genótipos inteiros podem ser trocados entre populações. Logo, se o número de migrantes por geração entre essas localidades foi alto, a estabilização populacional deveria ocorrer em um tempo reduzido.

Assim, a estrutura de uma população, onde eventos de recombinação podem ser raros, o fluxo gênico e as mutações assumem um papel extremamente importante, uma vez que eles são responsáveis pelas modificações na composição genética desses patógenos, além disso, podem conferir variabilidade dentro e entre as localidades.

A melhor forma de controle de doenças é o emprego da resistência genética. O conhecimento a respeito da estrutura genética de populações de espécies é importante para o entendimento da dinâmica espacial dos fitopatógenos, provendo informações que contribuirão no desenvolvimento de materiais com resistência às doenças (MOREIRA, 2006). Infelizmente, as estratégias de manejo em áreas produtoras de inhame são limitadas pelo ainda reduzido nível de conhecimento existente sobre a distribuição das espécies resistentes a doença.

Quaisquer que sejam as medidas tomadas para controlar a queima das folhas do inhame, devem-se levar em consideração os níveis de variação genética encontrados neste estudo e a possibilidade de plantas hospedeiras poderem estar servindo como fonte de inóculo destes fungos aparentemente comuns. Segundo McDonald & Linde (2002), patógenos com essas características apresentam alto potencial de adaptação em mudanças de ambiente.

A informação gerada com esta pesquisa pode oferecer subsídios importantes para o manejo da queima das folhas do inhame, fornecendo aos melhoristas informações sobre a composição de genótipos em cada uma das populações do patógeno. Assim, programas de melhoramento visando resistência a essa doença poderão testar variedades melhoradas, expondo-as à diversidade genética existente do patógeno, contribuindo para diminuir o risco de insucesso.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUDIN, P. **Maladies parasitaires des ignames en Cote d'Ivoire**. Disponível em: <[http://www. Bondy.ird.fr/pleins\\_textes/pleins\\_textes\\_s/b\\_fdi\\_08-09/10433.pdf](http://www.Bondy.ird.fr/pleins_textes/pleins_textes_s/b_fdi_08-09/10433.pdf)>. Acesso 12 de novembro de 2008.

BROWN, J. K. M. **Surveys of variation in pathogen population and their application to disease control**. In: Jones G (Ed.). *The epidemiology of plant diseases*. Dordrecht, Kluwer, 1998.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: Biometria**. Editora UFV. Viçosa, MG. 382p. 2006.

DANIAL, D.; PARLEVLIT, J.; ALMEKINDERS, C.; THIELE, G. Farmers' participation and breeding for durable disease resistance in the Andean region. **Euphytica**, v.153, p.385-396, 2007.

DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.1 p.13-15, 1990.

ELLIS, M.B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 608 p., 1971.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin. Version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics**, v.1, p. 47–50. 2005.

GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1323–1330, 1995..

HAMPL, V.; PAVLICEK, A.; FLEGR, J. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program Free Tree: application to trichomonad parasites. **International Journal of Systematic and Evolution Microbiology**, v.51, p.731-735, 2001.

HUBBELL, S. P., Light-Gap disturbances, recruitment limitation, and tree diversity in a neotropical forest. **Science**, p.554-557. 1999.

HUBBELL, S. P. The united neutral theory of biodiversity and biogeography. **Princeton University Press**, 2001.

IBGE. **SIDRA** - Sistema IBGE de recuperação automática. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Unidade Estadual – AL. Supervisão Estadual de Pesquisas Agropecuárias. <http://www.sidra.ibge.gov.br> (Julho, 2011).

JEGER, M.; PAUTASSO, M. Comparative epidemiology of zoosporic plant pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, v. 122, p.111-126, 2008.

KOHN, L.M. Applying comparative genomics to plant disease epidemiology. **Phytoprotection**, v. 85, p.45-48, 2004.

KUBISIAK, T. L.; ROBERDS, J. H.; SPAINE, P. C.; DOUDRICK, R. L. Microsatellite DNA suggests regional structure in the fusiform rust fungus *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme*. **Heredity**, Oxford, v.91, p.41-50, 2004.

LOURENÇO JR., V.; MOYA, A.; GONZÁLEZ-CANDELAS, F.; CARBONE, I.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G. Molecular diversity and evolutionary processes of *Alternaria solani* in Brazil inferred using genealogical and coalescent approaches. **Phytopathology**, v. 99, p.765-774, 2009.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v. 27, p. 209-220. 1967.

MCDONALD, B.A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, v.124, n.2, p.163-180, 2002.

McDONALD, B. A. **Populations genetics of plant pathogens**. APSnet Educations Center Advanced Topics. 2004.

MESQUITA, A. S. Inhame na Bahia – a produção no caminho certo. In: CARMO, C. A. S. do. **Inhame e taro: sistemas de produção familiar**. Vitória, ES: Incaper. p. 33-49. 2002.

MOREIRA, R. F. C. Estrutura genética de populações de *Crinipellis perniciosa* e *Moniliophthora roreri* utilizando marcadores RAPD e SSR. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas). Jaboticabal, 128 p., 2006.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.70, n.12, p.3321-3323, 1973.

YEH, F. C.; BOYLE, T. J. B. (1997) Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. **Belgian Journal of Botany**, v.129, p.157, 1997.

PARRENT, J. L.; GARBELOTTO, M.; GILBERT, G. S. Population genetic structure of the polypore *Datronia caperata* in fragmented mangrove forests. **Mycological Research.**, Cambridge, v.4, p.403-410, 2004.

PAULA, H.; MICHEREFF, S. J.; COSTA, V. S. O.; LARANJEIRA, D.; OLIVEIRA, S. M. A. Variabilidad de aislamientos de *Curvularia eragrostidis* que causan atizomamiento de las hojas de ñame (*Dioscorea cayennensis*) en Pernambuco, Brasil. **Boletim Micológico**, v.11, p.85-92, 2000.

PEREZ, J. O.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. da S.; SILVA, D. S. da; ALMEIDA, N. S. de; SANTOS, A. P. dos S.; SOUSA, C. da S. Ocorrência de *Phyllosticta* sp. em inhame nos municípios de Cruz das Almas e Maragogipe–BA. **Summa Phytopathologica**, v.30, p.120, 2004.

RADEMAKER, J.L.W.; LOUWS, F.J.; de BRUIJN, F.J. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: AKKERMANS, A.D.L; VAN ELSAS, J.D.; DE BRUIJN, F.J. (Ed.). **Molecular microbial ecology manual**, p.1-26, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Laboratory Press, New York, 1989.

SIVANESAN, A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. **Mycological Papers**, v. 158, p.1-261, 1987.

SUN, G.; OIDE, S; TANAKA, E.; SHIMIZU, K.; TANAKA, C.; TSUDA, M. Species separation in *Curvularia* "geniculata" group inferred from Brn1 gene sequences. **Mycoscience**, v. 44, p.239-244, 2003.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, n.10, p. 2731-2739, 2011.

VAN DER AA, H.A. Studies in *Phyllosticta* I. **Studies in Mycology**. Oxford, n.5, 1973.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.6823-6831, 1991.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cell Biology**, v.5, p.25-40, 1994.

VISSER, B.; HERSELMAN, L.; PRETORIUS, Z.A. Genetic comparison of Ug99 with selected South African races of *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, p.213–222, 2009.

## CAPÍTULO II

### **PATOGENICIDADE DE *Curvularia eragrostidis* E *Phyllosticta* spp.**

## **PATOGENICIDADE DE *Curvularia eragrostidis* E *Phyllosticta* spp.**

Autora: Darcilúcia Oliveira do Carmo de Almeida

Orientador: Jorge Teodoro de Souza

Co-orientador: Ricardo Franco Cunha Moreira

**RESUMO:** A queima das folhas do inhame, causada pelo fungo *Curvularia eragrostidis* é a doença mais freqüente em inhame (*Dioscorea rotundata*). *Phyllosticta* spp. foi identificado no Recôncavo da Bahia causando manchas foliares em inhame. Objetivou-se avaliar a patogenicidade de isolados de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. em folhas destacadas e *in planta* de inhame e outras plantas. Todos os isolados de *C. eragrostidis* mostraram-se patogênicos ao serem inoculados em folhas destacadas de inhame, batata doce e amendoim, mas não a feijão caupi, milho, jurubeba, abacaxi e tomate. Os isolados de *Phyllosticta* spp. foram patogênicos a folhas destacadas de banana e manga, mas não a amora, goiaba, figo, uva e lichia. Vinte e cinco isolados de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. obtidos de lesões foram patogênicos *in planta* de inhame. Um isolado endofítico de *Curvularia* sp. foi patogênico *in planta* de amendoim, *D. rotundata*, *D. alata* cv. São Tomé, *D. alata* cv. Jibóia e *D. bulbifera*, mas não a *D. trifida*, tomate, feijão caupi e milho. Isolados endofíticos de *Phyllosticta* spp. foi patogênico *in planta* de banana, *D. rotundata*, *D. alata* cv. São Tomé, *D. alata* cv. Jibóia e *D. bulbifera*, mas não foram patogênicos a mandioca, aipim e *D. trifida*. Ficou demonstrado que outras plantas podem servir de fonte de inóculo de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. para as plantações comerciais de inhame do Recôncavo da Bahia.

**Palavras chave:** Queima das folhas, *Dioscorea* spp., endofíticos, gama de hospedeiros.

## **PATHOGENICITY OF *Curvularia eragrostidis* AND *Phyllosticta* spp.**

Authora: Darcilúcia Oliveira do Carmo de Almeida

Advisor: Jorge Teodoro de Souza

Co-advisor: Ricardo Franco Cunha Moreira

**ABSTRACT:** The yam leaf blight, caused by the fungus *Curvularia eragrostidis* is the most common disease in yam (*Dioscorea rotundata*). *Phyllosticta* spp. was identified in the Reconcavo of Bahia causing leaf spots in yams. This study aimed to evaluate the pathogenicity of isolates of *C. eragrostidis* and *Phyllosticta* spp. to detached leaves and plants of yam and other cultures. All isolates of *C. eragrostidis* proved to be pathogenic to inoculated detached leaves of yams, sweet potatoes and peanuts, but not to cowpea, maize, jurubeba, pineapple and tomato. The isolates of *Phyllosticta* sp. caused lesions on detached leaves of banana and mango, but not on blackberry, guava, fig, grape and lychee. Twenty-five isolates of *C. eragrostidis* and *Phyllosticta* spp. obtained from leaf spots were pathogenic to yams. Endophytic *Curvularia* sp. isolate was pathogenic to peanut plants, *D. rotundata*, *D. alata* cv. São Tomé, *D. alata* cv. Jiboia and *D. bulbifera*, but not to *D. trifida*, tomato, cowpea and maize. Endophytic *Phyllosticta* spp. Isolate was pathogenic in banana plant, *D. rotundata*, *D. alata* cv. São Tomé, *D. alata* cv. Jiboia and *D. bulbifera*, but was not pathogenic to cassava, manioc and *D. trifida*. The results demonstrate that other plants can serve as inoculum sources of *C. eragrostidis* and *Phyllosticta* spp. in commercial plantations of taro in the Reconcavo of Bahia.

