



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – AGRICULTURA
TROPICAL**

KÁSSIO FELIPE BEZERRA OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE CAUSAL DA
ANTRACNOSE DE *Agave angustifolia***

Teresina
2021

KÁSSIO FELIPE BEZERRA OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE CAUSAL DA
ANTRACNOSE DE *Agave angustifolia***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Agricultura Tropical – PPGA-AT da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. José Evando Aguiar
Beserra Júnior

Teresina

2021

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processos Técnicos

O48i Oliveira, Kássio Felipe Bezerra.
Identificação e caracterização do agente causal da antracnose
de *Agave angustifolia* / Kássio Felipe Bezerra Oliveira. – 2021.
47 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí,
Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Teresina, 2021.
“Orientador: Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior.”

1. Agave. 2. Agavaceae. 3. *Colletotrichum*. 4. Etiologia. I. Título.

CDD 630

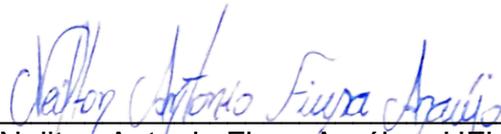
KÁSSIO FELIPE BEZERRA OLIVEIRA

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE DE *Agave angustifolia*

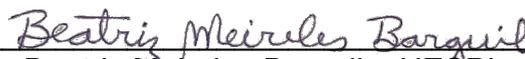
Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Agricultura Tropical, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

APROVADA em 21 de julho de 2021.

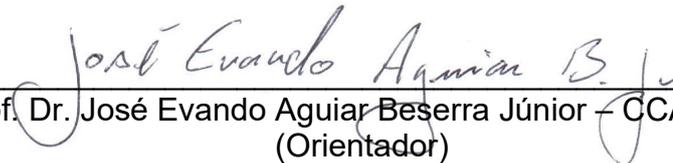
Comissão Julgadora:



Prof. Dr. Neilton Antonio Fiusa Araújo – UFLA



Profa. Dra. Beatriz Meireles Barguil – UESPI



Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior – CCA/UFPI
(Orientador)

TERESINA-PI

2021

*A Deus sobre tudo,
À minha família*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Eu creio que agradecimento é uma tarefa difícil. Não começa e nem se encerra aqui, levamos conosco.

Meu maior agradecimento é dirigido a YHWH, mantenedor e provedor, pelo dom da vida. A Ele toda honra e toda glória sejam oferecidas.

Agradeço a Universidade Federal do Piauí (UFPI) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Agricultura Tropical (PPGA-AT), por permitir que eu alcance mais um degrau na vida acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Meus agradecimentos ao professor Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior, pela paciência, apoio e orientação ao longo desse trabalho e por fazer jus a sua profissão, com conhecimento, sensatez e comprometimento.

À Elys Rejanne Marques, pela assessoria do trabalho, obrigado!

Aos professores do PPGA – AT.

À meus pais, Francisco Oliveira e Enedina Bezerra, pela educação, ensinamentos e amor e esforços sem medidas.

À minha irmã, Karla Oliveira, pelo seu apoio e amor fraternal.

Aos colegas de curso: Enayra Sousa, Elenildo, Alzeneide Lopes, Ana Melo, Ane Ferreira, Célia Nascimento, Cleriston Correia, Edson Neto, Ingrid Setubal, Marcus Briozo e Romário Martins, pelas horas de estudo.

À amiga de ontem e hoje, Shirlenne Ferreira.

A todos o meu sincero agradecimento.

RESUMO

Muitas espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum* causam antracnose em ampla gama de espécies de plantas. Membros desse gênero causam prejuízos em culturas economicamente importantes, especialmente frutas, vegetais e plantas ornamentais. Agaves é um grupo de plantas suculentas que ocorrem naturalmente em ambientes áridos ou semiáridos, sendo a *Agave angustifolia* a espécie de agave usada principalmente com fins ornamentais no Brasil. A antracnose de agave é uma doença associada a *Colletotrichum* spp. No entanto, a etiologia da doença não foi elucidada no Brasil. Assim, o objetivo do presente estudo foi identificar e caracterizar o agente causal da antracnose em *A. angustifolia* por meio da utilização de marcadores morfológicos, filogenia das regiões gênicas espaçador transcrito interno (ITS), subunidade maior do gene rDNA (LSU), e do gene actina (ACT), além de teste de patogenicidade. Os isolamentos fúngicos foram feitos a partir de plantas com sintomas de manchas necróticas nas margens foliares foram feitos os isolamentos fúngicos, seguindo-se o depósito dos isolados na coleção de fungos fitopatogênicos do Laboratório de Fitopatologia da UFPI (COUFPI). Os DNAs dos isolados de cultura pura foram extraídos e amplificados por PCR e sequenciados. As sequências de dois isolados foram editadas e as análises filogenéticas foram feitas para as regiões indicadas. Na caracterização morfológica foram avaliados o aspecto das culturas, tamanho e forma dos conídios e apressórios dos isolados. Cinco plantas para cada isolado foram inoculadas por meio da aplicação de suspensão de conídios em folhas feridas com a finalidade de avaliar a patogenicidade dos isolados. De acordo com as análises filogenéticas, os isolados COUFPI 217 e COUFPI 219 agruparam no mesmo clado com o isolado referência de *C. agaves*, e dentro do recém proposto complexo de espécies *Colletotrichum agaves*. A caracterização morfológica dos isolados revelou fungos com micélio aéreo aveludado de coloração creme, reverso marrom, de crescimento concêntrico e margens lisas. Os conídios produzidos por ambos os isolados são hialinos, asseptados, com formato cilíndrico, com comprimento médio de 16,3 μm (12,2-20,8) e largura de 3,9 μm (3,0-4,2). Os apressórios são arredondados (ovoides) e lisos (margens sem ondulações) ou subglobosos, com comprimento médio de 10,0 μm (6,7-14,7) e largura de 6,3 μm (4,9-10,4). Não foram observados peritécios, ascósporos e setas em nenhum dos isolados. Os dois isolados foram patogênicos, causando lesões necróticas, de coloração preta, que se tornaram deprimidas conforme a colonização do tecido. Portanto, por meio do uso de marcadores morfológicos, filogenia das regiões gênicas ITS, LSU e ACT, e teste de patogenicidade é possível concluir que *C. agaves* é o agente causal da antracnose observada em *A. angustifolia* coletada em Teresina, Piauí.

Palavras-chave: Agave. Agavaceae. *Colletotrichum*. Etiologia.

ABSTRACT

Many species belonging to the *Colletotrichum* genus cause anthracnose in a wide range of plant species. Members of this genus cause damage to economically important crops, especially fruits, vegetables and ornamental plants. Agaves are a group of succulent plants that occur naturally in arid or semiarid environments. *Agave angustifolia* is the agave species used mainly for ornamental purposes in Brazil. Agave anthracnose is a disease associated with *Colletotrichum* spp. However, the etiology of the disease has not been elucidated in Brazil. Thus, the aim of the present study was to identify and characterize the causal agent of anthracnose in *A. angustifolia* through the use of morphological markers, phylogeny of the internal transcribed spacer (ITS), major subunit of the rDNA gene (LSU), and of the gene regions. actin gene (ACT), in addition to pathogenicity testing. Fungal isolations were made from plants with symptoms of necrotic spots on the leaf margins, followed by the deposit of the isolates in the collection of phytopathogenic fungi of the Phytopathology Laboratory of UFPI (COUFPI). DNAs from pure cultured isolates were extracted and amplified by PCR and sequenced. The sequences of two isolates were edited and phylogenetic analyzes were performed for the indicated regions. In the morphological characterization, the appearance of the cultures, size and shape of the conidia and appressoria of the isolates were evaluated. Five plants for each isolate were inoculated by applying a suspension of conidia to wounded leaves in order to assess the pathogenicity of the isolates. According to phylogenetic analyses, isolates COUFPI 217 and COUFPI 219 grouped in the same clade with the reference isolate of *C. agaves*, and within the newly proposed *Colletotrichum agaves* species complex. The morphological characterization of the isolates revealed fungi with velvety aerial mycelium with cream color, brown reverse, concentric growth and smooth margins. The conidia produced by both isolates are hyaline, aseptate, cylindrical in shape, with an average length of 16.3 μm (12.2-20.8) and width of 3.9 μm (3.0-4.2). The appressoria are rounded (ovoid) and smooth (margins without undulations) or subglobular, with an average length of 10.0 μm (6.7-14.7) and width of 6.3 μm (4.9-10.4). Perithecia, ascospores and arrows were not observed in any of the isolates. Both isolates were pathogenic, causing necrotic lesions, black in color, which became depressed as the tissue colonized. Therefore, through the use of morphological markers, phylogeny of the ITS, LSU and ACT gene regions, and pathogenicity testing, it is possible to conclude that *C. agaves* is the causal agent of anthracnose observed in *A. angustifolia* collected in Teresina, Piauí.

Keywords: Agave. Agavaceae. *Colletotrichum*. Etiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore filogenética bayesiana de isolados de *Colletotrichum agaves* de *Agave angustifolia*. A árvore foi construída usando sequências concatenadas das regiões gênicas ITS e LSU. Os valores de probabilidade posterior bayesiana são indicados acima dos nós. As sequências geradas neste estudo estão destacadas em negrito. A análise foi realizada com sequências de culturas ex-tipo ou autênticas. A barra da escala (0,02) representa substituições de nucleotídeos por sítio. A árvore está enraizada com *Monilochaetes infuscans*.34

Figura 2. Árvore filogenética bayesiana de isolados de *Colletotrichum agaves* de *Agave angustifolia*. A árvore foi construída usando sequências do gene ACT. Os valores de probabilidade posterior bayesiana são indicados acima dos nós. As sequências geradas neste estudo estão destacadas em negrito. A análise foi realizada com sequências de culturas ex-tipo ou autênticas. A barra da escala (0,07) representa substituições de nucleotídeos por sítio. A árvore está enraizada com *Monilochaetes infuscans*.35

Figura 3. *Colletotrichum agaves* (COUFPI 219) em *Agave angustifolia*. Sintomas em folhas naturalmente infectadas (A, B). Verso (C) e reverso (D) do fungo em meio de cultura BDA. Conídios (E). Apressórios (F). Sintomas nas folhas inoculadas ao 3^o (G) e 8^o (H) dias após a inoculação. Barras: 20 µm (E); 10 µm (F).36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Lista de *primers* usados para amplificar as sequências neste estudo.26

Tabela 2 Isolados e sequências de *Colletotrichum* spp. usadas nas análises filogenéticas.29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 O gênero <i>Agave</i>	14
2.1.1 Histórico e classificação taxonômica	14
2.1.2 Características botânicas	15
2.1.3 Importância econômica do gênero <i>Agave</i>	16
2.2 <i>Agave angustifolia</i>	17
2.3 Doenças fúngicas em agaves	18
2.4 <i>Colletotrichum</i> spp.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Obtenção dos isolados, isolamento e cultivo monospórico	25
3.2 Extração de DNA e amplificação por PCR	25
3.3 Análise filogenética	26
3.4 Caracterização morfológica.....	27
3.5 Teste de patogenicidade	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Análise filogenética	33
4.2 Caracterização morfológica.....	36
4.3 Teste de patogenicidade	37
5 CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE DE *Agave angustifolia*

1 INTRODUÇÃO

As agaves são plantas suculentas comumente cultivadas no Brasil e em muitas partes do mundo. O gênero *Agave* (família Agavaceae) agrupa mais de 200 espécies, autóctones do México, que é o centro de diversidade e distribuição primária. São plantas de grande importância cultural e econômica, pois àquelas cultivadas são altamente valorizadas como matéria-prima para a produção de bebidas destiladas (pulque, mezcal e tequila) (GARCÍA-MENDOZA, 2011). Segundo Pérez-López e Simpson (2020) as culturas pré-colombianas exploraram essas plantas para alimentação, fibra (de suas folhas), construção, bebidas, combustíveis e medicamentos e eram elementos essenciais dos estilos de vida nômades.

Entre as espécies de maior importância econômica no México estão: *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck, *A. angustifolia* Haworth, *A. tequilana* Weber, *A. attenuata* Salmy-Dyck, *A. fourcroydes* Lemaire, e *A. lechuguilla* Torr (GARCÍA-MENDOZA, 2011). No Brasil, destaca-se, principalmente na região Nordeste, *A. sisalana* Perrine ex Engelm (sisal), pois fornece fibra têxtil utilizada na fabricação de cordas, tapetes e papel. *A. angustifolia* também está amplamente presente no Brasil, onde é explorada apenas com fins ornamentais.

