



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

TESE DE DOUTORADO

MAL-DO-PÉ DA BATATA-DOCE NO NORDESTE DO BRASIL: DIVERSIDADE DE PATÓGENOS E CONTROLE BIOLÓGICO

THAÍS REGINA PINTINO DE ALMEIDA

**Recife – PE
2023**

THAÍS REGINA PINTINO DE ALMEIDA

**MAL-DO-PÉ DA BATATA-DOCE NO NORDESTE DO
BRASIL: DIVERSIDADE DE PATÓGENOS E CONTROLE
BIOLÓGICO**

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador (a): Delson Laranjeira

Coorientadores: Marcos Paz Saraiva Câmara e Rejane Pereira Neves

**RECIFE-PE
FEVEREIRO - 2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A447m DE ALMEIDA, THAÍS REGINA PINTINO
Mal-do-pé da batata-doce no Brasil: diversidade de patógenos e controle biológico / THAÍS REGINA PINTINO DE ALMEIDA. - 2023.
98 f. : il.

Orientador: Delson Laranjeira.
Coorientador: Marcos Paz Saraiva .
Inclui referências e anexo(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, 2023.

1. Biocontrole. 2. Leveduras . 3. Ipomoea batatas . 4. Podridão. I. Laranjeira, Delson, orient. II. , Marcos Paz Saraiva, coorient. III. Título

MAL-DO-PÉ DA BATATA-DOCE NO NORDESTE DO BRASIL: DIVERSIDADE DE PATÓGENOS E CONTROLE BIOLÓGICO

THAÍS REGINA PINTINO DE ALMEIDA

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 07/02/2023.

ORIENTADOR: _____
Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)

EXAMINADORES: _____
Prof. Dr^a. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)

Dr^a. Iwanne Lima Coelho (UFRPE)

Dr^a. Tarciana Silva dos Santos (CETENE - PE)

Prof. Dr. Paulo Roberto Gagliardi (UFS)

**RECIFE-PE
FEVEREIRO - 2023**

A Deus, por iluminar meus caminhos e guiar meus passos e por estar comigo em todas as dificuldades, mostrando-me que cada obstáculo me fortaleceu nessa caminhada.

Aos meus pais, Roberto e Marinalva, por acreditarem em mim, mesmo quando eu não acreditava, por nunca me deixarem fraquejar, por sempre me incentivarem a ir atrás dos meus sonhos, em especial minha mãe, por todas as noites em claro estudando comigo e por toda ajuda durante os experimentos.

DEDICO

Ao meu namorado, Andrey Thyago, por todo apoio dado durante as etapas experimentais e por estar ao meu lado nos momentos bons ou ruins.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para o alcance deste degrau.

OFEREÇO

Em memória de minha madrinha Laudicéa, que esteve presente durante toda minha trajetória estudantil, me apoiou, aconselhou, incentivou, protegeu e nunca me deixou.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo cuidado, amparo, força, amor, direção, paciência e livramentos concedidos, permitindo minha existência e meu trajeto por esse caminho.

Aos meus pais, Roberto e Marinalva, pelos ensinamentos, amor, incentivo, apoio e confiança. Se eu cheguei até aqui, devo tudo a eles.

Ao Dr. Delson Laranjeira, pela orientação e aos Doutores Marcos Paz Saraiva Câmara e Rejane Pereira Neves pela coorientação, bem como a todos os professores do programa por todos os ensinamentos repassados durante a minha permanência no Curso de Pós-Graduação em Fitopatologia (UFRPE).

À Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE pelo apoio institucional e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus irmãos e familiares, que sempre demonstraram desejos positivos, rezaram e torceram pelo meu sucesso.

Ao meu namorado, Andrey Thyago que esteve ao meu lado em todos os momentos, pelo apoio, carinho e confiança e a toda sua família.

Aos meus PETs, Perseu, Princesa e Malhada, por estarem sempre ao meu lado e por todo amor que têm por mim.

Ao meu padrinho Fernando e minha madrinha Laurenice, por estarem sempre presentes em todas as etapas da minha vida.

Aos meus amigos Patrícia, Jhonatha, Felipe, Leonam, por todo companheirismo e auxílio em todos os momentos.

À família LAFSOL, pelos cafés, conversas e acolhimento, em especial, Elder, Letícia e Danúbia, por toda ajuda nos experimentos, inclusive pelas madrugadas e deslocamentos para montar os experimentos em minha casa.

Ao presidente da Cooperativa de Produtores de Moita Bonita, José Joelito, aos técnicos do IPA das cidades de Palmares, Belém de Maria, Bonito e Lagoa dos Gatos e aos agricultores pela contribuição com material vegetal utilizados neste trabalho.

À Maria do Carmo, Edivânia, Glaucia, Abia, Luís Coelho e Luís pela companhia e palavras de fé durante os experimentos e aos funcionários Romildo de Darci, pela amizade, atenção e suporte durante o curso.

À Psicóloga Adejane Gouveia e ao Neurologista Raphael Ramos, por toda paciência, conselhos e acompanhamento da minha saúde, física e mental, e por não me deixarem
desistir.

*Em muitos momentos nos sentimos sozinhos,
achamos que nada dará certo.
Mas são nestes momentos que reconhecemos o
amor das pessoas que estão ao nosso lado e
nos conectamos mais com Deus.
Com fé e força de coragem, superamos todos
os obstáculos e alcançamos aquilo que tanto
desejamos, afinal:
“Se Deus é por nós, quem será contra nós?”
(Romanos 8:31)*

Sumário

RESUMO GERAL.....	9
GENERAL ABSTRACT	10
CAPÍTULO I - Introdução Geral	11
1. A CULTURA DA BATATA-DOCE	12
1.1.IMPORTÂNCIA DA BATATA-DOCE NA ECONOMIA MUNDIAL E BRASILEIRA...	14
2. MAL-DO-PÉ DA BATATA-DOCE	17
2.1.ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA.....	17
2.2.SINTOMAS	18
2.3.MANEJO	19
3. CONTROLE BIOLÓGICO.....	19
3.1.LEVEDURAS COMO AGENTES BIOCONTROLADORES	21
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
CAPÍTULO II - Diversidade molecular e caracterização epidemiológica de agentes causais do mal-do-pé da batata-doce	30
RESUMO.....	31
1. INTRODUÇÃO	32
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3. RESULTADOS.....	37
4. DISCUSSÃO	39
5. AGRADECIMENTOS.....	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
CAPÍTULO III - Eficácia de <i>Candida orthopsilosis</i> e <i>Moesziomyces aphidis</i> no manejo do mal-do-pé da batata-doce	58
RESUMO.....	57
1. INTRODUÇÃO	60
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4. AGRADECIMENTOS.....	76
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
CAPÍTULO IV - First report of <i>Diaporthe kongii</i> causing foot rot on Sweet Potato in Brazil.	81
CAPÍTULO V - First report of <i>Nigrospora vesicularifera</i> causing foot rot on Sweet Potato in Brazil.....	84
CAPÍTULO VI - Conclusões Gerais	98

RESUMO GERAL

O mal-do-pé da batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.)] (MP), principal doença que afeta a cultura na região Nordeste do Brasil, é causado por fungos do gênero *Diaporthe*, *Nigrospora*, *Neoscytalidium* e *Lasiodiplodia* e pode ocasionar a destruição do sistema radicular, impedindo a formação de raízes tuberosas. Atualmente não há registro de fungicidas no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA), dificultando o manejo do MP, sendo necessária a busca por métodos alternativos, como o controle biológico. Diante do exposto, este estudo teve como objetivo identificar as espécies relacionadas ao mal-do-pé, avaliar aspectos epidemiológicos da doença em regiões produtoras de batata-doce dos estados de Pernambuco, Paraíba, Sergipe e Alagoas, bem como testar a eficácia de leveduras no controle biológico dos patógenos. Foram coletadas plantas sintomáticas para isolamento indireto e preservação do patógeno na Coleção de Fungos de Solo (CFS), do Laboratório de Fungos de Solo (LAFSOL), da Universidade Federal Rural de Pernambuco. As espécies foram identificadas pela amplificação e sequenciamento das regiões de Fator de Elongação 1- α (*tef1- α*), Internal Transcribed Space (ITS) e β -tubulina (Tub). Utilizou-se a Análise de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana para identificação dos isolados, com obtenção da árvore filogenética obtida pela comparação entre espécies descritas previamente. Após identificação dos agentes causais do MP, o controle biológico dos agentes causais com leveduras antagonistas, cedidas pela CFS, foi avaliado por testes *in vitro* de cultivo conjunto e produção de compostos voláteis, e *in vivo*, com avaliação do tempo de imersão das mudas em suspensão de leveduras e identificação molecular. As análises confirmaram a incidência de *Diaporthe destruens*, *D. batatas*, *D. kongii*, *Macrophomina* sp. e *Neoscytalidium dimidiatum*, além de promoverem o primeiro relato de *D. citri* e *D. ueckeri* como agentes causais do mal-do-pé da batata-doce, no mundo. Os testes de controle biológico indicaram que as leveduras *Moeszymices aphidis* e *Candida orthopsilosis* são eficazes no controle da doença, *in vitro*, através de mecanismos de controle, como antibiose, parasitismo e produção de metabólitos voláteis, e *in vivo*, com proteção das mudas após diferentes tempos de imersão na suspensão do antagonista. A importância da identificação correta dos patógenos, bem como a descoberta de métodos eficazes para o manejo da doença, é de fundamental importância para a redução dos danos econômicos gerados nas áreas de produção, devido à incidência da doença.

Palavras-Chave: Biocontrole, leveduras, *Ipomoea batatas*, podridão

GENERAL ABSTRACT

Foot rot of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.)] (MP), the main disease that affects the crop in Northeastern Brazil, is caused by fungi of the genus *Diaporthe*, *Nigrospora*, *Neoscytalidium* and *Lasioidiplodia* and can cause the destruction of the root system, preventing the formation of tuberous storages. Currently there is no registration of fungicides in the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA), making it difficult to manage MP, requiring the search for alternative methods, such as biological control. This study aimed to identify the species related to MP, evaluate the epidemiological aspects of the disease in sweet potato producing regions in the states of Pernambuco, Paraíba, Sergipe and Alagoas, as well as test the effectiveness of yeasts in the biological control of pathogens. Symptomatic plants were collected for indirect isolation and preservation of the pathogen in the Coleção de Fungos de Solo (CFS), at Laboratório de Fungos de Solo (LAFSOL), at the Universidade Federal Rural de Pernambuco. The species were identified by amplification and sequencing of the Elongation Factor 1- α (*tef1- α*), Internal Transcribed Space (ITS) and β -tubulin (Tub) regions. Maximum Likelihood Analysis and Bayesian Inference were used to identify the isolates through the phylogenetic tree obtained by comparing previously described species. After identification of the causal agents of the PM, the biological control of the causal agents with antagonist yeasts, provided by CFS, was evaluated by in vitro tests of joint cultivation and production of volatile compounds, and in vivo, with evaluation of the time of immersion of the seedlings in yeast suspension and molecular identification. The analyzes confirmed the incidence of *Diaporthe destruens*, *D. batatas*, *D. kongii*, *Macrophomina* sp. and *Neoscytalidium dimidiatum*, in addition to promoting the first report of *D. citri* and *D. ueckeri* as causal agents of sweet potato foot disease in the world. The biological control tests indicated that the yeasts *Moeszymomices aphidis* and *Candida orthopsilosis* are effective in controlling the disease, in vitro, through control mechanisms, such as antibiosis, parasitism and production of volatile metabolites, and in vivo, with protection of seedlings after different immersion times in the antagonist suspension. The importance of correct identification of pathogens, as well as the discovery of effective methods for managing the disease, is of fundamental importance for the reduction of economic damage generated in the production areas, due to the incidence of the disease.

Keywords: Biocontrol, *Ipomoea batatas*, rot, yeasts,

CAPÍTULO I

Introdução Geral

TÍTULO DO TRABALHO: MAL-DO-PÉ DA BATATA-DOCE NO NORDESTE DO BRASIL: DIVERSIDADE DE PATÓGENOS E CONTROLE BIOLÓGICO

INTRODUÇÃO GERAL

1. A CULTURA DA BATATA-DOCE

A batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) é a principal cultura de importância econômica pertencente à família Convolvulaceae e gênero *Ipomoea*. Possui caule herbáceo, hábito prostrado, raiz tuberosa e dimensões variáveis de tamanho, cor e pilosidade. Tem consumo impulsionado pelo elevado valor nutricional, industrial, alimentício e energético, bem como pela sua rusticidade, que permite o cultivo em diferentes regiões de clima tropical e subtropical, tornando-se uma cultura amplamente cultivada (BEHERA *et al.*, 2022; TADDA *et al.*, 2022).

A planta tem origem nas Américas Central e do Sul. As diversas cultivares, apresentam cores variadas, tais como branca, roxa, laranja, salmão, tamanhos diversos e presença ou ausência de pilosidades. Possui caule herbáceo, hábito prostrado e ramificações, com folhas largas, de formato, cores e recortes variados, pecíolo longo, flores hermafroditas e frutos do tipo cápsula (HUAMÁN, 1992).

A cultura possui dois tipos de raiz: de reserva/tuberosa e absorvente. de maior importância comercial são as tuberosas, originadas nos nós, desde o início do desenvolvimento da planta, têm poucas raízes secundárias e são mais espessas, o que facilita sua identificação. As raízes absorventes se formam do meristema cambial, quer seja nos nós ou nos entrenós, são altamente ramificadas, tornando sua identificação mais fácil (NUNES, 2016).

O crescimento das raízes é favorecido por solos com textura areno-argilosa ou arenosa, com boa drenagem, evitando a má-formação das batatas e facilitando a colheita, reduzindo os danos mecânicos causados no arranquio (CAMARGO, 2013). A cultura necessita de lâmina d'água em torno de 500 a 750 mm, durante o ciclo de produção, que varia entre 90 e 150 dias, a depender da cultivar e das condições ambientais da área de cultivo (VENDRAME; CASTRO E MELO *et al.*, 2021). As principais áreas de produção localizam-se em regiões de clima quente e alta luminosidade, como encontrado em Pernambuco, onde a temperatura média é acima de 24°C (PINTO, 2021).

São várias as formas de propagação da cultura, tais como estaquia, semente, cultura de tecido e/ou mudas. No entanto, devido aos custos menores, a utilização de ramas para a produção de mudas é a principal forma de propagação utilizada pelos produtores. Esta técnica além de ser mais econômica, preserva as características genéticas e de produtividade do material vegetal que será propagado, bem como permite a produção de mudas em maior quantidade, num menor intervalo de tempo (MOREIRA, 2016).

O espaçamento adequado para a cultura varia de 80 a 100 cm entre linhas e de 25 a 40 cm entre plantas. Os camalhões para plantio das mudas variam entre 20 e 30 cm, essa altura facilita a drenagem e aeração do solo, os tratos culturais e a colheita. Apesar de ser considerada uma cultura rústica, a batata-doce necessita de adubação mineral, principalmente de magnésio, cálcio, fósforo, nitrogênio e potássio, salientando que a extração de nutrientes varia de acordo com as características químico-físicas do solo, da cultivar, do clima e do ciclo da cultura (MARQUES, 2015).

A batata-doce tem uma grande variabilidade genética que pode ser observada em diversos formatos, colorações, tamanhos de raiz e diferentes composições. Essas características possibilitam a utilização da cultura para diversas finalidades, sejam elas na alimentação humana, animal ou na produção de biocombustíveis (PEDROSO *et al.*, 2021). Variedades regionais utilizadas por produtores e por comunidades indígenas permitem a manutenção da variabilidade de genótipos de batata-doce, possibilitando a adaptabilidade da cultura a diversas condições climáticas (MANTOVANI *et al.*, 2013).

O banco de germoplasma de batata-doce com maior número de acessos está localizado na Índia, com cerca de 3073, sendo composto de 70% de variedades locais, mantidas em condições de campo. Na Indonésia, está o segundo maior banco de germoplasma (1155 acessos), seguido da China (700 acessos). No Brasil, o maior banco ativo de germoplasma pertence à EMBRAPA, com mais de 650 acessos, porém há as variedades locais e os demais bancos de germoplasmas, localizados em Universidades e em outros locais (VETTORAZZI, 2016).

Os principais métodos de manejo da cultura são as capinas e a amontoa, visando reduzir o nível de plantas daninhas na área, principalmente nos primeiros 45 dias após o plantio. O cultivo de batata-doce, em sua maioria, é praticado sob baixo nível tecnológico, fator esse que predispõe à redução da produtividade da cultura (PEDROSO *et al.*, 2021).

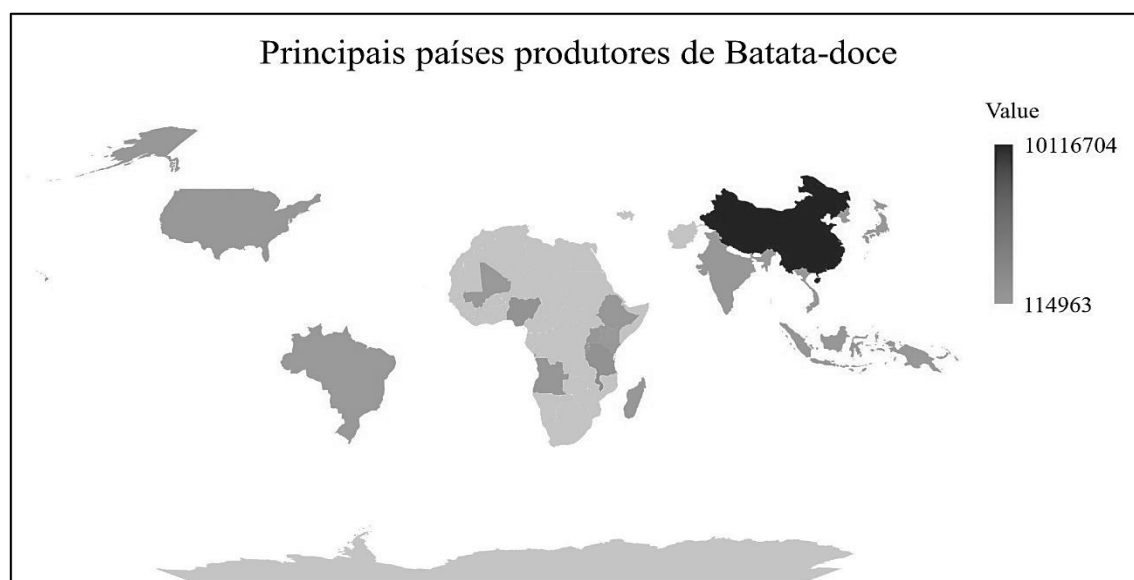
Apesar de ser considerada uma cultura rústica e ser cultivada em diferentes regiões, a produtividade da batata-doce no Brasil é considerada baixa. Durante o levantamento da produção de batata-doce, entre 2006-2017, foram propostas hipóteses para justificar a oscilação na produção, dentre elas citam-se a falta de tecnologia, falta de conhecimento, adoção de práticas incorretas de manejo e programa fitossanitário em aplicações de defensivos agrícolas por parte dos produtores (PEDROSO *et al.*, 2021).

A variabilidade de subprodutos oriundos da batata-doce fez com que esta hortaliça ganhasse importância na comercialização de hortaliças no estado de Pernambuco. Os produtos e subprodutos da batata-doce podem ser utilizados tanto para alimentação animal, alimentação humana ou como matéria prima para indústria de alimentos, tecidos, papel, cosméticos, biocombustíveis, macarrão, farinhas, entre outros produtos que agregam importância à cultura. Para o consumidor final, as formas de consumo são *in natura*, cozida, desidratada, na fabricação de pães e farinha e frita (CASTRO, 2010; MOTA *et al.*, 2011; MAINO *et al.*, 2019; GALERIANI *et al.*, 2020).

1.1.IMPORTÂNCIA DA BATATA-DOCE NA ECONOMIA MUNDIAL E BRASILEIRA

Com produção média de 89.487.835 toneladas, a batata-doce tornou-se a 16ª cultura alimentícia mais cultivada no mundo, no ano de 2020. A Ásia é o continente que concentra maior parte da produção mundial (81,4%), seguido da África, Américas, Oceania e Europa (Fig. 1). Dentre os países que mais produzem batata-doce, a China destaca-se com 10.116.704 toneladas anuais, sendo o Brasil 16º no ranking (Fig. 2),

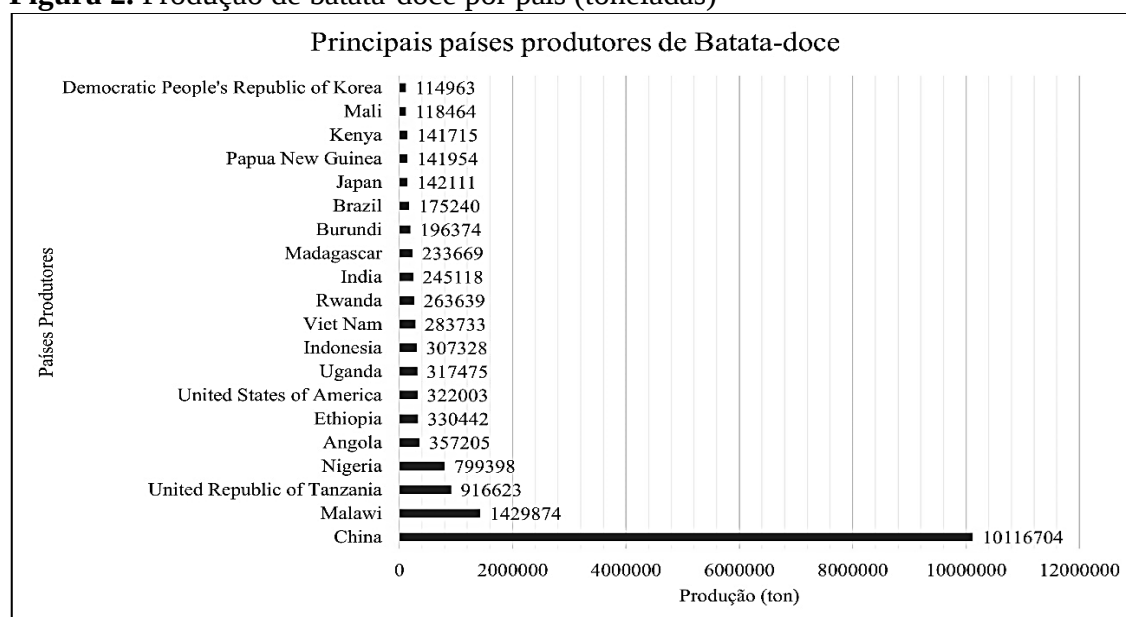
Figura 1. Principais produtores mundiais de batata-doce



com 847,9 toneladas. (FAO, 2023).

Fonte: Elaborado pela autora

Figura 2. Produção de batata-doce por país (toneladas)

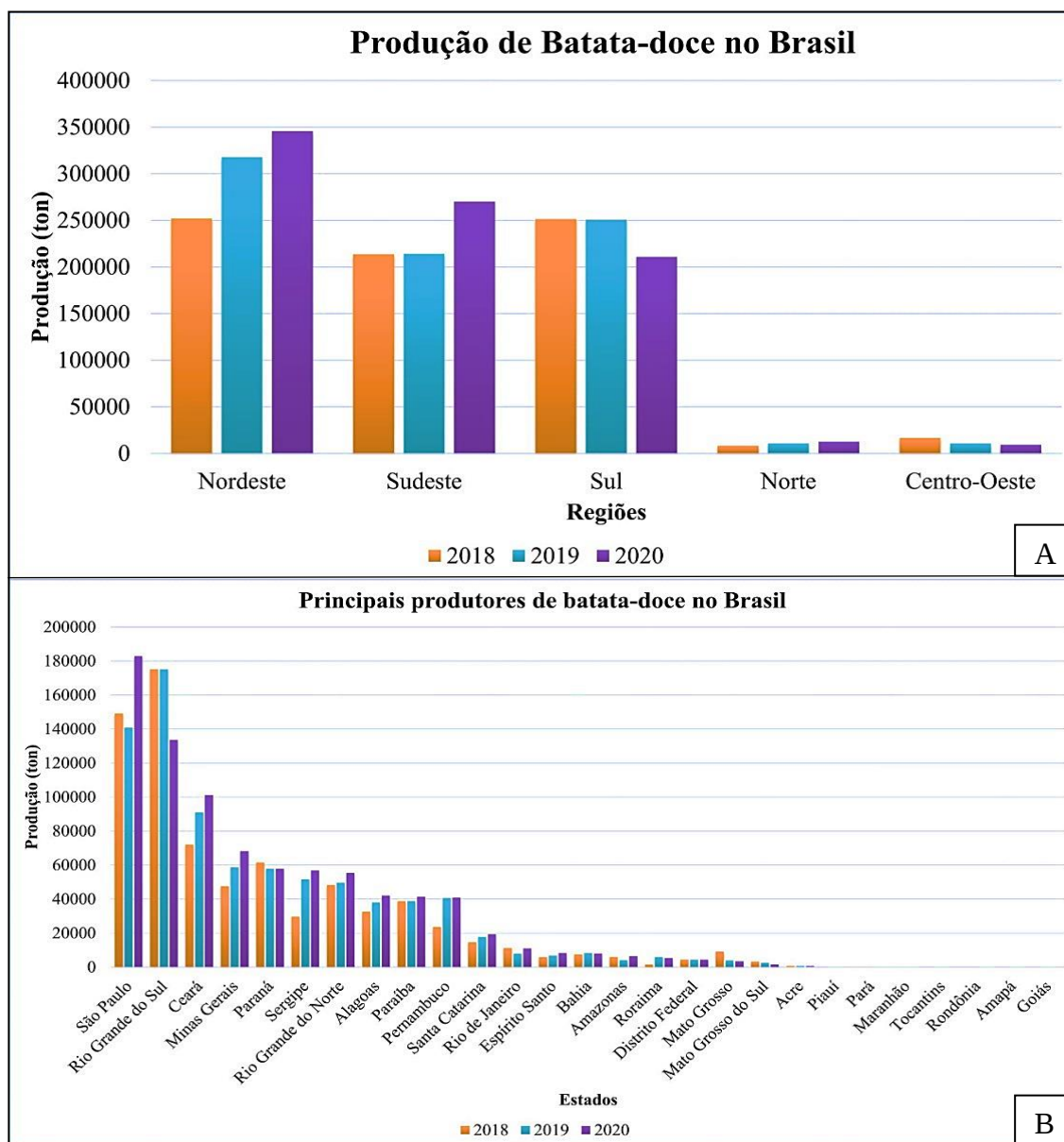


Fonte: Elaborado pela autora

De acordo com informações disponibilizadas pelo Censo Agropecuário, em 2020 a região Nordeste foi a que deteve maior parte da produção, seguida pela região sudeste, com 346 e 270 mil toneladas, respectivamente (Fig. 3A) (IBGE, 2022). Os números de produção de batata-doce no Nordeste são influenciados pela produção dos estados do Ceará, Sergipe, Rio Grande do Norte, Alagoas e Pernambuco, que estão entre os 10 principais Estados produtores do Brasil (Fig. 3B).