**Keywords:** Leaf blight, *Dioscorea* spp., endophytic, host range.



## INTRODUÇÃO

A cultura do inhame é produzida mundialmente, apresentando importância econômica em climas tropicais e subtropicais (SANTOS & MACEDO, 2002). O inhame (*Dioscorea* spp.) é uma monocotiledônea da Família Dioscoreaceae, que se desenvolve bem em zonas com precipitações pluviométricas em torno de 1300 mm anuais e regiões de altas temperaturas (MESQUITA, 2002). O inhame se destaca como alimento, por sua alta qualidade nutritiva, riqueza em vitaminas, carboidratos e amido, constituindo alimento básico para a população de baixa renda, sendo ainda utilizado na agroindústria (SANTOS et al., 1998).

No Brasil, a região Nordeste é a maior produtora, destacando os Estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Maranhão (MESQUITA, 2002). Apesar da importância econômica e elevado valor social, contribuindo na fixação do homem ao campo, a produtividade da cultura é baixa (SANTOS & MACEDO, 2002).

Na cultura do inhame ocorrem várias doenças, predominando as de natureza fúngica que se verificam tanto na parte aérea, interferindo na fotossíntese, como nos rizóforos, interferindo no armazenamento das substâncias de reserva (GARRIDO, 2005). Nas condições edafoclimáticas do Recôncavo Baiano e em outros Estados produtores, a queima das folhas do inhame, causada pelo fungo *Curvularia eragrostidis* é a doença mais freqüente em *D. rotundata*. Em casos severos, verifica-se o desfolhamento da planta, trazendo como conseqüência a redução de 40% no peso dos rizóforos comerciais (GARRIDO et al., 2003; MOURA, 2005). O patógeno, em condições favoráveis de temperatura e umidade, provoca a formação de manchas circulares e necróticas nas folhas e nas hastes da planta (SANTOS et al., 1998). Além de *D. cayennensis*, *D. alata* e *D. rotundata*, *C. eragrostidis* foi constatada em espécies botânicas de outras famílias como sorgo (*Sorghum bicolor*), batata doce (*Ipomoea batatas*), amendoim (*Arachis hypogea*), abacaxi (*Ananas comosus*) (Menezes & Oliveira, 1993), e arroz (*Oryza sativa*) (RASHID, 2001).

Outro agente fitopatogênico identificado no Recôncavo da Bahia causando manchas foliares em inhame é *Phyllosticta* spp. (PEREZ et al., 2004). Pouco se sabe sobre o seu comportamento nos plantios de inhame no Brasil, também não existem relatos desse fungo em plantios de outros Estados.

Objetivou-se avaliar a patogenicidade de isolados de *C. eragrostides* e *Phyllosticta* spp. *in planta* e em folhas destacadas de inhame e de outros cultivos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolados de *C. eragrostides* e *Phyllosticta* spp.

Os isolados foram obtidos a partir de lesões necróticas de folhas de inhame, coletadas em cinco áreas de produção no Recôncavo da Bahia: Batatan, Cruz das Almas, Maragogipe, São Felipe e São Félix. Vinte e cinco isolados de *C. eragrostides* e 25 de *Phyllosticta* spp. selecionados ao acaso foram utilizados para realização dos testes de patogenicidade em folhas destacadas e *in planta*.

### Testes de patogenicidade em folhas destacadas

Folhas destacadas sadias de inhame (*Dioscorea rotundata*), amendoim (*Arachis hypogaea*), tomate (*Solanum lycopersicum*), jurubeba (*Solanum paniculatum*), abacaxi (*Ananas comosus*), batata doce (*Ipomoea batatas*), feijão caupi (*Vigna unguiculata*) e milho (*Zea mays*) foram inoculadas com *C. eragrostides*. Para *Phyllosticta* spp., as inoculações foram realizadas em folhas destacadas e sadias de inhame, manga (*Mangifera indica*), figo (*Ficus carica*), videira (*Vitis vinifera*), lichia (*Litchi chinensis*), amora (*Moruse nigra*), goiaba (*Psidium guajava*) e banana (*Musa* sp.) cv. Grand Nine.

As folhas foram desinfestadas superficialmente com água e sabão, depositadas em placas de Petri contendo papel esterilizado e umedecido com água destilada esterilizada. Discos de micélio com 5 mm de diâmetro dos diferentes isolados de *C. eragrostides* e *Phyllosticta* sp. foram retirados de colônias puras crescidas em BDA 20% (Batata, 40g; Dextrose, 4g; e Ágar, 17g), a 26 °C, durante 7 dias e depositados sobre as folhas de cada espécie, com e sem ferimento. Para as inoculações com ferimento, perfurou-se a folha com um estilete, em três pontos equidistantes. A inoculação foi feita nas faces adaxial e abaxial das folhas. Para o tratamento controle (testemunha) foram utilizados discos de ágar sem o inóculo. As folhas inoculadas e a testemunha foram mantidas em BOD, temperatura de 25 °C, por 20 dias. O experimento constou de quatro repetições por tratamento. O experimento foi repetido para confirmação dos resultados.

### Testes de patogenicidade *in planta*

Suspensões de conídios de 25 isolados de *C. eragrostidis* e de 25 isolados de *Phyllosticta* spp. foram preparadas com 0,1% de Tween 20 e concentração ajustada para 10<sup>6</sup> conídios/mL. Plantas sadias de inhame (*D. rotundata*) de

aproximadamente 120 dias após plantio, cultivadas em vasos em casa de vegetação, foram inoculadas com as suspensões de conídios de *C. eragrostidis* e de *Phyllosticta* spp. Além disso, os 25 isolados de *Phyllosticta* spp. foram inoculados em banana cv. Grand Naine com fermento (Figura 1O). Adicionalmente, um isolado endofítico de *Curvularia* sp. foi inoculado nas seguintes espécies: *D. rotundata*, *D. alata* cv. São Tomé, *D. alata* cv. Jibóia, *D. bulbifera* cv. Fígado, *D. trifida* cv. Inhambú, amendoim (*Arachis hypogaea*), tomate (*Solanum lycopersicum*), feijão caupi (*Vigna unguiculata*) e milho (*Zea mays*); e três isolados endofíticos de *Phyllosticta* spp. foram inoculados nas seguintes espécies: inhame *D. rotundata*, *D. alata* cv. São Tomé, *D. alata* cv. Jibóia, *D. bulbifera* cv. Fígado, *D. trifida* cv. Inhambú, banana (*Musa* sp.) cv. Grand Naine, mandioca (*Manihot esculenta*) cv. Platina e aipim (*Manihot utilissima*) cv. eucalyptus. As plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 h após a inoculação.

A severidade da queima foliar foi avaliada 20 dias após a inoculação. A avaliação da severidade de *C. eragrostidis* foi realizada com base na escala diagramática estabelecida por Michereff *et al.* (2000), com os níveis de 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 e 32% de área foliar lesionada. Folhas pulverizadas com solução de água e Tween 20 a 0,1 % foram mantidas como controle negativo. Tanto os experimentos com *C. eragrostidis* quanto os com *Phyllosticta* sp foram instalados em um delineamento inteiramente casualizado, com um total de duas plantas de cada espécie de inhame e 10 repetições, onde cada folha inoculada constituiu uma repetição. Para as outras plantas utilizou-se cinco repetições.

A partir de imagens escaneadas da face externa de cada folha estimou-se o tamanho em cm<sup>2</sup> das lesões de *Phyllosticta* spp. usando o programa QUANT (VALE *et al.*, 2001).

## RESULTADOS

As culturas dos isolados de *C. eragrostidis* apresentaram crescimento rápido, sendo mais acentuado até o sexto dia de incubação (Figura 1A). *Phyllosticta* spp. apresentou desenvolvimento lento, só ocupando todo o diâmetro da placa num período de 12 a 20 dias de incubação. *Phyllosticta* spp. apresentou colônias com micélio de coloração negra (Figura 1B) com picnídios imersos no substrato.

### **Patogenicidade em folhas destacadas**

Todos os isolados de *C. eragrostidis* mostraram-se patogênicos a folhas destacadas de inhame, batata doce e amendoim (Figura 1C, 1D e 1E). Em folhas de batata doce e amendoim, houve formação de lesões nas duas faces da folha, somente com ferimento. Os sintomas típicos de *C. eragrostidis* desenvolveram-se quatro dias após a inoculação das folhas de inhame, batata doce e amendoim, caracterizado por manchas circulares, de coloração marrom escura.

Os isolados de *C. eragrostidis* não foram patogênicos a folhas destacadas de feijão caupi, milho, jurubeba, abacaxi e tomate.

Os vinte e cinco isolados de *Phyllosticta* sp. testados mostraram-se patogênicos ao serem inoculados em folhas destacadas de inhame e banana. Contudo, apenas os isolados PBI1, PBI2, PBII5, PBIV4 e PEZ5 foram patogênicos em folhas destacadas de manga (Figura 1I e 1J). Os isolados de *Phyllosticta* sp. não causaram lesões em folhas destacadas de amora, goiaba, figo, uva e lichia.

Em folhas destacadas de inhame observou-se o aparecimento de lesões de *Phyllosticta* sp. após 10 dias de inoculadas e em 15-20 dias após a inoculação em folhas destacadas de banana e manga. Em folhas de banana e manga, houve formação de lesões somente nas folhas mais jovens, com ferimento. As folhas adultas testadas não apresentaram lesões, a exemplo do que é observado no campo. Houve tendência de maior número de folhas com lesão quando se inoculou a face abaxial da folha.

### **Patogenicidade de *Curvularia eragrostides* in planta**

Todos os vinte e cinco isolados de *C. eragrostidis* foram patogênicos a plantas de inhame. Os primeiros sintomas da doença foram observados após quatro dias após a inoculação.