No entanto, alguns estudos tem apontado o potencial da *A. angustifolia* em diferentes aplicações como na produção de alimentos nutracêuticos (ALLSOPP *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2017), como surfactante natural na agricultura (MÜLLER, SCHIEDECK, 2018) e como fonte de frutanos (agavinas) na produção de alimentos (SANTIAGO-GARCÍA *et al.*, 2021; SANTIAGO-GARCÍA *et al.*, 2017).

As agaváceas podem ser colonizadas por vários patógenos, incluindo fungos como *Cercospora agavicola* (CORIA-CONTRERAS *et al.*, 2019), *Fusarium oxysporum* (ÁVILA-MIRANDA *et al.*, 2010), *Fusarium solani* (RAMÍREZ-RAMÍREZ *et al.*, 2017), *Cladosporium herbarum* (DUQUE-BAUTISTA *et al.*, 2017) e *Colletotrichum* spp. (FARR *et al.*, 2006), que causam danos às raízes e folhas. Contudo, os estudos sobre doenças fúngicas em plantas de agave são escassos na literatura científica, tanto a

nível mundial e especialmente nacional, concentrando-se nas espécies com maior relevância econômica e cultural.

O gênero *Colletotrichum* é considerado um dos grupos de fungos patógenos de plantas mais relevantes (DEAN *et al.*, 2012), sendo considerado numeroso, pois possui 248 espécies reconhecidas (JAYAWARDENA *et al.*, 2021). Organismos de *Colletotrichum* causam doenças em culturas economicamente importantes em todo o mundo. Como patógenos de plantas estes causam lesões necróticas ou manchas nas folhas, caules, flores, tanto em plantas herbáceas como lenhosas, e podridões em frutos (CANNON *et al.*, 2012).

A taxonomia de *Colletotrichum* foi por muitos anos realizada com base nas características morfológicas, fisiológicas e biológicas, isto é, gama de hospedeiros. Todavia, a identificação com base apenas nos caracteres morfológicos é problemática (HYDE *et al.*, 2009), pois há poucos caracteres confiáveis e apresentam grande plasticidade, dependentes de métodos e condições experimentais (CAI *et al.*, 2009). Há alguns anos, a diferenciação de espécies é baseada na análise filogenética de regiões gênicas (DAMM *et al.*, 2012a; DAMM *et al.*, 2012b).

Por conseguinte, Cai *et al.* (2009) propuseram o uso de abordagem polifásica com análises filogenéticas de sequências multilocus combinadas com dados geográficos, ecológicos e morfológicos para uma identificação confiável em *Colletotrichum*. A diferenciação entre os tipos de *Colletotrichum* responsáveis por epidemias de doenças é crítica para o desenvolvimento e implementação de estratégias de controle eficazes.

Uma vez que muitas espécies de *Colletotrichum* são cosmopolitas e polífagas, é provável que uma única espécie fúngica possa infectar e causar doença em vários hospedeiros (FREEMAN *et al.*, 1998; CANNON *et al.*, 2012; DA SILVA *et al.*, 2020), levando a sérios problemas de infecção cruzada. Portanto, é essencial identificar a(s) espécie(s) de *Colletotrichum* que infecta(m) plantas ornamentais, dentre elas as plantas de agaves. No Brasil, a etiologia da antracnose em agave não foi elucidada.

Diante do exposto, esse estudo teve como objetivo identificar e caracterizar o agente causal da antracnose em *A. angustifolia* pela utilização de marcadores morfológicos, filogenia das regiões gênicas ITS, LSU e ACT, além de teste de patogenicidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Agave*

2.1.1 Histórico e classificação taxonômica

A palavra agave vem do grego *agavus* e significa “admirável”. O gênero *Agave* é composto por amplo e distinto grupo de plantas herbáceas perenes, plurianual, monocárpicas, pois florescem apenas uma vez em seu ciclo de vida (PÉREZ-ZAVALA *et al.*, 2020). Esse gênero ocupa naturalmente regiões semidesérticas do hemisfério ocidental. Acredita-se que este gênero seja originário da Mesoamérica, sendo o México o principal centro de diversidade e a península de Yucatán apontada como o local mais preciso de sua origem (MEDINA, 1954).

Dentro da classificação filogenética, o gênero *Agave* Linnaeus 1753, pertence ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, ordem Asparagales, família Asparagaceae, e subfamília Agavoidea. De acordo com o tipo de inflorescência, pode ser dividido em dois subgêneros: *Agave* e *Littaea*. O subgênero *Agave* apresenta inflorescência em panícula ou umbela, e *Littaea* com inflorescência em forma de espiga ou racemosa (GARCÍA-MENDOZA, 2007; APG III, 2009).

Das mais de 200 espécies conhecidas, por volta de 159 podem ser encontradas no território mexicano, e 129 são endêmicas do país (GARCÍA-MENDOZA; MARTÍNEZ; GUTIÉRREZ, 2019). Isso se deve a heterogeneidade do território e às propriedades intrínsecas de cada táxon, como, por exemplo, plasticidade genética, tolerância ecológica, capacidade de germinação e dispersão, bem como interações bióticas com outros organismos (GARCÍA-MENDOZA, 2007). Os países que apresentam o maior número de táxons são o México, EUA, Cuba e Guatemala (GARCÍA-MENDOZA, 2002).

Várias espécies de agave foram difundidas para diversos países do velho mundo por meio de hispânicos e portugueses após o descobrimento da América, com destaque para a conquista do México, local de partida mais expressivo das agaves. No México, as agaves foram exploradas como alimento, fibra, materiais de construção e bebidas fermentadas desde a era pré-hispânica e assumiram importância para as culturas antigas que eram representadas por sua própria divindade: a deusa Mayahuel

(DAVIS *et al.*, 2019). As espécies para fins ornamentais e fonte de fibras foram as primeiras a serem levadas para o exterior (GENTRY, 1982).

2.1.2 Características botânicas

As plantas do gênero *Agave* são xerófitas, perenes, de hábito herbáceo e possuem escapo floral que pode atingir de 6 a 10 metros de altura (QUEIROGA *et al.*, 2020). O sistema radicular é fibroso e fasciculado. As raízes emergem da base do tronco e podem ser de dois modos: fixadoras e alimentadoras. As agaves possuem caule de constituição rizomatoso (JUDD *et al.*, 2009).

As folhas são suculentas, fibrosas, com epiderme composta por uma cutícula cerosa, que repele a água facilmente. Variam de linear (*A. angustifolia*) a lanceoladas (*A. attenuata*), e têm uma base dilatada e carnosa, sem pecíolo (sésil). A inserção da folha no pseudocaulo ocorre em forma de espiral ascendente, formando rosetas, que pode variar de 10 a 200 folhas. Quase sempre apresentam um espinho na ponta das folhas que podem medir desde milímetros até cinco centímetros de comprimento. A coloração das mesmas varia em tons que vão do verde escuro ao violeta (GARCÍA-MENDOZA, 2007).

As flores são homoclamídeas com pétalas e sépalas semelhantes em número, cor e forma, sendo chamadas de tépalas e actinomorfa com as pétalas divididas em vários planos simétricos. O ovário das agaves pode ser súpero ou ínfero e tricarpelar (GENTRY, 1982; GARCÍA-MENDONZA, 2007).

A reprodução pode ser sexuada ou assexuada. Na primeira forma de reprodução, os morcegos nectívoros são os principais polinizadores, seguidos pelos insetos. Quanto à reprodução assexuada, novos clones se originam do perfilho da base do tronco ou dos bulbilhos que se desenvolvem no pedúnculo floral. A reprodução sexuada ocorre em frequência inferior a assexuada. A propagação clonal proporciona maior capacidade de dispersão (GENTRY, 1982; GARCÍA-MENDONZA, 2007; SILVA *et al.*, 2008).

Os frutos apresentam a forma capsular, oblonga, trilocular, com rígido pericarpo, com 3 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro. Nos estágios iniciais tem cor verde e consistência carnosa, ficando preto quando maduro. As sementes são encontradas

no interior do fruto; são delgadas, escuras, lustrosas e triangulares (SILVA *et al.*, 2008).

2.1.3 Importância econômica do gênero *Agave*

Várias espécies de agave apresentam importância econômica. Desde épocas remotas, os primitivos povos habitantes do México conheciam suas propriedades, sendo fonte de matéria-prima para a fabricação de diversos produtos que serviam não só para alimento, como também para forragem, bebidas alcoólicas e fibra vegetal dura, de baixo custo extraída principalmente das espécies *A. sisalana*, conhecida como sisal e *A. fourcroydes*, conhecida como henequém (SILVA; BELTRÃO, 1999; SUINAGA *et al.*, 2006).

Várias espécies de *Agave* têm sido amplamente cultivadas nos trópicos e subtropicais em países como Indonésia, Filipinas e Brasil, como planta ornamental e como fonte de fibra vegetal que são extraídas de suas folhas como principal foco de exploração (GENTRY, 1982).

É comum o uso de algumas espécies de agave na alimentação humana. Depois que todas as folhas são arrancadas o bulbo ou pinha, como são conhecidos, são cozidos em fornos apropriados e, em seguida, cortados em pedaços que tanto podem ser consumidos de imediato como guardados para consumo futuro (LIMA, 1975).

A extração de frutopolissacarídeos de espécies de *Agave*, conhecidos como frutanos de agave ou agavinas, tem chamado a atenção na indústria de alimentos, uma vez que as agavinas podem contribuir na promoção da saúde humana (ESPINOSA-ANDREWS *et al.*, 2021). A aplicação é baseada em atributos tecnofuncionais das agavinas, como substitutos de açúcar ou gorduras, como fibras ou prebióticos (SANTIAGO-GARCÍA *et al.*, 2021). Para Pérez-López e Simpson (2020) frutanos são a base para a exploração comercial das agaves.

A utilização da planta na alimentação animal também se constitui em importante recurso das regiões desérticas; além da palma, as folhas de maguey (*Agave spp.*) são amplamente utilizadas (QUEIROGA *et al.*, 2021). Os açúcares, minerais e fibras contidos nas agaves, quando misturados com outras fontes de alimento como milho e sorgo, podem ajudar a reduzir a mortalidade dos rebanhos bovinos e pequenos ruminantes (PÉREZ-ZAVALA *et al.*, 2020).

No Brasil há maior destaque para o sisal (*A. sisalana*) que representa importante segmento econômico para o Nordeste brasileiro, devido a geração de renda e emprego em áreas do semiárido, com maior destaque para o estado da Bahia (SANTOS; SILVA, 2018). De acordo com Andrade, Ornelas e Brandão (2012) várias espécies de agaves se adaptaram facilmente às condições do nordeste brasileiro, sendo abundante o seu cultivo. Outra espécie facilmente encontrada no país e principalmente na região Nordeste é *A. angustifolia*, planta muito utilizada na ornamentação de áreas públicas e privadas (TAVARES; GALVÃO, 2019).

2.2 *Agave angustifolia*

Agave angustifolia Haw., ou chelem, como é chamada na língua maia, é originária da região das Antilhas e do México. É o único agave selvagem encontrado na Península de Yucatán, e é o mais provável ancestral de espécies domesticadas de grande valor econômico e cultural, como *A. fourcroydes*, *A. sisalana* e *A. tequilana* (COLUNGA-GARCÍAMARÍN *et al.*, 1996). Pertence à família Agavaceae e é conhecida pelos brasileiros como piteira-do-caribe ou agave (LORENZI; SOUZA, 2001). No Brasil, *A. angustifolia* apresentou adaptação favorável nas diversas regiões do país, haja vista as condições tropicais serem semelhantes aos locais de origem da espécie (TAVARES; GALVÃO, 2019).

As folhas de *A. angustifolia* são lineares, longas e estreitas derivando assim o epíteto em seu nome científico (*angustifolia*, que significa estreito). Apresenta o formato de espada que podem atingir de 1 a 2 metros de comprimento. Suas margens são amareladas, permitindo identificá-la como hortícola “Marginata”. Possuem espinhos pequenos nas laterais e no extremo possui uma ponta espinhenta aguçada. Dentre os agaves cultivadas, *A. angustifolia* é uma espécie notável pela produção de folhas (MEDINA, 1954).

O caule é curto e semilenhoso, formando grande roseta. Estas rosetas têm funções essenciais que influenciam nos ciclos de crescimento, florescimento e reprodução. A inflorescência é ereta, semelhante a uma haste, com altura de 2 a 3 metros; no seu ápice possui algumas ramificações que servem de base para a inflorescência. O florescimento é um processo fundamental para *A. angustifolia*, pois garante a geração dos bulbilhos que favorecem a propagação da espécie (LORENZI; SOUZA, 2001).