O cultivo de batata-doce, em sua maioria, é praticado sob baixo nível tecnológico, fator esse que predispõe à redução da produtividade da cultura. Outro fator que limita a produção e tem ocasionado perdas econômicas expressivas é a incidência de fitopatógenos, dentre os principais podem ser citados: nematoides (*Meloidogyne* spp. Goeldi (1887), *Rotylenchulus reniformis* Linford e Oliveira (1940), *Pratylenchus* spp. Minz (1957)), bactérias (*Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi *et al.* (1995)), vírus (*Cucumber mosaic virus* (CMV) Doolittle e Jagger (1916)) e fungos (*Diaporthe* spp. (FUCKEL, 1867) NITSCHKE (1870), *Lasiodiplodia* spp. Ellis; Everh (1896), *Macrophomina* spp. Petr (1923), *Fusarium* spp. Link (1809)) (CRUZ *et al.*, 2022; PEREIRA *et al.*, 2014).

Figura 3. Produção de batata-doce no Brasil em toneladas, nos anos de 2018, 2019 e 2020. Produção por região geográfica (A); Produção por estado (B)



Fonte: Elaborado pela autora

Atualmente, o mal-do-pé da batata-doce (MP) é a doença com maior relato nas áreas de produção da região Nordeste. A dificuldade no manejo da doença se deve, em partes, a forma como a cultura é propagada e a diversidade de gêneros de fungos que causam sintomas. Os prejuízos ocasionados pela ação do patógeno podem ser observados em todas as fases de desenvolvimento da cultura, inclusive na pós-colheita, afetando diretamente sua comercialização (ALMEIDA *et al.*, 2023).

2. MAL-DO-PÉ DA BATATA-DOCE

2.1. ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA

Inicialmente, acreditava-se que o agente causal do mal-do-pé da batata-doce (MP) era o fungo *Diaporthe destruens* Harter (1913), porém novos estudos comprovaram a existência de outras espécies do gênero *Diaporthe* associadas ao surgimento de sintomas característicos da doença, tais como podridão do colo da planta, amarelecimento das folhas e podridão de tubérculos, sugerindo que a doença na verdade pode ser causada por outros gêneros de fungos, além de *Diaporthe*. No Brasil, o primeiro relato foi realizado em 1990 pela revista Fitopatologia Brasileira (MENDES; URBEN, 2019).

O patógeno pode infectar a cultura em todas as etapas do seu ciclo de cultivo, incluindo as túberas durante o armazenamento, sobrevivendo em plantas voluntárias e restos de culturas no campo, favorecendo sua disseminação. Temperaturas superiores a 20 °C favorecem o desenvolvimento dos patógenos, bem como a elevada umidade do solo (PEREIRA *et al.*, 2014). A doença afeta, principalmente, a região do colo da planta, sendo os agentes causais fungos habitantes do solo, que podem causar sintomas severos em cultivares suscetíveis, chegando a 80% de perda na produtividade, principalmente em áreas de cultivo sucessivo intenso, sem rotação de cultura (ALMEIDA, 2018; PEDROSO *et al.*, 2021).

A identificação dos patógenos responsáveis pela doença era realizada utilizando análises morfológicas das colônias, porém, estudos mostraram que as diferenças morfológicas não eram suficientes para classificar os fungos em nível de espécies, podendo apresentar variação sob diferentes condições ambientais (ARIYAWANSA *et al.*, 2021). Diante da necessidade da correta identificação de agentes causais, atualmente utiliza-se a análise filogenética, através do sequenciamento de regiões do DNA, possibilitando a descoberta de novos táxons, reclassificando algumas espécies. Como exemplo, pode-se citar o gênero *Diaporthe*, com espécies morfológicamente semelhantes, porém com variações genéticas significativas (ARIYAWANSA *et al.*, 2021).

Até o presente momento, diferentes espécies fúngicas são relatadas como agentes causais do MP, dentre as quais pode-se citar: *Diaporthe destruens* (Harter) Hirooka, Minosh, Rossman, (2020), *D. kongii* Shivas, Thomps, Young (2011), *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz) Crous, Slippers (2006), *Macrophomina phaseolina*

(Tassi) Goid 1947), *M. pseudophaseolina* Crous, Sarr e Ndiaye (2014), *Lasiodiplodia theobromae* (Pat) Griffon, Maubl (1909), *L. hormozganensis* Abdollahz, Zare, Phillips (2010), *Fusarium solani* (Mart.) Sacc (1881) e *Rhizopus* sp. Ehrenb (1821) (ALMEIDA *et al.*, 2020; BOEREMA *et al.*, 1996; MELLO *et al.*, 2021; PIO-RIBEIRO *et al.*, 2016).

De acordo com um levantamento feito por Ariyawansa *et al.*, (2021), foram encontrados no Index Fungorum mais de 1000 registros de *Diaporthe* e 900 de *Phomopsis*. Doenças como podridão seca, mal-do-pé, queima das folhas, queima do caule, murcha, podridão de armazenamento e morte têm fungos deste gênero como principais agentes causais, causando prejuízos econômicos significativos para os produtores de batata-doce, em todas as regiões de cultivo (ALMEIDA *et al.*, 2020; MELO *et al.*, 2021).

A família *Botryosphaeriaceae* possui 23 gêneros e 195 espécies e, devido a sua baixa especificidade, é uma família que possui importantes fitopatógenos, como por exemplo *Lasiodiplodia* spp., *Macrophomina* spp., *Neoscytalidium* spp., entre outras espécies (DISSANAYAKE *et al.*, 2016). Sintomas como cancro, podridões e tombamento podem ser indicativos da ação destes fitopatógenos, podendo levar a planta à morte (MELLO *et al.*, 2021).

O gênero *Nigrospora*, pertencente à família *Apiosporaceae* e à ordem *Xylariales*, é composto por fungos com ampla gama de hospedeiros, podendo, além de fitopatógenos, sobreviver de forma endofítica ou saprófita. Em alguns estudos as espécies patogênicas mais frequentes *N. oryzae* e *N. sphaerica*, porém, *N. versicularifera* e *N. zimmermanii* foram recentemente relatadas como agentes causais de doenças em culturas importantes, como a cana-de-açúcar (HAO *et al.*, 2020).

A principal forma de propagação da cultura da batata-doce é através de ramas, devido ao baixo custo e à alta eficiência na germinação, bem como na manutenção dos caracteres genéticos e fenotípicos da planta original. Essa propagação é a principal responsável pela disseminação do patógeno, que ocorre por meio de ramas e raízes tuberosas infectadas ou infestadas, podendo também ser disseminado através de ventos acompanhados de chuva, insetos e/ou através de materiais contaminados (PEREIRA *et al.*, 2011).

2.2.SINTOMAS

Os sintomas característicos do mal-do-pé da batata-doce iniciam-se com lesões na haste da planta, na região do colo próximo ao solo, com coloração marrom, podendo atingir 20 cm acima da linha do solo, seguida de murcha, amarelecimento das folhas e morte. Nas túberas, os sintomas iniciam-se com lesões marrons, evoluindo para podridão, afetando o interior da túbera, inviabilizando-a para consumo. (ALMEIDA *et al.*, 2020). Infecções severas podem levar à destruição do sistema radicular, impedindo a formação de raízes tuberosas. Com o desenvolvimento da doença, podem ser observados picnídios, estruturas de reprodução do patógeno (ALMEIDA, 2018; PEREIRA *et al.*, 2014).

2.3.MANEJO

O principal método de controle do MP adotado atualmente é o uso de cultivares resistentes. Além desse método de manejo, torna-se essencial aquisição de mudas sadias, oriundas de áreas onde conhecidamente não há relatos do patógeno, a capina da área, rotação de culturas, quando possível, e a escolha de solos bem drenados (MARQUES, 2015; PEREIRA *et al.*, 2014).

Em 1989, a EMBRAPA lançou a cultivar Princesa como fonte de resistência à *Diaporthe destruens*, havendo perda da resistência posteriormente, sendo observadas diferentes expressões dos sintomas de acordo com o método de inoculação do patógeno (CAVALCANTI *et al.*, 2002; LOPES E SILVA, 1993; MENDES *et al.*, 2012; TRUTA *et al.*, 2000). Os programas de melhoramento de batata-doce visam, principalmente, a produção de amido e a resistência às pragas, negligenciando a ocorrência de doenças economicamente importantes para a cultura (VENDRAME *et al.*, 2022).

Tendo em vista as perdas econômicas ocasionadas pela ação do patógeno e a extensão de áreas inviabilizadas para cultivo, torna-se necessária a adoção de medidas eficientes para o manejo da doença. Atualmente não existem fungicidas registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle do mal-do-pé da batata-doce, no Brasil, no entanto, como método alternativo, o controle biológico tem se mostrado eficiente na redução das lesões em plantas de batata-doce (ALMEIDA, 2018).

3. CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico é definido como a utilização de microrganismos específicos, os quais interferem junto a organismos patogênicos e pragas causadoras de doenças em plantas. A utilização deste tipo de manejo visa reduzir o inóculo do patógeno ou de atividades causadoras de doenças, pela introdução em massa de um ou mais antagonistas. É uma técnica ambientalmente correta e economicamente viável, levando em consideração os preços dos produtos químicos e biológicos (FENTA; MEKONNEN; GASHAW, 2019).

O crescimento da demanda por alimentos, devido ao crescimento populacional, tem propiciado o desenvolvimento de novas tecnologias que visam o aumento da produtividade agrícola, respeitando as regras de segurança alimentar. Para garantir o incremento na produtividade das culturas, é necessária a utilização de métodos de manejo eficazes e ambientalmente corretos, reduzindo os danos e as perdas econômicas ocasionadas pela ação de pragas e doenças agrícolas (RODRIGUES; FORTINI; NEVES, 2023).

O uso de defensivos agrícolas tem sido uma das principais medidas adotadas para o manejo das doenças no campo. Porém, com o uso incorreto destes produtos, por vezes aplicados em excesso e desrespeitando as recomendações dos fabricantes, tem aumentado o índice de danos ao meio ambiente (contaminação de solo, água e animais), envenenamento de agricultores e desenvolvimento de resistências em populações de fitopatógenos a determinados ingredientes ativos, reduzindo a eficácia destes produtos (BETTIOL *et al.*, 2017; HAWKINS *et al.*, 2019).

Diante do exposto, o controle biológico torna-se cada vez mais fundamental para o manejo sustentável e eficaz de doenças de plantas, preservando os recursos naturais e a qualidade do meio ambiente, bem como a saúde do ser humano. Atualmente, o Governo Brasileiro tem incentivado os grupos de pesquisas a descobrirem novos agentes de controle biológico, bem como seus mecanismos de controle, formas de aplicação e tipos de formulação (RODRIGUES; FORTINI; NEVES, 2023).

A utilização de técnicas moleculares associadas aos bioensaios, tem contribuído para a identificação de biocontroladores, oferecendo novas possibilidades para seu uso. As técnicas têm auxiliado também a descoberta de genes responsáveis pela ativação dos mecanismos de controle, durante a produção massal, formulação, armazenamento e aplicação do produto (FENTA; MEKONNEN; GASHAW, 2019; RODRIGUES; FORTINI; NEVES, 2023).

A contínua retirada do mercado dos principais fungicidas, devido à exclusão pelas agências reguladoras, resistência de patógenos ou ao alto custo de novo registro, levará ao aumento no uso de produtos de controle biológico nos próximos anos, tornando-se mais amplamente aceito como um componente de uma abordagem integrada para o manejo de doenças de plantas. Dentre os principais agentes de controle biológicos estudados atualmente, destacam-se as leveduras (ALMEIDA, 2018; FENTA; MEKONNEN; GASHAW, 2019; RODRIGUES; FORTINI; NEVES, 2023).

Em ensaios em casa de vegetação, as espécies *Moesziomyces aphidis* (Henninger e Windisch) Wang, Begerow, Bai e Boekhout (2015) e *Candida orthopsilosis* Tavanti, Davidson, Gow, Maiden e Odds (2005) mostraram-se eficientes na redução da expressão de sintomas de plantas inoculadas com *D. destruens*, inibindo 100% o desenvolvimento do patógeno (ALMEIDA, 2018).

3.1.LEVEDURAS COMO AGENTES BIOCONTROLADORES

As leveduras diferem-se dos fungos filamentosos por possuírem um talo predominantemente unicelular, sem corpos de frutificação e reprodução assexuada por divisão binária (KURTZMAN; FELL, 1988). As leveduras podem habitar o filopiano epifítica ou endofiticamente, sendo amplamente encontradas em cascas de frutos, superfície das folhas, flores, tecidos necróticos, solo e na rizosfera. São capazes de competir por nutrientes, colonizar fermentos, induzir resistência em plantas, produzir antibióticos, além de promoverem ação micoparasítica, sendo considerada um eficiente agente biocontrolador (MILLAN *et al.*, 2021).

Um dos principais mecanismos relacionados à eficácia das leveduras como biocontroladoras é a competição, que pode ocorrer por espaço ou por nutrientes. A reprodução por brotamento permite a rápida colonização do hospedeiro pela levedura, possibilitando assim o seu estabelecimento antes do patógeno. As leveduras também possuem a capacidade de produzirem sideróforos em meios com baixo teor de ferro e oxigênio. A supressão de ferro causa redução na germinação, crescimento e virulência, além da diminuição da atividade da catalase dos fitopatógenos, deixando-os mais suscetíveis à ação das Rotas Oxidativas de Oxigênio (ROs) das plantas (SPADARO; DROBY, 2016).

Em 2019, Gore-Lloyd e colaboradores identificaram a produção do ácido pulcherríminico como sideróforo, por *Metschnikowia pulcherrima* Pitt e Mill (1968), e

sua atividade biocontroladora sobre *Botrytis caroliniana* Li e Schnabel (2012) e *Fusarium* spp. Outra forma relatada de competição por espaço é a formação de biofilme pelas colônias de leveduras, como por exemplo *Candida oleophila* Montrocher (1967), que se inicia pela adesão de células individuais à superfície, podendo ocasionar modificações na parede celular do hospedeiro, secreção de matriz extracelular e formação de pseudohifas (CAVALHEIRO E TEIXEIRA 2018; COSTA-ORLANDI *et al.* 2017).

Estudos recentes têm mostrado a ação dos compostos antimicrobianos secretados pelas leveduras, sendo quitinases e glucanases as principais enzimas secretadas por estes microrganismos, além de toxinas *killer* e lipases. As quitinases e glucanases atuam diretamente na degradação da parede celular de fungos. A secreção de glucanase pode promover a liberação de quito-oligossacarídeos, ativando o sistema de defesa das plantas (FREIMOSER *et al.*, 2019).

As exo-glucanases promovem modificação da parede celular do patógeno, adesão celular das leveduras à superfície do hospedeiro e resistência à toxina *Killer*. *Aureobasidium pullulans* (de Bary & Löwenthal) Arnaud (1918), *C. oleophila*, *M. pulcherrima* são exemplos de leveduras produtoras de quitinases e, *Rhodotorula glutinis* (Fresen) Harrison (1928) e *Sacharomyces cerevisiae* (Desm) Meyen (1838) são exemplos de produtoras de glucanases (FREIMOSER *et al.*, 2019).

As toxinas *killer* são toxinas proteicas ou glicoproteínas de baixa massa molecular, letais para outras leveduras suscetíveis, bem como para fungos filamentosos e bactérias. Sua ação tem sido comprovada em relatos na literatura, dentre os quais pode-se citar o controle de *Penicillium* spp. Link (1809) por leveduras produtoras de toxina *killer*, *in vitro* e na pós-colheita de citrus (PEREZ *et al.*, 2016).

Além da secreção de toxinas, as leveduras podem liberar compostos voláteis de baixa solubilidade em água e alta pressão de vapor, tais como hidrocarbonetos, álcoois, tioálcoois, aldeídos, cetonas, tioésteres, ciclohexanos, compostos heterocíclicos, fenóis e derivados de benzeno. A liberação de 1,3,5,7-ciclooctatetraeno, 3 -metil-1-butanol, 2-nonanona e álcool feniletílico tem sido associada aos principais componentes do volatiloma de *C. intermedia* (Cif.e Ashford) Langeron e Guerra (1938) durante a interação com *B. cinerea* (FREIMOSER *et al.*, 2019).

Outro mecanismo apresentado pelas leveduras é a indução de resistência. As plantas apresentam um sistema imunológico inato que reconhece e responde à presença de microrganismos. Essa resposta imune da planta pode induzir resistência

sistemicamente e é a base para a aplicação de microrganismos como fertilizantes e fortificantes de plantas, como por exemplo *C. oleophila*, que induz a superprodução de ROs na planta, ativando os mecanismos de defesa contra o patógeno, bem como *Moesziomyces aphidiis*, através da ativação das rotas do etileno e ácido jasmônico em tomateiro (FREIMOSER *et al.*, 2019).

Produtos à base de leveduras já são produzidos mundialmente, como Nexy® (*Candida oleophila*), registrado na Bélgica e utilizado na pós-colheita de maçã, citros e banana; Boni-Protect® (*Aureobasidium pullulans*), eficiente contra *Monilia fructigena*, *P. expansum* e *B. cinerea*, na pós-colheita de maçã. Em 2018, a produção de produtos biológicos no Brasil teve um acréscimo de 70%, movimentando em torno de 464 milhões de reais, tornando o Brasil o quarto país com desempenho na produção de biológicos mais expressivo, correspondendo a 7% da produção mundial (KUPPER, MOURA; DE PAULA, 2023).

A busca por métodos alternativos de manejo deve-se à limitação no uso de produtos químicos, por conta da baixa eficácia dos fungicidas registrados para o controle do crescimento e desenvolvimento dos patógenos. Em virtude dessa escassez, a utilização de leveduras torna-se uma aliada, tendo em vista que estudos já comprovaram seu potencial biocontrolador sobre *D. destruens*, precisando assim aprofundar o conhecimento a respeito do potencial biocontrolador, bem como de mecanismos utilizados na interação levedura-patógeno, no manejo do mal-do-pé (ALMEIDA, 2018).

Os estudos sobre uso de leveduras como agentes de controle biológico no manejo do mal-do-pé ainda são escassos, diante disso, o presente trabalho traz informações de caráter inovador e pioneiro acerca da utilização destes antagonistas no controle de *Nigrospora vesicularifera*, *Macrophomina* sp., *Diaporthe destruens*, *D. kongii* e *D. batatas*, principais gêneros patogênicos identificados relacionados ao mal-do-pé da batata-doce. Os resultados apresentados servem como embasamento para futuras pesquisas relacionadas aos mecanismos de ação das leveduras como biocontroladoras, à produção de compostos com interesse biotecnológico e à formulação de produtos com estes microrganismos como ingredientes ativos, além de sua viabilidade na aplicação em larga escala.

Diante do exposto, tornam-se necessários estudos que possibilitem o conhecimento a nível de espécie dos agentes causais do mal-do-pé da batata-doce, visando a otimização das técnicas de manejo, adequando-as para as características das espécies fúngicas encontradas. A falta de informações concretas sobre as perdas

ocasionadas pelo patógeno, nas principais cultivares encontradas no Nordeste, bem como sobre a resistência de cultivares às espécies relatadas, evidencia a necessidade de estudos mais aprofundados na área.

O presente trabalho objetivou caracterizar a capacidade patogênica e aspectos epidemiológicos de severidade de patógenos relacionados ao mal-do-pé da batata-doce, provenientes das principais zonas produtoras do Nordeste brasileiro, investigar os potenciais biocontroladores de leveduras sobre estes patógenos, in vitro e in vivo e sobre os sintomas do mal-do-pé na batata-doce; comparar, in vitro, a ação de leveduras com produtos químicos registrados para o patógeno e identificar melhor tempo de aplicação das leveduras, para a proteção de mudas.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, THAÍS REGINA PINTINO DE. **Atividade biocontroladora de *Trichoderma* spp. e de leveduras sobre *Diaporthe destruens***. 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

ALMEIDA, T.R.P; COELHO, I.L; VASCONCELOS, L.S.B; PONTES, M.A; VIEIRA, W.A.S; CÂMARA, M.P.S; DOYLE, V.P.; LARANJEIRA, D. First report of *Diaporthe kongii* causing foot rot on Sweet Potato in Brazil. **Plant Disease**, American Phytopathological Society (APS Press) St. Paul USA, v. 104, n.1, p. 284, 2020.

ALMEIDA, T.R.P; COELHO, I.L; VASCONCELOS, L.S.B; SILVA, E.F.M; BARROS, L.R.A; PONTES, M.A; SANTOS, T.S; VIEIRA, W.A.S; CÂMARA, M.P.S.; LARANJEIRA, D. First report of *Nigrospora vesicularifera* causing foot rot on sweet potato in Brazil. **Crop Protection**, vol. 166, 2023. ISSN 0261-2194, DOI: 10.1016/j.cropro.2022.106171

ARIYAWANSA, H.A.; TSAI, I.; WANG, J.-Y.; WITHEE, P.; TANJIRA, M.; LIN, S.-R.; SUWANNARACH, N.; KUMLA, J.; ELGORBAN, A.M.; CHEEWANGKOON, R. Molecular Phylogenetic Diversity and Biological Characterization of *Diaporthe* Species Associated with Leaf Spots of *Camellia sinensis* in Taiwan. **Plants**, vol. 10, n. 1434, 2021. DOI: 10.3390/plants10071434

BEHERA, S.; CHAUHAN, V.B.S.; PATI, K.; BANSODE, V.; NEDUNCHEZHIAN, M.; VERMA, A.K.; MONALISA, K.; NAIK, P.K.; NAIK, S.K. Biology and biotechnological aspect of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.): a commercially important tuber crop. **Planta**, Switzerland, v. 256, n. 40, 2022.

BETTIOL, W; HAMADA, E. (Org.); ANGELOTTI, F. (Org.); AUAD, A. M. (Org.); GHINI, R. (Org.). **Aquecimento Global e Problemas Fitossanitários**. 1. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2017. 488p.

BOEREMA, G.H., LOERAKKER, W.M.; HAMERS, M.E.C. Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) -III.2. Misapplications of the type species name

and the generic synonyms of *Plenodomus* (excluded species). **Persoonia**, v. 16, p. 141–190, 1996.

CAMARGO, LETÍCIA KURCHAIT PINHEIRO. **Caracterização de acessos de batata-doce do banco de germoplasma da UNICENTRO, PR.** 2013. 135 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR.

CASTRO, L. A. S. **Instruções para Plantio de Mudras de Batata-doce com Alta Sanidade.** Embrapa Clima Temperado, 2010. Disponível em: https://afubra.com.br/content/viveiro_muda/3/arquivos/6bc98e11b2870a99ff8e7c89899b3ccd.pdf. Acesso em: 05 abr. 2022.

VENDRAME, L. P. C.; CASTRO E MELO, R.A. (ed.). **Sistema de Produção de Batata-doce.** Embrapa Hortaliças. Brasília, DF: Embrapa, 2021. (Embrapa Hortaliças. Sistemas de produção, 9). ISSN 1678-880X.

CAVALCANTI, L.S; COELHO, R.S.B.; PEREZ, J.O. Reação de cultivares de batata-doce à podridão-do-pé, em condições de campo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 4, p. 699-701, 2002.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M.C. *Candida* biofilms: threats, challenges, and promising strategies. **Front Med** (Lausanne) v. 5, n. 28, 2018. DOI: 10.3389/fmed.2018.00028

CHET, I.; INBAR, J.; HADAR, I. Fungal antagonists and mycoparasites. In: WICKLOW, D. T., SODERSTROM, B. (ed.) **The mycota IV: Environmental and microbial relationships.** Berlin: Springer-Verlag, p. 165-184, 1997.

COSTA-ORLANDI, C.B; SARDI, J.C.O; PITANGUI, N.S; DE OLIVEIRA, H.C; SCORZONI, L; GALEANE, M.C; MEDINA-ALARCÓN, K.P; MELO, W.C.M.A; MARCELINO, M.Y; BRAZ, J.D; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases. **J. Fungi**, v. 3, n. 22, 2017. DOI: 10.3390/jof3020022

CRUZ, L; CRUZ, J; DUARTE, L; DIOGO, E; SÁNCHEZ, C; RUSINQUE, L; INÁCIO, M.L; SANTOS, M.T; SOUZA, E.; FERREIRA, M.E. Boas práticas para o controle de doenças na cultura da batata-doce. **Hortofruticultura: Vida Rural**, Portugal, p.62-67, 2022.

DISSANAYAKE, A.J; PHILLIPS, A.J.L; LI, X.H.; HYDE, K.D. *Botryosphaeriaceae*: Current status of genera and species. **Mycosphere**, v. 7, n. 7, p. 1001–1073, 2016. DOI: 10.5943/mycosphere/si/1b/13

FAO Global Statistical Yearbook, **FAO Regional Statistical Yearbooks.** Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QI>>. Acesso em: 05 jan 2023.

FENTA, L; MEKONNEN, H.; GASHAW, T. Biocontrol potential of trichoderma and yeast against post harvest fruit fungal diseases: A review. **World News of Natural Sciences**, v. 27, p. 153-173, 2019.

FREIMOSER, F.M; RUEDA-MEJIA, M.P; TILOCCA, B.; MIGHUELI, Q. Biocontrol yeasts: mechanisms and applications **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 154, 2019.

GALERIANI, T. M. Batata-doce: uma revisão com ênfase na dinâmica do nitrogênio. **Revista Tocantinense de Geografia**, Araguaína, v. 19, n. 09, p. 206-230, 2020.

GORE-LLOYD, D; SUMANN, I; BRACHMANN, A.O; SCHNEEBERGER, K; ORTIZ-MERINO, R.A; MORENO-BELTRÁN, M; SCHLÄFLI, M; KIRNER, P; KRON, A.S; RUEDA-MEJIA, M.P; SOMERVILLE, V; WOLFE, K.H; PIEL, L; AHRENS, C.H; HENK, D.; FREIMOSER, F.M. Snf2 controls pulcherriminic acid biosynthesis and antifungal activity of the biocontrol yeast *Metschnikowia pulcherrima*. **Mol Microbiol**, v. 112, p. 317–332, 2019. DOI: 10.1111/mmi.14272

HAO, Y; ALUTHMUHANDIRAM, J.V.S; CHETHANA, K.W.T; MANAWASINGHE, I.S; LI, X; LIU, M; HYDE, K.D; PHILLIPS, A.J.L.; ZHANG, W. *Nigrospora* Species Associated with Various Hosts from Shandong Peninsula, China. **Mycobiology**, v. 48, n. 3, p. 169–183, 2020. DOI: 10.1080/12298093.2020.1761747

HAWKINS, N.J; BASS, C; DIXON, A.; NEVE, P. The evolutionary origins of pesticide resistance. **Biol Rev**, v. 94, p. 135–155, 2019. DOI: 10. 1111/brv.12440

HUAMAN, ZOSIMO. Morphologic identification of duplicates in collections of *Ipomoea batatas*. **CIP Research: GUIDE 36**, Lima, Peru, 1992.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal**, 2022. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1612>. Acessado em: 05/01/2023

KUPPER, K.C; MOURA, V.S.; DE PAULA, F.B.F. Leveduras como agentes de controle biológico de patógenos de pós-colheita em citros. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 29, 2023. DOI: 10.31976/0104-038321v290002

LOPES, C.A.; SILVA, J.B.C. Management measures to control foot rot of sweet potato caused by *Plenodomus destruens*. **Internacional Journal of Pest Management**, v. 39, n. 1, p. 72-74, 1993.