Foram observadas variações quanto à severidade da doença, onde alguns isolados mostraram maior agressividade que outros (Tabela 1). Os maiores valores de severidade foram obtidos para os isolados das áreas de produção de Batatan seguido pelos isolados de Maragogipe e São Felipe. Estas áreas são consideradas as de maiores produção de inhame no Recôncavo baiano. Os isolados de São Félix e de Cruz das Almas mostraram-se menos agressivos.

O isolado endofítico de *Curvularia* spp. foi patogênico (Figura 1L, 1M e 1N) em plantas de amendoim e nas espécies de inhame *D. rotundata*, *D. alata* cv. São

Tomé, *D. alata* cv. Jibóia e *D. bulbifera*, mas não a *D. trifida*, tomate, feijão caupi e milho.

**Tabela 1.** Severidade da queima das folhas e número de lesões em mudas de inhame (*Dioscorea rotundata*) induzidos por diferentes isolados patogênicos de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. em condições de casa de vegetação, aos 15 dias após inoculação.

Áreas de Produção	Comunidades	Isolados <i>C. eragrostidis</i>	Severidade (%)	Isolados <i>Phyllosticta</i> spp.	Número de lesões
Batatan	Área I	CBI6	17,50a	PBI1	9,57a
Batatan	Área II	CBII3	19,10a	PBII2	9,40a
Batatan	Área II	CBIII2	18,40a	PBII3	9,20a
Batatan	Área IV	CBIV5	18,70a	PBIV4	9,70a
Batatan	Área V	CBV1	19,20a	PBV5	9,47a
C. das Almas	Combê	CCB4	4,11e	PCB4	2,36e
C. das Almas	Cadete	CCA1	3,78e	PCA3	2,29e
C. das Almas	Corta Jaca	CCJ3	3,80e	PCJ5	3,01e
C. das Almas	Tuá	CTU2	3,55e	PTU1	3,07e
C. das Almas	Tapera	CTP1	3,79e	PTP6	2,19e
Maragogipe	Campinas	CCP2	15,50b	PCP5	8,34b
Maragogipe	Encruzilhada	CEZ4	14,70b	PEZ2	8,20b
Maragogipe	Rio dos Paus	CRP6	16,70b	PRP4	8,52b
Maragogipe	Rodão	CRD1	16,20b	PRD1	8,40b
Maragogipe	Serraria	CSR3	15,40b	PSR3	8,03b
São Felipe	Boa Esperança	CBE4	13,60c	PBE5	6,92c
São Felipe	Bom Gosto	CBG6	12,40c	PBG2	6,38c
São Felipe	Camargo	CCM4	13,10c	PCM6	6,82c
São Felipe	Campo das Flores	CCF3	12,80c	PCF4	6,06c
São Felipe	Jacarandá	CJC4	12,63c	PJC3	6,40c
São Félix	Boa Vista	CBVt3	7,23d	PBVt5	4,44d
São Félix	Eng. de S. João	CEJ2	6,80d	PEJ3	4,23d
São Félix	Matataúba	CMT5	6,33d	PMT1	4,95d
São Félix	Monte Alegre	CMA1	6,68d	PMA2	4,06d
São Félix	São Bento	CSB6	5,98d	PSB4	4,80d

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Mudas com 120 dias foram inoculadas com isolados de cinco áreas de produção de inhame do Recôncavo da Bahia. A avaliação da severidade da doença foi com base em escala diagramática indicando níveis de 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 e 32% de área foliar lesionada.

### **Patogenicidade *in planta* de isolados de *Phyllosticta* spp. obtidos de lesões em inhame.**

Todos os 25 isolados de *Phyllosticta* spp. (Tabela 1) foram patogênicos *in planta* de inhame sem fermento. Os primeiros sintomas da doença foram observados após oito dias da inoculação.



**Figura 1.** Patogenicidade em inhame e outras plantas. Isolado de *C. eragrostidis* após 6 dias de incubação em meio BDA (A); isolado de *Phyllosticta* spp. após 12 dias de incubação em meio BDA (B); lesões de *C. eragrostidis* em folhas destacadas de inhame (C), batata doce (D) e amendoim (E), após seis dias de incubação; Folha de inhame lesionada por *Phyllosticta* spp. (F); folha de banana após 10 dias de incubação (G); folha de banana com lesão encontrada no campo (H); folha de manga após 15 dias da inoculação (I); folha de manga com lesão encontrada no campo (J); sintomas típicos de isolados endofíticos de *Curvularia* spp. *in planta* de *D. alata* cv. Jibóia (L), *D. bulbifera* (M) e mudas de amendoim (N); sintomas em plantas inoculadas com isolados patogênicos de *Phyllosticta* spp. em banana cv. Grand Naine inoculada com discos de micélio dos 25 isolados de *Phyllosticta* spp. (O); sintomas em inhame após 20 dias de incubação (P); sintomas em banana cv. 'Grande Naine' após 20 dias de incubação em casa de vegetação (Q); sintomas induzidos por isolados endofíticos de *Phyllosticta* spp. em mudas de banana após 20 dias de incubação em casa de vegetação (R); folhas de *D. alata* (S) e *D. bulbifera* (T) com sintomas típicos de *Phyllosticta* spp.. SF – sem fermento; CF – com fermento.

A maior quantidade de lesões foi obtida para os isolados das áreas de produção de Batatan, seguido pelos isolados de Maragogipe e São Felipe. Os isolados de São Félix e de Cruz das Almas mostraram-se menos agressivos

Dos vinte e cinco isolados de *Phyllosticta* spp. obtidos de lesões e testados, apenas os isolados PBIV4 e PBII5 causaram sintomas em plantas de banana (Figura 1Q). Os sintomas foram observados após quinze dias da inoculação. A formação de lesões nas folhas de banana ocorreu apenas com ferimento.

Todos os três isolados endofíticos de *Phyllosticta* spp. mostraram-se patogênicos (Figura 1R, 1S e 1T) a banana, *D. rotundata*, *D. alata* cv. São Tomé, *D. alata* cv. Jibóia e *D. bulbifera*. Os primeiros sintomas da doença foram observados oito dias após a inoculação. Nenhum dos isolados foi patogênico a mandioca, aipim e *D. trifida*. As lesões nas diferentes folhas ocorreram sem ferimento.

Foram observadas variações no tamanho das lesões foliares causada por endofíticos de *Curvularia* spp. e *Phyllosticta* spp. em diferentes plantas. O tamanho das lesões causada por *Phyllosticta* spp. foi maior que o das causadas por *Curvularia* spp. em todas as plantas avaliadas (Tabela 2). Vale ressaltar, que as lesões de *Curvularia* spp. eram menores, porém, estavam presentes em maior quantidade.

**Tabela 2.** Tamanho de lesões em diferentes plantas causadas por isolados endofíticos de *Curvularia* spp. e *Phyllosticta* spp. após 20 dias de inoculação.

Hospedeiros	<i>Curvularia</i> spp.	<i>Phyllosticta</i> spp.
	Tamanho da lesão (cm <sup>2</sup> )	Tamanho da lesão (cm <sup>2</sup> )
<i>D. rotundata</i>	*2,346a	2,549a
<i>D. alata</i> cv São Tomé	1,445b	1,605b
<i>D. alata</i> cv Jibóia	1,227b	1,384b
<i>D. bulbifera</i>	1,405b	1,589b
<i>D. trifida</i>	-	-
Amendoim	0,215c	-
Banana	-	-
		0,526c

\* Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de nível de significância. Média de 10 folhas para cada espécie fúngica. Tamanho da lesão em cm<sup>2</sup> estimada no programa Quant.

Em relação ao tamanho das lesões, o material mais suscetível foi *D. rotundata*, apresentando lesões significativamente maiores ( $P \leq 0,05$ ) que as demais espécies, enquanto que *Dioscorea trifida* não foi suscetível a *Curvularia eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. (Tabela 2). O tamanho das lesões não diferiu para as demais espécies suscetíveis.

## DISCUSSÃO

Apesar de *C. eragrostidis* ser considerado o agente primário da queima das folhas do inhame, *Phyllosticta* spp. acelera a deterioração das folhas a partir dessa infecção primária. Nesse contexto é interessante notar que *Phyllosticta* spp. apresenta lesões significativamente maiores que *C. eragrostidis*, o agente que inicia a queima das folhas. Vale salientar, que em cortes histológicos realizados em manchas foliares de coloração marrom escuro identificaram-se apenas estruturas de *C. eragrostidis*. Porém, em outras lesões com coloração marrom claro estavam presentes os dois fungos: *C. eragrostidis* + *Phyllosticta* spp. Na parte marrom escuro da lesão identificaram-se estruturas de *C. eragrostidis* e no meio marrom claro desta mesma lesão estavam as estruturas de *Phyllosticta* spp.

Paula (2000) também observou que isolados de *C. eragrostidis* podem ser agrupados quanto à agressividade. Nesse estudo observou-se que existe uma seleção de isolados mais agressivos de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. em áreas de maior cultivo de inhame. Nessas áreas as fazendas de cultivo de inhame são contíguas, criando um ambiente de competição entre os isolados, favorecendo a seleção de isolados mais agressivos.

Observou-se que o surgimento de lesões em hospedeiras naturalmente infectadas tanto por *C. eragrostidis* quanto por *Phyllosticta* spp. só ocorre artificialmente por meio de ferimentos. Esses resultados demonstram a pequena capacidade dos isolados de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. em penetrar no tecido das folhas jovens de plantas de algumas das culturas testadas, ao contrário do ocorrido com o inhame.

*Dioscorea trifida* mostrou-se resistente a *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp., possibilitando sua utilização em programas de melhoramento visando resistência a esses fungos.



Os resultados deste estudo indicam que outras plantas podem servir de fonte de inóculo de *C. eragrostidis* e de *Phyllosticta* spp. para as plantações comerciais de inhame no Recôncavo Baiano.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GARRIDO, M. D. S; SOARES, A. C. F.; MENDES, L. N.; PEREZ, J. O. O estudo de novas tecnologias para a produção de inhame no estado da Bahia. **Bahia Agrícola**, Salvador, v.6, n.1, p.19-22, 2003.

GARRIDO, M. D. S. **Manejo agroecológico da cultura do inhame: produtividade, qualidade, controle de nematóides e manchas foliares**. 2005. 73p. Dissertação. (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal da Bahia, Escola de Agronomia, Cruz das Almas.

MESQUITA, A. S. Inhame na Bahia – a produção no caminho certo. 2002. In: CARMO, C. A. S. do. **Inhame e taro: sistemas de produção familiar**. Vitória, ES: Incaper. p. 33-49, 2002.