A. angustifolia é uma boa opção a ser utilizada com fins ornamentais em jardins pelo seu aspecto estrutural, disposição das folhas, e o destaque da coloração das bordas das folhas. Planta perene e rústica utilizada em paisagismo como planta isolada ou várias plantas formando canteiros maciços (PATRO, 2014).

2.3 Doenças fúngicas em agaves

Embora a epiderme das plantas do gênero *Agave* possuam a cutícula espessa e cerosa, o que lhes confere uma barreira natural à penetração de microrganismos patogênicos, elas podem ser afetadas por várias doenças capazes de provocar danos consideráveis (TAVARES; GALVÃO, 2019).

De acordo com a base de dados do Comité Técnico Agronómico (2010), do México, a *A. tequilana* var. Azul, durante décadas de cultivo, foi afetada por pragas e doenças, das quais a podridão radicular é a mais predominante. Segundo Ramírez-Ramírez *et al.* (2017) e López-Bautista *et al.* (2020), o fungo *Fusarium oxysporum* Schlecht (Emend. Snyd. E Hans.) é descrito como o agente causal da podridão radicular, doença responsável pela limitação do cultivo de *A. tequilana* var. Azul no território mexicano. Esse tema foi objeto de estudo realizado por Vega-Ramos *et al.* (2013), em que foi confirmada a elevada variabilidade genética de isolados de *F. oxysporum* associados à podridão da raiz de *A. tequilana* no México.

Fusarium oxysporum também é responsável pela doença denominada murcha onde os sintomas característicos da doença são indução de ondulação e o aparecimento de coloração arroxeadada nas folhas devido à obstrução de canais vasculares impedindo a passagem de nutrientes e água para a planta (RUBIO-CORTÉS, 2007). Correlação positiva entre murcha e dano ao xilema pode ser constatada quando plantas de *A. tequilana* var. Azul são inoculadas com *F. oxysporum* (ÁVILA-MIRANDA *et al.*, 2010). A murcha, também, está associada ao *F. solani*, pois inoculações de mudas de agave apresentaram os sintomas típicos da podridão de raiz (RAMÍREZ-RAMÍREZ *et al.*, 2017).

Atualmente são conhecidas outras espécies de *Fusarium* capazes de causar a podridão seca das raízes em agave. Essa doença, juntamente com a murcha, ocasiona alto impacto econômico na produção de *A. tequilana* var. Azul. A caracterização dos isolados associados a plantas doentes revelou a presença de espécies de *Fusarium* como *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. falciforme*, além de duas

espécies não identificadas, mas pertencentes aos complexos *Fusarium solani* (FSSC) e *Fusarium fujikuroi* (FFSC) (LOPEZ-BAUDISTA *et al.*, 2020).

Entre as doenças fúngicas que infectam a parte aérea das agaves estão: antracnose, mancha cinza e mancha necrótica. *Cercospora agavicola* é o agente causal da mancha cinza no México. Visando o aprimoramento dos programas de controle preventivos de doenças em agave, estudos de monitoramento das variáveis climáticas favoráveis à ocorrência da doença vêm sendo feitos (CORIA-CONTRERAS *et al.*, 2019). *Cladosporium herbarum* foi descrito como patógeno causador de manchas necróticas das hastes de *A. angustifolia* no México. Essa espécie é normalmente considerada um patógeno oportunista, tendo sido encontrada causando doença em *Agave americana* na Itália (BENSCH *et al.*, 2021) e no México (DUQUE-BAUTISTA *et al.*, 2017).

No Brasil, de acordo com Farr e Rossman (2021), nove espécies de fungos foram associadas a doenças em *Agave* spp., sendo eles: *Calonectria transiens*, *Ceuthocarpon didymosporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Coniothyrium* sp., *Leptosphaeria agaves*, *Nectria arenula*, *Nectria ochroleuca*, *Nectriella callorioides* e *Phyllosticta agaves*. No entanto, essas descrições foram feitas com base apenas em caracteres morfológicos. Há também relatos de *Alternaria* sp., *Asterina mexicana*, *Colletotrichum* sp., *Diplodia* sp. *Diplodinia* sp. e *Phoma* sp. (QUEIROGA *et al.*, 2020). Porém, esse relato não descreve como os fungos foram identificados, nem se testes de patogenicidade foram realizados. Sabe-se que para a precisa identificação de fungos como agentes etiológicos de doenças de plantas, é necessária a identificação por meio de caracteres morfológicos, filogenéticos de genes ou regiões gênicas, e teste de patogenicidade.

Os relatos são, em sua maioria, feitos em *A. sisalana*, o sisal, devido à sua importância econômica, sobretudo no estado da Bahia, maior produtor. Outra doença registrada no Brasil, é a podridão do tronco do sisal, que acreditavam ser causada por *Pythium aphanidermatum* (BOCK, 1965). Posteriormente, foi associada a *Botryodiplodia* sp. (sin. *Lasiodiplodia*), em estudo que incluía também teste de patogenicidade, onde confirmaram que esse fungo era o agente causal da podridão do tronco, relatado no estado na Paraíba por Lima *et al.* (1998).

Entretanto, em pesquisa recente, por meio de filogenia molecular, caracteres morfológicos e teste de patogenicidade, *Aspergillus welwitschiae* foi reconhecido como o agente causal da podridão do tronco do sisal (DUARTE *et al.*, 2018). Antes a

doença foi associada a *Botryodiplodia* sp. (LIMA *et al.*, 1998), *Pythium aphanidermatum* (BOCK, 1965) e *Aspergillus niger* (COUTINHO *et al.*, 2006). No entanto, estes estudos eram imprecisos, pela razão que não adotaram uma análise polifásica para identificação do patógeno. Desta maneira, Duarte *et al.* (2018) é conclusivo que *A. welwitschiae* é o agente etiológico da doença podridão do tronco do sisal no Brasil.

2.4 *Colletotrichum* spp.

Colletotrichum é um grande gênero que pertence à classe dos Ascomycetos (Glomerellaceae, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Ascomycota) que abrange diversas espécies causadoras da antracnose e outras doenças em muitas culturas (BAILEY; JEGER, 1992). Os fungos possuem distribuição mundial (JAYAWARDENA *et al.*, 2020), causando maiores danos em regiões tropicais e subtropicais (WALLER, 1992).

O gênero *Colletotrichum* é um dos grupos mais importantes de patógenos de plantas cultivadas (JAYAWARDENA *et al.*, 2021; DEAN *et al.*, 2012). Taxonomicamente, apresenta como característica típica o conidiomata acervular, estrutura onde se encontram os conidióforos. Outra característica marcante deste gênero é a presença do apressório (SUTTON, 1992; FREEMAN *et al.*, 1998). Há mais de 900 epítetos de *Colletotrichum* listados no Index Fungorum (2020), compreendendo ao menos 248 espécies já aceitas na literatura (JAYAWARDENA *et al.*, 2021). A maioria das espécies estão agrupadas em 14 complexos de espécies, nomeadamente *acutatum*, *boninense*, *caudatum*, *dematium*, *destructivum*, *dracaenophilum*, *gigasporum*, *gloeosporioides*, *graminicola*, *magnum*, *orbiculare*, *orchidearum*, *spaethianum* e *truncatum* (JAYAWARDENA *et al.*, 2021; MARÍN-FELIX *et al.*, 2017; DAMM *et al.*, 2019).

A antracnose, doença provocada por espécies de *Colletotrichum*, leva à redução da produtividade em um grande número de lavouras em todo o mundo (DA SILVA *et al.*, 2020), incluindo cereais, gramíneas, leguminosas, hortaliças, culturas perenes (frutíferas), bem como plantas ornamentais. Foi validado como o oitavo fungo fitopatogênico mais eminente em todo o mundo em razão de sua importância científica e econômica (DEAN *et al.*, 2012; PHOULIVONG, 2011). Diferentes espécies de *Colletotrichum* podem infectar diferentes partes da mesma planta hospedeira,

causando doenças distintas, que ocorrem sucessivamente durante o desenvolvimento da planta (FREEMAN, 2000).

Os fungos do gênero *Colletotrichum* possuem estilo de vida variado. Podem ser amplamente categorizados como endofítico, hemibiotrófico, necrotrófico, latente ou quiescente (SILVA *et al.*, 2017). E dentre esses os mais comumente encontrados e descritos em *Colletotrichum* são endofíticos e fitopatogênicos hemibiotróficos (SILVA *et al.*, 2020).

Por ser um gênero complexo, *Colletotrichum* têm padrões de estilos de vida diferentes que variam entre grupos de espécies, muitos dos quais podem alternar entre estilos de vida (JAYAWARDENA *et al.*, 2021).

As espécies de *Colletotrichum* passam por várias transformações na morfologia celular e na infecção. Famílias de genes específicos e interações bioquímicas, como a produção de enzimas e metabólitos secundários regulam os padrões de estilo de vida das espécies de *Colletotrichum* (O'CONNELL *et al.*, 2012; GAN *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017). Com o avanço de pesquisas baseadas na genômica e transcriptômica, foram reveladas informações valiosas na relação entre genética e estilos de vida de *Colletotrichum* (GAN *et al.*, 2013, 2016, 2019; ZEILINGER *et al.*, 2016). Esses estudos forneceram dados sobre a evolução dos estilos de vida de *Colletotrichum* e suas relações funcionais, como também alvos potenciais para condução de mais pesquisas (CROUCH *et al.*, 2014).

Compreender o ciclo de vida de um fungo pode levar à compreensão do próprio fungo. As espécies de *Colletotrichum* têm formas assexuadas e sexuadas em seu ciclo de vida, que ocorrem na planta hospedeira ou em restos de plantas. Para completar o ciclo de vida, na metamorfose assexuada o fungo produzirá um acérvulo, uma estrutura formada intracuticularmente no tecido vegetal (KHAN; HSIANG, 2003). A tensão na cutícula aumenta, uma vez que o micélio fúngico cresce entre a epiderme e essa película da planta. Essa força à quebra da cutis e exposição do acérvulo maduro (SUTTON, 1992).

Segundo Phoulivong (2011), algumas espécies de *Colletotrichum* formam microescleródios, que funcionam como estruturas de sobrevivência, o que permite ao fungo permanecer no estado de dormência no solo, tanto durante o inverno como em condições de estresse. Os microescleródios sobrevivem por anos no solo; no caso do uso de rotação de culturas, é possível que ocorra reduções significativas no inóculo. Com relação aos apressórios, estes também atuam como estruturas de sobrevivência

até que um *peg* (hifa) de penetração se forme e penetre na superfície intacta do hospedeiro (RATANACHERDCHAI *et al.*, 2010).

O processo de infecção ocorre quando o conídio de *Colletotrichum* adere-se e germina à superfície da planta hospedeira, em sequência emite o tubo germinativo formando em sua extremidade o apressório que acaba germinando, dando início ao *peg* de penetração, que entra de forma direta na superfície do tecido hospedeiro. Abaixo da cutícula e da epiderme há o crescimento do fungo que penetra às células epidérmicas. Dentro dos tecidos vegetais seu estabelecimento se dá com o auxílio da produção de efetores de virulência (BAILEY *et al.*, 1992; PERFECT *et al.*, 1999; KLEEMAN *et al.*, 2012; LIAO *et al.*, 2012; O'CONNELL *et al.*, 2012).

Segundo Sutton (1992), os conídios de todas as espécies de *Colletotrichum* são envolvidos por uma matriz gelatinosa, constituída de polissacarídeos e proteínas. Eles são liberados pela ação dos respingos da chuva ou irrigação que favorece a diluição da matriz mucilaginosa, sendo dessa forma dispersos pela ação do vento e causam novas infecções em qualquer órgão da planta (SANTOS FILHO *et al.*, 2003).

A presença de água livre e umidade relativa do ar elevada favorecem a germinação dos esporos. O processo de germinação dura em média de 6 a 8 horas, seguido pelo desenvolvimento do apressório com duração de 10 a 12 horas, em sequência ocorre a penetração no hospedeiro. O fungo tem capacidade de penetrar o tecido que já está infectado em qualquer fase de desenvolvimento de forma direta ou indireta. A principal fonte do inóculo de *Colletotrichum* são os restos culturais constituídos por pecíolo, folhas, frutos senescentes infectados tanto na planta como nos que se encontram no solo, além de variados hospedeiros secundários (CARDOSO; FREIRE FILHO, 2002).