MAINO, S. C; SEABRA JÚNIOR, E; POZZO, D.M.D; SANTOS, R.F.; SIQUEIRA, J.A.C. Batata doce (*Ipomoea batatas*) dentro do contexto de culturas energéticas, uma revisão. **Revista Brasileira Energias Renováveis**, v. 8, n. 4, p. 629-638, 2019.

MANTOVANI, E.C.; DELAZARI, F.T.; DIAS, L.E.; ASSIS, I.R.; VIEIRA, G. H. S.; LANDIM, F. M. Eficiência no uso da água de duas cultivares de batata-doce em resposta a diferentes lâminas de irrigação. **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 602-606, 2013

MARQUES, K. R. Reação genótipos de batata-doce à isolados locais de *Plenodomus destruens* Harter, agente causal do mal-do-pé. 54 f. 2015. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. Gurupi-TO

MARQUES, K. R. Reação genótipos de batata-doce à isolados locais de *Plenodomus destruens* Harter, agente causal do mal-do-pé. 54 f. 2015. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. Gurupi-TO.

MELLO, J.F; BRITO, A.C.Q; VIEIRA, J.C.B; CÂMARA, M.P.S; MICHEREFF, S.J; SOUZA-MOTTA, C.M.; MACHADO, A.R. Identification and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species associated with root and stem rot of sweet potato in Brazil. **Plant Pathology**, p. 1–15, 2021.

MENDES, L.S; PEREIRA, R.B; AMARO, G.B.; PINHEIRO, J.B. – **Reação de Cultivares de Batata-doce ao Mal-do-pé**. II Jornada Científica da Embrapa Hortaliças, 31 de julho e 1 de agosto. Embrapa Hortaliças 2012.

MENDES, M. A. S.; URBEN, A. F.; **Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal**. Brasília, DF, 2019. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia). Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aqwweb/michtml/fgbanco01.asp>. Acesso em: 05 jan. 2023

MILLAN, A.F; LARRAYA, L; FARRAN, I; ANCIN, M.; VERAMENDI, J. Successful biocontrol of major postharvest and soil-borne plant pathogenic fungi by antagonistic yeasts. **Biological Control**, v. 160, 2021. ISSN 1049-9644, DOI: 10.1016/j.biocontrol.2021.104683

MONTES DE OCA, R.; SALEM, A.; KHOLIF, A.E.; MONROY, H.; PÉREZ, L.S.; ZAMORA, J.L.; GUTIÉRREZ, A.; PUNIYA, A.K. Yeast: description and structure. **Yeast Additives and Animal Production**, p. 4-13, 2016.

MOREIRA, Glaucia Bethânia Rocha. **Viabilidade de aplicação da seleção precoce em batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] e avaliação de caracteres relacionados à produção**. 2016. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-04102016-174804/>. Acesso em: 05 jan. 2023.

MOTA, J. H.; OLIVEIRA, J. F.; YURI, J. E. Qualidade de raízes de batata-doce comercializadas em Jataí-GO. **Congresso Brasileiro de Olericultura**. Viçosa, 2011. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/897495/1/JONYEISHIYURI12011.pdf>. Acesso em: 06 dez. 2022.

NUNES, Hendrie Ferreira. **Batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] nas roças e quintais do litoral paulista: diversidade genética morfoagronômica, com base em morfometria geométrica, descritores e produção de bioetanol**. 2016. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

PEDROSO, M.T.M; ALMEIDA, G.V.B; MOREIRA, L.R; SILVA JÚNIOR, L.H. Cadeia produtiva da batata-doce: Implicações para a agenda tecnológica. **Revista da Política Agrícola**, ano 30, n. 2, 2021.

PEREIRA, R. B.; AMARO, G. B.; RIBEIRO, M. C. V.; PINHEIRO, J. B. **Reação de genótipos de batata-doce ao mal-do-pé (*Plenodomus destruens*)**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2014. 20 p. - (Boletim Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Hortaliças, ISSN 1677-2229; 122).

PEREIRA, R. R.; FERNANDES, F. R.; PINHEIRO, J. B. **Recomendações para manejo da podridão-do-pé em batata-doce**. Brasília, DF: Embrapa-CNPq, dezembro, 2011. 5 p. (Comunicado técnico / Embrapa Hortaliças, ISSN 1414.9850; 79).

PEREIRA, R. R.; FERNANDES, F. R.; PINHEIRO, J. B. **Recomendações para manejo da podridão-do-pé em batata-doce**. Brasília, DF: Embrapa-CNPq, dezembro, 2011. 5 p. (Comunicado técnico / Embrapa Hortaliças, ISSN 1414.9850; 79).

PEREZ, M.F; CONTRERAS, L; GARNICA, N.M; FERNÁNDEZ-ZENOFF, M.V; FARÍAS, M.E; SEPULVEDA, M; RAMALLO, J.; DIB, JR. Native Killer Yeasts as Biocontrol Agents of Postharvest Fungal Diseases in Lemons. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0165590

PINTO, ANA CAROLINA DE OLIVEIRA. Cultivo *in vitro* de meristemas de batata-doce. 2021. 47 f. **Trabalho de conclusão de curso** (Agronomia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Pato Branco - PR.

PIO-RIBEIRO, G., MARIANO, R.L.R., PEREIRA CARVALHO, R.C., SOUZA, E.B.; MELO FILHO, P.A. (2016) Doenças da Batata-Doce. In: Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A. (Eds.) **Manual de Fitopatologia Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas**, 5ª edição. São Paulo, Brazil: Ceres: p. 149–157.

RODRIGUES, L.C.C; FORTINIM R.M.; NEVES, M.C.R. Impacts of the use of biological pest control on the technical efficiency of the Brazilian agricultural sector. **International Journal of Environmental Science and Technology**, vol. 20, p. 1–16, 2023.

SPADARO, D.; DROBY, S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends Food Sci Technol**, v. 47, p. 39–49, 2016. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.11.003

TADDA, S.A; KUI, X; YANG, H; LI, M; HUANG, Z; CHEN, X.; QIU, D. The response of vegetable sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam) nodes to different concentrations of encapsulation agent and MS salts. **Agronomy**, v. 12, n. 19, p. 1–13, 2022.

TRUTA, A.A.C; ARAÚJO, E.; SILVA, V.F. Reações de cultivares e controle químico do mal-do-pé da batata-doce na microrregião do Brejo, Paraíba. **Agropecuária Técnica**, v. 21, n. 1/2, 2000.

VENDRAME, L.P.C.; CASTRO E MELO, R.A; SILVA, G.O; AMARO, G.B; PILON, L; GRUIMARAES, J.A; PINHEIRO, J.B.; PEREIRA, R.B. **BRS Cotinga: nova cultivar de batata-doce de polpa roxa para processamento industrial – produtiva**,

com ampla adaptabilidade e rica em antioxidantes. Brasília: EMBRAPA HORTALIÇAS, 2022. 20p. (EMBRAPA HORTALIÇAS. Circular Técnica, 177).

VETTORAZZI, R, G. **Caracterização, estabelecimento *in vitro* e criopreservação de variedades locais de batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam.).** 2016. 101 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro.

CAPÍTULO II

Diversidade molecular e caracterização epidemiológica de agentes causais do mal- do-pé da batata-doce

DIVERSIDADE MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE AGENTES CAUSAIS DO MAL-DO-PÉ DA BATATA-DOCE

THAÍS REGINA PINTINO DE ALMEIDA (thaisrpintino@gmail.com)^{a*}; IWANNE LIMA COELHO (iwannecoelho@gmail.com)^a; ELDER FELIPE DE MOURA SILVA (elderfelipe16@gmail.com)^a; LETÍCIA REBECA DE ARAÚJO BARROS (euletiabarrosgmail.com)^a; WILLIE ANDERSON DOS SANTOS VIEIRA (andersonvieira12@gmail.com)^a; MARCOS PAZ SARAIVA CÂMARA (marcos.camara@ufrpe.br)^a; REJANE PEREIRA NEVES (rejadel@yahoo.com.br)^b; DELSON LARANJEIRA (delson.laranjeira@ufrpe.br)^a.

^aDepartamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brasil.

^bDepartamento de Micologia. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos. Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife-PE, Brasil.

*Autor correspondente

RESUMO

Considerada uma das principais doenças que afetam a cultura da batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.)], a alta incidência do mal-do-pé (MP) pode levar à destruição do sistema radicular, impedindo o desenvolvimento das plantas e a formação de raízes tuberosas. Inicialmente, acreditava-se que o agente causal da doença era o fungo *Diaporthe destruens*, sendo relatadas recentemente novas espécies de *Diaporthe* e gêneros como *Nigrospora*, *Neoscytalidium* e *Lasiodiplodia* relacionadas à doença. O manejo da doença é realizado, com melhor resultado, através do uso de mudas micropropagadas e cultivares resistentes, sem registro de produtos químicos eficientes para o manejo do MP. Diante do exposto, este estudo teve como objetivo identificar as espécies relacionadas ao mal-do-pé, bem como avaliar aspectos epidemiológicos da doença em regiões produtoras de batata-doce dos estados de Pernambuco, Paraíba, Sergipe e Alagoas. Os isolados patogênicos foram obtidos através do método de isolamento indireto de tecidos de plantas sintomáticas, com preservação em Castellani. Os aspectos epidemiológicos avaliados foram patogenicidade, Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), taxa de progresso da doença (r) e Período de Incubação (PI). A análise morfológica observou a coloração das colônias, formato de crescimento, produção, cor e tamanho de picnídios e presença ou ausência de gutação. Os isolados selecionados foram identificados molecularmente através da extração de DNA, reações em cadeia de polimerase (PCR), amplificação das regiões de Fator de Elongação 1- α (*tef1*- α), Internal Transcribed Space (ITS) e β -tubulina (Tub), seguida por sequenciamento destas. Foi utilizada a Análise de Máxima Verossimilhança para identificação dos isolados utilizados neste estudo, comparando-os com espécies descritas previamente, com obtenção da árvore filogenética. A AACPD variou de acordo com o isolado, não sendo relacionada a variação entre espécies. De acordo com os resultados obtidos nas análises morfológicas e filogenéticas, comprovou-se a incidência de *Diaporthe destruens*, *D. batatas*, *D. kongii*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Macrophomina* sp. e *Nigrospora vesicularifera* como agentes causais do MP, bem como foram apresentados os primeiros relatos mundiais da patogenicidade de *D. citri* e *D. ueckeri* na batata-doce, com maior incidência de *D. batatas*. A correta identificação dos agentes causais do mal-do-pé é de extrema importância para a adoção das medidas de manejo, visando atuar diretamente com o patógeno presente na área e reduzir os danos socioeconômicos gerados pela ação dos patógenos.

Palavras-Chave: *Diaporthe* spp.; *Ipomoea batatas*; *Macrophomina* sp.; *Neoscytalidium dimidiatum*; *Nigrospora vesicularifera*

1. INTRODUÇÃO

Em 2020, a batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.)] tornou-se a 16ª cultura alimentícia mais cultivada no mundo, com produção média de 89.487.835 toneladas. A China lidera o ranking de países produtores de batata-doce, com 10.116.704 toneladas anuais. O Brasil é o 16º do ranking, com 847,9 toneladas e, de acordo com informações disponibilizadas pelo Censo Agropecuário, em 2020 a região Nordeste foi a que deteve maior parte da produção, aproximadamente, 346 toneladas (FAO, 2022; IBGE, 2022).

Embora os valores anuais da produção mundial da batata-doce continuem expressivos, houve uma variação negativa nos últimos 45 anos, com redução de, aproximadamente 59%, quando comparado ao pico de produção em 1959, com 159 milhões de toneladas (FAO, 2022). Dentre os fatores responsáveis pela redução na produção da batata-doce, destacam-se as doenças causadas por fungos, sendo o mal-do-pé a principal doença a afetar a cultura (VENDRAME, *et al.*, 2021).

A principal forma de propagação do patógeno são ramas contaminadas, utilizadas como material propagativo, devido ao baixo custo e à alta eficiência na germinação, bem como na manutenção dos caracteres genéticos e fenotípicos da planta original (PEREIRA *et al.*, 2011). Os prejuízos ocasionados pela ação do patógeno podem ser observados em todas as fases de desenvolvimento da cultura, inclusive na pós-colheita, afetando diretamente sua comercialização (MELLO *et al.*, 2021).

Os sintomas característicos da doença iniciam-se com lesões na haste da planta, na região do colo próximo ao solo, com coloração marrom. Com o avanço da doença, ocorre amarelecimento e murcha das folhas. O ataque severo causa podridão no sistema radicular, impedindo a formação das raízes tuberosas ou a colonização das túberas já formadas, sendo observada podridão seca e escura. No armazenamento, este sintoma evolui rapidamente, inviabilizando sua comercialização (ALMEIDA *et al.*, 2020).

Inicialmente, a identificação dos patógenos responsáveis pela doença era realizada através da análise morfológica das colônias, porém, estudos mostraram que as diferenças morfológicas não eram suficientes para classificar os fungos a nível de espécies, podendo apresentar variação sob diferentes condições ambientais. A utilização da análise filogenética, através do sequenciamento de regiões do DNA, possibilita a descoberta de novos táxons, reclassificando algumas espécies fitopatogênicas

morfologicamente semelhantes, porém com variações genéticas significativas, como *Diaporthe* spp. (ARIYAWANSA *et al.*, 2021).

Até o presente momento, diferentes espécies fúngicas são relatadas como agentes causais do mal-do-pé da batata-doce, dentre as quais pode-se citar: *Diaporthe destruens*, *D. batatas*, *D. kongii*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Ceratocystis fimbriata*, *Macrophomina phaseolina*, *M. pseudophaseolina*, *M. euphorbiicola*, *Lasiodiplodia theobromae*, *L. hormozganensis*, *Fusarium solani*, *Rhizopus* sp. e *Nigrospora vesicularifera* (ALMEIDA *et al.*, 2020; ALMEIDA *et al.*, 2023; BOEREMA *et al.*, 1996; MELLO *et al.*, 2021; PIO-RIBEIRO *et al.*, 2016).

Para um manejo correto da doença, a diagnose correta torna-se uma aliada na redução dos custos com medidas de controle, tendo em vista que o conhecimento do patógeno permite a utilização de ações direcionadas àquela espécie, potencializando a eficiência dos métodos de manejo. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo identificar as espécies associadas ao mal-do-pé em diferentes áreas de cultivo de batata-doce no Nordeste do Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. OBTENÇÃO DE ISOLADOS

Para o isolamento dos fungos, plantas e túberas sintomáticas foram coletadas em regiões produtoras dos estados da Paraíba [Lucena (-6.89927, -34.8691) e Guarabira (-6.85552, -35.4901)], Sergipe [Moita Bonita (-10.5717, -37.3414) e Santa Rosa de Lima (-10.6561, -37.2004)] e do banco de Germoplasma de batata-doce, da Universidade Federal de Alagoas, Campus Rio Largo (-9.466396, -35.829433), entre os meses de fevereiro de 2019 a março de 2020. Foram utilizados 14 isolados patogênicos do estado de Pernambuco, cedidos pela Coleção de Fungos de Solo (CFS), do Laboratório de Fungos de Solo (LAFSOL), da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Fragmentos de tecido vegetais (7 mm) foram retirados da área de interseção entre tecido necrosado e tecido assintomático e submetidos à bateria de desinfestação (álcool 70% por 30 segundos; hipoclorito de sódio (NaClO – 1%) por um minuto; duas lavagens consecutivas com Água Destilada e Esterilizada (ADE) e secos em papel filtro qualitativo estéril (Ø 9 cm, 80 g de gramatura). Posteriormente, os fragmentos foram plaqueados em placas de Petri, contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), acrescido de Cloranfenicol (5 mg.L⁻¹), e incubados por cinco dias, na temperatura de 27 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 horas (luz/escuro).

Todas as culturas puras foram transferidas para tubos criogênicos graduados de rosca externa (Kasvi ®, São José dos Pinhais, Brasil), de acordo com a metodologia descrita por Castellani (1963), e depositadas, em seguida, na CFS.

2.2. TESTE DE PATOGENICIDADE

Para as avaliações da patogenicidade dos isolados e da epidemiologia comparativa foram utilizadas túberas assintomáticas, da cv. Rainha da Praia, com tamanho aproximado de 15 cm, adquiridas na Central de Abastecimento de Pernambuco – CEASA-PE. O material foi desinfestado com solução de hipoclorito de sódio (1%), por 10 minutos, para remoção de agentes externos e restos de solo.

Na inoculação, os isolados foram repicados para meio BDA + Cloranfenicol e incubados por 15 dias, em temperatura de 25 ± 2 °C, com 12h de fotoperíodo. Após o período de incubação, realizou-se a inoculação das túberas utilizando o método de discos da seguinte forma: a) pequenos furos ($\varnothing = 2$ mm) foram realizados nas túberas com auxílio de agulha hipodérmica; b) sobre os furos foram depositados os discos de meio BDA ($\varnothing = 5$ mm) com crescimento micelial do isolado em contato com a superfície do hospedeiro; c) fragmentos de fita Crepe 3M® (50 mm x 50 mm) foram utilizados para fixação dos discos na superfície de cada túbera inoculada.

As túberas foram submetidas às mesmas condições, porém com discos contendo apenas meio de cultura BDA+ Cloranfenicol, no tratamento controle. Os tratamentos foram submetidos à câmara úmida, utilizando-se sacos plásticos transparentes (30x40 cm) e dispostos em delineamento em blocos casualizados, com 2 blocos e 6 repetições por bloco, com remoção da fita crepe após 48 horas. Para recuperação dos respectivos isolados, deu-se prosseguimento aos postulados de Koch.

As avaliações foram realizadas a cada 48 horas, para observação do surgimento dos sintomas, por 15 dias. Para patogenicidade, foi verificada a presença ou ausência de sintomas do mal-do-pé nas túberas, com a medição do diâmetro das lesões, utilizando o paquímetro Digital Caliper (150mm – 6”) MK-040.

2.3. ANÁLISE FILOGENÉTICA

Para preparo da amostra, os patógenos foram cultivados em meio BDA, sob película de celofane de 35g, da Celomax ®, por 15 dias. Para obtenção do micélio, realizou-se a raspagem do papel celofane, prosseguindo-se com a extração de DNA, utilizando o protocolo adaptado de Murray; Thompson (1980).

Devido a variação morfológica das culturas e ao número elevado de patógenos, foi estimada a diversidade de haplótipos entre os isolados, através do sequenciamento da região de Fator de Elongação 1- α (*tef1- α*) (Tabela 1), utilizando o software DnaSP 6.0 (ROZAS *et al.*, 2017). Representantes de cada grupo foram selecionados aleatoriamente, contemplando todas as áreas geográficas de origem dos isolados. Foram sequenciadas as regiões Internal Transcribed Space (ITS) e β -tubulina (Tub), marcadores indicados para análises multilocus dos gêneros *Lasiodiplodia*, *Neoscytalidium*, *Diaporthe* e *Macrophomina*, utilizando os *primers* listados na tabela 1. As concentrações de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoPhotometer UV/Vis (IMPLEN, Korea) e diluídas para 25 ng / μ L para reações de PCR.

As amplificações via PCR foram preparadas em reações com volume final de 14 μ L contendo: 2 μ L de DNA; 0,625 μ L dimethyl sulfoxide - DMSO (Synth, São Paulo, BR); 0,625 μ L Oligonucleotídeo 1; 0,625 μ L Oligonucleotídeo 2; 6,25 μ L GreenTaq MasterMix (Promega); e 3,875 μ L de água ultrapura.

As ciclagens térmicas das PCR foram realizadas em SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Scientific, Waltham, USA), conforme Udayanga et al (2014) e Crous et al (2004) para os *primers*. Os produtos de PCR foram corados com SYBR® green (Thermo Scientific, Waltham, USA), e visualizados em gel de agarose (1%).

Purificaram-se as amostras da PCR com kit de purificação PureLink™ PCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. As sequências gênicas foram obtidas por eletroforese capilar em sequenciador automático ABI3500, utilizando polímero POP7 e BigDye Terminator 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e os mesmos conjuntos de iniciadores utilizados para amplificação por PCR.

As sequências gênicas foram montadas em *contigs*, editadas usando o programa MEGA11 (TAMURA; STECHER; KUMAR, 2021), com sequências consenso comparadas com sequências referências pertencentes aos gêneros encontrados. Para comparações das sequências através da análise de BLAST (Basic Local Alignment Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), com espécies previamente identificadas e depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), sequências adicionais foram obtidas. As sequências obtidas serão depositadas no GenBank e ficarão à disposição para consultas futuras.

A determinação dos haplótipos foi realizada usando o *software* DNA sequence polymorphism – DnaSP versão 6.12.03 (<http://www.ub.edu/dnasp/>). Os alinhamentos de

múltiplas sequências (MSAS) foram realizados no software Multiple Alignment Program For Amino Acid Or Nucleotide Sequences – MAFFT versão 7 (KATO; ROZEWICKI; YAMADA, 2019), usando ferramentas de ajuste para direcionamento das sequências, submetendo posteriormente a um novo alinhamento no portal GUIDANCE2 (<http://guidance.tau.ac.il/ver2>) (SELA et al., 2015).

Os agrupamentos genéticos individuais e concatenados (*tef1-α*, ITS e tub) foram submetidos à Análise de Máxima Verossimilhança, em inglês ‘Maximum Likelihood’ (ML), estimadas com a ferramenta RAxML-HP2 on SEDE, modelo GTR GAMMA, na plataforma CIPRES Science Gateway versão 3.3 (<https://www.phylo.org/index.php/>), com 1000 reamostragens para calcular valores de Bootstrap. A árvore filogenética foi visualizada no software FigTree (RAMBAUT, 2018).

Baseando-se na comparação entre os resultados comparativos das filogenias dos genes individuais e multilocus, obtidas por ML, os agrupamentos filogenéticos foram determinados de acordo com o conceito de Reconhecimento de Espécies Filogenéticas Genealógicas e os critérios adotados para concordância e discordância entre genealogias (TAYLOR *et al.*, 2000).

2.4.EPIDEMIOLOGIA COMPARATIVA

Os parâmetros epidemiológicos foram mensurados seguindo a metodologia descrita no teste de patogenicidade, com o objetivo de observar possíveis diferenças na expressão dos sintomas e avanço da doença, relacionadas às diferentes espécies de agentes causais identificadas. As avaliações foram realizadas a cada 48 horas, para observação do surgimento dos sintomas, por 15 dias e a medição do diâmetro das lesões foi realizada utilizando o paquímetro Digital Caliper (150mm – 6”) MK-040, com valores obtidos da média dos eixos das medições.

Determinou-se também o Período de Incubação (PI), de acordo com o intervalo de tempo entre a inoculação do patógeno e o surgimento dos sintomas, a taxa de progresso da doença (r), calculada utilizando a equação $Y_t = Y_0 + Y_0.r.t$, onde Y = diâmetro da lesão, r = taxa de progresso da doença e t = tempo de avaliação) e a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), obtida pela soma das médias da severidade em cada intervalo de aferição. As médias foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Scott-knott a 5%, para AACPD e PI, e Kruskal-Wallis a 5%, para r , utilizando o Statistix 9.0.

2.5. ANÁLISE MORFOLÓGICA

Isolados representativos foram cultivados em placa de Petri ($\varnothing = 9$ cm), com meio BDA, por 10 dias, a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 horas. O diâmetro das colônias foi medido diariamente, com auxílio de paquímetro digital, para calcular a taxa de crescimento do patógeno (mm.dia^{-1}). Cada tratamento foi composto por cinco repetições. Avaliou-se, após 10 dias, a forma da colônia, a densidade e a produção de pigmentos no meio BDA foram observadas após sete dias. Forma, cor e tamanho dos ascospores foram observados usando microscopia de luz (Carl Zeiss, Berlim, Germany), por objetivas de 10x e 40x.

3. RESULTADOS

3.1. OBTENÇÃO DE ISOLADOS

A partir do material vegetal sintomático, foram obtidos e armazenados na CFS 239 isolados fúngicos de Sergipe, Alagoas e Paraíba, somados aos 14 isolados de Pernambuco (Tabela 2). Os isolados foram recuperados de cultivares distintas de batata-doce: cv. CO-Roxa, cv. CO-Branca, cv. Rainha da Praia, cv. Beterraba, cv. Abóbora, cv. Rosada e cv. Vermelha, observando-se maior incidência nas áreas de coleta cultivadas com a cv. CO-Roxa (35%), cv. CO-Branca (30%) e cv. Rainha da Praia (20%).

3.2. TESTE DE PATOGENICIDADE

Dos isolados coletados na Paraíba, Sergipe e Alagoas, foram patogênicos 3, 22 e 17, respectivamente, com confirmação da patogenicidade dos isolados de PE. A expressão dos sintomas iniciou-se 48 horas após a inoculação do patógeno (Tabela 3), com lesões circulares observadas seis dias após a inoculação do patógeno, de coloração variando entre castanho claro e escuro, com visualização de picnídios de cor preta, em alguns isolados (Fig. 2). Internamente, alguns isolados apresentavam lesões ascendentes, atingindo a polpa da batata-doce, encharcadas, inicialmente castanhas, tornando-se necrosadas com o desenvolvimento dos sintomas (Fig. 3).

3.3. ANÁLISE FILOGENÉTICA

A partir dos *amplicons* sequenciados obteve-se 39 sequências para *tef1- α* e 18 para ITS e TUB2. Foram obtidos 16 haplótipos (Tabela 4), por meio do sequenciamento das regiões *tef1- α* , sendo selecionados 18 isolados representativos para amplificação e sequenciamento de ITS e β -TUB, com análise filogenética concatenada (*tef1- α* , ITS e β -

TUB), comparada com regiões de espécies representativas já descritas previamente (Tabela 5).

A análise de ML revelou a incidência de *Diaporthe batatas*, *D. destruens*, *D. kongii*, *D. citri* e *D. ueckeri* (Fig. 4), *Macrophomina* sp. (Fig. 5) e *Neoscytalidium dimidiatum* (Fig. 6) nas áreas, todos suportados por valores de Bootstrap ≤ 85 .