MICHEREFF, S.J.; MAFFIA L.A.; NORONHA, M.A. Escala diagramática para avaliação da severidade da queima das folhas do inhame. **Fitopatologia Brasileira**. Vol. 24, p. 174-180, 2000.

MOURA, R. M. Doenças do inhame-da-costa (*Dioscorea cayennensis*).In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p.415-419, 2005.

PEREZ, J. O.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. da S.; SILVA, D. S. da; ALMEIDA, N. S. de; SANTOS, A. P. dos S.; SOUSA, C. da S. Ocorrência de *Phyllosticta* sp. em inhame nos municípios de Cruz das Almas e Maragogipe– BA. **Summa Phytopathologica**, v.30, p.120, 2004.

RASHID, M. M. Detection of *Curvularia* species on boro rice seeds of Dinajpur. **Online Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 7, p. 591-592, 2001.

SANTOS, E. S.; MACÊDO, L. S.; MATIAS, E. C.; MELO, A. S. **Contribuição tecnológica para a cultura do inhame no Estado da Paraíba**. João pessoa, PB: EMEPA-PB/MMA- PRONAF, (EMEPA-PB. Documentos, 23), 84p., 1998.

SANTOS, E. S. dos; MACÊDO, L. de S. Tendências e perspectivas da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do Brasil. In: II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO. **Anais**. João Pessoa, PB: EMEPA-PB, p. 21-31, 2002.

VALE, F.X.R. et al. **Quantificação de doenças - Quant**: versão 1.0.1. Viçosa: UFV, 2001. Software.

## CAPÍTULO III

### **USO DE EXTRATOS VEGETAIS NA PROTEÇÃO DE PLANTAS DE INHAME CONTRA *Curvularia eragrostidis* E *Phyllosticta* spp.**

---

3 Artigo a ser ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Agrotropica, em versão na língua portuguesa.

## **USO DE EXTRATOS VEGETAIS NA PROTEÇÃO DE PLANTAS DE INHAME CONTRA *Curvularia eragrostidis* E *Phyllosticta* spp.**

Autora: Darcilúcia Oliveira do Carmo de Almeida

Orientador: Jorge Teodoro de Souza

Co-orientador: Ricardo Franco Cunha Moreira

**RESUMO:** Informações sobre o controle da queima das folhas do inhame com o uso de extratos vegetais em condição de campo são escassos. Objetivou-se avaliar a atividade fungitóxica *in vitro*, casa de vegetação e campo de manipueira, extratos vegetais de folhas de juá (*Ziziphus joazeiro*); folhas de velame (*Julocroton triqueter*) e sementes de nim (*Azadirachta indica*) contra *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. em inhame. No experimento *in vitro* e em casa de vegetação foram avaliadas as concentrações de 5, 15, 25, 35 e 45% dos extratos aquosos de folhas de juá, folhas de velame, sementes de nim e manipueira. Em campo, avaliou-se os extratos vegetais na concentração de 25% em duas áreas experimentais. Nas análises *in vitro*, a manipueira e folhas de juá mesmo em baixas concentrações inibiram o crescimento micelial, esporulação e germinação de conídios de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* sp. A incidência da doença variou de 20 a 100% para *C. eragrostidis* e 30 a 100% para *Phyllosticta* sp. em casa de vegetação. Em campo, as menores médias de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foram observadas nas aplicações de manipueira e folhas de juá e as maiores médias foram observadas nas aplicações de sementes de nim que não diferiu da testemunha. Na área experimental I, as maiores médias de área foliar foram nos tratamentos com a manipueira - 134,17cm<sup>2</sup>, o extrato de folhas de juá - 121,17cm<sup>2</sup> e o extrato de folhas de velame - 109,17cm<sup>2</sup> que foram significativamente iguais ao tratamento com o fungicida Chlorothalonil com 103,81cm<sup>2</sup>. Resultados semelhantes foram observados na área experimental II. Houve redução da área foliar nos tratamentos com extrato de sementes de nim e a testemunha. Todos os produtos promoveram aumento no comprimento, diâmetro e peso dos rizóforos de inhame, destacando-se entre eles, os extratos da manipueira e das folhas de juá. Os extratos vegetais usados neste estudo indicaram grande potencial a ser explorado no cultivo do inhame em condições de campo, interferindo positivamente nas suas características fisiológicas.

**Palavras chave:** promoção de crescimento, Produto natural, controle alternativo, *Dioscorea* spp

## **YAM PLANT PROTECTION AGAINST *Curvularia eragrostidis* AND *Phyllosticta* spp. USING PLANT EXTRACTS.**

Authora: Darcilúcia Oliveira do Carmo de Almeida

Advisor: Jorge Teodoro de Souza

Co-advisor: Ricardo Franco Cunha Moreira

**ABSTRACT:** Scarce Information is available about the control of leaf blight of taro using plant extracts under field conditions. This study aimed to evaluate the fungitoxic activity in vitro, greenhouse and field of. This study aimed to evaluate the fungitoxic activity in vitro, greenhouse and field cassava plant extracts leaves juá (*Ziziphus joazeiro*); leaf canopy (*Julocroton triqueter*) and seeds of neem (*Azadirachta indica*) against *C. eragrostidis* and *Phyllosticta* spp. in yam. In vitro and in the greenhouse were evaluated concentrations of 5, 15, 25, 35 and 45% of aqueous extracts of leaves of juá, canopy leaves, neem seeds and cassava. In the field, we assessed plant extracts in concentration of 25% in two experimental areas. In *in vitro* assays, the cassava leaves and juá even at low concentrations inhibited mycelial growth, sporulation and conidial germination of *C. eragrostidis* and *Phyllosticta* spp. Disease incidence ranged from 20 to 100% for *C. eragrostidis* and 30 to 100% *Phyllosticta* spp. in a greenhouse. In the field, the lowest average of area under the disease progress curve (AACPD) were observed in the applications of cassava leaves and juá and the highest averages were observed in applications of neem seed that did not differ statistically from control. The lower stratum was the most affected plants, for all products tested. In experimental areas I, the highest average leaf area were in treatments with cassava - 134.17 cm<sup>2</sup>, the leaf extract juá - 121.17 cm<sup>2</sup> and leaf extract canopy - 109.17 cm<sup>2</sup> were significantly equal treatment with the fungicide Chlorothalonil with 103.81 cm<sup>2</sup>. Similar results were observed in the experimental area II. There was a reduction in leaf area in the treatments with neem seed extract and witness. All products caused an increase in the length, diameter and weight of rhizophores yam, foremost among them, the extracts of leaves of cassava and juá. The plant extracts used in this study showed great potential to be explored in the cultivation of yam under field conditions, interfering in their physiological characteristics.

**Keywords:** Growth promotion, Natural product, Alternative control, *Dioscorea* spp.

## INTRODUÇÃO

O inhame (*Dioscorea rotundata*) é uma tuberosa de alto valor energético e nutricional, que desempenha importante papel sócio-econômico na região Nordeste (SANTOS et al., 2007). É nesta região que se concentram aproximadamente 90% de toda a produção brasileira, com destaque para os Estados de Alagoas, Bahia, Maranhão, Paraíba e Pernambuco (GARRIDO, 2005). Contudo, a falta de tecnologia e informações técnicas, o uso de sementes de baixa qualidade, a baixa fertilidade natural dos solos e a ocorrência de doenças foliares são os principais problemas enfrentados pelos produtores (MESQUITA, 2002; SANTOS, 2002; GARRIDO et al., 2003; GARRIDO, 2005).

Dentre as doenças fúngicas que afetam a cultura do inhame, merece destaque a queima das folhas causada pelo fungo *C. eragrostidis*. A doença é responsável por grandes prejuízos na produção, em decorrência da sua alta capacidade de disseminação e redução da área fotossintética das plantas, ocasionando perdas de aproximadamente 40% na produtividade (GARRIDO et al., 2003; GARRIDO, 2005). *Phyllosticta* spp., foi também constatado em cultivos de inhame no Recôncavo da Bahia, não tendo sido relatado em outras regiões produtoras do Brasil (PEREZ et al, 2004).

Não existem defensivos registrados para a cultura do inhame no Ministério da Agricultura. O controle da queima das folhas no campo vem sendo realizado com a utilização de fungicidas registrados para o controle de doenças foliares em outras olerícolas, como os pertencentes aos grupos dos ditiocarbamatos, triazóis e benzimidazóis (SANTOS et al., 2007). Por ser uma cultura explorada principalmente por pequenos produtores, a necessidade de controlar a queima foliar sem depender da aplicação de fungicidas ou com quantidades mínimas destes compostos é evidente. A utilização de métodos alternativos de controle de doenças de plantas representa um grande desafio para a agricultura moderna.

Informações sobre o controle da queima das folhas do inhame com o uso de extratos vegetais em condição de campo são escassas. Trabalhos vêm sendo realizados no controle *in vitro* de *C. eragrostidis*, com resultados promissores (CARVALHO et al., 2002; SOARES et al., 2006; SOARES et al., 2008), porém, relatos do uso de extratos vegetais em campo são raros, o que justifica a realização desta pesquisa.

Com base no exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade fungitóxica *in vitro*, casa de vegetação e campo de manipueira, extratos vegetais de folhas de juá (*Ziziphus joazeiro*), folhas de velame (*Julocroton triqueter*), sementes de nim (*Azadirachta indica*) contra *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. na cultura do inhame.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Obtenção dos isolados**

Os isolados de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. utilizados neste estudo foram obtidos a partir de folhas de inhame com sintomas típicos de queima coletados de áreas de produção do Recôncavo Baiano. Foram utilizados um isolado de *C. eragrostidis* e um de *Phyllosticta* spp., da área de produção do Batatan no Recôncavo Baiano.

### **Preparo dos extratos vegetais**

Foram utilizados no preparo dos extratos aquosos 100 g de cada material vegetal: folhas de juá, folhas de velame e sementes de nim. Os materiais vegetais foram triturados em liquidificador contendo 250 mL de água destilada esterilizada (ADE). A manipueira é um subproduto da produção de farinha de mandioca (*Manihot esculenta*) com até 24 horas de colhida. As concentrações de cada produto vegetal foram preparadas no momento da aplicação. O fungicida Chlorothalonil foi aplicado na dosagem de 100g/100L. Nas plantas testemunhas pulverizou-se apenas água.

### **Ensaio *in vitro***

A fungitoxidade dos extratos vegetais foi avaliada determinando-se a percentagem de inibição do crescimento micelial de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. em placas de Petri contendo o meio BDA 20% (Batata- 40g; Dextrose- 4g; Ágar - 17g). Discos esterilizados de papel foram imersos em manipueira, extratos de folhas de juá, extratos de folhas de velame e sementes de nim, nas concentrações de 5, 15, 25, 35 e 45%.