Após a formação das colônias, estas entram em uma fase biotrófica com tecidos infectados, que externamente permanecem assintomáticos por dias ou estendem-se envolvendo dormência (DE SILVA *et al.*, 2017). A maioria das espécies de *Colletotrichum* desenvolve um estágio necrotrófico em seus ciclos de vida. Durante esta fase, o fungo infecta e coloniza ativamente as células vegetais, levando à morte significativa das células vegetais onde aparecem as lesões patogênicas (JAYAWARDENA *et al.*, 2021).

Na fase necrotrófica, as hifas secundárias começam a emergir das hifas primárias invadindo as células vizinhas. Necrotróficos normalmente secretam enzimas que degradam a parede celular, fitotoxinas que matam os tecidos vegetais e outras

enzimas extracelulares em tecidos do hospedeiro antes e durante a colonização. A infecção necrotrófica geralmente envolve vários estágios: fixação de conídios, germinação, penetração do hospedeiro, formação da lesão primária, expansão da lesão e dilaceração do tecido, seguida de esporulação (PRINS *et al.*, 2000). O patógeno posteriormente sobrevive no conteúdo das células mortas ou doentes e completa seu ciclo de vida (LALUK; MENGISTE, 2010; O'CONNELL *et al.*, 2012; GAN *et al.*, 2013). Quando há atraso no aparecimento dos sintomas da doença, há perdas significativas na pós-colheita (PRUSKY; PLUMBLEY, 1992; O'CONNELL *et al.*, 2000).

O gênero *Colletotrichum* vêm passando por grandes mudanças taxonômicas. Na era pré-molecular, a taxonomia das espécies de *Colletotrichum* era predominantemente baseada em caracteres morfológicos e culturais, como tamanho e forma de conídios e apressórios, presença ou ausência de cerdas, cor da colônia e taxa de crescimento (SUTTON, 1992). No entanto, esses caracteres nem sempre são confiáveis para a diferenciação de espécies (CAI *et al.* 2009). O entendimento atual da taxonomia de *Colletotrichum* e a aplicação de várias técnicas na definição de espécies dentro do gênero são de extrema relevância.

Segundo Jayawardena *et al.* (2016) há registros de *Colletotrichum* em espécies de agave em diversos países como Cuba, El Salvador, Haiti, Itália, Jamaica, México, Holanda e EUA. Além disso, espécies de *Colletotrichum* foram identificadas a partir de plantas da família Agavaceae: *Agave* na Holanda e México, *Dracaena* na China, e *Phormium* na Nova Zelândia, Inglaterra, África do Sul e Alemanha, das quais cinco espécies de *Colletotrichum* foram identificadas: *C. agaves*, *C. boninense*, *C. dracaenophilum*, *C. gloeosporioides* e *C. phromii* (FARR *et al.*, 2006). *C. agaves*, *C. dracaenophilum* e *C. phromii* parecem ocorrer apenas em plantas dessa família.

Espécimes de *C. agaves* de Cuba, El Salvador, Haiti, Itália, Jamaica, México, Holanda e EUA também foram analisadas por meio dos caracteres morfológicos. Embora nenhum espécime tenha sido localizado em coleções micológicas, há relatos da ocorrência de *C. agaves* na China, Coréia do Sul, Filipinas e Taiwan. Um possível espécime de *C. agaves* coletado em Campinas (SP), Brasil, cujo nome de depósito era *Gloeosporium agaves* (sin. *C. agaves*) foi examinado, e constataram que não se tratava de *C. agaves* (FARR *et al.*, 2006).

De acordo com Farr *et al.* (2006), *C. agaves* pode ser distinguida de outras espécies de *Colletotrichum* de Agavaceae pela presença de numerosas setas de

coloração preta que comumente se desenvolvem nos acérvulos. Além disso, os conídios são maiores, medindo 19-30,5 x 5-8,5 μm .

Das cinco espécies de *Colletotrichum* encontradas em Agavaceae, apenas *C. agaves* não está inserido em nenhum dos 14 complexos de espécies de *Colletotrichum* conhecidos (CANNON *et al.*, 2012; DAMM *et al.*, 2012b; DAMM *et al.*, 2019). Além disso, apenas dois isolados de *C. agaves* foram descritos e somente sequências das regiões gênicas da subunidade maior do gene rDNA (LSU) e do espaçador transcrito interno (ITS) estão disponíveis em bancos de dados de DNA. Há, portanto, clara dificuldade na análise de possíveis novos isolados de *C. agaves*, uma vez que faltam dados acerca de sequências de genes *housekeeping*, os quais são atualmente imprescindíveis na identificação de espécies de *Colletotrichum* (VIEIRA *et al.*, 2020).

Recentemente foi proposta nova abordagem para a identificação de espécies de *Colletotrichum* (BHUNJUN *et al.*, 2021). A proposta compreende estimar o tempo de divergência entre as espécies aliado a análises filogenéticas. Baseado no nível elevado de congruência, foi proposto um novo complexo de espécies - *Colletotrichum agaves*, contendo cinco taxa que são caracterizados pela presença de conídios retos ou ligeiramente curvados com ápices obtusos. As espécies propostas para compor esse novo complexo são: *C. agaves*, *C. euphorbiae*, *C. ledebouriae*, *C. neosansevieriae* e *C. sansevieriae*.

No Brasil, os estudos sobre a ocorrência de *Colletotrichum* em plantas do gênero *Agave* reportam à antracnose no sisal, associada supostamente à *C. agaves* (SUINAGA *et al.*, 2019). Contudo, esse registro não satisfaz as exigências de identificação de uma espécie fúngica, porquanto há falta de dados importantes para a confirmação da identidade do fungo como marcadores morfológicos e filogenéticos, como também do teste de patogenicidade. De acordo com o exposto, no Brasil há falta de informações disponíveis sobre o agente causal da antracnose em agaves. É sabido da necessidade de conhecer as espécies de *Colletotrichum* capazes de causar doenças em plantas ornamentais, pois estas podem atuar como reservatório de patógenos, os quais podem causar infecções cruzadas em plantas agronomicamente importantes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos isolados, isolamento e cultivo monospórico

Em agosto de 2018, foram observadas plantas de *A. angustifolia* com sintomas de manchas necróticas nas margens foliares, em um jardim (Coordenadas 5°3'55.20"S, 42°47'5.98"O) na cidade de Teresina. Folhas sintomáticas foram coletadas e levadas ao Laboratório de Fitopatologia, do Departamento de Fitotecnia, UFPI.

Para o isolamento do agente causal, foram cortados fragmentos do tecido (margem entre o tecido doente e o aparentemente saudável), os quais foram desinfestados em solução de etanol 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2% por 1 minuto, e água destilada e esterilizada por 1 minuto, e secados em lenços de papel esterilizados. Posteriormente, os fragmentos foram depositados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (B.D.A.) em placas de Petri. As placas foram vedadas com plástico filme e incubadas em estufa tipo BOD a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 horas. Os isolados fúngicos foram repicados para novas placas de Petri contendo meio de cultura BDA, e em seguida incubados novamente em estufa tipo BOD sob as condições descritas, objetivando obter culturas puras para o cultivo monospórico.

A obtenção das culturas de esporos únicos foi realizada pela observação direta dos isolados esporulantes em meio de cultura. Discos de micélio contendo massas de esporos foram transferidos assepticamente para microtubos de 1,5 mL contendo água destilada esterilizada e agitados em agitador vórtex. Duas gotas da suspensão de esporos foram transferidas com micropipeta automática para a superfície de placas com meio ágar-água, seguido de espalhamento com alça de Drigalski esterilizada, e incubação das placas inclinadas por 24h a 25 ± 2 °C. Os conídios germinados foram transferidos para novas placas de Petri com meio de cultura BDA para obtenção de culturas puras e monospóricas (ALFENAS; MAFIA, 2007).

As culturas obtidas foram preservadas em papel filtro e sílica, dentro de microtubos de 1,5 mL, e mantidas em refrigerador a 4° C na coleção de fungos fitopatogênicos do Laboratório de Fitopatologia da UFPI (COUFPI).

3.2 Extração de DNA e amplificação por PCR

Os isolados foram cultivados em meio de cultura BDA e incubados a $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Os micélios foram raspados da superfície do meio e o DNA genômico foi extraído usando o protocolo de Möller *et al.* (1992) com modificações. Foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase, PCR (do inglês *polymerase chain reaction*), as regiões gênicas do espaçador transcrito interno (ITS) com os *primers* ITS1 e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990), da subunidade maior do gene rDNA (LSU) com os *primers* LROR e LR7 (VILGALYS; HESTER, 1990), e do gene actina (ACT) com os *primers* ACT-512F e ACT783R (CARBONE; KOHN, 1999) (Tabela 1). Cada reação consistiu de 10 μL de tampão *Taq* DNA polimerase; 2 μL de MgCl_2 ; 1 μL de dNTP Mix (100 nM), 1 μL de cada primer (*forward* e *reverse*) (40 μM); 0,4 μL (5 u/ μL) de *Taq* DNA polimerase, 1 μL de DNA e água ultrapura autoclavada (q.s.p. para 50 μL). As reações de PCR foram realizadas no termociclador automático Axygen (Axygen, Applied Biosystems, Foster City, EUA).

Tabela 1 Lista de *primers* usados para amplificar as sequências neste estudo.

Região gênica	Primer	Sequência (5' → 3')	Referência
ITS	ITS - 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> (1990)
	ITS - 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> (1990)
LSU	LROR	ACCCGCTGAACTTAAGC	Vilgalys; Hester (1990)
	LR7	TACTACCACCAAGATCT	Vilgalys; Hester (1990)
ACT	ACT - 512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	Carbone; Kohn (1999)
	ACT - 783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	Carbone; Kohn (1999)

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1 % em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5 (μM ou μL), intercalados com brometo de etídio e visualizadas sob luz ultravioleta no transiluminador UVB (Loccus do Brasil, São Paulo, Brasil). Os fragmentos amplificados foram editados e sequenciados em ambas as direções (*forward* e *reverse*) pela empresa Macrogen (Macrogen, Inc., Seul, Coréia do Sul), e os eletroferogramas foram analisados com o programa SeqAssem (HEPPERLE, 2004).

3.3 Análise filogenética

As sequências de DNA obtidas neste estudo foram inicialmente analisadas por BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) e otimizadas manualmente para assegurar a homologia posicional. Os *gaps* foram tratados como dados perdidos. Os alinhamentos múltiplos das sequências foram gerados através da ferramenta MUSCLE do programa

MEGA-X (KUMAR *et al.*, 2018). A Inferência Bayesiana foi realizada utilizando o programa MrBayes v 3.2.6 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). O programa MrModelTest v 2.3 foi utilizado para a determinação dos modelos de substituição nucleotídica mais apropriados ao alinhamento das sequências nucleotídicas das regiões gênicas ITS e LSU e gene ACT. As análises foram realizadas empregando o método de Monte Carlo via Cadeia de Markov (MCMC) - para gerar árvores filogenéticas com probabilidade posterior. As árvores foram amostradas ao acaso a cada 1000 gerações e 25% das árvores iniciais foram descartadas. As árvores foram editadas pelo programa Figtree 3.1 (RAMBAU, 2009). As sequências de referências das regiões ITS, LSU e ACT de espécies de *Colletotrichum*, disponíveis no GenBank, foram incluídas nas análises (Tab. 1). As sequências correspondentes às regiões ITS, LSU e ACT da espécie *Monilochaetes infuscans* (CBS 869.96) foram usadas como *outgroup*.

Os melhores modelos de substituição de nucleotídeos, selecionados de acordo com o “Akaike information criterion” (AIC), foram GTR+I+G para ITS e LSU, e HKY+I+G para ACT.

3.4 Caracterização morfológica

Um disco micelial de 5 mm de diâmetro da borda de colônia de 5 dias de idade foi transferido assepticamente para o centro de placas de Petri com meio de cultura BDA. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com três repetições para cada isolado. As placas foram incubadas em estufa tipo BOD a 25 ± 2 °C sob luz fluorescente contínua durante sete dias. Após esse período, foram avaliados a cor e o aspecto das culturas, tamanho e forma dos conídios dos isolados. A medição do crescimento da colônia foi feita com uso de régua milimetrada ao final de seis dias de crescimento após a repicagem, medindo-se o diâmetro da colônia em dois sentidos perpendiculares entre si.