3.4.EPIDEMIOLOGIA COMPARATIVA

Em relação às espécies identificadas neste trabalho, *Diaporthe batatas* foi a de maior frequência, sendo encontrada nas áreas de coleta de Pernambuco, Alagoas e Sergipe, em ramas e túberas. Os isolados de *D. destruens* foram recuperados dos estados de Pernambuco e Paraíba, *D. ueckeri*, *D. citri* e *Neoscytalidium dimidiatum* no estado de Pernambuco, *D. kongii* em Pernambuco e Sergipe e *Macrophomina* sp. na Paraíba (Fig. 7).

O período de incubação dos patógenos variou entre dois e treze dias e os resultados de AACPD diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$) entre os isolados. O agrupamento epidemiológico foi realizado através da distribuição dos isolados, com intervalos de AACPD de 6,5 a 139 mm², sem distinção específica (Fig. 8). Aproximadamente 84% dos isolados apresentaram médias entre 6,5 e 59 mm², não sendo a variação uniforme entre as espécies. Os valores de *r* não diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$), portanto não foram ranqueados (Tabela 3).

3.5.ANÁLISE MORFOLÓGICA

Foram observadas colônias de coloração amarela, branca, cinza, preta e verde olivácea, algumas apresentando manchas zonadas, gutação e produção de picnídios (Tabela 6). Isolados de *D. batatas* tiveram, dentre as principais características morfológicas, coloração branca na parte superior da colônia (tampa), branca e verde olivácea na parte inferior (fundo), manchas zonadas, produção de picnídios de tamanhos distintos e coloração preta, crescimento cotonoso e gutação em alguns isolados (Fig. 9A). As colônias de *D. destruens* (Fig. 9B) apresentaram crescimento rasteiro, coloração marrom e não houve formação de picnídios.

Para *D. kongii* (Fig. 9C), o crescimento colonial observado foi de micélio amarelo na parte superior e marrom na parte inferior. A colônia de *D. ueckeri* (Fig. 9D) apresentou cor cinza no fundo e branca na parte superior, crescimento cotonoso e pode ser observada a gutação, semelhante à colônia de *D. citri* (Fig. 9E), que, além destas características, produziu picnídios grandes e pretos. No isolado de *Macrophomina* sp.

(Fig. 9F), observou-se micélio preto, de crescimento cotonoso, assim como o isolado de *Neoscytalidium dimidiatum* (Fig. 9G).

4. DISCUSSÃO

O elevado número de isolados obtidos nas áreas de coleta reflete a problemática da doença, sendo observadas áreas 100% inviabilizadas para o cultivo, principalmente nos estados de Alagoas, Pernambuco e Sergipe, onde um elevado número de fungos foi isolado. Dados da FAO (2022) mostram que houve redução de 2,7% na produção nacional de batata-doce, entre as safras de 2020 e 2021, sendo esta queda na produção atribuída a diversos fatores, dentre eles a incidência do mal-do-pé (VENDRAME *et al.*, 2022).

Os principais métodos adotados no manejo da doença é utilização de cultivares resistentes e a produção de mudas micropropagadas certificadas e livres do patógeno. A produtividade média abaixo das cultivares convencionais, bem como diferentes características de coloração e polpa, dificulta a aceitação de cultivares resistentes no mercado, incentivando o uso das cultivares suscetíveis (AMARO *et al.*, 2019; VENDRAME *et al.*, 2022).

Observou-se maior incidência da doença nas áreas de plantio onde são produzidas as cultivares CO-Roxa, CO-Branca e Rainha da praia. Embora a literatura afirme que não há cultivares resistentes ao mal-do-pé da batata-doce, nas áreas cultivadas com a cv. Nova Italiana, cultivar regional do estado de Sergipe, não foram observados sintomas da doença (VENDRAME *et al.*, 2022).

Os isolados patogênicos promoveram sintomas característicos de podridão de túberas em batata-doce, semelhantes aos descritos na literatura, havendo variação na coloração dos sintomas, de acordo com os isolados estudados. A presença de podridão de cor castanha nos tratamentos com isolados de *Diaporthe* spp. e preta, para os isolados de *N. dimidiatum* e *Macrophomina* sp. foi evidenciada neste estudo, com sintomas semelhantes aos identificados por GAI *et al.* (2016), HAO *et al.* (2020) e MELLO *et al.* (2021).

A variabilidade morfológica dos isolados patogênicos fomentou os estudos sobre diversidade de agentes causais da doença, tendo em vista que as características observadas em alguns isolados diferiram das características gerais relatadas para o gênero *Diaporthe*, tais como coloração das colônias, produção de picnídios e formato

das hifas (GAO *et al.*, 2017; UDAYANGA *et al.*, 2014). A diversidade de gêneros se dá mediante a proximidade das áreas de produção de batata-doce e áreas de produção de hortaliças, cana-de-açúcar e outras raízes, pois uma espécie com ampla gama de hospedeiros, tende a se estabelecer com maior facilidade em novas áreas de cultivo, não necessitando de hospedeiro-específico para o seu desenvolvimento (MELLO *et al.*, 2021).

Atualmente, considera-se *D. destruens* como principal agente causal do mal-do-pé da batata-doce, contudo, o alto número de isolados de *D. batatas* mostra que há predominância desta espécie nas áreas de coleta, em todas as regiões geográficas estudadas. Baseando-se nos resultados obtidos, não se descarta a possibilidade de espécies distintas coexistirem na área, sobrevivendo como saprófitas ou endófitas e comportando-se como oportunistas, infectando o hospedeiro em situações de estresse ou por ferimentos gerados pela ação de pragas ou danos durante o manejo da cultura (MELLO *et al.*, 2021).

A patogenicidade de *Neoscytalidium dimidiatum* e *Macrophomina* sp. em batata-doce, teve seu relato publicado recentemente, com isolados coletados em regiões produtoras também no nordeste do Brasil (MELLO *et al.*, 2019; MELLO *et al.*, 2021). Almeida *et al.* (2023) identificaram a espécie *N. vesicularifera* como agente causal do mal-do-pé, em plantações localizadas no estado de Pernambuco, confirmando a diversidade de agentes causais da doença.

Os primeiros relatos de *D. ueckeri* causando podridão em batata-doce, em regiões produtoras representativas no nordeste brasileiro, são apresentados neste trabalho. Por meio de tais relatos, ampliamos o leque de diversidade de gêneros responsáveis pelo mal-do-pé da batata-doce, fomentando material para mais estudos sobre etiologia, epidemiologia e manejo da doença (ALMEIDA *et al.*, 2020; ALMEIDA *et al.*, 2023).

Os resultados deste estudo comprovam a disseminação de patógenos responsáveis pelo mal-do-pé da batata-doce, na região Nordeste do Brasil, indicando que a sua facilidade em se adaptar a novas culturas pode representar uma ameaça para a agricultura atual. A correta identificação dos agentes causais do mal-do-pé é de extrema importância para a adoção das medidas de manejo, visando atuar diretamente com o patógeno presente na área e reduzir os danos socioeconômicos gerados pela ação dos patógenos.

5. AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brasil). Os autores agradecem ao Presidente da Cooperativa de Produtores Rurais de Moita Bonita, José Joelito Costa Santos, a Estação Experimental de Bonito, do Instituto Agrônomo de Pernambuco, ao Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE e ao Departamento de Melhoramento Genético da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, pelo auxílio durante as coletas em campo, disponibilização de material vegetal utilizado nos experimentos, disponibilização de estrutura física e pelos serviços de análises genéticas e acesso ao banco de germoplasma de batata-doce, respectivamente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, T.R.P; COELHO, I.L; VASCONCELOS, L.S.B; PONTES, M.A; VIEIRA, W.A.S; CÂMARA, M.P.S; DOYLE, V.P; LARANJEIRA, D. First report of *Diaporthe kongii* causing foot rot on Sweet Potato in Brazil. **Plant Disease**, v. 104, n.1, p. 284, 2020.

ALMEIDA, THAÍS REGINA PINTINO DE. **Atividade biocontroladora de *Trichoderma* spp. e de leveduras sobre *Diaporthe destruens***. 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

ALMEIDA, T.R.P; COELHO, I.L; VASCONCELOS, L.S.B; SILVA, E.F.M; BARROS, L.R.A; PONTES, M.A; SANTOS, T.S; VIEIRA, W.A.S; CÂMARA, M.P.S. & LARANJEIRA, D. First report of *Nigrospora vesicularifera* causing foot rot on sweet potato in Brazil. **Crop Protection**, v. 166, 2023. ISSN 0261-2194, DOI: 10.1016/j.cropro.2022.106171

AMARO, G.B; TALAMINI, V; FERNANDES, F.R; SILVA, G.O; MADEIRA, N.R. **Desempenho de cultivares de batata-doce para rendimento e qualidade de raízes em Sergipe**. **Brazilian Journal of Agricultural Sciences / Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.. 14, n. 1, p. 1-6, 2019

ARIYAWANSA, H.A; TSAI, I; WANG, J; WITHEE, P; TANJIRA, M; LIN, S; SUWANNARACH, N; KUMLA, J; ELGORBAN, A.M; CHEEWANGKOON, R. Molecular Phylogenetic Diversity and Biological Characterization of *Diaporthe* Species Associated with Leaf Spots of *Camellia sinensis* in Taiwan. **Plants** v. 10, 2021. DOI: 10.3390/plants10071434

BOEREMA, G.H; LOERAKKER, W.M; HAMERS, M.E.C. Contributions towards a monograph of *Phoma* (*Coelomycetes*) -III. 2. Misapplications of the type species name and the generic synonyms of *Plenodomus* (excluded species). **Persoonia**, v. 16, p. 141–190, 1996.

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.

CASTELLANI, A. The “water cultivation” of pathogenic fungi. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Michigan, v. 66, p. 283-286, 1963.

FAO Global Statistical Yearbook, **FAO Regional Statistical Yearbooks**. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QI>>. Acesso em: 05 jan 2023.

GAI, Y; MA, H; CHEN, X; ZHENG, J; CHEN, H; LI, H. Stem blight, foot rot and storage tuber rot of sweet potato caused by *Plenodomus destruens* in China. **J Gen Plant Pathol**, v. 82, p.181–185, 2016. DOI: 10.1007/s10327-016-0661-z

GAO, Y.; LIU, F.; DUAN, W.; CROUS, P. W. and CAI, L. *Diaporthe* is paraphyletic. **IMA FUNGUS**. v. 8, n.º 1, p. 153–187, 2017.

HAO, Y; ALUTHMUHANDIRAM, J.V.S.; CHETHANA, K. W. T; MANAWASINGHE, I.S.; LI, X; LIU, M; HYDE, K.D; PHILLIPS, A.J.L.; ZHANG, W. *Nigrospora* Species Associated with Various Hosts from Shandong Peninsula, China, **Mycobiology**, 2020. DOI: 10.1080/12298093.2020.1761747

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção Agrícola Municipal, 2022. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1612>. Acessado em: 03/01/2023

KATOH, K; ROZEWICKI, J; YAMADA, K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1160–1166, 2019. DOI: [10.1093/bib/bbx108](https://doi.org/10.1093/bib/bbx108).

MELLO, J.F; BRITO, A.C.Q; SOUZA-MOTTA, C.M; VIEIRA, J.C.B; MICHEREFF, S.J. and MACHADO, A.R; First Report of *Neoscytalidium dimidiatum* Causing Root Rot in Sweet Potato in Brazil. **Plant disease**, v. 103, n. 2, p. 373, 2019.

MELLO, J.F; BRITO, A.C.Q; VIEIRA, J.C.B; CÂMARA, M.P.S; MICHEREFF, S.J; SOUZA-MOTTA, C.M; MACHADO, A.R. Identification and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species associated with root and stem rot of sweet potato in Brazil. **Plant Pathology**, p. 1–15, 2021.

MURRAY, M. A. S. E THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, p. 4321-4325, 1980. DOI: 10.1093/nar/8.19.4321

PEREIRA, R. R.; FERNANDES, F. R.; PINHEIRO, J. B. **Recomendações para manejo da podridão-do-pé em batata-doce**. Brasília, DF: Embrapa-CNPH, dezembro, 2011. 5 p. (Comunicado técnico / Embrapa Hortaliças, ISSN 1414.9850; 79).

PIO-RIBEIRO, G; MARIANO, R.L.R; PEREIRA CARVALHO, R.C; SOUZA, E.B; MELO FILHO, P.A. (2016) Doenças da Batata-Doce. In: Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A. (Eds.) Manual de Fitopatologia, Volume 2: **Doenças das Plantas Cultivadas**, 5ª edição. São Paulo, Brasil: Ceres: p. 149–157.

RAMBAUT, A. (2018) **FigTree 1.4.4**. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Acessado em 15/01/2023.

RAZA, M; ZHANG, Z; HYDE, K.D.; DIAO, Y; CAI, L. Culturable plant pathogenic fungi associated with sugarcane in southern China **Fungal Diversity**, p. 1-104, 2019.

ROZAS, J; FERRER-MATA, A; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C; GUIRAO-RICO, S; LIBRADO, P; RAMOS-ONSINS, S. E; SÁNCHEZ-GRACIA, A. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 12, p. 3299–3302., 2017. DOI: 10.1093/molbev/msx248

TAMURA, K; STECHER, G; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, p. 3022-3027, 2021.

TAYLOR, J. W; JACOBSON, D. J; KROKEN, S; KASUGA, T; GEISER, D. M; HIBBETT, D. S; FISHER, M.C. Phylogenetic Species Recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genet. Biology**, v. 31, p. 21-32, 2000. DOI: 10.1006/fgbi.2000.1228

UDAYANGA, D; CASTLEBURY, L.A; ROSSMAN, A.Y; CHUKEATIROTE, E; HYDE, K.D. Insights into the genus *Diaporthe*: phylogenetic species delimitation in the *D. eres* species complex. **Fungal Diversity**, v. 67, p. 203–229, 2014. DOI: 10.1007/s13225-014-0297-2

VENDRAME, L.P.C.; CASTRO E MELO, R.A; SILVA, G.O; AMARO, G.B; PILON, L; GRUIMARAES, J.A; PINHEIRO, J.B; PEREIRA, R.B. **BRS Cotinga: nova cultivar de batata-doce de polpa roxa para processamento industrial – produtiva, com ampla adaptabilidade e rica em antioxidantes**. Brasília: EMBRAPA HORTALIÇAS, 2022. 20p. (EMBRAPA HORTALIÇAS. Circular Técnica, 177).

ANEXOS I – FIGURAS

Figura 4. Sintomas do mal-do-pé da batata-doce. Ramas sintomáticas (A, B e C). Corte transversal de túberas sintomáticas: cv. Beterrada Beterraba (D) e cv. Rainha da Praia (E).

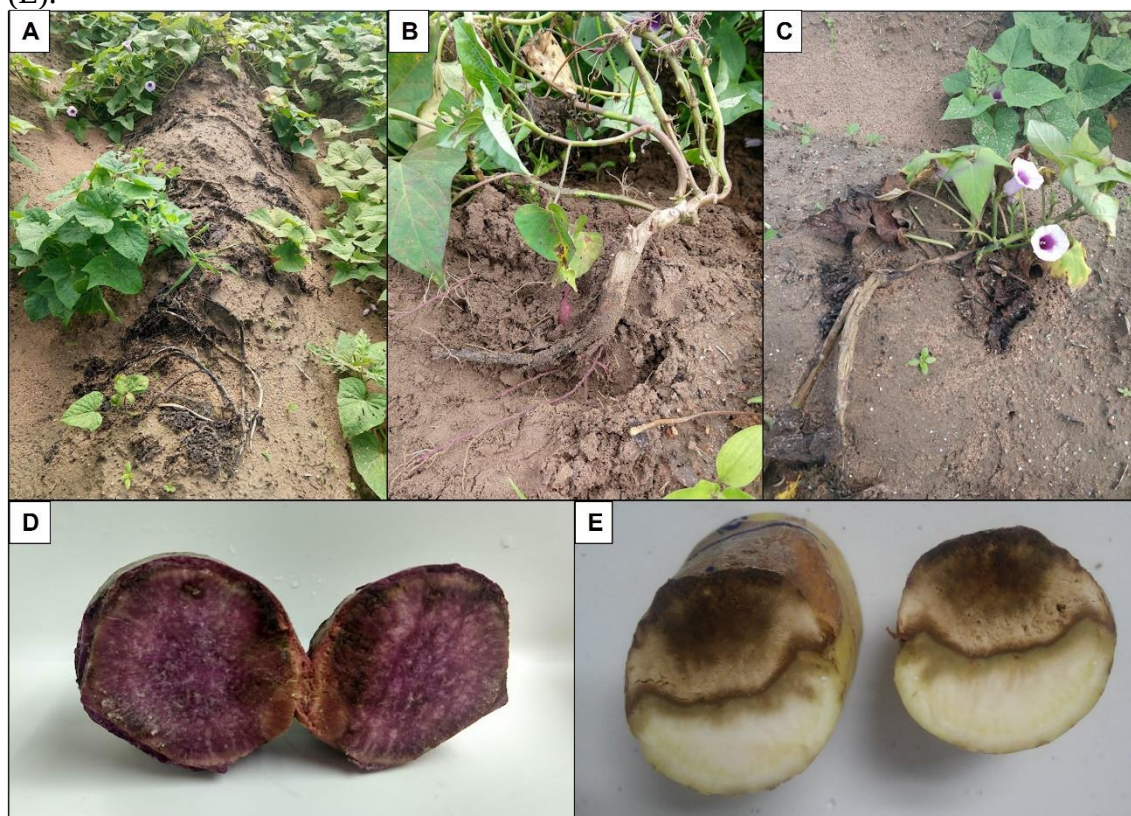
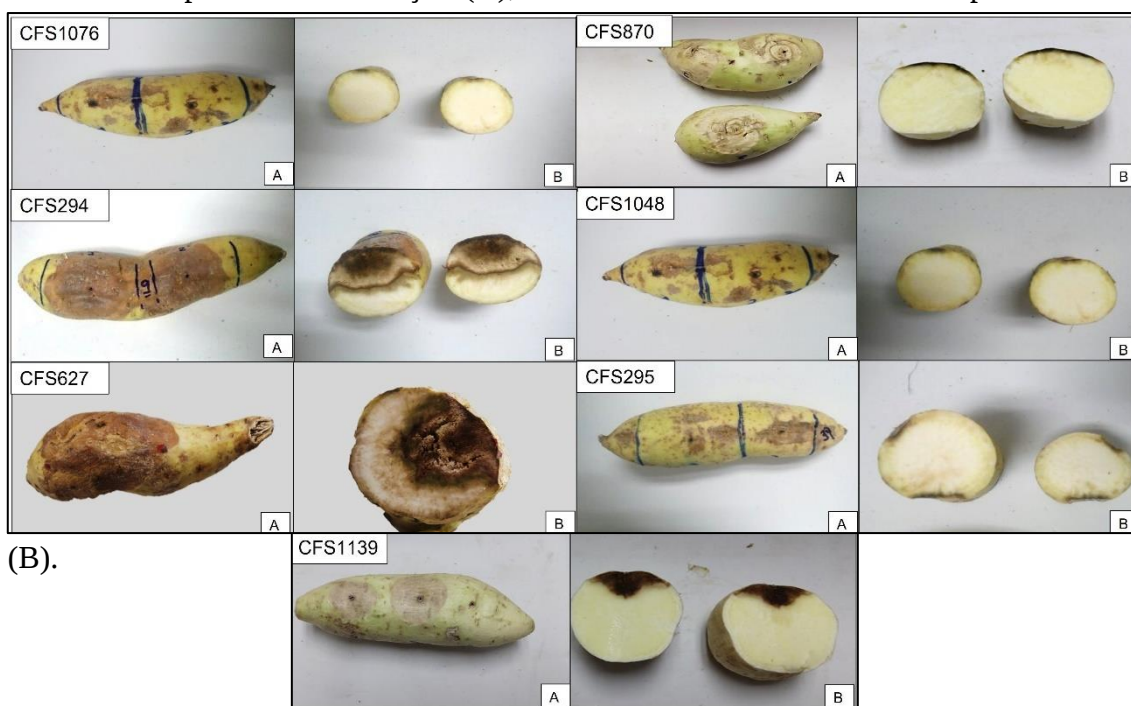


Figura 5. Sintomas do mal-do-pé em túberas, cv. Rainha da Praia, causados por *D. ueckeri* (CFS1076), *D. Batatas* (CFS870), *D. destruens* (CFS294), *D. citri* (CFS1048), *D. kongii* (CFS627), *N. Dimidiatum* (CFS295) e *Macrophomina* sp. (CFS1139). Sintomas no ponto de inoculação (A); Corte transversal e sintomas em profundidade



(B).

Figura 6. Visualização de sintomas a partir do corte transversal de túberas de batata-



doce

Figura 7. Árvore de Máxima Verossimilhança – MV de espécies de *Diaporthe*, baseada nas regiões gênicas ITS, *tef1-α* e *tub2*, enraizada com *Diaporthella corylina* (CBS 121124). Os valores de Bootstraps acima de 70, estão dispostos nos ramos, próximos aos nós. Sequências em negrito foram obtidas nesse estudo e encontram-se destacadas em cinco agrupamentos coloridos (I, II, III, IV, V).



Figura 8. Árvore de Máxima Verossimilhança – MV de *Macrophomina* sp., baseada nas regiões gênicas ITS, *tef1-α*, enraizada com *Botryosphaeria dothidea* (DAR77825). Os valores de Bootstraps acima de 70, estão dispostos nos ramos, próximos aos nós.

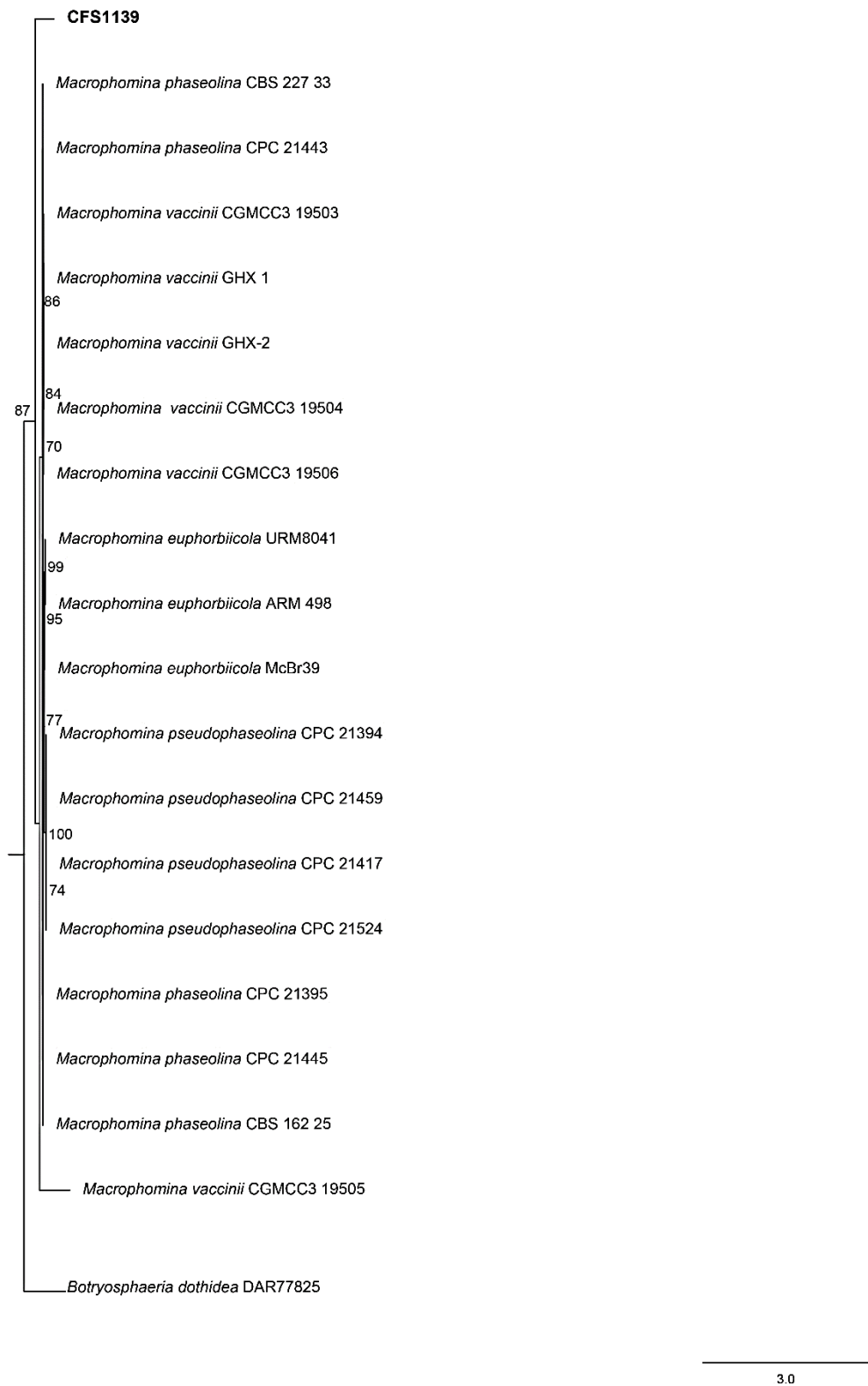


Figura 9. Árvore de Máxima Verossimilhança – MV de *Neoscytalidium dimidiatum*, baseada nas regiões gênicas ITS e *tef1-α*, enraizada com *Macrophomina phaseolina* (PD112). Os valores de Bootstraps acima de 70, estão dispostos nos ramos, próximos aos nós. Sequências em negrito foram obtidas nesse estudo.