No lado esquerdo de cada placa foi colocado um disco de micélio de cada fungo (5mm), obtidos de cultura pura de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. equidistantes 2cm do disco de papel esterilizado contendo cada concentração de

extrato. Para a testemunha foram utilizadas apenas placas de Petri contendo BDA 20%. As placas contendo os tratamentos foram mantidas no escuro contínuo, durante dez dias. As avaliações foram realizadas a cada 24h, através da medição do diâmetro das colônias em dois sentidos opostos.

Avaliou-se a produção de conídios após sete dias. Para o preparo da suspensão de conídios, foram adicionados 20mL de ADE nas placas contendo cada tratamento individualmente, para facilitar a remoção do micélio, mediante o uso de escova de cerdas macias. O material foi filtrado em duas camadas de gaze esterilizada, e a concentração determinada em hemacitômetro, com microscópio óptico, obtendo-se uma média de cinco leituras para cada um dos tratamentos.

Para avaliação do efeito dos extratos vegetais sobre a germinação de conídios foram adicionados ao meio de cultura BDA 20%, 0,1mL de uma suspensão de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. ( $10^6$  conídios/mL), acrescidas de 0,1mL de manipueira, extratos de juá, velame e nim nas concentrações de 5, 15, 25, 35, 45%. A suspensão foi espalhada sobre o meio de cultura com alça de Drigalski. As placas foram incubadas em distribuição casualizada dos tratamentos em escuro contínuo. Para avaliação ao microscópio as placas foram divididas em quatro quadrantes por marcas na sua parte interior externa, onde foram realizadas duas leituras após 48 h de incubação. O mesmo procedimento foi realizado para a testemunha. Cada repetição foi representada por um quadrante.

A avaliação do efeito dos extratos sobre a germinação dos conídios dos dois fungos foi realizada através da contagem de conídios germinados por quadrante e comparados com os conídios germinados na testemunha. Foram considerados germinados os conídios que apresentavam a emissão do tubo germinativo cujo tamanho fosse pelo menos 2X maior que o diâmetro do esporo.

Para a análise do crescimento micelial, esporulação e germinação de conídios dos dois fungos, determinaram-se a percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), a percentagem de inibição da esporulação (PIE) e a percentagem de germinação de conídios (PIG), para cada extrato em relação ao tratamento testemunha, por meio das fórmulas apresentadas a seguir.

$$PIC = \frac{(\text{Diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento}) \times 100}{\text{Diâmetro da testemunha}}$$

$$PIE = \frac{(\text{Esporulação da testemunha} - \text{esporulação do tratamento}) \times 100}{\text{Esporulação da testemunha}}$$



$$\text{PIG} = \frac{(\text{Germinação da testemunha} - \text{germinação do tratamento}) \times 100}{\text{Germinação da testemunha}}$$

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (4 x 5 + 1) quatro extratos vegetais, testados em cinco concentrações + testemunha (ADE), totalizando 20 tratamentos, com cinco repetições para o PIC e PIE e para o PIG quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de regressão e de variância pelo teste F, comparando as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa Sisvar.

### **Ensaio em casa de vegetação**

Foram utilizados rizóforos-sementes de uma área de produção do Batatan. Plantas saudáveis de inhame (*Dioscorea rotundata*) de aproximadamente 120 dias de idade, cultivadas em vasos em casa de vegetação, foram pulverizadas com manipueira, extratos de folhas de juá, extratos de folhas de velame e sementes de nim, nas concentrações de 5, 15, 25, 35 e 45%. Plantas pulverizadas com água foram usadas como testemunha. A pulverização foi efetuada com auxílio de borrifador manual e as plantas de inhame foram mantidas em câmara úmida por 48 h, em casa de vegetação. Após este período, suspensões de conídios dos dois fungos foram inoculados na concentração de  $10^6$  conídios/mL. Adicionou-se 0,1% de Tween 20 à suspensão. As plantas de inhame foram novamente mantidas em câmara úmida por 48 h. Após este período, a percentagem de incidência da queima foliar foi avaliada aos vinte dias após a inoculação. Folhas pulverizadas com solução de água e Tween 20 a 0,1 % foram mantidas como testemunha. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com dez repetições, onde cada par de folíolos pulverizado e inoculado constituiu uma repetição. Utilizou-se um total de 50 plantas, sendo duas plantas de inhame para cada concentração de extrato vegetal. Para avaliação da incidência da doença, para cada tratamento, foram contados os pares de folíolos sintomáticos, observando-se a presença de queima. Os dados foram transformados para percentagem de folíolos com sintomas.

### Ensaio em campo

O experimento foi realizado no período de fevereiro a dezembro de 2012. O solo foi preparado por meio de aração, duas gradagens e confecção de leirões de aproximadamente 50 cm de altura com trator e enxada.. As parcelas foram compostas por três leirões, medindo cada um 2,4 m de comprimento e distanciados entre si por 1,2 m e 1 m entre parcelas perfazendo uma área de 8,64 m, com 27 plantas úteis.

No plantio, empregou-se rizóforos sementes com massa média de 150g. Foram realizados dois experimentos utilizando rizóforos-sementes de duas áreas de produção do Recôncavo Baiano: Batatan e São Felipe, respectivamente. Utilizou-se esterco curtido de gado e adubação conforme análise do solo (Tabela 1). No plantio foram utilizadas a parte apical e mediana dos rizóforos, descartando a parte distal devido ao desenvolvimento diferenciado que estas apresentam.

**Tabela 1.** Características químicas do solo da área Experimental I e II, coletado na profundidade de 0-20 cm.

Características Químicas	Valores obtidos
pH em água	4,9
P <sup>-</sup> (mg/dm <sup>3</sup> )	20
K <sup>+</sup> (mg/dm <sup>3</sup> )	0,18
Na <sup>+</sup> (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	0,02
S - SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	1,41
Ca <sup>+2</sup> (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	0,80
Mg <sup>+2</sup> (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	0,40
Al <sup>+3</sup> (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	0,1
H <sup>+</sup> + Al <sup>+3</sup> (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	2,31
Matéria orgânica (g/Kg)	8,49

O ensaio foi realizado com aplicação de manipueira, extratos de folhas de juá, folhas de velame, sementes de nim, na proporção de 25%, acrescidos de óleo mineral na proporção 5mL/100L de água e para a testemunha apenas água e o fungicida Chlorothalonil, sem adição de óleo mineral.

As aplicações foram realizadas aos 105 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas da doença. Foram realizadas três pulverizações das plantas em intervalo de 20 dias com o uso de pulverizador costal com capacidade de cinco

litros. Para a análise da doença utilizou-se escala diagramática estabelecida para *C. eragrostidis* (MICHEREFF et al., 2000), com severidade variando de 0 a 32%. A severidade de manchas foliares do inhame foi estimada em todos os tratamentos a intervalos de 15 dias após as aplicações. A partir dos dados de severidade, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), baseado na fórmula:  $AACPD = \sum(y_i + y_{i+1})/2 * (t_{i+1} - t_i)$ , onde: n = número de avaliações; y = severidade (%); t = tempo (dias). Os valores de AACPD foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A porcentagem de área foliar lesionada de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. foi estimada aos 180 dias após o plantio, em cinco plantas por parcela experimental. Em cada planta foi avaliado um total de nove folhas sendo três de cada um dos terços inferior, mediano e superior. As folhas foram escaneadas individualmente respeitando-se a posição e os tratamentos. Para esta análise utilizou-se o programa Quant (VALE et al, 2001). Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foi realizada a colheita aos nove meses após o plantio, quando os rizóforos atingiram sua completa maturação fisiológica. Essa fase foi indicada pela presença de folhas e ramos senescentes. Determinou-se o peso médio de rizóforos de inhame de cada tratamento bem como o diâmetro e o comprimento. Para análise de produção, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