Para observação do tamanho e forma dos conídios, massas de conídios de uma cultura esporulante foram raspadas e transferidas para superfície de cubos de ágar-água (10 mm²) postos sobre gotas de água destilada esterilizada em uma lâmina de microscópio, e em seguida cobertos com lamínula. As imagens dos conídios foram registradas com câmera digital Tucsen (Tucsen Imaging Technology Co. Ltd., Fuzhou, Fujian, PR China) acoplada ao microscópio Opton TNB-41T-PL conectado ao

computador com o software Tsview v. 6.13.2. As medidas (comprimento e largura) de 50 conídios por isolado foram obtidos com o software de análise de imagem MicroMeasure v. 3.3 (Universidade do Estado de Colorado, Colorado, EUA).

Para a obtenção de apressórios, conídios de culturas esporulantes foram inoculados em gotas de água destilada esterilizada na superfície de cubos de ágar-água (10 mm²) colocados em lâmina de microscópio esterilizada, cobertos com lamínula e incubados em placas de Petri sob condições de câmara úmida no escuro por até 24h. A seguir, as imagens dos apressórios foram obtidas com câmera digital descrita anteriormente. O comprimento e a largura de 10 apressórios de cada isolado foi medido com o software MicroMeasure v. 3.3.

Tabela 2 Isolados e sequências de *Colletotrichum* spp. usadas nas análises filogenéticas.

Nome da espécie	Número da cultura em coleção ^a	Hospedeiro	Origem	Número de acesso no GenBank ^b		
				ITS	ACT	LSU
<i>C. acutatum</i>	CBS 112996	<i>Carica papaya</i>	Austrália	JQ005776	JQ005839	MH874481
<i>C. agaves</i>	CBS 118190	<i>Agave striata</i>	México	DQ286221	-	DQ286222
<i>C. boninense</i>	CBS 123755	<i>Crinum asiaticum</i>	Japão	JQ005153	JQ005501	MH874855
<i>C. circinans</i>	CBS 221.81	<i>Allium cepa</i>	Sérvia	GU227855	GU227953	MH873089
<i>C. cliviae</i>	CBS 125375	<i>Clivia miniata</i>	China	MH863509	MG600939	MH874998
<i>C. colombiense</i>	CBS 129818	<i>Passiflora edulis</i>	Colômbia	MH865416	JQ005522	MH876878
<i>C. curcumae</i>	IMI 288937	<i>Curcuma longa</i>	Índia	GU227893	GU227991	-
<i>C. dematium</i>	CBS 125.25	<i>Eryngium camplestre</i>	França	GU227819	GU227917	MH866311
<i>C. destructivum</i>	CBS 136228	<i>Trifolium hybridum</i>	EUA	KM105207	KM105417	-
<i>C. doitungense</i>	MFLUCC 14-0128	<i>Dendrobium</i> sp.	Tailândia	MF448524	MH376385	-
<i>C. dracaenophilum</i>	CBS 118199	<i>Dracaena sanderana</i>	China	JX519222	JX519238	-
<i>C. dracaenophilum</i>	CBS 119360	<i>Dracaena</i> sp.	China	MG600711	-	DQ286208
<i>C. euphorbiae</i>	CBS 134725	<i>Euphorbia</i> sp.	África do Sul	KF777146	KF777125	-
<i>C. gloeosporioides</i>	CBS 112999	<i>Citrus sinensis</i>	Itália	JQ005152	JQ005500	-
<i>C. gloeosporioides</i>	CBS 119201	Orquídea	Jamaica	-	-	DQ286179
<i>C. graminicola</i>	M 1.001/ CBS 130836	<i>Zea mays</i>	EUA	JQ005767	JQ005830	-
<i>C. guizhouensis</i>	CGMCC 3.15112	desconhecido	desconhecido	JX625158	KC843536	-
<i>C. hippeastri</i>	CBS 125376	<i>Hippeastrum vittatum</i>	China	MH863510	JQ005579	MH874999
<i>C. ledebouriae</i>	CBS 141284	<i>Ledebouria floribunda</i>	África do Sul	KX228254	KX228357	-

Nome da espécie	Número da cultura em coleção ^a	Hospedeiro	Origem	Número de acesso no GenBank ^b		
				ITS	ACT	LSU
<i>C. liaoningense</i>	CGMCC 3.17616	<i>Chili pepper</i>	China	KP890104	KP890097	-
<i>C. lindemuthianum</i>	CBS 144.31	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Alemanha	JQ005779	JQ005842	MH866611
<i>C. lineola</i>	CBS 125337	Apiaceae	República Checa	GU227829	GU227927	MH875018
<i>C. magnisporum</i>	CBS 398.84	Desconhecido	desconhecido	KF687718	KF687803	-
<i>C. magnum</i>	CBS 519.97	<i>Citrullus lanatus</i>	EUA	MG600769	MG600973	-
<i>C. navitas</i>	CBS 125086	<i>Panicum virgatum</i>	EUA	JQ005769	JQ005832	-
<i>C. neosansevieriae</i>	CBS 139918	<i>Sansevieria trifasciata</i>	África do Sul	KR476747	KR476790	KR476780
<i>C. ocimi</i>	CBS 298.94	<i>Ocimum basilicum</i>	desconhecido	KM105222	KM105432	-
<i>C. orbiculare</i>	CBS 570.97	<i>Cucumis sativus</i>	desconhecido	KF178466	KF178563	-
<i>C. orchidearum</i>	CBS 135131	<i>Dendrobium nobile</i>	Holanda	MG600738	MG600944	-
<i>C. orchidis</i>	MFLUCC 17-1302	<i>Orchis</i> sp.	Itália	MK502144	MK486853	-
<i>C. phormii</i>	CBS 118194	<i>Phormium</i> sp.	Alemanha	JQ948446	JQ949767	MH877757
<i>C. pluvivorum</i>	CBS 125474	<i>Coffea</i> sp.	Vietnã	MG600718	MG600925	-
<i>C. sansevieriae</i>	MAFF 239721	<i>Sansevieria trifasciata</i>	Japão	LC179806	LC180127	-
<i>C. siamense</i>	MFLU 090230	<i>Coffea arabica</i>	Tailândia	FJ972613	FJ907423	-
<i>C. spaethianum</i>	CBS 167.49	<i>Funkia sieboldiana</i>	Alemanha	GU227807	GU227905	MH868015
<i>C. trichellum</i>	CBS 118198	<i>Hedera</i> sp.	Guatemala	GU227813	GU227911	DQ286153
<i>C. truncatum</i>	CBS 151.35	<i>Phaseolus lunatus</i>	EUA	GU227862	GU227960	MH867120
<i>C. vietnamense</i>	CBS 125478	<i>Coffea</i> sp.	Vietnã	KF687721	KF687792	MH875166
<i>C. yunnanense</i>	CBS 132135	<i>Buxus</i> sp.	China	JX546804	JX519239	MH877404

^aCBS: Culture collection of the CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; CGMCC: China General Microbiological Culture Collection; IMI: International Mycological Institute, CABI-Bioscience, Europe-UK, Egham, Boreham Lane; MFLUCC: Mae Fah Luang University Culture Collection, Chiang Rai, Thailand; BPI, US National Fungus Collections; MAFF: NIAS Genebank, Microorganism Section, Tsukuba, Japan; CPC: Working collection of Pedro W. Crous, housed at CBS, Utrecht, The Netherlands. ^bITS: internal transcribed spacer regions 1 and 2 including the 5.8S rRNA gene; ACT: actin gene; LSU: Large subunit ribosomal ribonucleic acid.

3.5 Teste de patogenicidade

Para obtenção das plantas, mudas clones de *A. angustifolia* com três meses de idade foram transplantadas para vasos de plásticos de 3,0 L contendo terra vegetal, mantendo-as em casa de vegetação. As plantas foram irrigadas diariamente e não foram fertilizadas durante o experimento.

Os isolados COUFPI 217 e COUFPI 219 foram cultivados em meio de cultura BDA por sete a 14 dias sob a temperatura de 25 ± 2 °C, com ciclo de alternância de 12 horas. Para a obtenção das suspensões de conídios, foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada à superfície do micélio crescido em meio de cultura, que foi em seguida suavemente raspado com alça de platina. As estruturas fúngicas em suspensão foram acondicionadas em béquer esterilizado. A suspensão foi filtrada através de duas camadas de gaze estéril. A concentração de conídios foi determinada em Câmara de Neubauer e ajustada para a concentração de 1×10^5 esporos / mL de água destilada esterilizada.

A inoculação dos isolados foi realizada por meio da aplicação das suspensões de conídios em folhas artificialmente feridas (ALFENAS; MAFIA, 2007). Foram feitos dois ferimentos: um na região distal, outro na região mediana da folha em todas as folhas das plantas que foram inoculadas. Foram inoculadas cinco plantas sadias para cada isolado. E outras cinco plantas foram usadas como testemunhas não inoculadas, que foram pulverizadas apenas com água destilada esterilizada. Após a inoculação, as plantas foram envolvidas em sacos plásticos, para manter a umidade alta, e mantidas a temperatura de 26 °C em sala climatizada. As câmaras úmidas foram removidas após 48h, e as plantas foram monitoradas, diariamente, quanto ao desenvolvimento dos sintomas.

O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado com 3 tratamentos (2 isolados de *Colletotrichum* e o controle) com cinco repetições por tratamento. A parcela experimental consistiu de um vaso com uma planta.

Visando completar os Postulados de Koch realizou-se o procedimento de reisolamento dos fungos a partir das folhas de plantas inoculadas, bem como das plantas testemunhas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise filogenética

Baseado nas análises filogenéticas das sequências ITS e LSU os isolados COUFPI 217 e COUFPI 219 agruparam no mesmo clado com o isolado referência de *C. agaves* (CBS 118190), com elevado suporte (Bpp=1,0) (Fig. 1), e próximos a *C. euphorbiae*, *C. neosansevieriae*, *C. ledebouriae* e *C. sansevieriae* (Fig. 1), os quais, juntos com *C. agaves*, formam o recém proposto complexo de espécies *Colletotrichum agaves* (BHUNJUN *et al.*, 2021).

Colletotrichum agaves foi descrito a partir de isolados obtidos de *Agave americana* da Holanda (CBS 318.79) e *Agave striata* do México (CBS 118190) (FARR *et al.*, 2006). Nesse estudo, além de *C. agaves*, foram observadas quatro outras espécies de *Colletotrichum* infectando plantas da família Agavaceae: *C. boninense*, *C. dracaenophilum*, *C. gloeosporioides* e *C. phormii*. Destas espécies, três parecem ser exclusivas de agaváceas: *C. agaves*, *C. dracaenophilum* e *C. phormii*. E *C. dracaenophilum* foi descrito como uma nova espécie para isolados com conídios longos ocorrendo em *Dracaena sanderiana* da China.

Na tentativa de gerar mais informação sobre os isolados COUFPI 217 e COUFPI 219, o gene ACT de ambos os isolados foi sequenciado. A análise filogenética revelou o agrupamento destes isolados com as demais espécies do complexo *Colletotrichum agaves* com elevado suporte (Bpp=1,0) (Fig. 2). Nessa análise, os isolados COUFPI 217 e COUFPI 219 permaneceram juntos, mas separados das outras espécies, ou seja, não agruparam com nenhuma outra espécie além de *C. agaves* (Fig. 2). A ausência de sequências do gene ACT dos holótipos de *C. agaves* impossibilita a análise filogenética mais acurada, uma vez que as regiões gênicas ITS e LSU são menos informativas quando comparadas aos genes *housekeeping*, como actina, histona, β -tubulina dentre outros. Apenas dois isolados de *C. agaves* foram descritos no mundo, e apenas sequências das regiões gênicas ITS e LSU estão disponíveis no GenBank (DQ286219 a DQ286222). Portanto, é notória a lacuna de informação genética de *C. agaves*. O sequenciamento de genes *housekeeping* dos isolados referência (holótipos) de *C. agaves* permitiria confirmar o posicionamento taxonômico desta espécie.