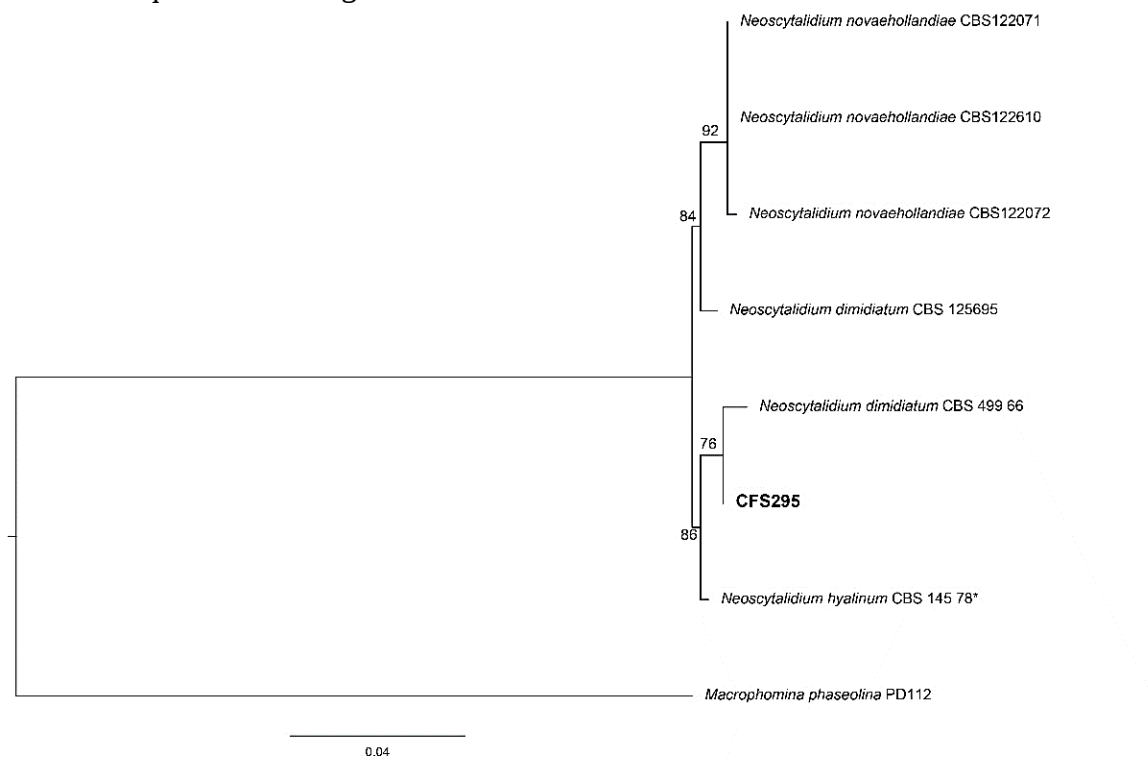


Figura 10. Frequência de espécies patogênicas associadas ao mal-do-pé da batata-doce, de acordo com a região geográfica.

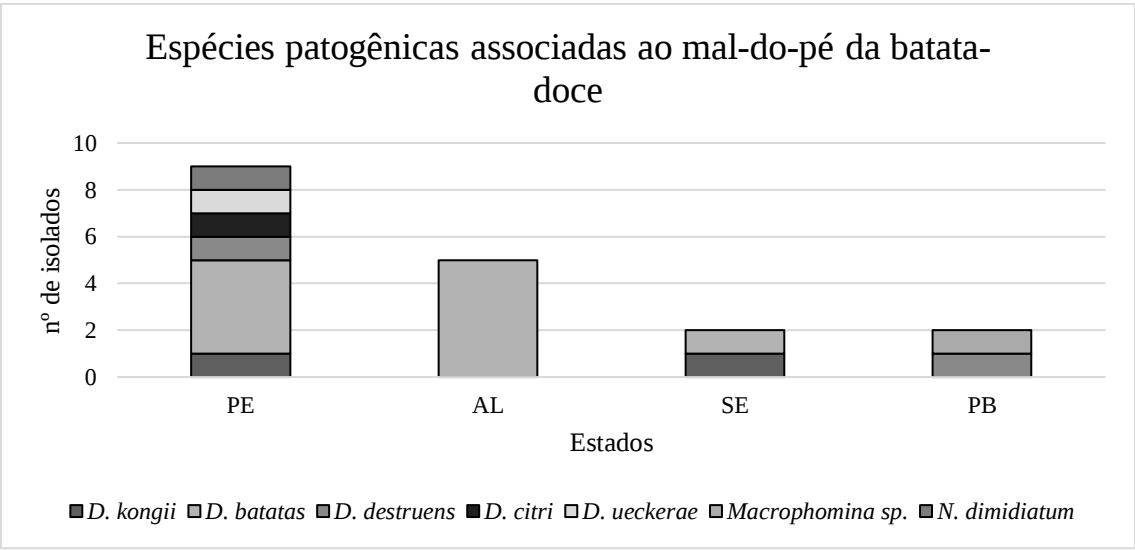


Figura 11. Agrupamento epidemiológico (conforme a severidade estimada pelos valores médios da área abaixo da curva do progresso da doença – AACPD) de isolados patogênicos à batata-doce.

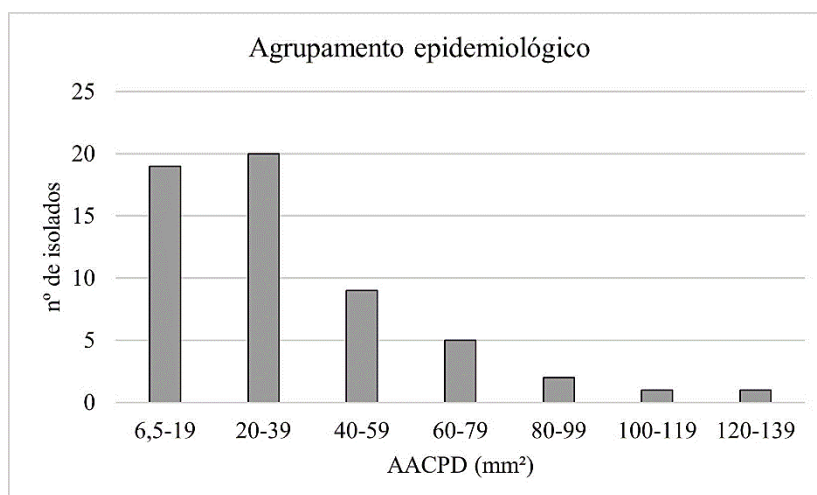
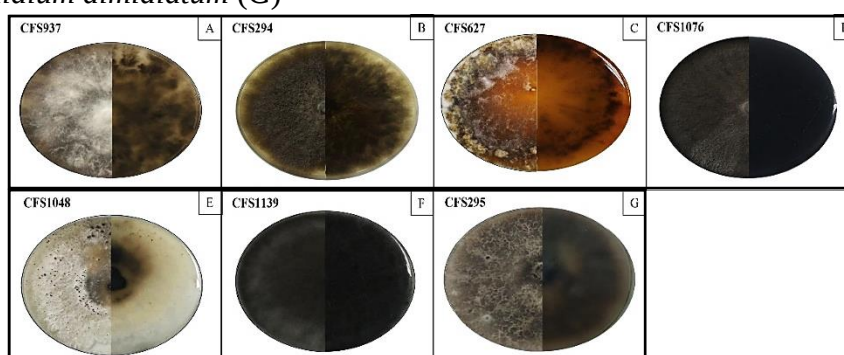


Figura 12. Agentes causais do mal-do-pé da batata-doce: *Diaporthe batatas* (A); *D. destruens* (B); *D. kongii* (C); *D. ueckeri* (D); *D. citri* (E); *Macrophomina* sp. (F); *Neoscytalidium dimidiatum* (G)



ANEXO II – TABELAS

Tabela 1. Sequências de *primers* e regiões gênicas utilizados neste estudo.

Região	Primer	Sequência	Referência
ITS	ITS 1	5'-TCCGTWGGTGAACCWGC-3'	White <i>et al.</i> , 1990
ITS	ITS 4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	Udayanga <i>et al.</i> , 2012
EF	258F	5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3'	Carbone; Kohn 1999
EF	986R	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	Udayanga <i>et al.</i> , 2012
EF	688F	5'-CGGTCACTTGATCTACAAGTGC-3'	Alves <i>et al.</i> , 2008
EF	1251R	5' -CCTCGAACTCACCAGTACCG-3'	
Tub2	Bt1a	5'-GGTAACCAAATCGGTGCTTTC-3'	Crous <i>et al.</i> , 2004
Tub2	Bt1b	5'-ACCCTCAGTG TAGTGACCCTTGGC-3'	
Tub2	Bt2a	5'-GGTAACCAAATCGGTGCTTTC-3'	Crous <i>et al.</i> , 2004
Tub2	Bt2b	5'-ACCCTCAGTG TAGTGACCCTTGGC-3'	

Tabela 2. Descrição e procedência de isolados fúngicos obtidos de *Ipomoea batatas*.

Código*	Local	Local
CFS 740 – 759, 791, 792	Túbera	Santa Rosa de Lima/Povoado de Areia / SE
CFS 789	Túbera	Moita Bonita / SE
CFS 894 – 897, 952, 953	Túbera	Rio Largo/UFAL
CFS 1131 – 1138, 1143 – 1148	Túbera	Itambé/PB
CFS 1159 - 1161	Túbera	Lucena/PB
CFS760 – 788, 790, 793 – 798	Caule	Santa Rosa de Lima/Povoado de Areia / SE
CFS798 – 851, 853 – 874	Caule	Moita Bonita / SE
CFS875 – 893, 898 – 921, 954 – 977	Caule	Rio Largo / UFAL
CFS294, 627, 1015 – 1021, 1023 – 1036	Caule	São Joaquim do Monte / PE
CFS1037 – CFS1053, 1055 – 1063	Caule	Belém de Maria/PE
CFS1064, 1065	Caule	Palmares / PE
CFS1066 – 1075	Caule	Cupira / PE
CFS1022, 1054, 1076 – 1130	Caule	Lagoa dos Gatos / PE
CFS 1139 – 1142	Caule	Lucena / PB
CFS 1149 – 11458	Caule	Guarabira/PB

Tabela 3. Área abaixo da curva de progresso da doença, taxa de progresso da doença e período de incubação de agentes causais do mal-do-pé da batata-doce.

Código	AACPD ^x	r ^y	PI ^z
CFS 831	14,178 ± 5,99 ^d	0,0426 ± 0,02	7
CFS 802	11,587 ± 1,92 ^d	0,0279 ± 0,01	7
CFS 775	11,433 ± 8,56 ^d	0,0000 ± 0	13
CFS 817	12,798 ± 1,81 ^d	0,0415 ± 0	7
CFS 740	12,582 ± 1,47 ^d	0,0448 ± 0	7
CFS 750	11,956 ± 1,35 ^d	0,0205 ± 0	9
CFS 752	25,403 ± 4,92 ^c	0,0674 ± 0,01	9
CFS 861	11,420 ± 3,53 ^d	0,0199 ± 0	9
CFS 742	14,350 ± 3,71 ^d	0,0234 ± 0,01	9
CFS 823	6,502 ± 0,30 ^d	0,0000 ± 0,00	13
CFS 754	26,344 ± 8,93 ^c	0,0744 ± 0,02	7
CFS 778	21,396 ± 7,16 ^c	0,0617 ± 0,02	7
CFS 837	9,608 ± 3,25 ^d	0,0000 ± 0	13
CFS 791	65,052 ± 3,11 ^a	0,11795 ± 0	7
CFS 822	27,668 ± 2,64 ^c	0,060335 ± 0,06	11
CFS 773	40,424 ± 2,97 ^b	0,067328 ± 0,02	8
CFS 829	45,999 ± 24,85 ^b	0,092272 ± 0,02	8
CFS 747	90,072 ± 3,78 ^a	0,109441 ± 0	7
CFS 828	44,401 ± 7,13 ^b	0,065118 ± 0,02	9
CFS 935	38,748 ± 0,53 ^b	0,0861 ± 0	7
CFS 942	26,845 ± 6,80 ^c	0,0854 ± 0,02	7
CFS 879	27,911 ± 2,40 ^c	0,0987 ± 0	7
CFS 913	54,618 ± 13,04 ^b	0,0875 ± 0,01	9
CFS 897	25,981 ± 1,59 ^c	0,0679 ± 0	9
CFS 903	25,443 ± 7,10 ^c	0,0464 ± 0,02	9
CFS 870	18,654 ± 3,02 ^c	0,0345 ± 0,01	9
CFS 896	26,877 ± 5,08 ^c	0,0732 ± 0,01	7
CFS 932	18,283 ± 2,93 ^c	0,0493 ± 0,02	8
CFS 907	15,607 ± 1,64 ^d	0,0290 ± 0	7
CFS 865	16,482 ± 3,05 ^d	0,0478 ± 0,01	9
CFS 946	22,117 ± 4,97 ^c	0,0417 ± 0	9
CFS 931	14,948 ± 1,67 ^d	0,0434 ± 0,01	9
CFS 934	27,862 ± 9,65 ^c	0,0541 ± 0,02	7
CFS 965	15,623 ± 1,13 ^d	0,0334 ± 0	7
CFS 937	16,889 ± 4,00 ^d	0,0222 ± 0,01	9
CFS 854	30,113 ± 3,91 ^c	0,0797 ± 0,01	7
CFS 953	13,641 ± 0,27 ^d	0,0313 ± 0	7
CFS 970	28,158 ± 8,16 ^c	0,0683 ± 0	7
CFS 960	26,056 ± 0,99 ^c	0,0412 ± 0,01	7
CFS 1156	49,727 ± 3,07 ^b	0,0259 ± 0	7
CFS 1139	26,650 ± 12,6 ^c	0,0302 ± 0	5
CFS 1136	15,147 ± 8,80 ^d	0,2391 ± 0,05	9
CFS 1015	55,1725 ± 2,61 ^b	0,0689 ± 0,01	4
CFS 1017	42,741 ± 19,98 ^b	0,1166 ±	8
CFS 1023	91,384 ± 19,19 ^a	0,0605 ± 0,01	8
CFS 1029	36,102 ± 12,9 ^b	0,0794 ± 0,02	4

Tabela 3. Continuação

CFS 1043	62,755 ± 13,5 ^a	0,0601 ± 0	4
CFS 1044	37,726 ± 2,17 ^b	0,0593 ± 0	7
CFS 1047	133,574 ± 17,5 ^a	0,0722 ± 0	2
CFS 1048	39,639 ± 4,73 ^b	0,0700 ± 0	5
CFS 1056	78,571 ± 38,37 ^b	0,1076 ± 0,07	6
CFS 1059	60,505 ± 3,88 ^a	0,0614 ± 0	4
CFS 1061	56,667 ± 8,13 ^b	0,0444 ± 0,01	3
CFS 1076	30,181 ± 10,79 ^c	0,2631 ± 0,10	8
CFS294	42,741 ± 19,9 ^b	0,11668 ± 0,03	5
CFS295	112,087 ± 7,9 ^a	0,049453 ± 0	3
CFS 627	75,82 ± 1,14 ^a	0,054389 ± 0,01	2
M.G	35,77		
C.V(%)	11,52		

^xAACPD – Área abaixo da curva de progresso da doença (mm²): valores médios ± valores de desvio médio. Para análise estatísticas, os valores foram submetidos a transformação de Logaritmo: Log (AACPD). Médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.

^yr – Taxa de progresso da doença (mm.dia⁻¹): valores médios estimados pelo modelo linear ($Yt=Y0+Y0.r.t$). Para análise estatísticas, os valores foram submetidos a transformação de Logaritmo: Log(r). Médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.

^zPI – Período de incubação (dias): determinado pelo intervalo de tempo entre a inoculação e o surgimento dos primeiros sintomas.

Tabela 4. Diversidade de haplótipos entre os isolados, através do sequenciamento da região de Fator de Elongação 1- α (*tef1*- α)

Haplótipo	Frequência ^a	Sequências (CFS)
1	23	953, 965, 970, 1023, 1029, 1032, 1044, 1051, 1056, 1133, 865, 896, 897, 903, 907, 932, 935, 937, 942, 1043, 1059, 1047, 1015
2	1	931
3	1	1038
4	1	960
5	1	1017
6	2	1035, 1136
7	1	870
8	1	879
9	1	942
10	1	854
11	1	1048
12	1	1076
13	1	627
14	1	294
15	1	295
16	1	1139

^aNúmero de isolados patogênicos

Tabela 5. Espécie, hospedeiro/substrato, localidade e números de acesso do GenBank dos isolados incluídos no estudo.

Espécies	Código do Isolado	Hospedeiro	País	ITS	EF	TUB
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	DAR77825	<i>Vitis vinifera</i>	Australia	EU137876	EU137877	-
<i>Diaporthe batatas</i>	SP-d1	<i>Ipomoea batatas</i>	Coréia do Sul	KU577616	KU647703	KU577614
<i>D. batatas</i>	ZJUDB34	<i>Phomopsis phaseoli</i>	China	KP938298	KP973893	KP973871
<i>D. citri</i>	CBS 135422	<i>Citrus</i> sp.	EUA	NR_145304	KC843071	KC843187
<i>D. citri</i>	CBS 199.39	-	Italia	KC343051	KC343777	KC344019
<i>D. citri</i>	CBS 135422*	<i>Citrus</i> sp.	EUA	KC843311	KC843071	KC843187
<i>D. destruens</i>	MAFF:247441	<i>Ipomoea batatas</i>	Japão	LC624795	LC624796	LC624797
<i>D. endophytica</i>	CBS 133811*	<i>Schinus terebinthifolius</i>	Brasil	KC343065	KC343791	KC344033
<i>D. endophytica</i>	LGMF911	<i>Schinus terebinthifolius</i>	Brasil	KC343066	KC343792	KC344034
<i>D. eres</i>	AR5193*	<i>Ulmus</i> sp.	Alemanha	KJ210529	KJ210550	KJ420799
<i>D. eres</i>	CBS 587.79	<i>Pinus parviflora</i> var. <i>pentaphylla</i>	Japão	KC343153	KC343879	KC344121
<i>D. eres</i>	CBS 101742	<i>Fraxinus</i> sp.	Nova Zelândia	KC343073	KC343799	KC344041
<i>D. irregularis</i>	CGMCC 3.20092*	-	China	MT385951	MT424686	MT424706
<i>D. kongii</i>	BRIP 54031 *	<i>Helianthus annuus</i>	Australia	NR_111616	JN645797	KJ197272
<i>D. kongii</i>	BRIP 54032	<i>Helianthus annuus</i>	Australia	JF431300	JN645798	-
<i>D. masirevicii</i>	BRIP 54256	<i>Helianthus annuus</i>	Australia	KJ197276	KJ197238	-
<i>D. masirevicii</i>	ZHKUCC20-0009	<i>Citrus grandis</i>	China	MT355679	MT409333	MT409287
<i>D. masirevicii</i>	BRIP 57892a *	<i>Glycine max</i>	Australia	KJ197277	KJ197239	-
<i>D. miriciae</i>	BRIP 56918a	<i>Vigna radiata</i>	Australia	KJ197284	KJ197246	KJ197264
<i>D. passifloricola</i>	CPC 27480 = CBS 141329	<i>Passiflora foetida</i>	Malásia	KX228292	-	KX228387
<i>D. passifloricola</i>	<i>D. passifloricola</i> type	<i>Passiflora foetida</i>	Malásia	NR_147595	-	-
<i>D. phaseolorum</i>	CBS 116019	<i>Caperonia palustris</i>	EUA	KC343175	KC343901	KC344143
<i>D. sennae</i>	CFCC 51636*	<i>Cassia bicipularis</i>	China	KY203724	KY228885	KY228891
<i>D. sennae</i>	CFCC 51637	<i>Cassia bicipularis</i>	China	KY203725	KY228886	KY228892
<i>D. sojae</i>	FAU635*	<i>Glycine max</i>	EUA	KJ590719	KJ590762	KJ610875
<i>D. sojae</i>	ZJUD68	<i>Citrus unshiu</i>	China	KJ490603	KJ490482	KJ490424

Tabela 6. Continuação.

<i>D. ueckerae</i>	FAU656 *	<i>Cucumis melo</i>	EUA	KJ590726	KJ590747	KJ610881
<i>D. ueckerae</i>	FAU658	<i>Cucumis melo</i>	EUA	KJ590725	KJ590746	KJ610880
<i>D. ueckerae</i>	FAU660	<i>Cucumis melo</i>	EUA	KJ590723	KJ590744	KJ610878
<i>D. ueckerae</i>	LEQZ03	<i>Eucalyptus citriodora</i>	China	ON075782	ON093809	ON093812
<i>D. unshiuensis</i>	CFCC 52594	<i>Carya illinoensis</i>	China	MH121529	MH121571	MH121606
<i>D. unshiuensis</i>	ZJUD52*	<i>Citrus unshiu</i>	China	KJ490587	KJ49046	KJ490408
<i>Diaporthe coryna</i>	CBS 121124*	<i>Corylus</i> sp.	China	KC343004	KC343730	KC343972
<i>M. euphorbiticola</i>	ARM 498	<i>Ipomoea batatas</i>	Brasil	MK488048	MK511899	-
<i>Macrophomina euphorbiticola</i>	McBr39	<i>Trianthema portulacastrum</i>	Brasil	MH715971	MH712509	-
<i>M. euphorbiticola</i>	URM8041	<i>Ipomoea batatas</i>	Brasil	MK488049	MK511901	-
<i>M. phaseolina</i>	CBS 227.33	<i>Zea mays</i>	-	KF531825	KF531806	-
<i>M. phaseolina</i>	CPC 21443	<i>Vigna unguiculata</i>	Senegal	KF951734	KF952194	-
<i>M. phaseolina</i>	CBS 162.25	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	KF531826	KF531805	-
<i>M. phaseolina</i>	CPC 21445	<i>Vigna unguiculata</i>	Senegal	KF951736	KF952196	-
<i>M. phaseolina</i>	PD112	<i>Prunus dulcis</i>	EUA	GU251105	GU251237	-
<i>M. pseudophaseolina</i>	CPC 21394	<i>Vigna unguiculata</i>	Senegal	KF951786	KF952228	-
<i>M. pseudophaseolina</i>	CPC 21417	<i>Arachis hypogaea</i>	Senegal	KF951791	KF952233	-
<i>M. pseudophaseolina</i>	CPC 21459	<i>Arachis hypogaea</i>	Senegal	KF951794	KF952236	-
<i>M. pseudophaseolina</i>	CPC 21524	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Senegal	KF951799	KF952240	-
<i>M. vaccinii</i>	CGMCC 3.19503	<i>Vaccinium</i> sp.	China	MK687450	MK687434	-
<i>M. vaccinii</i>	CGMCC 3.19506	<i>Vaccinium</i> sp.	China	MK687453	MK687437	-
<i>M. vaccinii</i>	CGMCC 3.19505	<i>Vaccinium</i> sp.	China	MK687452	MK687436	-
<i>M. vaccinii</i>	<i>Macrophomina vaccinii</i> isolate GHX-1	<i>Pogostemon cablin</i>	China	MZ375360.1	MZ393806	-
<i>M. vaccinii</i>	<i>Macrophomina vaccinii</i> isolate GHX-2	<i>Pogostemon cablin</i>	China	MZ375361.1	MZ393807.1	-
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	CBS 499 66	<i>Mangifera indica</i>	Mali	KF531820	ABX80035	-
<i>N. dimidiatum</i>	CBS:125695	<i>Unha humana</i>	França	MH863611	KX464764	-
<i>N. hyalinum</i>	CBS 145 78	<i>Homo sapiens</i>	Reino Unido	MH872880	KF531795	-

Tabela 7. Continuação.

<i>N. novaeollandiae</i>	CBS122071	<i>Crotalaria medicaginea</i>	Australia	EF585540	EF585580	-
<i>N. novaeollandiae</i>	CBS122610	<i>Acacia synchronicia</i>	Australia	EF585536	EF585578	-
<i>N. novaeollandiae</i>	CBS122072	<i>Adansonia gibbosa</i>	Australia	EF585535	EF585581	-

Tabela 6. Características morfológicas de agentes causais do mal-do-pé da batata-doce

Código CFS	Cor da Tampa	Cor do Fundo	Coloração Zonada	Formato de Crescimento	Guta-ção	Produção de Picnídio	Cor de Picnídio	Tamanho do Picnídio
1015	B ^b	B / V	Não	Rasteiro	Sim	Sim	P	Médio
1017	M ^d / B	M	Não	Cotonoso	Não	Não	x	x
294	M / B	M	Não	Rasteiro	Não	Não	x	x
1023	B / V	V	Não	Cotonoso	Não	Sim	P	Grande
1029	B / V	V	Não	Cotonoso	Não	Sim	P	Pequeno
1032	B / V	V	Não	Cotonoso	Não	Sim	P	Médio
1035	M / B	M	Não	Rasteiro	Não	Não	x	x
1038	M / B	M / B	Sim	Rasteiro	Sim	Não	x	x
1043	B / V ^f	V	Sim	Cotonoso	Sim	Sim	P	Grande
1044	B / V	V	Sim	Cotonoso	Sim	Sim	P	Grande
1047	B	B / V	Não	Cotonoso	Sim	Sim	P	Médio
1048	B / C ^c	B / C	Sim	Cotonoso	Sim	Sim	P	Grande
295	P ^e / C	P	Não	Cotonoso	Não	Não	x	x
1051	B / V	V	Sim	Cotonoso	Sim	Sim	P	Grande
627	A ^a	M	Não	Rasteiro	Não	Não	x	x
1056	B / V	V	Sim	Cotonoso	Sim	Sim	P	Grande
1059	B / V	V	Não	Cotonoso	Não	Sim	P	Grande
1061	B / C	C	Não	Cotonoso	Sim	Não	x	x
1076	B / C	C	Não	Cotonoso	Não	Não	x	x
1139	P / C	P	Não	Cotonoso	Não	Não	x	x
1136	M / B	M	Não	Rasteiro	Não	Não	x	x
1133	B / V	V	Sim	Cotonoso	Sim	Sim	P	Grande
752	B / V	V	Sim	Cotonoso	Sim	Sim	P	Grande
854	A	M	Não	Rasteiro	Não	Não	x	x
865	B / V	V	Sim	Cotonoso	Sim	Sim	P	Grande
870	B / C	B / C	Sim	Contonoso	Sim	Sim	P	Grande
879	B / V	V	Sim	Cotonoso	Sim	Sim	P	Grande
896	B / V	V	Sim	Cotonoso	Sim	Sim	P	Grande
897	B	B	Sim	Cotonoso	Sim	Sim	P	Grande
903	B	B	Não	Cotonoso	Não	Sim	B	Pequeno
907	B / V	B / V	Sim	Contonoso	Sim	Sim	P	Médio
913	B	B	Não	Rasteiro	Não	Não	x	x
931	B / V	V	Sim	Cotonoso	Sim	Sim	P	Grande
932	B	B / V	Sim	Contonoso	Sim	Sim	P	Médio
934	B / V	V	Sim	Cotonoso	Sim	Sim	P	Grande
935	B	B / V	Sim	Contonoso	Sim	Sim	P	Médio
937	A / B	A	Sim	Contonoso	Sim	Não	P	Pequeno
942	B / V	B / V	Sim	Contonoso	Sim	Sim	P	Pequeno
946	B / V	V	Sim	Cotonoso	Sim	Sim	P	Grande
953	B / V	B / V	Sim	Contonoso	Sim	Sim	P	Pequeno

Tabela 6. Continuação

960	B / V	B / V	Sim	Contonoso	Sim	Sim	P	Pequeno
965	B	B / V	Sim	Contonoso	Sim	Sim	P	Grande
970	B	B / V	Sim	Contonoso	Sim	Sim	P	Médio

^aAmarelo; ^bBranco; ^cCinza; ^dMarrom; ^ePreto; ^fVerde Oliváceo.