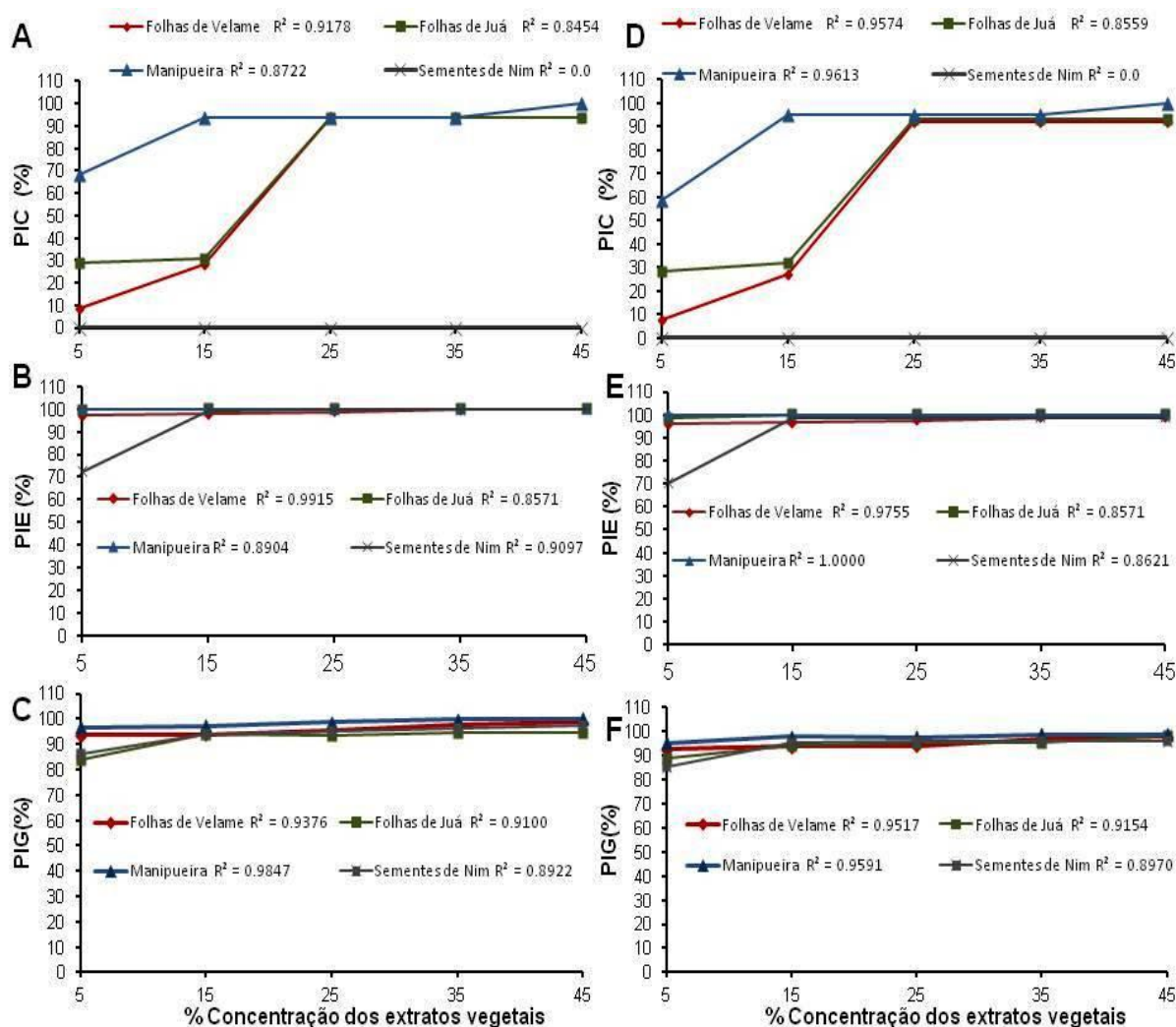
## RESULTADOS

### Atividade *in vitro* de extratos vegetais

As percentagens de inibição do crescimento micelial (PIC), inibição da esporulação (PIE) e germinação de conídios (PIG) de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. utilizando-se extratos vegetais indicam que dos quatro extratos vegetais utilizados, a manipueira e o juá destacaram-se já na concentração de 5% (Figura 1). As inibições aumentaram para valores próximos a 100% em concentrações

acima de 25% para todos os extratos, com exceção dos extratos de sementes de nim, que não inibiu o crescimento micelial.

**Figura 1.** Percentagem de inibição do crescimento micelial, da esporulação e da germinação de conídios de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. com o uso de extratos vegetais após dez dias de incubação.



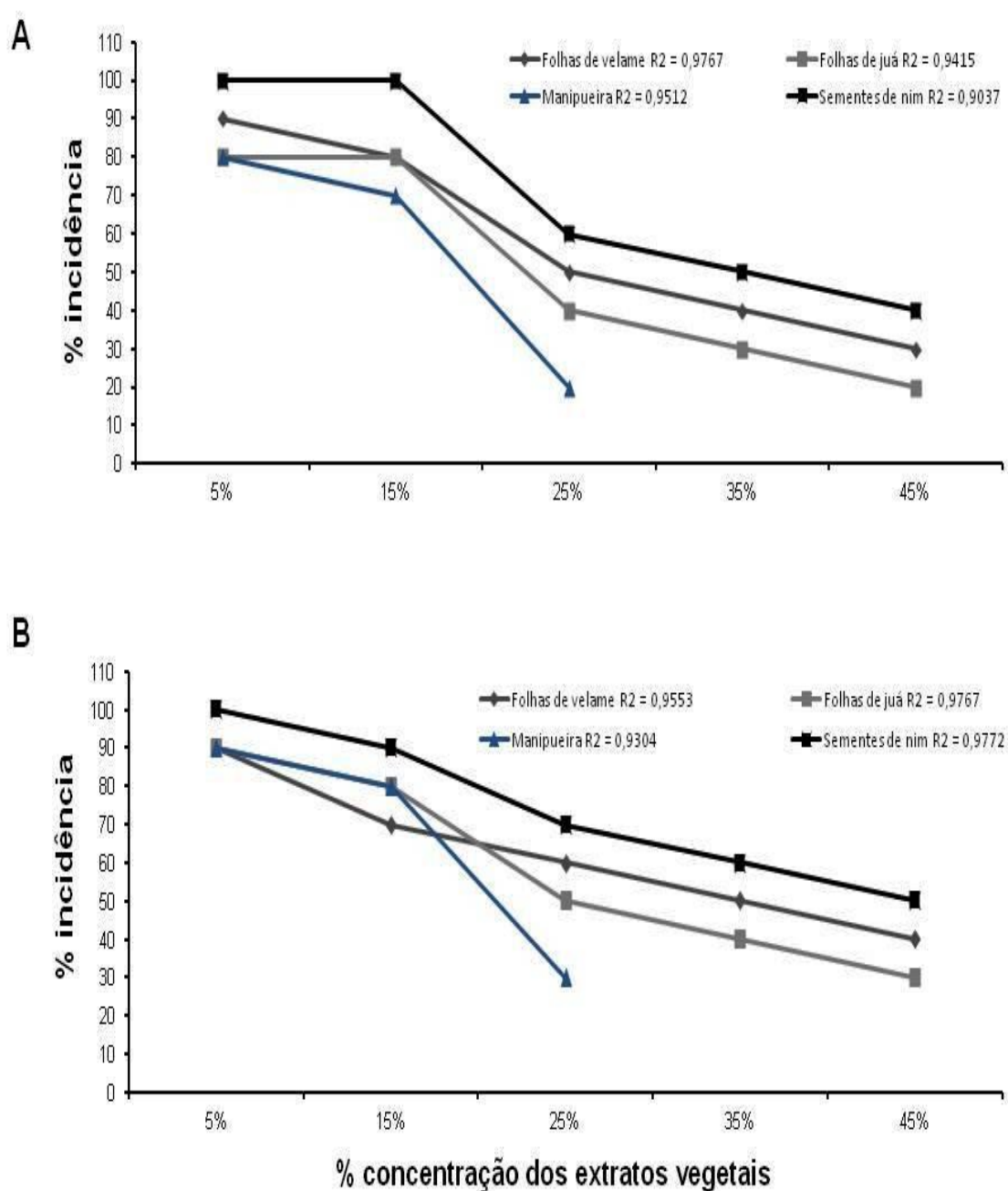
Os isolados de *C. eragrostidis* - CB11 e *Phyllosticta* spp. - PBI1 foram coletados na área de produção de inhame de Batatan. % PIC = inibição do crescimento micelial (A e D); % PIE = inibição da esporulação (B e E) e % PIG = inibição da germinação de conídios (C e F).

### Controle em casa de vegetação

Houve redução da incidência dos dois patógenos para as diferentes concentrações dos extratos testados, quando comparados com a testemunha, pulverizada com água.

A incidência da doença variou de 20 a 100% para *C. eragrostidis* e 30 a 100% para *Phyllosticta* spp. (Figura 2). Após 24 horas da pulverização, as concentrações de 35% e 45% de manipueira causaram murchas de todas as folhas em plantas de inhame cultivadas em casa de vegetação.

**Figura 2.** Incidência de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. em mudas de inhame (*D. rotundata*) tratadas com diferentes concentrações de extratos vegetais.



*Curvularia eragrostidis* (A); *Phyllosticta* spp. (B). As concentrações 35% e 45% de manipueira causaram murcha de plantas em casa de vegetação.

### Controle da queima das folhas do inhame no campo

Foram observados os primeiros sintomas de manchas foliares ocasionadas por *Curvularia eragrostidis* e *Phyllosticta* spp., aos 105 dias após o plantio (DAP), quando se iniciaram as aplicações dos extratos.

Houve influência dos estratos da planta sobre a área abaixo da curva de progresso da doença para queima das folhas do inhame causada por *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp.. nas duas áreas experimentais (Tabela 2).

**Tabela 2.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em plantas pulverizadas com extratos vegetais contra *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp.

Área experimental	Tratamentos	<i>C. eragrostidis</i>	<i>Phyllosticta</i> spp.
I	Testemunha	238,77 aA	228,77 aA
	Folhas de velame 25%	196,00 bB	186,00 bB
	Folhas de juá 25%	180,37 cC	170,37 cC
	Manipueira	157,70 dD	147,70 dD
	Sementes de nim 25%	236,73 aA	223,73 aA
	Chlorothalonil	194,07 bB	184,07 bB
II	Testemunha	269,40 aA	259,40 aA
	Folhas de velame 25%	232,10 cC	222,10 cC
	Folhas de juá 25%	189,33 dD	179,33 dD
	Manipueira	175,67 eE	165,67 eE
	Sementes de nim 25%	253,73 bB	243,73 bB
	Chlorothalonil	236,27 cC	226,27 cC

\*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. O experimento I utilizou rizóforos semente da área de produção de inhame de Batatan e o Experimento II rizóforos semente da área de São Felipe. Médias da AACPD encontradas nos três estratos das plantas de inhame em campo: superior, mediano e inferior.

As menores médias da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foram obtidas para os tratamentos com manipueira 25% e folhas de juá 25%. Resultados semelhantes foram obtidos para queima das folhas causada por *Phyllosticta* spp.. O estrato inferior das plantas foi o mais afetado, em todos os tratamentos.

Os extratos vegetais na concentração de 25% reduziram a AACPD em níveis semelhantes ao fungicida Chlorothalonil.

Houve influência dos tratamentos sobre a área foliar do inhame naturalmente infectado por *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. aos 180 dias após o plantio nas duas áreas experimentais.

A aplicação dos produtos vegetais para o controle de *C. eragrostidis* na área experimental I (Tabela 3) proporcionou as maiores médias de área foliar nos

tratamentos com a manipueira 25% (134,17cm<sup>2</sup>), o extrato de folhas de juá 25% (121,17cm<sup>2</sup>) e o extrato de velame 25% com 109,17cm<sup>2</sup> que foram significativamente iguais ao tratamento com o fungicida Chlorothalonil com 103,81cm<sup>2</sup>. O mesmo comportamento foi observado na área experimental II.

A área foliar nos tratamentos com extrato de sementes de nim 25% não diferiu da testemunha, havendo diferenças significativas destes tratamentos quando comparado aos outros extratos vegetais e ao fungicida.

**Tabela 3.** Área foliar da cultura do inhame aos 180 dias após pulverização com extratos vegetais contra *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp.

Área Experimental	Tratamentos	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	
		<i>C. eragrostidis</i>	<i>Phyllosticta</i> spp.
I	Testemunha	46,61 cB	53,27 cB
	Folhas de velame 25%	109,17bA	108,5 bA
	Folhas de juá 25%	121,17 aA	121,51 aA
	Manipueira	134,17 aA	133,52 aA
	Sementes de nim 25%	62,14 cB	60,14 cB
	Chlorothalonil	103,81 bA	108,50 bA
II	Testemunha	64,27 cB	63,27 cB
	Folhas de velame 25%	114,81 bA	113,81 bA
	Folhas de juá 25%	132,17 aA	131,52 aA
	Manipueira	144,17 aA	143,50 aA
	Sementes de nim 25%	71,81 cB	70,14 cB
	Chlorothalonil	103,17 bA	104,71 bA

\*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. O experimento I utilizou rizóforos semente da área de produção de inhame de Batatan e o Experimento II rizóforos semente da área de São Felipe. Médias da área foliar encontradas nos três estratos das plantas de inhame: superior, mediano e inferior.