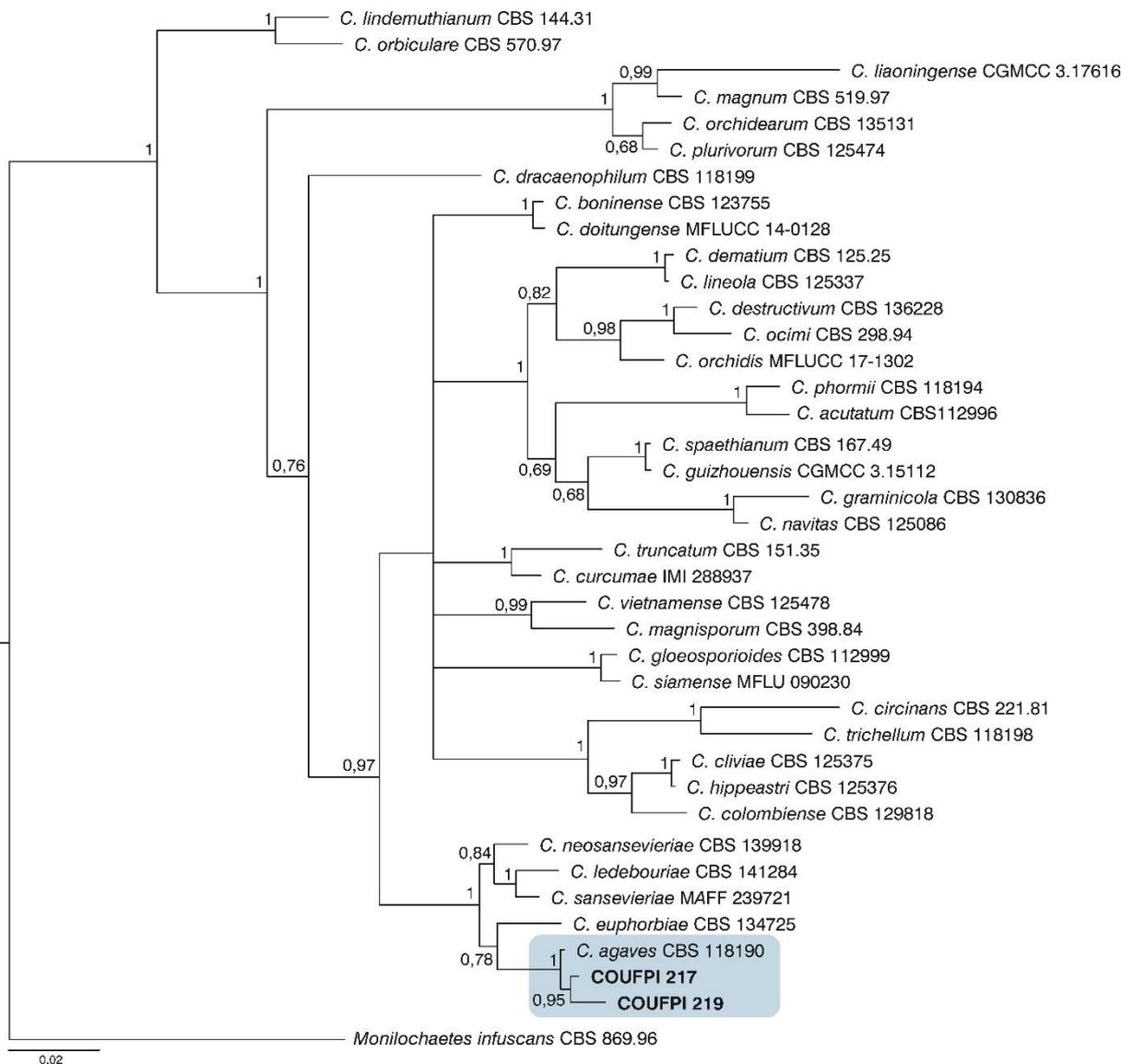


Figura 1. Árvore filogenética bayesiana de isolados de *Colletotrichum agaves* de *Agave angustifolia*. A árvore foi construída usando sequências concatenadas das regiões gênicas ITS e LSU. Os valores de probabilidade posterior bayesiana são indicados acima dos nós. As sequências geradas neste estudo estão destacadas em negrito. A análise foi realizada com sequências de culturas ex-tipo ou autênticas. A barra da escala (0,02) representa substituições de nucleotídeos por sítio. A árvore está enraizada com *Monilochaetes infuscans*.

Possivelmente em razão do pequeno número de isolados de *C. agaves* descritos, e da escassez de sequências de DNA disponíveis, esta espécie tenha recebido pouca atenção dos micologistas/sistematas.

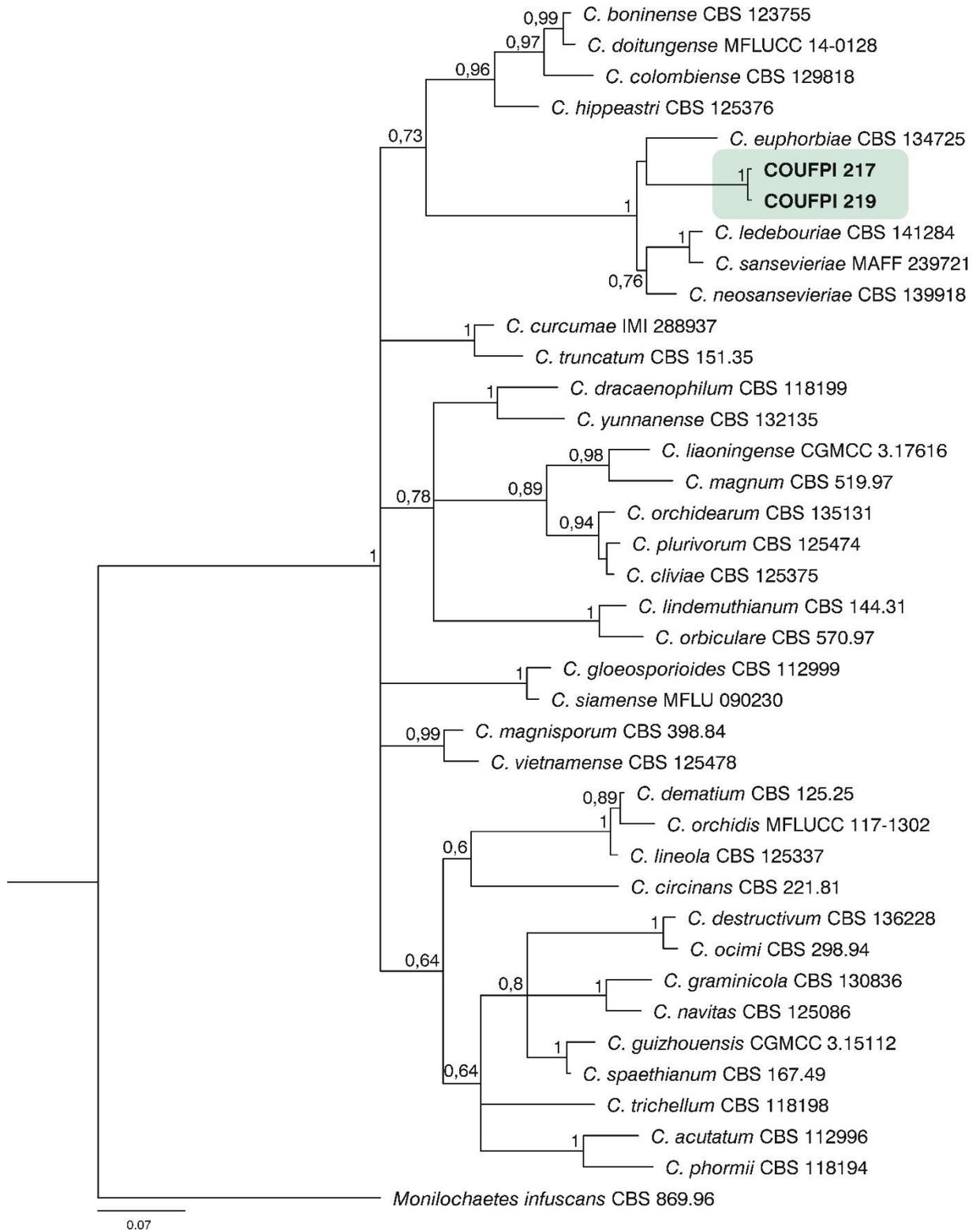


Figura 2. Árvore filogenética bayesiana de isolados de *Colletotrichum agaves* de *Agave angustifolia*. A árvore foi construída usando sequências do gene ACT. Os valores de probabilidade posterior bayesiana são indicados acima dos nós. As sequências geradas neste estudo estão destacadas em negrito. A análise foi realizada com sequências de culturas ex-tipo ou autênticas. A barra da escala (0,07) representa substituições de nucleotídeos por sítio. A árvore está enraizada com *Monilochaetes infuscans*.

4.2 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica dos isolados revelou fungos com micélio aéreo aveludado de coloração creme, reverso marrom, de crescimento concêntrico e margens lisas e onduladas (Fig. 3 C, D). Os conidiomatas apresentaram a coloração levemente marrom em ambos os isolados.

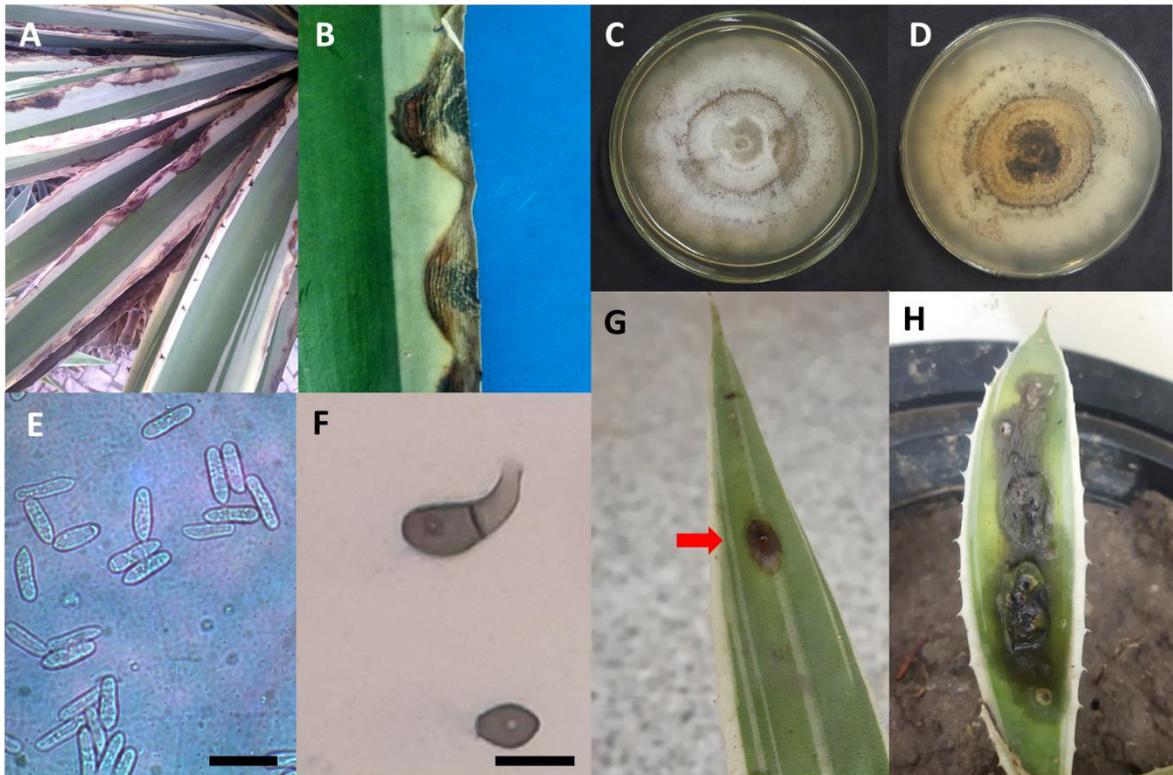


Figura 3. *Colletotrichum agaves* (COUFPI 219) em *Agave angustifolia*. Sintomas em folhas naturalmente infectadas (A, B). Verso (C) e reverso (D) do fungo em meio de cultura BDA. Conídios (E). Apressórios (F). Sintomas nas folhas inoculadas ao 3^o (G) e 8^o (H) dias após a inoculação. Barras: 20 μ m (E); 10 μ m (F).

Os conídios produzidos por ambos os isolados foram hialinos, asseptados, com formato cilíndrico, com extremidades arredondadas e, às vezes, com uma das extremidades aguda (Fig. 3E). Os conídios apresentaram comprimento médio de 16,3 μ m (12,2-20,8) e largura de 3,9 μ m (3,0-4,2).

Os apressórios (Fig. 3F) são arredondados (ovoides) e lisos (margens sem ondulações) ou subglobosos; apresentaram comprimento médio de 10,0 μ m (6,7-14,7) e largura de 6,3 μ m (4,9-10,4). Não foram observados peritécios, ascósporos e setas em nenhum dos isolados.