CAPÍTULO III

EFICÁCIA DE *Candida orthopsilosis* E *Moesziomyces aphidis* NO MANEJO DO MAL-DO-PÉ DA BATATA-DOCE

EFICÁCIA DE *Candida orthopsilosis* E *Moesziomyces aphidis* NO MANEJO DO MAL-DO-PÉ DA BATATA-DOCE

THAÍIS REGINA PINTINO DE ALMEIDA (thaisrpintino@gmail.com)^{a*}; IWANNE LIMA COELHO (iwannecoelho@gmail.com)^a; ELDER FELIPE DE MOURA SILVA (elderfelipe16@gmail.com)^a; LETÍCIA REBECA DE ARAÚJO BARROS (euletiabarros@gmail.com)^a; WILLIE ANDERSON DOS SANTOS VIEIRA (andersonvieira12@gmail.com)^a; MARCOS PAZ SARAIVA CÂMARA (marcos.camara@ufrpe.br)^a; REJANE PEREIRA NEVES (rejadel@yahoo.com.br)^b; DELSON LARANJEIRA (delson.laranjeira@ufrpe.br)^a.

^aDepartamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, Recife-PE, Brasil.

^bDepartamento de Micologia. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos. Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife-PE, Brasil.

*Autor correspondente

RESUMO

A disseminação em larga escala do mal-do-pé da batata-doce, demonstra a importância da descoberta de manejos eficazes contra a doença. Como alternativa ao controle químico, o controle biológico tem sido amplamente estudado e aplicado nas lavouras, sendo considerado economicamente viável e ambientalmente correto. Como um dos principais grupos de agentes biocontroladores (BCAs), pode-se citar as leveduras, que ganham destaque por apresentarem facilidade de produção e cultivo *in vitro*, fácil adaptação nutricional, alta capacidade de proliferação e colonização, bem como os compostos secretados por elas, sejam eles voláteis ou não. Diante do exposto, o presente trabalho objetivou avaliar o potencial biocontrolador de *Candida orthopsilosis* e *Moesziomyces aphidis* em *Macrophomina* sp. (CFS1139), *Diaporthe destruens* (CFS294), *D. batatas* (CFS946 e CFS937) e *Nigrospora vesicularifera* (CFS1061), bem como avaliar a produção de compostos livres de células de leveduras, compostos termoestáveis e/ou compostos voláteis, *in vitro*. Além de testes *in vitro*, o estudo permitiu propor formas e tempos de aplicação das leveduras, com o intuito de obter proteção de mudas, para que as mesmas possam ser plantadas em áreas com histórico da doença. As leveduras foram identificadas molecularmente, por meio da extração de DNA, reações em cadeia de polimerase (PCR), amplificação das regiões de Subunidade maior do RNA ribossomal (LSU) e Internal Transcribed Space (ITS). Foi utilizada a Análise de Máxima Verossimilhança para identificação dos isolados utilizados neste estudo, comparando-os com espécies descritas previamente, com obtenção da árvore filogenética, identificando as leveduras como *Candida orthopsilosis* (CFS809, CFS811 e CFS808) e *Moesziomyces aphidis* (CFS810). Nos testes *in vitro*, os mecanismos como produção de compostos voláteis, compostos termoestáveis e compostos livres das células das leveduras foram responsáveis pela inibição do crescimento micelial de todos os patógenos. Os resultados dos testes em mudas mostraram que todos os isolados de BCAs reduziram significativamente a expressão dos sintomas da doença nas plantas, com período ideal para imersão das mudas na suspensão de leveduras variando de acordo com a levedura e o patógeno testado. A descoberta de métodos eficazes para o manejo da doença é de fundamental importância para a redução dos danos econômicos gerados nas áreas de produção, devido à alta devastação das lavouras. O estudo permitiu propor formas e tempos de aplicação das leveduras, com o intuito de obter proteção de mudas, para que as mesmas possam ser plantadas em áreas com histórico da doença.

Palavras-chave: Antagonista; biocontrole; *Ipomoea batatas*; leveduras;

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, houve uma variação negativa na produção brasileira de batata-doce, com redução de, aproximadamente, 59% do valor máximo de produção, obtido em 1959. Embora seja considerada a maior produtora nacional, a região nordeste teve redução na produção em torno de 50% entre os anos de 2006 e 2017, voltando a retomar o crescimento da produção em 2018 e nos anos posteriores (FAO, 2023; IBGE, 2022). Além do uso de pouca tecnologia na produção, a incidência de doenças é um dos principais fatores que contribuem diretamente para a redução na produção da cultura, como o mal-do-pé (ALMEIDA, 2018; PEDROSO *et al.*, 2021).

Atualmente, devido a diversidade de gêneros patogênicos à batata-doce, responsáveis por sintomas de podridão, técnicas de controle têm sido empregadas sem muito sucesso, com exceção da utilização de mudas micro propagadas, isentas dos patógenos. Porém, com a disseminação da doença, a maior parte das áreas produtoras já tem relatos do patógeno, sendo o cultivo micro propagado de mudas associado ao uso de cultivares resistentes.

Até o momento atual, foram relatados como agentes causais de podridões da batata-doce *Diaporthe destruens*, *D. kongii*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Ceratocystis fimbriata*, *Macrophomina phaseolina*, *M. pseudophaseolina*, *M. euphorbiicola*, *Lasiodiplodia theobromae*, *L. hormozganensis*, *Fusarium solani* e *Rhizopus* sp. (ALMEIDA *et al.*, 2020; BOEREMA *et al.*, 1996; MELLO *et al.*, 2021; PIO-RIBEIRO *et al.*, 2016). São fungos com alta capacidade de sobrevivência em restos de culturas, plantas invasoras e voluntárias. Devido a capacidade de sobrevivência do patógeno em restos culturais, a propagação de ramas tem se tornado a principal forma de disseminação da doença, tendo em vista que os agricultores da região, em sua maioria, adquirem ramas oriundas de áreas com infestação dos patógenos (PEREIRA *et al.*, 2011).

Não há registros de defensivos agrícolas eficazes no controle das doenças, inclusive, no Brasil, não há produtos registrados para o controle do mal-do-pé na batata-doce (AGROFIT, 2022). Ademais, o uso descontrolado de produtos químicos, sem respeitar as recomendações dos fabricantes elevou o índice de danos ao meio ambiente e aos seres humanos, além do surgimento de populações fitopatogênicas resistentes a determinados ingredientes ativos (BETTIOL *et al.*, 2017; HAWKINS *et al.*, 2019).

O surgimento de problemas pelo uso inadequado de produtos químicos, faz o controle biológico tornar-se cada vez mais fundamental para o manejo sustentável e eficaz de doenças de plantas, preservando os recursos naturais e a qualidade do meio ambiente, bem como a saúde do ser humano. Dentre os principais agentes de controle biológicos estudados atualmente, destacam-se as leveduras. As leveduras são fungos eucarióticos, unicelulares, presentes na microbiota das plantas, utilizadas como agentes biocontroladores, pois são capazes de inibir ou interferir no crescimento, desenvolvimento, reprodução ou atividade de fitopatógenos importantes para a agricultura (ZHANG *et al.*, 2020).

Além dos requisitos já mencionados, uma levedura é considerada um agente biocontrolador com potencial aplicação comercial quando é capaz de crescer em meios de cultura simples e baratos, ser fácil de armazenar, ter compatibilidade com outros métodos de manejo, como químico e físico e não ser patogênica às plantas, ao homem e a animais. Estudos mostram que, além destas características, as leveduras não produzem metabólitos tóxicos ao ser humano, podendo ser utilizadas em tratamentos de doenças pós-colheita, e não contaminam o meio ambiente (HERNANDEZ-MONTIEL *et al.*, 2021; MILLAN *et al.*, 2021).

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou avaliar o potencial biocontrolador de *Candida orthopsilosis* e *Moesziomyces aphidis* em *Macrophomina* sp., *Diaporthe destruens*, *D. kongii*, *D. batatas* e *Nigrospora vesicularifera*, bem como avaliar a produção de compostos livres de células de leveduras, compostos termoestáveis e/ou compostos voláteis, in vitro. Além de testes in vitro, o estudo permitiu propor formas e tempos de aplicação das leveduras, com o intuito de obter proteção de mudas, para que as mesmas possam ser cultivadas em áreas com histórico da doença.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. OBTENÇÃO E PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS

Para realização dos testes, isolados de leveduras (CFS808, CFS809, CFS810 e CFS811), *Diaporthe batatas* (CFS946 e CFS937), *D. destruens* (CFS294), *Nigrospora vesicularifera* (CFS1061) e *Macrophomina* sp. (CFS1139) foram cedidos pela Coleção Micológica do Laboratório de Fungos do Solo (LAFSOL). Os isolados patogênicos cedidos foram repicados para placas de Petri, com meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), enquanto as leveduras foram repicadas em meio Yeast Extract-Peptone-Dextrose

(YEPD + ágar). Ambos foram purificados, quando necessários, e preservados em duplicatas, pelo método Castellani (1963).

A visualização das características morfológicas das colônias (Tab. 1) foi realizada utilizando a lupa estereoscópica da Opton®, modelo TIM-2BR (Almeida, 2018). A identificação dos isolados, bem como descrição do local de origem, pode ser observada na tabela 2.

Tabela 8. Aspectos morfológicos de leveduras isoladas da batata-doce

Isolado	Cor	Textura	Forma	Borda	Superfície	Tamanho*
CFS811	Branca	Brilhosa	Circular	Redonda	Convexa	Médio
CFS809	Branca	Brilhosa	Circular	Redonda	Convexa	Médio
CFS808	Branca	Brilhosa	Circular	Redonda	Convexa	Médio
LCB11	Branca	Brilhosa	Circular	Redonda	Convexa	Médio
CFS810	Bege	Brilhosa	Filamentosa	Irregular	Rugosa	grande

Fonte: Almeida (2018)

Tabela 9. Descrição e procedência de isolados patogênicos utilizados nos experimentos

Código	Espécie	Local
CFS 937	<i>Diaporthe batatas</i>	UFAL – AL
CFS 946	<i>Diaporthe batatas</i>	UFAL – AL
CFS 1139	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Lucena – PB
CFS 294	<i>Diaporthe destruens</i>	São Joaquim do Monte – PE
CFS 1061	<i>Nigrospora vesicularifera</i>	Belém de Maria – PE

2.2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA

O preparo das amostras foi realizado através do cultivo das leveduras em meio YEPD, por 72 horas. As colônias foram congeladas, com tampão de extração, prosseguindo com a extração de DNA, de acordo com o protocolo adaptado de Murray; Thompson (1980). As concentrações de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoPhotometer UV/Vis (IMPLEN, Korea) e ajustadas para 25 ng / µL para reações de PCR.

Os isolados CFS810, CFS811 foram previamente descritos por Almeida (2018) como *M. aphidis* e *C. orthopsilosis*, respectivamente, através do sequenciamento da região Internal Transcribed Space (ITS), sendo realizado neste estudo o sequenciamento da região Large-Subunit rDNA (LSU - D1/D2) para complementar as análises filogenéticas e oferecer maior segurança na identificação das espécies. Para os demais isolados, CFS809 e CFS808 foi realizado o sequenciamento de ambas as regiões, utilizando os *primers* listados na tabela 1.

As amplificações via PCR foram preparadas em reações com volume final de 25 µL contendo: 2 µl de DNA template, 1 U Platinum® Taq DNA Polymerase; 2,5 µl 10X PCR Buffer; 2 µl magnesium chloride 50 mM; 2,5 µl nucleotídeo mix (Thermo Scientific, Waltham, USA); 2 µl de cada primer forward e reverse, a 10 µM (sintetizados por Invitrogen™, Carlsbad, USA), 1 µl de dimethyl sulfoxide - DMSO (Synth, São Paulo, BR) e 10,85 µl de água ultrapura.

As ciclagens térmicas das PCR foram realizadas em SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Scientific, Waltham, USA), seguindo a ciclagem otimizada por Udayanga et al (2014) e Crous et al (2004) para os primers. Os produtos de PCR foram corados com SYBR® green (Thermo Scientific, Waltham, USA), e visualizados em gel de agarose (1%).

Os produtos de PCR obtidos foram purificados com kit de purificação PureLink™ PCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. As sequências gênicas foram obtidas por eletroforese capilar em sequenciador automático ABI3500, utilizando polímero POP7 e BigDye Terminator 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e os mesmos conjuntos de iniciadores utilizados para amplificação por PCR.

As sequências gênicas foram editadas em contigs, através do programa MEGA11 (TAMURA, STECHER e KUMAR, 2021), com sequências consenso comparadas com sequências referências pertencentes aos gêneros encontrados. Para comparações das sequências através da análise de BLAST (basic local alignment tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), com espécies previamente identificadas e depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), sequências adicionais foram obtidas. As sequências obtidas foram depositadas no GenBank e ficarão à disposição para consultas futuras.

Os grupamentos genéticos individuais e concatenados (ITS e LSU D1/D2) foram submetidos à Análise de Máxima Verossimilhança (em inglês, Maximum likelihood –

ML) e Inferência Bayesiana (IB), para identificação dos isolados utilizados neste estudo, comparando-os com espécies descritas previamente. As análises de ML foram estimadas com a ferramenta RAxML-HPC2- on SEDE, modelo GTR GAMMA, na plataforma CIPRES Science Gateway versão 3.3 (<https://www.phylo.org/index.php/>), com 1000 reamostragens para calcular valores de Bootstrap.

Para IB, o modelo de evolução K80+G foi determinado no MrMODELTEST 2.3 (POSADA E BUCKLEY, 2004), de acordo com o Critério de Informação Akaike (AIC), e as estimativas filogenéticas foram inferidas empregando-se o método da Cadeia de Markov e Monte Carlo (MCMC), pela ferramenta MrBayes on XSEDE, no portal web CIPRES. Quatro cadeias MCMC foram executadas simultaneamente, a partir de árvores aleatórias para 50 milhões de gerações, amostradas a cada 1.000 gerações, totalizando 50.000 árvores. As probabilidades posteriores (PP) foram calculadas após o descarte dos primeiros 25% das gerações como burn-in e seleção de uma árvore de consenso, gerada a partir das árvores restantes.

As árvores foram visualizadas utilizando a ferramenta FigTree v1.4.3 (RAMBAUT, 2018), exportadas e editadas no software Adobe Illustrator Lite® Portable (Adobe®). Os agrupamentos filogenéticos foram determinados de acordo com o conceito de Reconhecimento de Espécies Filogenéticas Genealógicas e os critérios adotados para concordância e discordância entre genealogias (TAYLOR *et al.*, 2000).

2.3. CULTIVO CONJUNTO

O teste do cultivo conjunto foi realizado com o objetivo avaliar o potencial biocontrolador das leveduras. Foram escolhidas e utilizadas quatro leveduras (CFS811, CFS809, CFS810 e CFS808) e cinco patógenos (CFS627, CFS294, CFS1061, CFS1139 e CFS937). A suspensão da levedura ($1,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹) foi semeada na placa de Petri, contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e, com auxílio de uma alça de Drigalski, distribuída uniformemente por toda a superfície do meio. Sob a área de semeio, foi depositado um disco contendo estrutura fúngica do patógeno ($\varnothing = 0,5$ mm). No tratamento controle, o patógeno foi cultivado diretamente sobre o meio BDA, na ausência de leveduras.

2.4. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS PELA LEVEDURA

Realizou-se a determinação da produção dos compostos voláteis através do cultivo entre placas pareadas, contendo o tratamento com a levedura na placa superior e

o patógeno na placa inferior. As placas foram posicionadas mantendo as leveduras na parte de cima, para evitar dispersão dos esporos dos patógenos.

Para montagem do experimento, o patógeno foi cultivado por 10 dias, em meio BDA, e as leveduras por 72 horas, em meio YEPD+ÁGAR. Após o cultivo dos microrganismos, as leveduras foram semeadas em um lado da placa por meio do método de riscos, com auxílio de uma alça de semente. O patógeno foi repicado através de discos de meio BDA, com 5mm de diâmetro, contendo crescimento micelial, depositados ao centro da placa.

2.5. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS PELA LEVEDURA

Realizou-se a determinação da produção dos compostos voláteis através do cultivo entre placas pareadas, contendo o tratamento com a levedura na placa superior e o patógeno na placa inferior. As placas foram posicionadas mantendo as leveduras na parte de cima, para evitar dispersão dos esporos dos patógenos.

Para montagem do experimento, o patógeno foi cultivado por 10 dias, em meio BDA, e as leveduras por 72 horas, em meio YEPD+ÁGAR. Após o cultivo dos microrganismos, as leveduras foram semeadas em um lado da placa por meio do método de riscos, com auxílio de uma alça de semente. O patógeno foi repicado através de discos de meio BDA, com 5mm de diâmetro, contendo crescimento micelial, depositados ao centro da placa.

2.6. AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO DE MUDAS POR DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO NA SUSPENSÃO DE LEVEDURAS

Para determinação do tempo de imersão das plantas em suspensão com leveduras, foram utilizadas mudas provenientes de material propagativo de plantas saudáveis de batata-doce, cv. CO-Roxa, coletadas em áreas produtoras do município de Bonito-PE. As ramas foram seccionadas nos entrenós, deixando gemas para germinação das raízes, e imersas na suspensão de leveduras, na concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL⁻¹.

Os tratamentos utilizados foram compostos por plantas imersas na suspensão de leveduras, na concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL⁻¹. Seguindo os seguintes tratamentos: As ramas saudáveis de batata-doce foram imersas na suspensão de levedura durante 24 horas, e 48 horas em água destilada esterilizada (ADE); ramas imersas em suspensão de leveduras durante 36 horas, e 36 horas em ADE; e ramas imersas durante 48 horas em suspensão de levedura, e 24 horas em ADE. O experimento foi conduzido em blocos

inteiramente casualizados, com quatro leveduras, cinco isolados patogênicos e 10 repetições para cada tratamento.

Para a avaliação da influência do tempo de imersão do material de propagação na proteção da planta, após o tempo de imersão, as ramas foram transplantadas para copos plásticos de 300ml, contendo substrato Basaplant previamente autoclavado, a 120 rpm por 1 hora, sendo esse processo realizado 2 vezes. Os isolados patogênicos foram cultivados por 15 dias, em placa de Petri com meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), a temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ e inoculados em dois pontos, na região basal da planta e no terceiro entrenó, através do método de discos. Os discos de meio BDA, com crescimento micelial do patógeno ($\varnothing=5\text{ mm}$) foram depositados sobre micro furos ($\varnothing=2\text{ mm}$), realizados com auxílio de agulha hipodérmica.

Após o acondicionamento, o disco foi fixado, com fita crepe 3M, sobre a região perfurada, sendo as plantas submetidas à câmara úmida, durante 48 horas. As avaliações iniciaram-se após decorridas 24 horas da retirada da câmara úmida, sendo realizadas a cada 48 horas, durante oito dias. O experimento foi repetido e os resultados mantiveram-se similares.

Os dados de aferição do diâmetro da lesão, foram utilizados para calcular a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), submetidos à análise de variância, sendo as médias dos tratamentos comparadas entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, sendo utilizado o software Assistat v.7.7.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. PRESERVAÇÃO E DEPÓSITO DE ISOLADOS

As características morfológicas, observadas após o plaqueamento das leveduras, foram semelhantes às relatadas por Almeida (2018), com colônias de *M. aphidis* (CFS810) de coloração bege, textura brilhosa, forma filamentosa, bordas irregulares, superfície convexa e tamanho maior que 5 mm. As colônias de *C. orthopsilosis* (CFS811, CFS810 e CFS809), também apresentaram morfologia similar à descrita para a espécie, tais como, coloração branca, textura brilhosa, forma circular, bordas redonda, superfície convexa e tamanho aproximado entre 2 mm e 5 mm (Fig. 1). Os aspectos morfológicos dos isolados patogênicos foram análogos às espécies correspondentes (Fig. 2).

Figura 13. Características morfológicas de isolados representativos de *Moesziomyces aphidis* (A) e *Candida orthopsilosis* (B), visualizadas em microscópio estereoscópico.

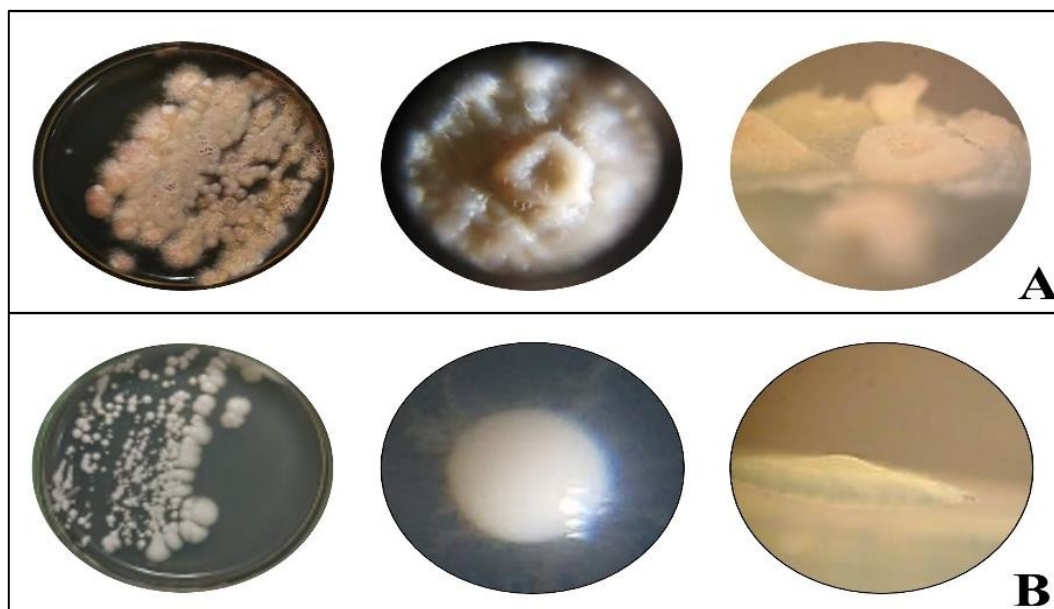
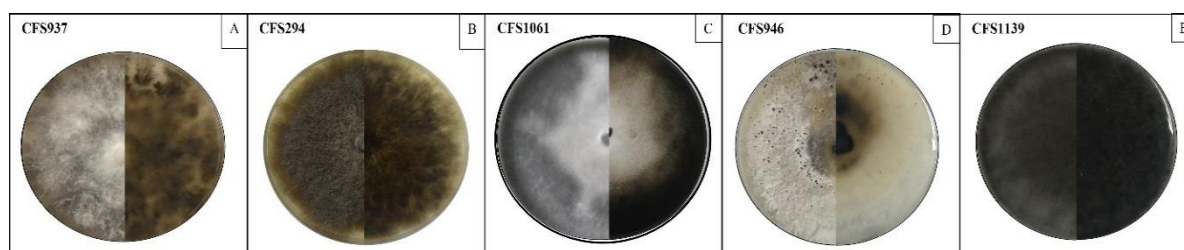


Figura 14. Isolados de *Diaporthe batatas* (CFS937, CFS946), *Diaporthe destruens* (CFS294), *Nigrospora vesicularifera* (CFS1061) e *Macrophomina* sp. (CFS1139), visualizados em microscópio estereoscópico.



Recentemente, novas espécies fúngicas têm sido associadas ao mal-do-pé da batata-doce (MP). A descoberta de novos agentes causais demonstra a importância da descoberta de métodos de manejo eficazes, visando o controle da doença e da ampla gama de patógenos (ALMEIDA *et al.*, 2020; ALMEIDA *et al.*, 2023; MELLO *et al.*, 2021).

O primeiro passo para a pesquisa e o desenvolvimento de um produto biológico é o isolamento e a triagem dos agentes biocontroladores (BCAs), sendo as leveduras isoladas, em sua maioria, habitantes naturais da superfície de frutas, raízes e caules de plantas (ALMEIDA, 2018; HERNANDEZ-MONTIEL *et al.*, 2021). Os isolados de *Candida orthopsilosis* e *Moesziomyces aphidis* utilizados neste estudo, foram selecionados após comprovação da sua ação na inibição do crescimento *in vitro* e *in*

vivo de *D. destruens*, principal agente causal relatado responsável pelo mal-do-pé, e por serem habitantes naturais do filoplano da batata-doce (ALMEIDA, 2018).

3.2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA

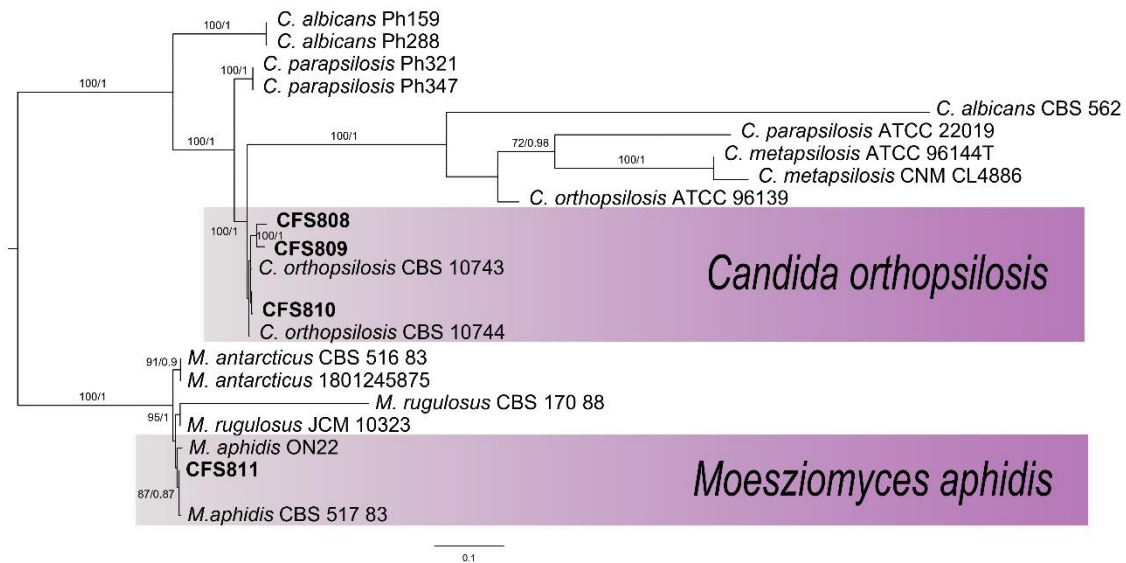
Através do sequenciamento das regiões ITS e LSU, com análise filogenética concatenada das regiões, a Análise de Máxima Verossimilhança revelou a presença de *Moesziomyces aphidis* (CFS808) e *Candida orthopsilosis* (CFS809, CFS811 e CFS810), suportados por valores de Bootstrap ≤ 87 (Fig. 3), possibilitando a diferenciação entre os isolados utilizados neste estudo e espécies patogênicas aos seres humanos pertencentes ao complexo *C. parapsilosis*.