Resultados semelhantes foram observados com as aplicações dos produtos vegetais no controle de *Phyllosticta* spp., nas duas áreas experimentais.

Houve influência dos extratos vegetais utilizados apenas sobre o comprimento e o peso dos rizóforos colhidos, mas não para o diâmetro (Tabela 4).

Todos os tratamentos, com exceção do extrato de sementes de nim promoveram aumento no comprimento dos rizóforos de inhame, enquanto que somente diferiram dos demais significativamente para o peso, a manipueira 25% e folhas de juá 25%.

**Tabela 4.** Características agrônômicas da produção de *D. rotundata* submetidas a diferentes extratos vegetais contra queima das folhas em duas áreas experimentais.

Área experimental	Tratamentos	Comprimento (cm)	Diâmetro (mm)	Peso de rizóforos (Kg)
I	Testemunha	12,07 b	6,2 a	0,95 b
	Folhas de velame 25%	14,51 a	6,3 a	1,36 b
	Folhas de juá 25%	15,74 a	6,4 a	2,03 a
	Manipueira	17,70 a	6,6 a	2,27 a
	Sementes de nim 25%	12,67 b	6,3 a	1,32 b
	Chlorothalonil	16,73 a	6,3 a	1,37 b
II	Testemunha	11,06 b	5,1 a	0,85 b
	Folhas de velame 25%	13,52 a	5,2 a	1,26 b
	Folhas de juá 25%	14,64 a	5,4 a	2,13 a
	Manipueira	16,50 a	5,6 a	2,37 a
	Sementes de nim 25%	11,57 b	5,2 a	1,42 b
	Chlorothalonil	15,63 a	5,2 a	1,47 b

\*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. O experimento I utilizou rizóforos semente da área de produção de inhame de Batatan e o Experimento II rizóforos semente da área de São Felipe.

## Discussão

Informações sobre o controle da queima das folhas do inhame com o uso de extratos vegetais em condição de campo são escassos. Este trabalho avaliou o controle da queima das folhas do inhame em condições *in vitro*, casa de vegetação e campo com extratos vegetais de folhas de juá (*Ziziphus joazeiro*); folhas de velame (*Julocroton triqueter*), sementes de nim (*Azadirachta indica*) e manipueira

Em condições epidemiológicas favoráveis, como temperaturas noturnas (20 a 22°C) com umidade relativa em torno de 100% e temperaturas diurnas (25 a 28°C), com umidade relativa de 65%, e presença do vento, o patógeno pode ser disseminado e provocar danos à cultura no campo (SANTOS et al., 2007; MOURA, 2005; MICHEREFF et al., 2000). Essas condições ocorreram nas duas áreas experimentais (dados não mostrados).

Os efeitos promovidos pelos extratos sobre a doença podem estar relacionados à sua atividade antimicrobiana direta sobre o patógeno. Esta ação dos extratos também já foi observada em outros trabalhos utilizando plantas medicinais (BALBI-PEÑA, 2005; BONALDO et al., 2004; FRANZNER et al., 2003). Estes efeitos promovidos pelos extratos vegetais sobre o controle de fungos de interesse agrônômico, também tem sido reportado em outros trabalhos em condições *in vitro*



ou em casa de vegetação (NASCIMENTO et al., 2008; NERY, 2006; PASSOS, 2006;). Poucos trabalhos na literatura observaram as atividades dos princípios ativos de plantas em condições de campo (RODRIGUES et al., 2007; RODRIGUES, 2004; KUHN et al., 2006).

A manipueira vem sendo testada no controle de fitopatógenos e apresenta comprovada ação nematicida (FRANCO, 1986; FRANCO et al., 1990), inseticida e fungicida (PONTE, 2000). Segundo Lorenzi & Dias (1993), a manipueira apresenta ácido cianídrico (HCN) em sua composição. Acredita-se que a atividade fungicida seja causada pela presença de dois glicosídeos cianogênicos, como a linamarina, que participa em maior proporção (92-98%), a lotaustralina metil, derivada da linamarina (2-8%), e pela presença da enzima linamarase, que promove a hidrólise dos glicosídeos (CARVALHO & CARVALHO, 1979). O enxofre, presente em larga quantidade neste material, atrelado à presença de outras substâncias, tais como cetonas, aldeídos, cianalaninas, lectinas e outras proteínas tóxicas, inibidoras de amilases e proteinases, apresentam grande eficiência como agentes fungicidas. Um estudo realizado por Wong et al (2011) demonstrou que a incorporação de folhas de mandioca seguida da solarização do solo inativou *Fusarium oxysporum*. Segundo Soriano (2011) as concentrações 20, 40 e 60% de manipueira foram capazes de inibir em 100% o crescimento micelial *in vitro* de *Phytophthora* sp. Observou-se neste estudo um efeito significativo no controle *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. *in vitro*, casa de vegetação e campo com a utilização de manipueira na concentração de 25%.

O potencial do nim (*Azadirachta indica*) em controlar doenças no campo, mesmo quando aplicado em baixas concentrações foi evidenciada em diversos trabalhos. Observou-se efeitos significativos de extratos de nim sobre *F. oxysporum* (CANDIDO et al., 2007), *Colletotrichum* spp., (MIGUEL et al., 2006), no controle do oídio (*Oidium lycopersici*) (CARNEIRO, 2003), mancha de *Alternaria*, tombamento (*Ralstonia solani*), *Fusarium*, *S. rolfsii* (PENTEADO, 2001; ABREU JÚNIOR, 1998) e antracnose (AMADIOHA & OBI, 1998). Avaliando o efeito do extrato de sementes de nim no crescimento micelial de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* sp. observou-se que o crescimento micelial dos fungos não foi inibido, em nenhum dos tratamentos testados em relação a testemunha. Contudo, houve uma diferença de vigor do fungo nos tratamentos contendo o extrato de sementes de nim, em cujas placas, as colônias apresentaram coloração mais clara que as da testemunha. Contudo, neste

estudo não foi observado com a utilização de extrato de sementes de nim nenhum efeito significativo no controle *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. em campo. Segundo Martinez et al (2002) a exposição de óleo de nim a altas temperaturas e a radiação solar promove a degradação dos compostos ativos.

Os extratos das folhas de *Z. joazeiro* mostraram potencial inibitório frente às bactérias *Mycobacterium smegmatis* e *Micrococcus luteus* (SILVA et al, 2011), *Lasiodiplodia theobromae* (FEITOSA et al., 2000). Nas análises *in vitro* com *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp., o extrato de folhas de juá mesmo em baixas concentrações inibiu o crescimento micelial, esporulação e germinação de conídios desses patógenos. Em casa de vegetação e campo esse extrato a partir da concentração de 25% apresentou potencial fungitóxico para a queima das folhas em inhame.

O extrato de folha de velame mostrou potencial inibitório no controle de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. *in vitro*, casa de vegetação e em campo para a cultura do inhame. Não foi encontrado na literatura registro desse extrato no controle de doenças fúngicas em outras culturas.

Não existe recomendação do fungicida Chlorothalonil (Bravonil Ultrex) para a cultura do inhame. O fungicida Chlorothalonil é recomendado para controle de doenças fúngicas em outras culturas: Antracnose causada pelo patógeno *Elsinoe ampelina*; Pinta preta em tomate (*Phytophthora infestans*, *Alternaria solani*) e Oídio (*Uncinula necator*). O Chlorothalonil foi considerado um fungicida protetor de pouca eficiência em mangueira e videira para *Lasiodiplodia theobromae* (RODRIGUES, 2003; TAVARES et al, 1994), em míldio (*Pseuoperonospora cubensis*) do meloeiro (CARDOSO et al, 2001). Em inhame, o fungicida Chlorothalonil mostrou potencial no controle de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. em campo, não diferindo da manipueira e dos extratos vegetais de juá e velame.

Quando há fatores ambientais adversos e a presença de doenças no campo, as características fisiológicas podem ser alteradas. O que foi observado é que a aplicação dos extratos vegetais e do fungicida apresentou efeitos sobre a área foliar em comparação com a testemunha. Não foram encontrados registros na literatura que mensurem quantitativamente a área foliar da cultura do inhame, possibilitando correlacionar ou inferir possíveis resultados encontrados. Um dos sinais fisiológicos indutores de mecanismos de defesa contra o estresse é a redução na expansão das folhas (KUHN, 2007; LOPES, 2006).

As manchas foliares causadas por *Phyllosticta* spp. desapareceram das plantas nas duas áreas avaliadas aproximadamente 180 dias após plantio. Foi observada uma baixa severidade causada por este patógeno, confirmando que o mesmo tem importância secundária para a cultura do inhame. A elevada sensibilidade do patógeno às condições climáticas (VAN DER Aa, 1973) pode estar relacionado a baixa incidência do fungo após 180 dias.

A aplicação dos extratos vegetais de manipueira e juá foi efetiva no controle da queima das folhas do inhame, aumentando o peso médio dos rizóforos de inhame. Estes extratos vegetais apresentaram grande potencial a ser explorado no cultivo do inhame em condições de campo, interferindo positivamente na produção e no estado vegetativo das plantas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU JÚNIOR, H. **Práticas alternativas de controle de pragas e doenças na agricultura: coletânea de receitas**. Campinas, SP: EMOPI, 115p., 1998.

AMADIOHA, A.C.; OBI, V.I. Fungitoxic Activity of Extracts from *Azadirachta indica* and *Xylopiya aethiopica* on *Colletotrichum lindemuthianum* in Cowpea. **Journal Herbs, Spices & Medicinal Plants**, Amherst, vol. 6, p. 33-40, 1998.

BALBI-PEÑA, M. I. **Efeito do extrato do rizoma de *Curcuma longa* e solução de curcumina em *Alternaria solani* e controle de pinta preta em tomateiro**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, PR. 50p., 2005.

BONALDO, S. M.; SCHWANN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TESSAMAN, D. J.; SCAPIM, C. A. Fungitoxidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum langenarium* pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.128-134, 2004.

CANDIDO, E. K.; RODRIGUES, A. A. C.; VERAS, M. S. Efeito de resíduos orgânicos na supressão de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em quiabeiros. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.1, 2007.