Os isolados de *C. agaves* descritos por Farr *et al.* (2006) possuem conídios com dimensões (23,5 x 6,5 µm) superiores às das dos isolados COUFPI 217 e COUFPI 219. Além disso, não foi observada a produção de setas em meio de cultura pelos isolados COUFPI 217 e COUFPI 219, em contraste ao observado por Farr *et al.* (2006), os quais observaram numerosas setas nos acérvulos em meio de cultura ágar-água. Aos seis dias de crescimento, os isolados COUFPI 217 e COUFPI 219 apresentaram colônias de 3 a 4 cm de diâmetro. Os isolados de *C. agaves* caracterizados por Farr *et al.* (2006) apresentaram crescimento de 3,7 a 4,2 cm no mesmo período. A causa das variações descritas acima permanece inexplicada. Para esclarecer essa questão, é necessária a caracterização morfológica de maior número de isolados de *C. agaves*.

4.3 Teste de patogenicidade

Os isolados COUFPI 217 e COUFPI 219, obtidos de lesões necróticas de folhas de *A. angustifolia* (Fig. 3A, B), foram patogênicos quando inoculados em mudas sadias desta espécie, causando lesões necróticas, de coloração preta, que se tornaram deprimidas conforme a colonização do tecido. Os sintomas surgiram 2 dias após a inoculação (D.A.I.), com o surgimento de lesões pretas e circulares no tecido (Fig. 3G). Aos 4 DAI as lesões tornaram-se deprimidas e aumentaram rapidamente de tamanho. A partir do 8° DAI pode-se observar a coalescência das lesões, fazendo com que mais da metade da folha se tornasse sintomática (Fig. 3H). No 11° DAI os sintomas alcançaram o colo da planta, ocasionando a morte do órgão. Pôde-se constatar, portanto, a elevada agressividade dos isolados fúngicos em causar doença em *A. angustifolia*, devido a precocidade no surgimento e no rápido desenvolvimento dos sintomas.

Nenhum sintoma foi observado nas plantas utilizadas como testemunhas. *C. agaves* foi reisolado de todas as plantas inoculadas, completando os Postulados de Koch. Com a exceção do presente estudo, de acordo com Jayawardena *et al.* (2021) não são conhecidos testes de patogenicidade de *C. agaves*. Nenhuma outra espécie fúngica foi isolada das plantas inoculadas ou não inoculadas.

5 CONCLUSÕES

Por meio do uso de marcadores morfológicos, filogenia das regiões gênicas ITS, LSU e ACT, e teste de patogenicidade, é possível concluir que *C. agaves* é o agente causal da antracnose observada em *A. angustifolia* coletada em Teresina, Piauí.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007. 382 p.

ALLSOPP, P.; POSSEMIERS, S.; CAMPBELL, D.; OYARZÁBAL, I. V.; GILL, C.; ROWLAND, I. An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from *Agave angustifolia* and the associated anticancer activity. **Anaerobe**, v. 22, p. 38-44, 2013.

ANDRADE, R.; ORNELAS, J.; BRANDÃO, W. Situação atual do sisal na Bahia e suas novas possibilidades de utilização e aproveitamento. **Comunicação SEAGRI**, 2012.

APG III. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.161, ed. 2, p. 105-121, 2009.

ÁVILA-MIRANDA, M. E.; LÓPEZ-ZAZUETA, C. A-C.; RODRÍGUES-MENDIOLA, M. A.; GUZMÁN-de PEÑA, D. A.; VERA-NÚÑEZ, J. A.; PEÑA-CABRIALES, J. J. Vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* in agave (*Agave tequilana* Weber var. azul). **Journal of the Professional Association for Cactus Development**, v. 12, p. 166-180, 2010.

BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum**: biology, pathology and control. Wallingford: Centre for Agriculture and Biosciences International, p. 167-185, 1992.

BAILEY, J. A.; O'CONNELL, R. J.; PRING, R. J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum**: biology, pathology and control. Wallingford: Centre for Agriculture and Biosciences International, p.88-120, 1992.

BENSCH, K.; BRAUN, U.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The genus *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, v. 72, p. 1-401, 2021.

BHUNJUN, C. S.; CHAYANARD, P.; RUVISHIKA, S. J.; RAJESH, J.; ITTHAYAKORN, P.; KEVIN, D. H. Investigating species boundaries in *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v. 107, p.107-127, 2021.

BOCK, K. R. Diseases of sisal. **World Crops**, v.17, n.1, p.64-67, 1965.

CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; WALLER, J. M.; ABANG, M. M.; ZHANG, J. Z.; YANG, Y. L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z. Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R. G.; McJENZIE, E. H. C.; JOHNSTON, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*, **Fungal Diversity**, v. 39, p. 183-204, 2009.

CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 181-213, 2012.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, n. 3, p. 553–556, 1999.

CARDOSO, J. E.; FREIRE, F. C. O. Identificação e manejo das principais doenças. In: MELO, Q. M. S. (Org). **Caju fitossanidade**. Brasília: Embrapa, 2002. p.41-51 (Frutas do Brasil), 2002.

CASTAÑEDA-NAVA, J. J.; RODRÍGUEZ-DOMÍNGUEZ, J. M.; CAMACHO-RUIZ, R. M.; GALLARDO-VALDEZ, J.; VILLEGAS-GARCÍA, E.; GUTIÉRREZ-MORA, A. Morphological comparison among populations of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck (Asparagaceae), a species used for mezcal production in Mexico. **Flora**, v. 225, p. 18-25, 2019.

COLUNGA-GARCÍAMARÍN, P.; ESTRADA-LOERA, E.; MAY-PAT, F. Patterns of morphological variation, diversity, and domestication of wild and cultivated populations of Agave in Yucatán, Mexico. **American Journal of Botany**, v. 83, p. 1537-2197, 1996.

CORIA-CONTRERAS, J. J.; MORA-AGUILERA, G.; YÁÑES-MORALES, M. J.; ACEVEDO-SÁNCHEZ, G.; SANTANA-PEÑALOZA, B.; MENDOZA-RAMOS, C.; JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, L.; MARTÍNEZ-BUSTANAMANTE, V. I.; GARCÍA-MARTÍNEZ, D, C.; RUBIO-CORTÉS, R. Applied regional epidemiology to inductive characterization and forecasting of blue agave gray-spot (*Cercospora agavicola*) in Jalisco, Mexico. **Mexican Journal of Phytopathology**, v. 37, p. 71-94, 2019.

COUTINHO, W. M.; SUASSUNA, N. D.; LUZ, C. M.; SUINAGA, F. A.; SILVA, O. R. R. F. Bole rot of sisal caused by *Aspergillus niger* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 605, 2006.

CROUCH, J. A.; O'CONNELL, R.; GAN, P.; BUIATE, E. *et al.* The genomics of *Colletotrichum*. **Genomics of plant-associated fungi, monocot pathogens**, Springer, Berlin, Heidelberg, p. 69-102, 2014.

CRT (2010). Actualización de la base de datos y diagnostico fitosanitario de *Agave tequilana* Weber var. azul en la denominación de origen tequila. **Comité Técnico Agronómico**, 2010.

DA SILVA, L. L.; MORENO, H. L. A.; CORREIA, H. L. N.; SANTANA, M. F.; DE QUEIROZ, M. V. *Colletotrichum*: species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 1891-1904, 2020.

DE SILVA, D. D.; CROUS, P. W.; ADES, P. K.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J. Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, p. 155-168, 2017.

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

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S.; TAN, Y. P.; SHIVAS, R. G.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 1-36, 2012b.

DAMM, U.; SATO, T.; ALIZADEH, A.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. **Studies in Mycology**, v. 92, p.1-46, 2019.

DAVIS, S. C.; SIMPSON, J.; GIL-VEGA, K. C.; NIECHAYEV, N. A.; TONGERLO, E.; CASTANO, N. H.; DEVER, L. V.; BÚRQUEZ, A. Undervalued potential of crassulacean acid metabolism for current and future agricultural production. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 22, p. 6521-6537, 2019.

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

DUARTE, E. A. A.; DAMASCENO, C. L.; de OLIVEIRA, T. A. S.; BARBOSA, L. de O.; MARTINS, F. M.; SILVA, J. R. Q.; de LIMA, T. E. F.; da SILVA, R. M.; KATO, R. B.; BORTOLINI, D. E.; AZEVEDO, V.; GÓES-NETO, A.; SOARES, A. C. F. Putting the Mess in Order: *Aspergillus welwitschiae* (and Not *A. niger*) Is the Etiological Agent of Sisal Bole Rot Disease in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-21, 2018.

DUQUE-BAUTISTA, H.; VÁSQUEZ, G. G. Z.; HERNÁNDEZ, Y. P.; RUANO, N. V. Etiology of a black spot symptom in *Agave angustifolia*: An *in vitro* approach towards its biological control. **Mexican Journal of Phytopathology**, v. 35, p. 326-337, 2017.

ESPINOSA-ANDREWS, H.; URÍAS-SILVAS, J. E.; MORALES-HERNÁNDEZ. The role of agave fructans in health and food applications: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 114, p. 585-598, 2021

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. Fungal databases: fungus-host distributions [on line]. Beltsville: Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS-USDA, 2021. Disponível em: <<http://nt.arsgrin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm>>. Acesso em: 30 mai. 2021.

FARR, D. F.; AIME, M. C.; ROSSMAN, A. Y.; PALM, M. E. Species of *Colletotrichum* on *Agavaceae*. **Mycological Research**, v. 110, p.1395-1408, 2006.

FREEMAN, E.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, v. 82, n. 6, p. 596-605, 1998.

FREEMAN, S. Genetic diversity and host specificity of *Colletotrichum* species on various fruits. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. **Colletotrichum: host specificity, pathology and host-pathogen interaction**. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, p. 131-144, 2000.

- GAN, P.; IKEDA, K.; IRIEDA, H.; NARUSAKA, M.; O'CONNELL, R. J.; NARUSAKA, Y.; TAKANO, Y.; KUBO, Y.; SHIRASU, K. Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. **New Phytologist**, v. 197, p. 1236-1249, 2013.
- GAN, P.; NARUSAKA, M.; KUMAKURA, N.; TSUSHIMA, A.; TAKANO, Y.; NARUSAKA, Y.; SHIRASU, K. Genus-wide comparative genome analyses of *Colletotrichum* species reveal specific gene family losses and gains during adaptation to specific infection lifestyles. **Genome Biology and Evolution**, v. 8, p. 1467-1481, 2016.
- GAN, P.; TSUSHIMA, A.; NARUSAKA, M.; NARUSAKA, Y.; TAKANO, Y.; KUBO, Y.; SHIRASU, K. Genome sequence resources for four phytopathogenic fungi from the *Colletotrichum orbiculare* species complex. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.32, p. 1088-1090, 2019.
- GARCÍA-MENDOZA, A. Distribution of the genus *Agave* (Agavaceae) and its endemic species in Mexico. **Cactus and Succulent Journal**, v. 74, p. 177-187, 2002.
- GARCÍA-MENDOZA, A. J. Los Agaves del Mexico. **Ciencias**, v. 87, p. 14-23, 2007.
- GARCÍA-MENDOZA, A. J. **Agavaceae. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán**. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, 88 (2011), pp. 1-95.
- GARCÍA-MENDOZA, A. J; MARTÍNEZ, I. S. F.; GUTIÉRREZ, D. S. Four new species of *Agave* (Asparagaceae, Agavoideae) from southern Mexico. **Acta Botanica Mexicana**, v. 126: e1461, 2019.
- GENTRY, H. S. **Agaves of continental North America**. Tucson, AZ: The University of Arizona Press, 670p. 1982.
- HEPPERLE, D. (2004) **SeqAssem©: Win32-Version. A sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences**. Disponível em: <http://www.sequentix.de>
- HYDE, K. D.; CAI, L.; MCKENZIE, E. H. C.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z.; PRIHASTUTI, H. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 1-17, 2009.
- Index Fungorum (2020). Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>>. Acesso em: 25.05.2021.
- JAYAWARDENA, R. S.; HYDE, K. D.; DAMM, U.; CAI, L.; LIU, M.; LI, X. H.; ZHANG, W.; ZHAO, W. S.; YAN, J. Y. Notes on currently accepted species of *Colletotrichum*. **Mycosphere**, v. 7, n. 8, p.1192-1260, 2016.
- JAYAWARDENA, R. S.; HYDE, K. D.; CHEN, Y. J.; PAPP, V.; PALLA, B.; PAPP, D.; BHUNJUN, C. S.; HURDEAL, V. G.; SENWANNA, C.; MANAWASINGHE, I. S.;

HARISCHANDRA, D. L.; GAUTAM, A. K.; AVASTHI, S.; CHUANKID, B.; GOONASEKARA, I. D.; HONGSANAN, S.; ZENG, X. Y.; LIYANAGE, K. K.; LIU, N.; KARUNARATHNA, A.; HAPUARACHCHI, K. K.; LUANGHARN, T.; RASPE, O.; BRAHMANAGE, R.; DOILOM, M.; LEE, H. B.; MEI, L.; JEEWON, R.; HUANRALUEK, N.; CHAIWAN, N.; STADLER, M.; WANG, Y. One stop shop IV: taxonomic update with molecular phylogeny for important phytopathogenic genera: 76-100 (2020). **Fungal Diversity**, v. 103, p. 87-218, 2020.