Inicialmente, realizava-se a identificação de leveduras a partir de aspectos morfológicos, assimilação e fermentação de diferentes tipos de fontes de carbono, produção de esporos, bem como produção de compostos enzimáticos. Contudo, a classificação de espécies, baseada apenas nessas características ocasionou a classificação errada de algumas leveduras, a nível de gênero e espécie (MICCOLI *et al.*, 2020). A adoção de técnicas moleculares na taxonomia está propiciando a reclassificação de gêneros e espécies de microrganismos, incluindo as leveduras biocontroladoras.

A diferenciação de leveduras do complexo *C. parapsilosis* através de caracteres fenotípicos não é suficiente, sendo necessária a comparação das regiões ITS e D1/D2 (CORDEIRO *et al.*, 2018). *Candida orthopsilosis* tem sido relatada recentemente como um promissor agente de controle biológico de *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vassoura-de-bruxa do cacau (*Theobroma cacao* L.), e de *Aspergillus* sp., em frutos de laranja (*Citrus sinensis*) (PIMENTA NETO *et al.*, 2021; SUKMAWATI *et al.*, 2021).

Por sua vez, *M. aphidis* (sin. *Pseudozyma aphidis*) é uma das espécies de maior eficiência no controle biológico de doenças de plantas. Devido à eficiência no uso de *M. aphidis*, há registro de patente de cepas de interesse biotecnológico, com atividade biocontroladora comprovada contra importantes fitopatógenos, tais como *D. phaseolorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Nigrospora oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Ustilago tritici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, entre outros (LEVY; GAFNI, 2015).

Figura 15. Árvore de Máxima Verossimilhança – MV de *Candida orthopsilosis* e *Moesziomyces aphidis*, baseada nas regiões gênicas ITS e LSU. Os valores de Bootstrap acima de 70% (indicando ML) e de inferência Bayesiana acima de 0,85, estão dispostos nos ramos, próximos aos nós.

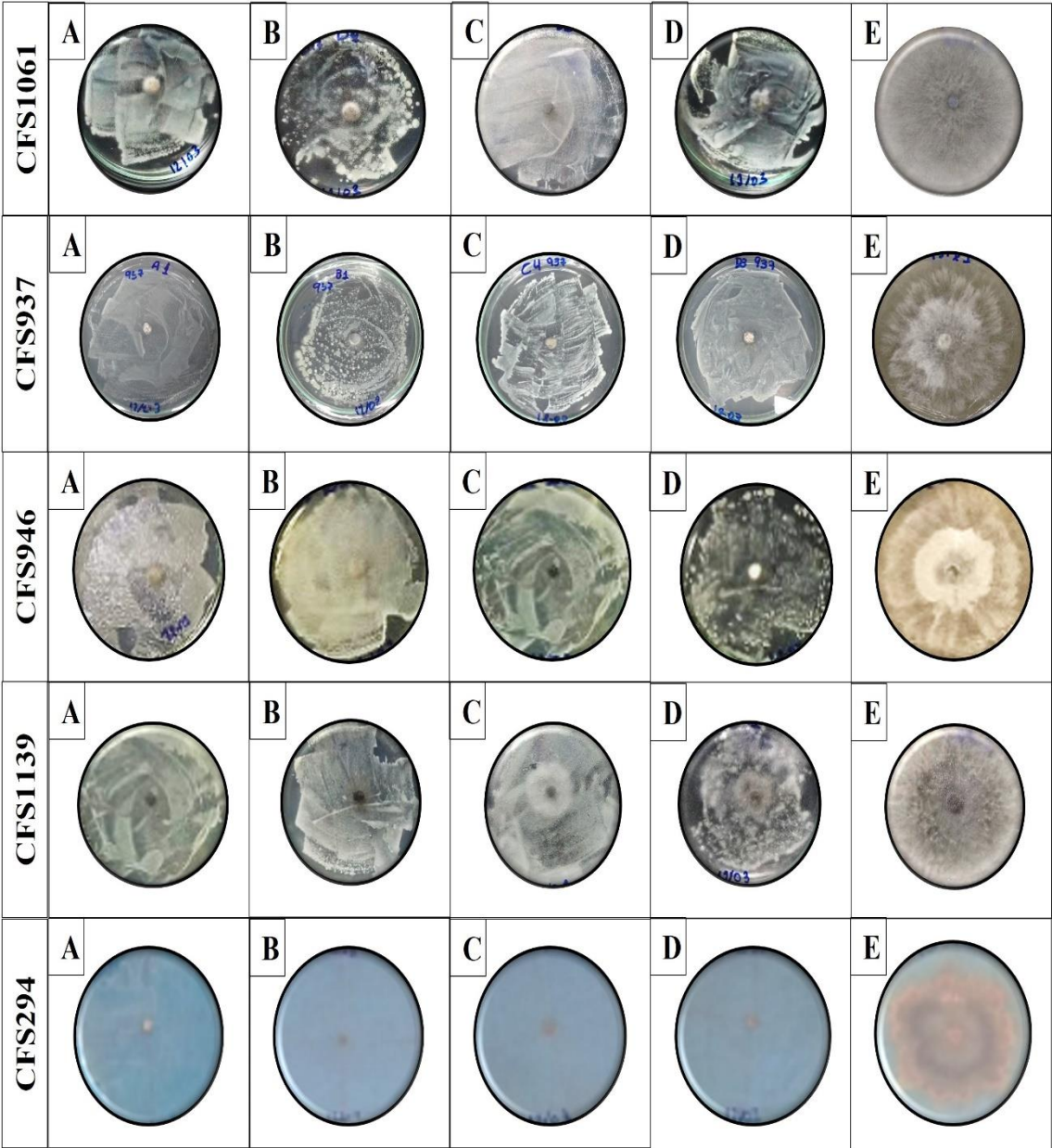


3.3.CULTIVO CONJUNTO

Na Porcentagem de Inibição de Crescimento Micelial (PIC) dos isolados patogênicos, houve interação significativa entre os fatores Isolados patogênicos x leveduras ($P \leq 0,05$), desconsiderando os fatores isolados, apresentando cada isolado uma resposta melhor para um patógeno específico. Diante dos dados obtidos, observou-se que as leveduras CFS808 e CFS810 promoveram a redução em 100% no crescimento dos isolados CFS1061, CFS937, CFS946 e CFS294. A levedura CFS811 controlou os isolados CFS946 e CFS 294 em 100% e inibiu o crescimento do CFS1061 em 71% e do CFS937 em 68,71%.

Dentre os isolados patogênicos, observou-se que o CFS294 foi controlado em sua totalidade por todos os isolados de levedura. Em contramão, o CFS1139, obteve menores índices de controle, com, aproximadamente, 75% de inibição de crescimento.

Figura 16. Cultivo conjunto de *Moesziomyces aphidis* e *Candida orthopsilosis* com agentes causais do mal-do-pé da batata-doce^a. A. CFS 808 (*M. aphidis*); B. CFS809 (*C. orthopsilosis*); C. CFS810 (*C. orthopsilosis*); D. CFS 811 (*C. orthopsilosis*); E. Tratamento controle.



^a CFS1061 (*N. vesicularifera*); CFS937 e CFS946 (*D. batatas*); CFS1139 (*Macrophomina* sp.); CFS294 (*D. destruens*)

Tabela 10. Interação entre leveduras e diferentes espécies de agentes causais do mal-do-pé da batata-doce, medida pela Porcentagem de Inibição de Crescimento Micelial (PIC)*

Patógeno	Leveduras			
	<i>M. aphidis</i> CFS808	<i>C. orthopsilosis</i> CFS809	<i>C. orthopsilosis</i> CFS810	<i>C. orthopsilosis</i> CFS811
<i>N. vesicularifera</i> (CFS1061)	100 aA	90,09 bB	100 aA	68,71 bC
<i>D. batatas</i> (CFS937)	100 aA	77,89 cB	100 aA	100 aA
<i>D. batatas</i> (CFS946)	100 bA	100 aA	100 aA	100 aA
<i>Macrophomina</i> sp. (CFS1139)	61,503 bA	56,84 dA	23,40 bB	21,03 cB
<i>D. destruens</i> (CFS294)	71,792 bB	100 aA	100 aA	90,92 aA
Média	77,38			
C.V (%)	6,08			

*Média de quatro repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P=0,05).

Em concordância com os resultados obtidos neste estudo, Pimenta Neto e colaboradores (2021) atestaram a eficiência de isolados de *C. orthopsilosis* na inibição do crescimento micelial, *in vitro*, de *Moniliophthora perniciosa*, podendo a competição por espaço ser um dos mecanismos responsáveis pela atividade antagonista das leveduras. Os índices de inibição no crescimento *in vitro* dos fitopatógenos, obtidos para o isolado CFS808, comprovam os apresentados por Almeida (2018), demonstrando a ação biocontroladora deste isolado *in vitro*, assim como Levy; Gafni (2015), quando, através do registro da patente de uma cepa de *M. aphidis*, relataram sua ação biocontroladora de uma ampla gama de patógenos, incluindo gêneros dos patógenos testados neste estudo.

3.4. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS PELAS LEVEDURAS

Na avaliação da produção dos compostos voláteis foram observados diferentes níveis de resposta na inibição de crescimento do patógeno, havendo uma interação fatorial entre leveduras e patógenos. Os dados de inibição no crescimento micelial do patógeno variaram entre 12,04% e 85%. Foram atribuídos intervalos para melhor agrupamento dos resultados e notou-se que 70% dos tratamentos obtiveram PIC (%) entre 26% e 75%.

Tabela 11. Ação de compostos voláteis produzidos por leveduras em diferentes agentes causais do mal-do-pé da batata-doce, medida pela Porcentagem de Inibição de Crescimento Micelial (PIC)*

Patógeno	Leveduras			
	<i>M. aphidis</i> CFS808	<i>C. orthopsilosis</i> CFS809	<i>C. orthopsilosis</i> CFS810	<i>C. orthopsilosis</i> CFS811
<i>N. vesicularifera</i> (CFS1061)	55,54 aAB	67,33 aA	39,20 bcA	55,54 abAB
<i>D. batatas</i> (CFS937)	50,47 abB	60,25 abA	17,65 cA	43,07 abAB
<i>D. batatas</i> (CFS946)	26,28 bB	25,51 cB	22,86 bcB	49,30 aB
<i>Macrophomina</i> sp. (CFS1139)	49,64 abcAB	65,27 aA	24,31 bA	44,07 bcAB
<i>D. destruens</i> (CFS294)	85 aA	67,96 aA	12,05 bA	55 abA
Média	45,81			
C.V (%)	41,98			

*Média de quatro repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P=0,05).

É importante salientar que leveduras que apresentam excelentes resultados in vitro podem ter resultados não satisfatórios in vivo, pois a expressão destes mecanismos varia de acordo com o ambiente, hospedeiro e interações existentes entre leveduras, plantas e patógenos. Por exemplo, a composição química dos voláteis, conhecida como volatiloma, sofre influência direta do nicho ecológico que a levedura habita. Entretanto, os altos custos envolvidos nos estudos de bioprospecção e as dificuldades logísticas tornam essenciais a utilização da seleção in vitro de BCAs, tornando viáveis testes com um maior número de fitopatógenos (FREIMOSER, 2019).

3.5. AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TEMPOS DE APLICAÇÃO DAS LEVEDURAS

Os resultados da análise de variância da AACPD indicaram que espécies patogênicas distintas e os tempos de imersão influenciaram significativamente no desempenho das leveduras ($p \leq 0,05$). Entretanto, os fatores apresentaram interação significativa entre si, sendo necessária a análise conjunta dos mesmos (Tab. 5). Contudo, vale salientar que, comparado ao tratamento controle (Fig. 5), houve redução expressiva no surgimento dos sintomas, indicando que as leveduras utilizadas têm potencial biocontrolador (Fig. 6).

Figura 17. Sintomas de podridão nos tratamentos controles com agentes causais do mal-do-pé da batata-doce^a.



^a Isolados patogênicos: CFS937 (*D. batatas*); CFS294 (*D. destruens*); CFS1061 (*N. vesicularifera*); CFS1139 (*Macrophomina* sp.) e CFS946 (*D. batatas*).

Figura 18. Proteção de mudas de batata-doce, utilizando diferentes tempos de imersão^a em suspensão de leveduras, contra diferentes agentes causais do mal-do-pé^b.



^a Tempo de imersão de acordo com a levedura e o agente causal: *M. aphidis*: CFS808 – 24 h em suspensão + 48 h em água; *C. orthopsilosis*: CFS809 - 24 h em suspensão + 48 h em água (CFS937; CFS294; CFS1061) e 48 h em suspensão + 24 h em água (CFS1139; CFS946); CFS810 - 36 h em suspensão + 36 h em água; CFS811 - 24 h em suspensão + 48 h em água.

^b Isolados patogênicos: CFS937 (*D. batatas*); CFS294 (*D. destruens*); CFS1061 (*N. vesicularifera*); CFS1139 (*Macrophomina* sp.) e CFS946 (*D. batatas*).

Tabela 12. Diferentes tempos de imersão de ramas em suspensão de leveduras, visando a proteção de mudas para o controle do mal-do-pé da batata-doce, avaliada pela medição da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença.

Levedura	Patógeno	Tempos de Imersão*		
		36h/36h ^x	48h/24h ^y	24h/48h ^z
<i>M. aphidis</i> CFS808	CFS937	6,8750 bB	17,4263 dC	0 aA
	CFS294	0 aA	7,0306 bB	0 aA
	CFS1061	0 aA	11,3988 cB	0 aA
	CFS1139	9,1019 cB	0 aA	0 aA
	CFS946	0 aA	0 aA	0 aA

Tabela 5. Continuação

<i>C. orthopsilosis</i> CFS809	CFS937	5,5344 cB	10,1763 bC	0 aA
	CFS294	5,5413 bB	0 aA	0 aA
	CFS1061	0 aA	0 aA	0 aA
	CFS1139	7,7919 cB	0 aA	9,9431 bB
	CFS946	1,8881 bB	0 aA	9,6119 bC
<i>C. orthopsilosis</i> CFS810	CFS937	0 aA	19,6469 cB	0 aA
	CFS294	0 aA	0 aA	0 aA
	CFS1061	0 aA	0 aA	22,9894 bB
	CFS1139	0 aA	5,8125 bB	0 aA
	CFS946	0 aA	0 aA	0 aA
<i>C. orthopsilosis</i> CFS811	CFS937	8,4844 bB	25,5556 cC	0 aA
	CFS294	0 aA	0 aA	0 aA
	CFS1061	0 aA	0 aA	0 aA
	CFS1139	11,4888 cB	10,9844 bB	0 aA
	CFS946	0 aA	0 aA	0 aA
Controle	CFS937	39,5225 cB	28,4794 bB	29,0856 bB
	CFS294	42,3049 cB	16,06 aA	39,3525 bB
	CFS1061	28,4794 bA	29,0856 bAB	42,3019 bB
	CFS1139	10,06 aA	39,3525 cB	28,4794 bB
	CFS946	29,0856 bB	42,3019 cB	16,0600 aA
CV (%)		64,48	31,24	36,02
Média		8,97493		
dms		1,1152		

*AACPD – Área abaixo da curva de progresso da doença (mm²): valores médios ± valores de desvio médio. Para análise estatísticas, os valores foram submetidos a transformação de Raiz: Raiz (AACPD). Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (p<0,05);

^x mudas imersas por 36 horas na suspensão de leveduras e, posteriormente, 36 horas em água;

^y mudas imersas por 48 horas na suspensão de leveduras e, posteriormente, 24 horas em água;

^z mudas imersas por 24 horas na suspensão de leveduras e, posteriormente, 48 horas em água.

Os sintomas do MP têm sido relatados com maior frequência nas áreas produtoras da região Nordeste do Brasil, estando a doença presente em quase todas as áreas de cultivo dos estados de Pernambuco, Paraíba, Alagoas e Sergipe (ALMEIDA, 2018). Nesse sentido, diante da perda de resistência de cultivares, a falta de produtos químicos registrados para a cultura e o aumento das áreas infestadas, a utilização de mudas protegidas torna-se essencial para a proteção das plantas.

A produção de mudas de batata-doce é realizada a partir do corte de ramas provenientes de plantas matrizes, com o material seccionado, ficando uma gema e uma folha, com um fragmento de, aproximadamente, 1 cm de caule. A recomendação é de imersão das ramas por três dias (72 horas) em água, para melhor enraizamento (VILETE *et al.*, 2020). Os resultados deste estudo comprovaram que a utilização de

suspensão de leveduras durante a imersão das ramas promove a proteção de mudas contra o MP. Embora no teste de imersão a interação entre leveduras, espécies patogênicas e tempos de imersão tenha sido significativa, pode-se recomendar a adoção do tempo de imersão de cada levedura de acordo com o histórico dos patógenos presentes na área.

De tal maneira, recomenda-se a imersão das mudas por 24 horas na suspensão de leveduras e, em seguida, 48 horas na água, para produtos com as cepas CFS808, CFS811 e CFS810, para manejo de áreas com histórico de *Macrophomina* sp. (CFS1139), enquanto para *N. vesicularifera* (CFS1061), recomenda-se imersão das ramas 36 horas na suspensão e 36 horas na água, obtendo esse tratamento 100% de controle para todas as leveduras. Para áreas com relato de *D. destruens* (CFS294) e *D. batatas* (CFS937 e CFS946), o indicado é 24 horas na suspensão de leveduras e, em seguida, 48 horas na água, sendo este o tratamento com maior eficiência na redução dos sintomas para esse gênero.

Os resultados deste estudo representam o primeiro relato de *C. orthopsilosis* e *M. aphidis* como potenciais BCAs na redução dos sintomas do mal-do-pé e na inibição ou no retardo do desenvolvimento de *Macrophomina* sp., *N. vesicularifera*, *D. destrues* e *D. batatas*, na proteção de mudas de batata-doce. Esses estudos preliminares abordam importantes informações sobre a atividade biocontroladora de leveduras no manejo do mal-do-pé, disponibilizando informações que fomentam dados para pesquisas futuras visando a identificação de mecanismos de ação específica, produção de compostos de interesse biotecnológico, tolerância das leveduras aos produtos químicos utilizados no campo e sua viabilidade de aplicação em grandes áreas, bem como condições de preservação de produtos formulados e tempo de prateleira.

4. AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brasil). Os autores agradecem ao Presidente da Cooperativa de Produtores Rurais de Moita Bonita, José Joelito Costa Santos, a Estação Experimental de Bonito do Instituto Agrônomo de Pernambuco, ao Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE e ao Departamento de Melhoramento Genético da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, pelo auxílio durante as coletas em campo, disponibilização de material vegetal

utilizado nos experimentos, disponibilização de estrutura física e pelos serviços de análises genéticas e acesso ao banco de germoplasma de batata-doce, respectivamente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 12/12/2022.

ALMEIDA, T.R.P; COELHO, I.L; VASCONCELOS, L.S.B; PONTES, M.A; VIEIRA, W.A.S; CÂMARA, M.P.S; DOYLE, V.P; LARANJEIRA, D. First report of *Diaporthe kongii* causing foot rot on Sweet Potato in Brazil. **Plant Disease**, American Phytopathological Society (APS Press) St. Paul USA, v. 104, n.1, p.284, 2020.

ALMEIDA, T.R.P; COELHO, I.L; VASCONCELOS, L.S.B; SILVA, E.F.M; BARROS, L.R.A; PONTES, M.A; SANTOS, T.S; VIEIRA, W.A.S; CÂMARA, M.P.S; LARANJEIRA, D. First report of *Nigrospora vesicularifera* causing foot rot on sweet potato in Brazil. **Crop Protection**, v. 166, 2023. ISSN 0261-2194, DOI: 10.1016/j.cropro.2022.106171

ALMEIDA, THAÍS REGINA PINTINO DE. **Atividade biocontroladora de *Trichoderma* spp. e de leveduras sobre *Diaporthe destruens***. 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

BETTIOL, W; HAMADA, E. (Org.); ANGELOTTI, F. (Org.); AUAD, A. M. (Org.); GHINI, R. (Org.). **Aquecimento Global e Problemas Fitossanitários**. 1. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2017. 488p

BOEREMA, G.H., LOERAKKER, W.M; HAMERS, M.E.C. Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) -III.2. Misapplications of the type species name and the generic synonyms of *Plenodomus* (excluded species). **Persoonia**, 16, 141–190, 1996.

CASTELLANI, A. The “water cultivation” of pathogenic fungi. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Michigan, v. 66, p. 283-286, 1963.

CORDEIRO, R.A; SALES, J.A; DE PONTE, Y.B; MENDES, P.B; SERPA, R; EVANGELISTA, A.J; DE ALENCAR, L.P; PEREIRA-NETO, W.A; BRILHANTE, R.S; SIDRIM, J.J; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M; ROCHA, M.F.G. Phenotype-driven strategies for screening *Candida parapsilosis* complex for molecular identification. **Braz J Microbiol**, v. 49, p. 193-198, 2018. DOI: 10.1016/j.bjm.2017.11.004.

FAO Global Statistical Yearbook, **FAO Regional Statistical Yearbooks**. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QI>>. Acesso em: 05 jan 2023.

FREIMOSER, F.M; RUEDA-MEJIA, M.P; TILOCCA, B; MIGHUELI, Q. Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 154, 2019. DOI:10.1007/s11274-019-2728-4

HAWKINS, N.J; BASS, C; DIXON, A; NEVE, P. The evolutionary origins of pesticide resistance. **Biol Rev**, v. 94, p. 135–155, 2019. DOI: 10. 1111/brv.12440

HERNANDEZ-MONTIEL, L.G; DROBY, S; PRECIADO-RANGEL, P; RIVAS-GARCÍA, T; GONZÁLEZ-ESTRADA, R.R; GUTIÉRREZ-MARTÍNEZ, P; ÁVILA-QUEZADA, G.D. A Sustainable Alternative for Postharvest Disease Management and Phytopathogens Biocontrol in Fruit: Antagonistic Yeasts. **Plants**, v. 10, n. 2641, 2021. DOI: 10.3390/plants10122641.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal**, 2020. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1612>. Acessado em: 15/12/2022

LEVY, MARGANIT; GAFNI, AVIVA. **Pseudozyma aphidis as a biocontrol agent against various plant pathogens**. Depositante: Yissum Research Development Company of the Hebrew University of Jerusalem Ltd., Jerusalem (IL). Depósito: 5 fev. 2014. Concessão: 20 out. 2015.

MELLO, J.F; BRITO, A.C.Q; VIEIRA, J.C.B; CÂMARA, M.P.S; MICHEREFF, S.J; SOUZA-MOTTA, C.M; MACHADO, A.R. Identification and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species associated with root and stem rot of sweet potato in Brazil. **Plant Pathology**, p. 1–15, 2021.

MICCOLI, C; PALMIERI, D; CURTIS, F; LIMA, G; HEITMAN, J; CASTORIA, R; IANIRI, G. The necessity for molecular classification of basidiomycetous biocontrol yeasts. **BioControl**, v. 65, p. 489 – 500, 2020.

MILLAN, A.F; LARRAYA, L; FARRAN, I; ANCIN, M; VERAMENDI, J. Successful biocontrol of major postharvest and soil-borne plant pathogenic fungi by antagonistic yeasts. **Biological Control**, v. 160, 2021. ISSN 1049-9644, DOI: 10.1016/j.biocontrol.2021.104683

MURRAY, M. A. S. E THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight 464 DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, p. 4321-4325, 1980. DOI: 10.1093/nar/8.19.4321

PEDROSO, M.T.M; ALMEIDA, G.V.B; MOREIRA, L.R & SILVA JÚNIOR, L.H. Cadeia produtiva da batata-doce: Implicações para a agenda tecnológica. **Revista da Política Agrícola**, ano 30, n. 2, 2021.

PEREIRA, R. B; AMARO, G. B; RIBEIRO, M. C. V.; PINHEIRO, J. B. **Reação de genótipos de batata-doce ao mal-do-pé (*Plenodomus destruens*)**. Brasília, DF:Embrapa Hortaliças, 2014. 20 p. - (Boletim Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Hortaliças, ISSN 1677-2229; 122).

PIMENTA NETO, A.A; SANTO, T.R; DUARTE, E.A.A; OLIVEIRA, T.A.S; SILVA, E.M.A; UETANABARO, A.P.T; COSTA, A.M; NEWMAN, E.D.M; LARANJEIRA, D. Yeasts associated with aerial parts of *Theobroma cacao* L. in southern Bahia, Brazil, as prospective biocontrol agentes against *Moniliophthora perniciosa*. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, p. 109–128, 2021.

PIO-RIBEIRO, G., MARIANO, R.L.R., PEREIRA CARVALHO, R.C., SOUZA, E.B; MELO FILHO, P.A. (2016) Doenças da Batata-Doce. In: Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A; Camargo, L.E.A. (Eds.) **Manual de Fitopatologia Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas**, 5ª edição. São Paulo, Brazil: Ceres: pp. 149–157.

POSADA, D.; BUCKLEY, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Syst. Biol.**, v. 53, p. 793-808, 2004. DOI: 10.1080/10635150490522304

RAMBAUT, A. (2018) **FigTree 1.4.4**. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Acessado em 15/01/2023.

SUKMAWATI, D; FAMILY, N; HIDAYAT, I; SAYYED, R.Z; ELSAYED, E.A; DAILIN, D.J; HANAPI, S.Z; WADAAN, M.A; ENSHASY, H.E. Biocontrol Activity of *Aureobasidium pullulans* and *Candida orthopsilosis* Isolated from *Tectona grandis* L. Phylloplane against *Aspergillus* sp. in Post-Harvested Citrus Fruit. **Sustainability**, v. 13, n. 7479, 2021. DOI: [10.3390/su13137479](https://doi.org/10.3390/su13137479)

TAMURA, K; STECHER, G; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, p. 3022-3027, 2021.