CARDOSO, J.E., SANTOS, A. A. dos, VIDAL, J.C., BADU, F. O., VIANA, F. M. P. & FREIRE, F.C.O. Eficiência de Tiofanato Metílico e Clorotalonil no controle do míldio do meloeiro. Fortaleza. Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 55. 2001.

CARNEIRO, S. M. T. P. G. Efeito de extratos de folhas e de óleo de nim sobre o oídio do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 29, p.262-265, 2003.

CARVALHO, R. A.; LACERDA, J. T.; OLIVEIRA, E. F.; SANTOS, E. S. 2002. Extratos de plantas medicinais como estratégia para o controle de doenças fúngicas do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste. In: II Simpósio Nacional sobre as culturas do inhame e do taro, 2, 2002. João Pessoa. **Anais...** João Pessoa, PB: EMEPA – PB. v. 1, p. 99 – 112, 2002.

CARVALHO, V. D. ; CARVALHO, J. G. Princípios tóxicos da mandioca. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 5, n. 59/60, p. 82- 88, 1979.

FEITOSA, V. S.; PESSOA, M. N. G.; ALMEIDA, J. L. & SILVA, M. G. V. Efeito da tintura, extrato bruto e sumo de plantas medicinais sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Macrophomina phaseolina* “in vitro”. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 374, 2000.

FRANCO, A. Subsídios à utilização da manipueira como nematicida Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 53 f. 1986.

FRANCO, A. et al. Dosagem de manipueira para tratamento desolo infestado por *Meloidogyne* : II) segundo experimento. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 14, n. 1, p. 25-32, 1990.

FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R.; SCHWANN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum**, v.25, p.503-507, 2003.

GARRIDO, M. D. S; SOARES, A. C. F.; MENDES, L. N.; PEREZ, J. O. O estudo de novas tecnologias para a produção de inhame no estado da Bahia. **Bahia Agrícola**, Salvador, v.6, n.1, p.19-22, 2003.

GARRIDO, M. D. S. **Manejo agroecológico da cultura do inhame: produtividade, qualidade, controle de nematóides e manchas foliares.** Dissertação. (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal da Bahia, Escola de Agronomia, Cruz das Almas, 73p. 2005.

KUHN, O. J.; PORTZ, R. L.; STANGARLIN, J. R.; DEL ÁGUILA, R. M.; SCHWANN-ESTRADA, K. R. F.; FRANZENER, G. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*. **Sêmima: Ciências Agrárias**, Londrina, v.27, n.1, p.13-20, 2006.

KUHN, O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção.** 2007. 140p. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP.

LOPES, F. C. A. **Efeito de fontes de silício no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.).** 2006. 67p. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LORENZI, J.O.; DIAS, C.A. C. Cultura da mandioca. **Boletim Técnico CATI**, Campinas, n.211, 1993, 41p.

MARTINEZ, S.S. **O Nim - *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção.** Londrina: Instituto Agronômico do Paraná, 142p., 2002.

MESQUITA, A. S. Inhame e taro: cenário dos mercados internacional, brasileiro e baiano. **Bahia Agrícola**, Salvador, v.5, n.2, p.54-64, 2002.

MICHEREFF, S.J.; MAFFIA L.A.; NORONHA, M.A. Escala diagramática para avaliação da severidade da queima das folhas do inhame. **Fitopatologia Brasileira**. Vol. 24, p. 174-180, 2000.

MIGUEL, E. G. et al. Atividade de extratos de nim (*Azadirachta indica*) sobre o crescimento de *Colletotrichum* spp... In: XXIX Congresso Paulista de Fitopatologia, Botucatu - SP. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 18-18, 2006.

MOURA, R. M. Doenças do inhame-da-costa (*Dioscorea cayennensis*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4ª edição. São Paulo: Agronômica Ceres, p.415-419, 2005.

NASCIMENTO, L. C.; NERY, A. R.; RODRIGUES, L. N. Controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamoeiro, utilizando extratos vegetais, indutores de resistência e fungicida. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.30, n.3, p.313-319, 2008.

NERY, A. R. **Avaliação de extratos vegetais, indutores de resistência e fungicida no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamoeiro**. 2006. 49p. Monografia (Graduação em Agronomia). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB.

PASSOS, A. N. **Avaliação de extratos vegetais, indutores de resistência e fungicidas sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* e o desenvolvimento de antracnose pós-colheita em frutos de manga**. 2006.43p. Monografia (Graduação em Agronomia). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB.

PENTEADO, S. R. A utilização dos defensivos alternativos na agricultura: histórico e perspectivas. In: HEIN M.; GUEDES, A. C. L.; AGUIAR, M. S. Resumos do 1º Encontro de Processos de Proteção de Plantas: controle ecológico de pragas e doenças. **Agroecológica**, Botucatu, p.13-21, 2001.

PONTE, R. A., Use of the *manipueira* as agricultural input: defensive and fertilizer, In: CEREDA, M. P. (Ed.). *Uso, manuseio e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca*. v. 4. São Paulo: **Cargill Foundation**, p. 80-95, 2000.

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; FIORI-TUTIDA, A. C. G.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Fungitoxidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotium* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.2, p.124-128, 2007.

RODRIGUES, E. **Atividade antimicrobiana in vitro, indução de peroxidase e controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em alface cultivado organicamente pelo uso de extrato de gengibre**. 2004. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

SANTOS, E. S. dos; MACÊDO, L. de S. Tendências e perspectivas da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do Brasil. In: II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO. **Anais**. João Pessoa, PB: EMEPA-PB, p. 21-31, 2002.

SANTOS, E. S. Manejo da cultura do inhame. In: CARMO, C. A. S. **Inhame e taro: sistema de produção familiar**. Vitória: Incapar, p.253-279, 2002.

SANTOS, E. S.; CAZÉ FILHO, J.; LACERDA, J. T.; CARVALHO, R. A. Inhame (*Dioscorea* sp.): Tecnologias de produção e preservação ambiental. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.1, n.1, p.31-36, 2007.

SANTOS, A.S.; JULIATTI, F.C.; SANTOS, V.A.; POLIZEL, A.C.; JULIATTI, F.C.; HAMAWAKI, O.T. Caracteres epidemiológicos e uso da análise de agrupamento para resistência parcial à ferrugem da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, p.443-447, 2007.

SILVA, T.C.L.; ALMEIDA, C.C.B.R.; VERAS FILHO, J.; PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S.; AMORIM, E.L.C.; COSTA, E.P., ARAÚJO, J.M. Atividades antioxidante e

antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* mart. (Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas. **Revista Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 32, p.193-199, 2011.

SOARES, A. C. F.; SOUSA, C. S.; GARRIDO, M. S.; PEREZ, J. O.; ALMEIDA, N. S. Soil streptomycetes with in vitro activity against the yam pathogens *Curvularia eragrostidis* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.456-461, 2006.

SOARES, A. C. F.; PEREZ, J. O.; SOUSA, C. S.; GARRIDO, M. S.; ALMEIDA, N. S. Eficiência do acibenzolar-S-methyl na proteção de plantas de inhame à *Curvularia eragrostidis*. **Caatinga**, v.21, n.1, p.147-151, 2008.

SORIANO, W. T. **Avaliação de métodos alternativos no controle de *Phytophthora* sp em laranja pêra e limão cravo**. 2011. 68p. Dissertação. (Mestrado em Agronomia: Produção e Proteção Vegetal). Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo.

PEREZ, J. O.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. da S.; SILVA, D. S. da; ALMEIDA, N. S. de; SANTOS, A. P. dos S.; SOUSA, C. da S. Ocorrência de *Phyllosticta* sp. em inhame nos municípios de Cruz das Almas e Maragogipe–BA. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, p.120, 2004.

VALE, F.X.R. et al. **Quantificação de doenças - Quant**: versão 1.0.1. Viçosa: UFV, 2001. Software.

WONG, L. C.; AMBRÓSIO, M. M. de Q.; SOUZA, N. L. Sobrevivência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2 submetido à técnica da solarização associada à incorporação de folhas de mandioca. **Summa Phytopathologica**, v.37 n<sup>o</sup>.2 2011.

TAVARES, C. C. H.; AMORIM, L. R.; ASSUNÇÃO, I. P.; PEREZ, J. O. & LIMA, J. A. S. *Botryodiplodia theobromae* (Pat.) em mangueira no Vale São Francisco, IV proteção de pomares. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, p. 292, 1994.



VAN DER AA, H.A. Studies in *Phyllosticta* I. **Studies in Mycology**. Oxford, n.5, 1973.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O inhame (*D. rotundata*) desempenha importante papel socioeconômico no Nordeste do Brasil, especialmente nos Estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Maranhão, considerados os maiores produtores dessa *Dioscorea* na região. No Recôncavo da Bahia é bastante cultivado por pequenos agricultores familiares nas áreas de Maragogipe, São Felipe, São Félix e Cruz das Almas. Em função do seu valor alimentício, grande parte da produção é destinada ao mercado interno e a outra parte é exportada para outros países, principalmente para a Europa.

A queima das folhas é o principal problema fitossanitário da cultura do inhame nas principais áreas produtoras. Apesar disso, poucos estudos têm sido destinados à essa doença.

Diante desta problemática, esse trabalho teve como objetivo avaliar a estrutura populacional de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. oriundos do inhame; avaliar a patogenicidade de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. em inhame e outras plantas e avaliar o controle de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. com extratos vegetais *in vitro*, casa de vegetação e campo.

No **Capítulo I** analisou a diversidade genética de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp. na região do Recôncavo da Bahia. Nesse estudo, observou-se uma alta variabilidade genética entre os isolados dos dois patógenos, superior à esperada para um organismo assexual. *Phyllosticta* foi confirmado como um segundo fungo que vem causando queima nas folhas em inhame no Recôncavo da Bahia e provavelmente em outros estados produtores.

Os resultados do **Capítulo II** de patogenicidade confirmaram que outras plantas podem está servindo como fonte de inóculo dos dois patógenos em campo. O estudo ainda revelou haver variabilidade de agressividade entre isolados de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp.

Por fim, no **Capítulo III**, os extratos vegetais de manipueira e folhas de juá usados neste estudo indicaram grande potencial a ser explorado no cultivo do inhame em condições de campo, interferindo nas suas características fisiológicas.

Esses resultados poderão contribuir para pesquisas futuras, haja vista que facilitarão a busca de maior concentração de variabilidade genética e de patogenicidade de *C. eragrostidis* e *Phyllosticta* spp., e posterior emprego no melhoramento genético do inhame, com o desenvolvimento de variedades com

resistência à queima das folhas do inhame. Também poderá auxiliar no desenvolvimento de técnicas mais adequadas ao manejo da cultura.