JAYAWARDENA, R. S.; BHUNJUN, C. S.; HYDE, K. D.; GENTEKAKI, E.; ITTHAYAKORN, P. *Colletotrichum*: lifestyles, biology, morpho-species, species complexes and accepted species. **Mycosphere**, v. 12, n.1, p. 519-669, 2021.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHU, M. J. **Sistemática Vegetal - Um Enfoque Filogenético**. 3 ed. – Porto Alegre: Artmed, 2009. 632 p.: il. color.; 28 cm.

KHAN, A.; HSIANG, T. The infection process of *Colletotrichum graminicola* and relative aggressiveness on four turfgrass species. **Canadian Journal of Microbiology**, n.49, 433-442, 2003.

KLEEMANN, J.; RINCON-RIVERA L. J.; TAKAHARA, H.; NEUMANN, U.; THEMAAT E. V. L. et al. Sequential de efetores de virulência induzida pelo hospedeiro por apressórios e hifas intracelulares do fitopatôgeno *Colletotrichum higginsianum*. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, e1002643, 2012.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology Evolution**, v. 35, p. 1547-1549, 2018.

LALUK, K.; MENGISTE, T. **Necrotroph attacks on plants, wanton destruction or covert extortion?** The *Arabidopsis* Book/American Society of Plant Biologists, v. 8, 2010.

LIAO, C. Y.; CHEN, M. Y.; CHEN, Y. K.; KUO, K. C.; CHUNG K. R.; LE, M. H. Formation of highly branched hyphae by *Colletotrichum acutatum* within the fruit cuticles of *Capsicum* spp. **Plant Pathology**, v. 61, n. 2, p. 262-270, 2012.

LIMA, G. O. **Pulque e balchê pajauaru**. Na Etnobiologia das bebidas e dos alimentos fermentados. Universidade Federal de Pernambuco, 405p. 1975.

LIMA, E. F.; MOREIRA, J. A. N.; BATISTA, F. A. S.; SILVA, O. R. R. F.; FARIAS, F. J. C.; RAÚJO, A. M. Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perrine) causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v.2, n.2, p.109-112, 1998.

LÓPEZ-BAUTISTA, V.; MORA-AGUILERA, G.; GUITIÉRREZ-ESPINOSA, J.; MENDOZA-RAMOS, C.; MARTÍNÉZ-BUSTAMANTE, V. I.; CORIA-CONTRERAS, J. J.; ACEVEDO-SÁNCHEZ, G.; SANTANA-PENA-LOZA, B. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated to the regional occurrence of

wilt and dry bud rot in *Agave tequilana*. **Mexican Journal of Phytopathology**, v. 38, n. 1, p. 79-106, 2020.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas Ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3º edição. Nova Odesa, SP: Instituto Plantarum, p.1088, 2001.

MARÍN-FELIX, Y.; GROENEWALD, J.Z.; CAI, L.; CHEN, Q.; MARINCOWITZ, S.; BARNES, I.; BENSCH, K.; BRAUN, U.; CAMPORESI, E.; DAMM, U.; de BEER, Z. W.; DISSANAYAKE, A.; EDWARDS, J.; GIRALDO, A.; HERNANDEZ-RESTREPO, M.; HYDE, K. D.; JAYAWARDENA, R. S.; LOMBARD, L.; LUANGSA-ARD, J.; McTAGGART, A. R.; ROSSMAN, A. Y.; SANDOVAL-DENIS, M.; SHEN, M.; SHIVAS, R. G.; TAN, Y. P.; van der LINDE, L. J.; WINGFIELD, M. J.; WOOD, A. R.; ZHANG, J. Q.; ZHANG, Y.; CROUS, P. W. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. **Studies in Mycology**, v. 86, p.99-216, 2017.

MEDINA, J. C. **O Sisal**. Secretaria da agricultura. Diretoria de Publicidade Agrícola. São Paulo, 286p. 1954.

MÖLLER, E. M.; BAHNWEIG, G.; SANDERMANN, H.; GEIGER, H. H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p. 6115-6116, 1992.

MÜLLER, L. E.; SCHIEDECK, G. Physical properties of botanical surfactants. **Science of the Total Environment**, 610-611, p. 1133–1137, 2018

O'CONNELL, R. J.; PERFECT, S.; HUGHES, B.; CARZANIGA, R.; BAILEY, J. A. *et al.* **Dissecando a biologia celular dos processos de infecção por *Colletotrichum***. In: *Colletotrichum*. Hospedeiro Especificidade, Patologia e interação hospedeiro-patógeno (PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B, eds). APS Press, St Paul, USA, p. 57-77, 2000.

O'CONNELL, R. J.; PERFECT, S.; HUGHES, B.; CARZANIGA, R.; BAILEY, J. A.; GREEN, J. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. In: O'CONNELL, R. J.; THON, M. R.; HACQUARD, S.; AMYOTTE, S. G.; KLEEMANN, J. Life-style transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**, v. 44, n. 9, p. 1060-1067, 2012.

PATRO, R. Piteira-do-caribe – *Agave angustifolia*. Jardineiro.net, 2014. Disponível em:< <https://www.jardineiro.net/plantas/piteira-do-caribe-agave-angustifolia.html>>. Acesso em: 23 de jul. 2021

PÉREZ-ZAVALA, M. L.; ARZABA, J. C. H.; BIDESHI, D. K.; CORONA, J. E. B. Agave: a natural renewable resource with multiple applications. **Journal Science Food Agriculture**, v. 100, p. 5324-5333, 2020.

PERFECT, S. E.; HUGHES, H. B.; O'CONNELL, R. J.; GREEN, J. R. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, n. 2-3, p. 186-198, 1999.

PEREIRA, G. M.; RIBEIRO, M. G.; SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. Structural characterization of a new steroidal saponin from *Agave angustifolia* var. Marginata and a preliminary investigation of its in vivo antiulcerogenic activity and in vitro membrane permeability property. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, p. 4345-4349, 2017.

PÉREZ-LÓPEZ, A. V.; SIMPSON, J. The sweet taste of adapting to the desert: fructan metabolism in *Agave* species. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1-5, 2020.

PHOULIVONG, S. *Colletotrichum*, naming, control, resistance, biocontrol of weeds and current challenges. **Current Research in Environmental and Applied Mycology**, v. 1, n. 1, p. 53-73, 2011.

PRINS, T. W.; TUDZYNSKI, P.; VON TIEDEMANN, A.; TUDZYNSKI, B. Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. **Fungal Pathology**, p. 33-64, 2000.

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

QUEIROGA, V. P.; SILVA, O. R. R. F.; MEDEIROS, G. C.; FRANCO, C. F. O. **Sisal (Agave sisalana, Perrine), tecnologias de plantio e utilização**. Associação da Revista Eletrônica, a Barriguda-AREPB, 1 edição, 218p. 2021.

QUEIROGA, V. P.; GONDIM, T. M. S.; MEDEIROS, J. C.; FIGUEIREDO NETO, A. (Eds.). **Agave americana L. Tecnologias de plantio e produção de pulque**. Campina Grande: AREPB, 1 edição, 189 p. 2020.

RAMBAU, T. A. **Figtree 3.1**. Versão 1, 2009. Disponível em: <<http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/FigTree-AR.shtml>>. Acesso em 22 jun. 2021.

RAMÍREZ-RAMÍREZ, M. J.; MANCILLA-MARGALLI, N. A.; MEZA-ÁLVAREZ, L.; TURINCIO-TADEO, R.; GUZMÁN-de PEÑA, D.; AVILA-MIRANDA, M. E. Epidemiology of *Fusarium* agave wilt in *Agave tequilana* Weber var. azul. **Plant Protection Science**, v. 53, p. 144-152, 2017.

RATANACHERDCHAI, K.; WANG, H.; LIN, F.; SOYTONG, K. ISSR for comparison of cross-inoculation potential of *Colletotrichum capsici* causing chili anthracnose. **Microbiology Research**, v. 4, n. 1, p. 76-83, 2010.

RONQUIST, F.; HUELSENENCK, J. P. MrBayes3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v.19, p. 1572-1574, 2003.

RUBIO-CORTÉS, R. Enfermedades del cultivo de agave. In: RULFO V., F. O. *et al.* (ed) 2007. Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona con denominación de origen del tequila. Instituto Nacional de Investigadores Forestales y pecuarias. Centro de Investigación Regional Pacífico Centro. **Libro técnico**, n.4, p.169-195, 2007.

SANTIAGO-GARCÍA, P. A.; MELLADO-MOJICA, E.; LEÓN-MARTÍNEZ, F. M.; DZUL-CAUICH, J. G.; LÓPEZ, M. G.; GARCÍA-VIEYRA, I. Fructans (agavins) from *Agave angustifolia* and *Agave potatorum* as fat replacement in yogurt: Effects on physicochemical, rheological, and sensory properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 140, p. 1-11, 2021.

SANTIAGO-GARCÍA, P. A.; MELLADO-MOJICA, E.; LEÓN-MARTÍNEZ, F. M.; LÓPEZ, M. G. Evaluation of *Agave angustifolia* fructans as fat replacer in the cookies manufacture. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 100-109, 2017.

SANTOS FILHO, H. P.; BARBOSA C. J.; NICKEL, O. **Doenças do cajueiro**. In: FREIRE, F. C. O. CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P. Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial. Brasília: Embrapa, p.391-334, 2003.

SANTOS, E. M. C.; SILVA, O. A. Sisal na Bahia-Brasil. **Mercator (Fortaleza)**, v.16, 2018.

SILVA, O. R. R. F.; BELTRÃO, N. E. M. **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília, Distrito Federal, Embrapa, 205 p. 1999.

SILVA, O. R. R. F.; COUTINHO, W. M.; CARTAXO, W. V.; SOFIATTI, V.; SILVA FILHO, J. L.; CARVALHO, O. S.; COSTA, L. B. **Cultivo do Sisal no Nordeste Brasileiro**. Circular Técnica 123. Embrapa Algodão. Campina Grande, Paraíba, 25p. 2008.

SUINAGA, F. A.; SILVA, O. R. R. F.; COUTINHO, W. M. **Cultivo de sisal na região Semiárida do Nordeste Brasileiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão, (Sistemas de Produção, n. 5), 44 p. 2006.

SUINAGA, F. A.; COUTINHO, W. M.; SILVA, O. R. R. F. **Árvore de conhecimento sisal**. Brasília-DF, 2019. Disponível em: <<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/sisal/arvore/CONT000gv5km0x602wx7ha0g934vg0sbdksz.html>>. Acesso em: 18.05.2021

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

TAVARES, G. T. P.; GALVÃO, A. G. L. *Agave tequilana* (Asparagaceae): construindo valores ao semiárido, RN, Brasil. IN: **VI Congresso Nacional de Educação- CONEDU**. Avaliação: Processos e Políticas. Fortaleza-CE, 2019.

VEGA-RAMOS, K. L.; XAVIER, J. U. B.; GÓMEZ-LEYA, J. Molecular variability among isolates of *Fusarium oxysporum* associated with root rot disease of *Agave tequilana*. **Biochemical Genetics**, v. 51, p. 243-255, 2013.

VIEIRA, W. A.; BEZERRA, P. A.; DA SILVA, A. C.; VELOSO, J. S.; CÂMARA, M. P. S.; DOYLE, V. P. Optimal markers for the identification of *Colletotrichum* species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 143, p. 106694, 2020.

VILGALYS, R.; HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 4238-4246, 1990.

WALLER, J. M. *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. England. Wallingford: CAB International, p. 167-185, 1992.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. J. W. T.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SHINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.) **PCR Protocols: A guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

ZEILINGER, S.; GUPTA, V. K.; DAHMS, T. E.; SILVA R. N. Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, p.182-207, 2016.