TAYLOR, J. W; JACOBSON, D. J; KROKEN, S; KASUGA, T; GEISER, D. M; HIBBETT, D. S; FISHER, M.C. Phylogenetic Species Recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genet. Biology**, v. 31, p. 21-32, 2000. DOI: 10.1006/fgbi.2000.1228

VILETE, V.F; NASCIMENTO, W.P; AGUIRRE, T.R; OLIVEIRA, C.P. Produção de mudas de batata-doce em clima tropical. **Revista Agri - Environmental Sciences**, Palmas - TO, v. 6, e020007, 2020. DOI: <https://doi.org/10.36725/agries.v6i0.3389>

ZHANG, X; LI, B; ZHANG, Z; CHEN, Y; TIAN, S. Antagonistic Yeasts: A Promising Alternative to Chemical Fungicides for Controlling Postharvest Decay of Fruit. **J. Fungi**, v. 6, p. 158, 2020. DOI: [10.3390/jof6030158](https://doi.org/10.3390/jof6030158)

CAPÍTULO IV

First report of *Diaporthe kongii* causing foot rot on Sweet Potato in Brazil

First report of *Diaporthe kongii* causing foot rot on Sweet Potato in Brazil

THAÍS REGINA PINTINO DE PINTINO ALMEIDA, IWANNE LIMA COELHO, LEIRSON SALVADOR BEZERRA DE VASCONCELOS, MARIA APARECIDA PONTES, WILLIE ANDERSON SANTOS VIEIRA, MARCOS PAZ SARAIVA CAMARA, VINSON P. DOYLE, AND DELSON LARANJEIRA

Published Online: 5 Sep 2019 <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-19-0868-PDN>

Abstract

Sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.) are one of the most important crops in the world, especially in developing countries. The foot rot of sweet potato is one of the major diseases responsible for economic losses in the crop, making some areas of production unviable. Reports show that foot rot of sweet potato causes losses of 80% in the productivity of the cv. CO-BRANCA in the area. Postharvest rot may occur on storage roots, making them unviable for commercialization. In May 2017, symptoms similar to foot rot, such as brown to black lesions on roots and yellowing of leaves were observed in plants and roots of cv. CO-Branca in Belém de Maria, Pernambuco, Brazil (8 ° 32'41.7 "S 35 ° 50'47.0" W). Fragments of symptomatic tissues were removed from the lesion transition area, surface disinfested (45 s in 70% alcohol, 1 min in 1% NaOCl, and rinsed twice in sterile water), and plated on Potato Dextrose Agar (PDA). The representative isolate CFS 627, deposited in the Collection of Soil Fungi – UFRPE, produced white to grayish tufted aerial mycelium and a brown reverse with an isabelline ring and black stromatic pycnidia, morphologically similar to those of *Diaporthe endophytica*, *D. masirevicii* and *D. kongii* (Thompson et al. 2011; Thompson et al. 2015; Gao et al. 2017). The identity of the isolate was determined by maximum likelihood and Bayesian inference of the sequences of nrITS and EF1- α regions, Genbank accession number MK840849 and MK829788. The isolate shared 99% identity (E value = 0.0) and 98.8% identity (E value = 0.0) with nrITS (NR111616) and EF1- α (JN645797) sequences, respectively, from the ex-type of *Diaporthe kongii* BRIP 54031 and was nested within the clade that includes *D. kongii* isolates with 99% bootstraps support and 1.0 Bayesian Inference (Supplementary Figure 1). The pathogenicity of CFS 627 isolate was confirmed by inoculation of PDA medium discs

containing mycelial growth of the isolate. To pathogen penetrate, were performed 5 punctures, in two points of the storage root, placing the pathogen mycelial growth disc in contact with the surface of the host. Punctures were performed with a hypodermic needle of 13 x 4.5 mm (four replicates / two inoculation points each). The storage roots inoculated with sterile PDA plugs represented negative control. The inoculated sweet potatoes were kept in a humid chamber, at 12 hours photoperiod, for 48 hours (27 ± 2 °C and 75 % RH). The storage roots inoculated with CFS 627 showed symptoms of rot, producing brown lesions that become blackened, similar to the symptoms observed in the field, while the controls remained asymptomatic (Supplementary Figure 2). The pathogens were re-isolated, and the fungal colonies recovered were similar to CFS 627 in morphology, thus fulfilling Koch's postulates. *Diaporthe kongii* was previously reported in association with sunflower, peanut, and *Portulaca grandiflora* in Australia (Thompson et al., 2011, 2018). To the best of our knowledge, this is the first report of *D. kongii* causing disease on sweet potatoes in the world. The identification of new fungal species pathogenic to sweet potato contributes to the choice of appropriate measures for the management of the pathogen, reducing its action on the crop. Therefore, future research is necessary to develop efficient phytosanitary management strategies for this pathogen.

Gao Y. et al. 2017. Syst. Biodivers. 14, 1. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2017.08.01.11>

Thompson, S.M. et al 2011. Persoonia 27, 80-89. <http://dx.doi.org/10.3767/003158511X617110>

Thompson, S.M. et al. 2015. Persoonia 35, 39-49. <https://doi.org/10.3767/003158515X687506>

Thompson, S.M. et al. 2018. Plant Disease. 102:7, 1459. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-17-1930-PDN>

Supplementary figure S2. Whole and cross sections of sweet potato tubers inoculated with *Diaporthe kongii*. Symptoms of rot, were initial brown coloration becoming blackened (A1-A2), compared to the mock inoculated control (B1-B2).

CAPÍTULO V

First report of *Diaporthe kongii* causing foot rot on Sweet Potato in Brazil



First report of *Nigrospora vesicularifera* causing foot rot on sweet potato in Brazil

Thaís Regina Pintino De Almeida ^a  , Iwanne Lima Coelho ^a ,
Leirson Salvador Bezerra Vasconcelos ^b , Elder Felipe De Moura Silva ^a ,
Letícia Rebeca De Araújo Barros ^a , Maria Aparecida Pontes ^c ,
Tarciana Silva Dos Santos ^d , Willie Anderson Dos Santos Vieira ^a ,
Marcos Paz Saraiva Câmara ^a , Delson Laranjeira ^a 

Show more 

 Share  Cite

<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2022.106171> 

[Get rights and content](#) 

First report of *Nigrospora vesicularifera* causing foot rot on Sweet Potato in Brazil

THAÍS REGINA PINTINO DE ALMEIDA (thaisrpintino@gmail.com)^{a*}; IWANNE LIMA COELHO (iwannecoelho@gmail.com)^a; LEIRSON SALVADOR BEZERRA VASCONCELOS (leirson.vasconcelos@ipa.br)^b; ELDER FELIPE DE MOURA SILVA (elderfelipe16@gmail.com)^a; LETÍCIA REBECA DE ARAÚJO BARROS (euleticiabarros@gmail.com)^a; MARIA APARECIDA PONTES (apontes30@hotmail.com)^c; TARCIANA SILVA DOS SANTOS (tarciana.agronomia@gmail.com)^d; WILLIE ANDERSON DOS SANTOS VIEIRA (andersonvieira12@gmail.com)^a; MARCOS PAZ SARAIVA CÂMARA (marcos.camara@ufrpe.br)^a; DELSON LARANJEIRA (delson.laranjeira@ufrpe.br)^a.

^aDepartamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brazil.

^bInstituto Agrônômico de Pernambuco, Camocim de São Félix, 55665-000, Pernambuco, Brazil.

^cSecretaria Agricultura, Meio Ambiente e Recursos Hídricos de São Joaquim do Monte, São Joaquim do Monte, 57770-000, Pernambuco, Brazil.

^dCentro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE, Recife – Pernambuco, Brazil.

*Corresponding author

Abstract

Colonies with similar morphological characteristics to the genus *Nigrospora* were isolated from stems and tubers of sweet potato plants showing characteristic symptoms of foot rot disease, collected in the agricultural region of Lagoa dos Gatos, Pernambuco, Brazil. The pathogenicity test was carried out by inoculating the isolates in sweet potato tubers (Co-Branca variety). The inoculated tubers showed symptoms similar to those of the foot rot observed in the field, producing brown lesions that turned black and yellowing of the leaves. After the colonies were re-isolated, the fungal structures were observed under a microscope for morphological characterization. Species recognition was carried out by sequencing the internal transcribed spacer region (ITS) and the translation elongation factor (TEF1- α) of the isolates, followed by phylogenetic comparison with sequences of recognized species. The phylogenetic analyses supported the identification of the isolates as *Nigrospora vesicularifera*, generating the first worldwide report of *N. vesicularifera* in sweet potato and the first record of this pathogen in a plant host in Brazil.

Keywords: foot rot; molecular biology; plant pathology.

1. Introduction

Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) is one of the main vegetable crops grown in developing countries. In 2020, the Brazilian sweet potato production amounted to 847 thousand tons. The incidence of diseases in the culture and the lack of technology during production were some of the main factors responsible for productivity decrease of sweet potato culture globally in 2018. In 2020, the use of technological methods and correct crop management led to an increase in global production. In this context, Brazil went from being the tenth largest producer in the world to the sixth (FAO, 2020; IBGE, 2020).

The main disease that affects the culture is the sweet potato foot disease, initially attributed to the fungus *Diaporthe destruens*. The high incidence of this disease in the subhumid zone of the state of Pernambuco promoted studies that showed that, in addition to *D. destruens*, *D. kongii* and *Neoscytalidium dimidiatum* are also pathogenic, indicating the occurrence of the phytopathogen group associated with sweet potato foot disease (KÖPPEN, 1931; GAO et al., 2016; ALMEIDA, 2018; MELLO et al., 2018; ALMEIDA et al., 2020). In the areas where samples were collected, symptoms of foot disease were observed, such as brown to black lesions on the roots and yellowing of the leaves, leading to wilting and death of the plants.

Fungi of the genus *Nigrospora* are cosmopolitan, having multiple possible hosts, such as sugarcane, rice, corn, wheat, and beans. *Nigrospora oryzae* and *N. sphaerica* are the most frequently reported species of the genus globally. Initially, the identification of *Nigrospora* was based on morphological characteristics of the colonies. However, due to the overlapping characteristics of different species, such as conidium size, species recognition requires matching the morphological characterization with phylogenetic analyses. The sweet potato production areas in Pernambuco are surrounded by crops that host *Nigrospora* sp., such as sugarcane fields and vegetable crop areas, including beans and corn (HAO et al., 2020).

This work is motivated by the proximity of sweet potato planting areas to other crops that host various diseases, by the appearance of symptoms in plants and tubers, and by the ecological variability of fungi observed in sweet potato planting areas. Our observations aim to identify the causal agents of sweet potato foot disease, providing molecular data that will contribute to the identification of new species or hosts (HAO et al., 2020). In addition, fungi of the genus *Nigrospora* are potential threats to

agriculturally important crops, and molecular studies are increasingly important in the management of plant diseases.

2. Materials and methods

2.1.Fungal isolation and morphological characterization

In 2019, symptoms of foot rot were observed in plants of the Co-Branca variety in Lagoa dos Gatos, Pernambuco, Brazil (8°39'15"S 35°54'10"O), with 70% disease incidence. Symptomatic tissues were removed from the lesion transition area, the surface was disinfected (45 s in 70% ethanol, 1 min in 1% NaOCl, and rinsed twice in sterile water), and plated on Potato Dextrose Agar (PDA) with humidity removed with sterile filter paper. The fragments were then transferred to a Petri dish with Potato Dextrose Agar (PDA) for a 48-hour incubation.

The isolates obtained were deposited in the soil fungi collection of the Soil Fungi Laboratory at Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. To evaluate morphology, isolates were cultured on PDA at 25°C for 10 days. Fungal samples were placed on glass slides for microscopic examination.

2.2.Pathogenicity test

The pathogenicity test was carried out at the Soil Fungi Laboratory – LAFSOL/UFRPE using healthy sweet potato tubers and plants, Co-Branca cultivar, from the agricultural area of the municipality of São Joaquim do Monte, Pernambuco, Brazil. The samples were washed in running water, disinfected in 0.2% sodium hypochlorite solution for 10 min and dried on trays covered with paper towel at 26±2°C.

The fungal isolates CFS1061, CFS1062, CFS1063, CFS1064 E CFS1065, with morphological characteristics compatible with the genus *Nigrospora* were cultivated in Petri dishes containing PDA culture medium for 7 days at 26±2°C and inoculated in

potatoes by depositing PDA medium disks (5 mm diam) containing mycelial structures on the previously injured tissue, with the aid of a hypodermic needle (5 holes/1 mm diam/2 mm deep). To test seedlings, the fungus was inoculated in the plant neck region. The control treatment consisted of plants inoculated with PDA disks without mycelial growth. The inoculated potatoes and plants were placed in a humid chamber for 48 hours at $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ and 70% relative humidity, in a randomized block arrangement (3 blocks), using 8 replicates for each treatment. The evaluations started 48 hours after inoculation and were carried out daily by measuring the diameter of the lesion.

2.3. Molecular characterization

Molecular identification of the CFS1061 isolate was performed by amplification and sequencing of the Internal Transcribed Spacer (ITS) 1 and 2 regions, including the 5.8S rRNA gene, and the Elongation Factor 1- α (TEF1- α) gene. The polymerase chain reactions (PCRs) were carried out with a 25 μL volume, containing 1 μL of total DNA (50 ng μL^{-1}), 1 U Platinum® Taq DNA Polymerase; 2 μL 10X PCR Buffer; 1.8 μL 50 mM magnesium chloride; 2 μL nucleotide mix (Thermo Scientific, Waltham, USA); 1.8 μL each of forward and reverse primer at 10 μM (synthesized by Invitrogen™, Carlsbad, USA), 1 μL of dimethyl sulfoxide – DMSO (Synth, São Paulo, BR) and 13.5 μL of ultrapure water. Cycling was performed in a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems), with initial denaturation at 94°C for 2 min; followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 57°C for 1 min, 72°C for 1 min and final extension at 72°C for 10 min for the ITS regions; or with 15 cycles of 94°C for 30s, 65°C for 30s and 72°C for 1 min plus 35 more cycles at 94°C for 30s; 48°C for 30s and 72°C for 1 min, with extension of 72°C for 10 minutes, following the protocol of Montova et al. (2016), for the TEF1- α region. Successful PCR products were purified with a PureLink™ PCR purification kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), according to the manufacturer's

specifications, and sequenced (automatic sequencer ABI3730) at the Myleus Biotecnologia Laboratory, Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil.

Sequences from previous studies were retrieved from GenBank (Table 1) and aligned in MAFFT (Katoh and Standley, 2013). Alignments were concatenated in Sequence Matrix v.1.8 (Vaidya et al., 2011). The alignments were checked and adjusted manually when necessary. The gaps were treated as missing data. The bootstrap resampling strategy with 1,000 bootstraps test replicates was used. The phylogenetic tree for the identification of *Nigrospora vesicularifera* was generated using Maximum Likelihood method and rooted with *Apiospora ovata* (CBS 115042). Visualization was conducted using the software FigTree v1.4.3 (RAMBAUT, 2016) and the results of single gene and multilocus trees were compared.

3. Results

3.1.Fungal isolation and morphological characterization

The five isolates showed an initially white colony growth, turning gray at the center, after 7 days of incubation in PDA medium. The hyphae showed color ranging from hyaline to light brown. The colonies presented vesicles surrounded by the septum between the conidiogenous cells, and the conidia were black, shiny, smooth, globose or subglobose, solitary and aseptate. According to the morphological characteristics, the fungus was identified as *Nigrospora* sp. Type isolate presents as morphological characteristics fast growing in PDA medium, rough surface, downy, filiform at margin. In microscopic visualization, the type isolate has hyphae hyaline to rarely pale brown, branched, smooth, septate, hyaline vesicles, conidia black, shiny, smooth, globose or subglobose, solitary, aseptate.

3.2.Pathogenicity test

In the pathogenicity tests, symptoms began to appear 3 days after pathogen inoculation. Symptoms of circular brown rot were observed in the tubers, with lesions showing a swollen center after the disease developed. In plants, the lesions started as a light brown spot progressing to dark brown at the point of inoculation and yellowing of the leaves (Figure 1). Control plants did not show any symptoms. The pathogen was reisolated from tubers and symptomatic plants, but not from control plants, according to Koch's postulates. Morphologically, the isolates were similar in appearance to the initially obtained *Nigrospora* isolate.

3.3. Molecular characterization

From the *Nigrospora* CFS 1061 representative isolated from sweet potato tubers, we obtained 704-bp and 445-bp long sequences for ITS and TEF1- α , respectively. The representative isolate shared 99.78% identity (E value = 0.0) and 100% identity (E value = 0.0) with nrITS (NR_165927.1) and EF1- α (MN264051.1) sequences, respectively, from the type isolate *Nigrospora vesicularifera* CGMCC3.19333, and emerged nested within the clade that includes *N. vesicularifera* isolates with 83% bootstraps support (Figure 2).

4. Discussion

In sweet potato crops, the fungi *Diaporthe destruens*, *D. kongii* and *Neoscytalidium dimidiatum* were reported as causal agents of foot disease (MELLO et al., 2018; ALMEIDA et al., 2020). *Nigrospora vesicularifera* was first reported in sugarcane by RAZA et al. (2019). The geographical proximity between the sweet potato production areas in which the samples were collected and sugarcane fields strengthens the hypothesis of migration of pathogenic *Nigrospora* from sugarcane crops to other areas. Pathogens of the genus *Nigrospora* are cosmopolitan and can cause disease in several

hosts, becoming a potential threat to agricultural crops due to the economic losses associated with their incidence, as demonstrated by HAO et al. (2020).

The morphological similarity of species of *Nigrospora* makes the recognition of this causal agent of plant diseases difficult. The morphological classification alone is not enough to distinguish between species of *Nigrospora*, requiring phylogenetic analyses, as morphologically similar species frequently emerge in separate clades in the phylogeny (HAO et al., 2020). The production of vesicles by *N. musae*, *N. sphaerica* and *N. vesicularis* is an example of a characteristic shared by morphologically similar species that emerge in separate groups in the phylogeny. To differentiate *N. vesicularifera* from *N. saccharicola*, the presence of vesicles surrounded by the septum between the conidiogenic cells and the conidia needs to be observed, as it is an exclusive trait of *N. vesicularifera* (RAZA et al., 2019).

The molecular identification of fungal species associated with sweet potato disease is an important and indispensable tool for the choice of control measures and management. Correct species recognition allows the selection of methods that act on a broad pathogen spectrum and can reduce the losses and damages in sweet potato production. To the best of our knowledge, this is the first report of *N. vesicularifera* in sweet potato in the world. Additionally, the presence of this pathogen is first reported in Brazilian agricultural crops. This finding is extremely important for epidemiological studies of the fungus, as well as for the adoption of effective disease management methods, reducing economic losses.

5. Acknowledgements

The authors thank the financial support of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We also thank the Phytobacteriology Laboratory

(LAFBAC), Mycology Laboratory and Soil Fungi Laboratory (LAFSOL) of the Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) for the support during field collections, availability of plant material used in the experiments, use of the physical structure and genetic analysis services, respectively.

6. References

ALMEIDA, THAÍS REGINA PINTINO DE. **Atividade biocontroladora de *Trichoderma* spp. e de leveduras sobre *Diaporthe destruens***. 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

ALMEIDA, T.R.P; COELHO, I.L; VASCONCELOS, L.S.B; PONTES, M.A; VIEIRA, W.A.S; CÂMARA, M.P.S; DOYLE, V.P; LARANJEIRA, D. First report of *Diaporthe kongii* causing foot rot on Sweet Potato in Brazil. **Plant Disease**, American Phytopathological Society (APS Press) St. Paul USA, v. 104, n.1, p.284, 2020.

FAOSTAT. FAO Global Statistical Yearbook, FAO Regional Statistical Yearbooks. Available at.: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QI>>. Accessed: 24 May 2022.

GAO, Y.; LIU, F.; DUAN, W.; CROUS, P. W. and CAI, L. *Diaporthe* is paraphyletic. **IMA Fungus**. v. 8. Nº 1, p. 153–187. 2017.

HAO, YUANYUAN; ALUTHMUHANDIRAM, JANITH V. S.; CHETHANA, K. W. THILINI; MANAWASINGHE, ISHARA S.; LI, XINGHONG; LIU, MEI; HYDE, KEVIN D; PHILLIPS, ALAN J. L. & ZHANG, WEI. *Nigrospora* Species Associated with Various Hosts from Shandong Peninsula, China, **Mycobiology**, 2020. DOI: 10.1080/12298093.2020.1761747

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal**, 2020. Available at.: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1612>. Accessed: 23 May 2022

KATOH, K. AND STANDLEY, D.M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Mol. Biol. Evol.**, 30(4), 772–780, 2013. Available at.: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1612>. Accessed: 23 May 2022

KÖPPEN, W. (1931). Grundriss der Klimakunde: Outline of climate science. **Berlin**: Walter de Gruyter.

MELLO, J.F; BRITO, A.C.Q; MOTTA, C.M.S; VIEIRA, J.C.B; MICHEREFF, S.J. and MACHADO, A.R; First Report of *Neoscytalidium dimidiatum* Causing Root Rot in Sweet Potato in Brazil. **Plant disease** 103(2): 373, 2019.

RAZA, MUBASHAR; ZHANG, ZHI-FENG; HYDE, KEVIN D.; DIAO, YONG-ZHAO; CAI, LEI. Culturable plant pathogenic fungi associated with sugarcane in southern China. **Fungal Diversity**, 19, 1-104, 2019.

RAMBAUT, A. FigTree v1.4.3, 2016. Available at. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Accessed: 30 May 2022.

VAIDYA, G., LOHMAN, D.J., MEIER, R. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi gene datasets with character set and codon information. **Cladistics** 27, 171–180, 2011.

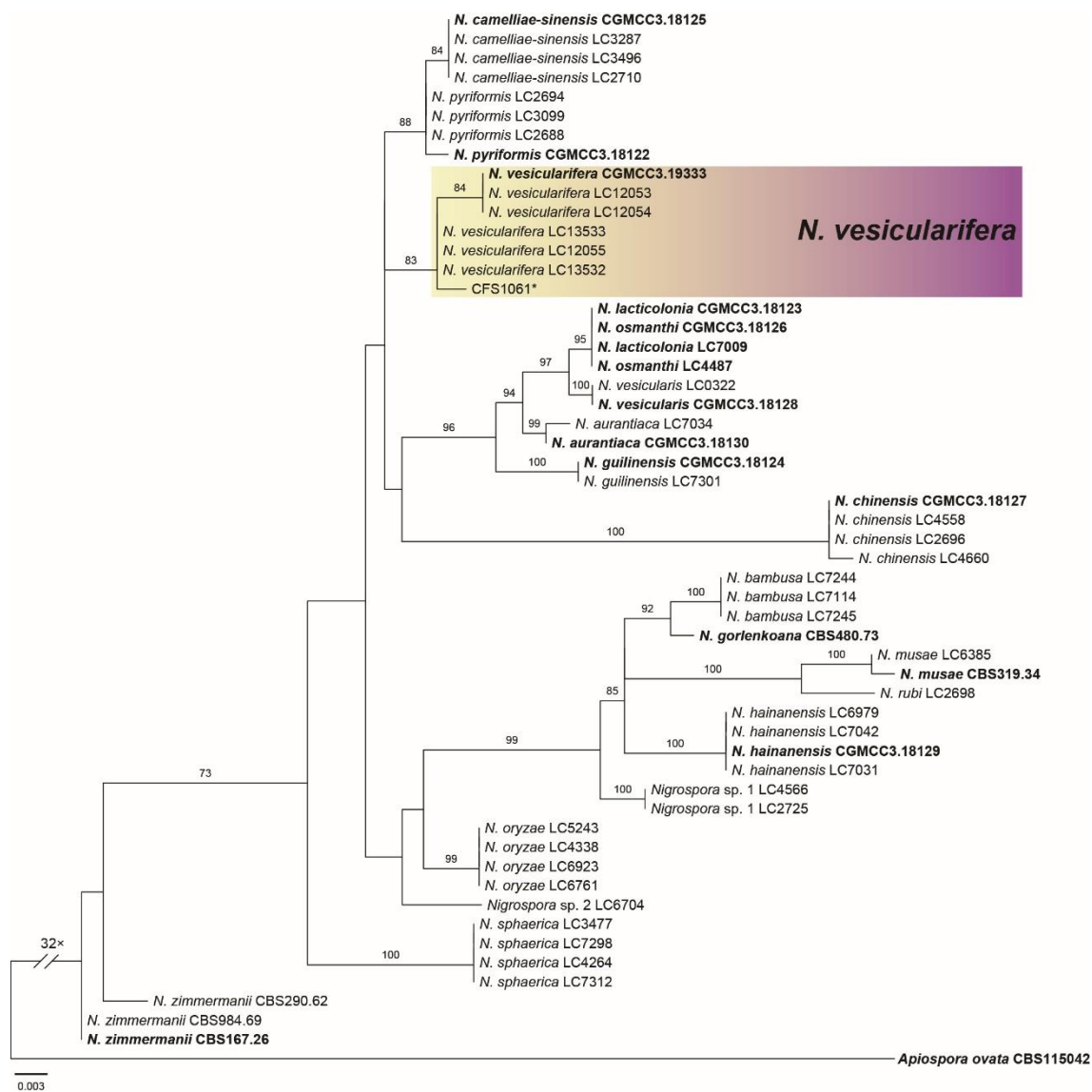
SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure 1. Foot rot symptoms on *Ipomoea batatas* plants (B–C, F–G) and *Nigrospora vesicularifera* (isolate CFS1061) morphological features (A–B, E). B–C: natural infection on tubers (C) and stem (D); F–G: symptoms from artificial inoculation on tuber (F) and stem (G); A–B: colonies on PDA from aerial (A) and reverse (B) view; E: conidia. Scale bar = 10 μ m.



SUPPLEMENTARY MATERIAL

Fig. 2. Maximum likelihood tree of the *Nigrospora* inferred from a concatenated alignment of ITS and EF1- α . Bootstrap support values (ML ≥ 70) are shown above the branches. “*” indicates isolate from *Ipomoea batatas*. Ex-type isolates are highlighted in bold font. The scale bar indicates the estimated number of substitutions per site. The tree is rooted with *Apiospora ovata*.



CAPÍTULO VI

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

- A combinação de sequências gênicas amplificadas das regiões ITS, tub e *tef1-α* é eficiente para identificação preliminar de espécies de *Nigrospora*, *Neoscytalidium*, *Diaporthe* e *Macrophomina*, associadas ao mal-do-pé da batata-doce.
- O mal-do-pé da batata-doce é causado por um complexo de agentes causais: *Nigrospora vesicularifera*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Macrophomina* sp., *Diaporthe batatas*, *D. destruens*, *D. kongii* e *D. ueckeri*.
- *Diaporthe batatas* é a espécie com maior incidência nas áreas de coleta, seguida por *D. destruens*.
- Para agrupamento de *Candida orthopsilosis*, as sequências das regiões ITS e LSU (D1/D2) foram satisfatórias, diferenciando-as das demais espécies pertencentes ao complexo *C. parapsilosis*.
- Isolados de *C. orthopsilosis* e *M. aphidis* produzem metabólitos voláteis com potencial inibidor sobre o crescimento micelial de *N. vesicularifera*, *N. dimidiatum*, *Macrophomina* sp., *D. kongii*, *D. destruens* e *D. batatas*, *in vitro*.
- O tempo de imersão de mudas na suspensão de leveduras varia de acordo com o antagonista e o patógeno, sendo observada uma maior redução dos sintomas no tratamento de 24 h na suspensão + 48 h em água para *M. aphidis* (CFS808) e *C. orthopsilosis* (CFS 809 e CFS 811) e 36 h na suspensão + 36 h em água para o isolado de *C. aphidis* CFS810.
- As leveduras *C. orthopsilosis* e *M. aphidis* apresentam potencial para a proteção de mudas de batata-doce contra o mal-do-pé, causado por *N. vesicularifera*, *N. dimidiatum*, *Macrophomina* sp., *D. destruens* e *D. batatas*.