UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

ABEL GALON TORRES

O JARDIM DIDÁTICO DE DOENÇAS (INFECTÁRIO) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA COMO FONTE DE NOVIDADES CIENTÍFICAS: PRIMEIRO RELATO DE *CERCOSPORA APII SENSU LATO* CAUSANDO MANCHA FOLIAR EM *DIOSCOREA CAYENNENSIS*

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2016

ABEL GALON TORRES

O JARDIM DIDÁTICO DE DOENÇAS (INFECTÁRIO) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA COMO FONTE DE NOVIDADES CIENTÍFICAS: PRIMEIRO RELATO DE *CERCOSPORA APII SENSU LATO* CAUSANDO MANCHA FOLIAR EM *DIOSCOREA CAYENNENSIS*

Relatório final, apresentado à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Robert Weingart Barreto

Coorientadores: Adans A. Colman

Bruno W. Ferreira

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2016

ABEL GALON TORRES

O JARDIM DIDÁTICO DE DOENÇAS (INFECTÁRIO) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA COMO FONTE DE NOVIDADES CIENTÍFICAS: PRIMEIRO RELATO DE *CERCOSPORA APII SENSU LATO* CAUSANDO MANCHA FOLIAR EM *DIOSCOREA CAYENNENSIS*

Relatório final, apresentado à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

APROVADA: 9 de Dezembro de 2016

Prof. Robert Weingart Barreto
(Orientador)
(UFV)

RESUMO

O Infectário do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, recentemente estabelecido na Vila Gianetti, tem como propósito: servir de fonte de material para uso nas aulas práticas, servir de mostruário de botânica econômica e fitossanidade. Paralelamente ele tem sido fonte de novidades fitopatológicas relevantes. Um exemplo recente é a mancha foliar observada em *Dioscorea cayennensis* (cará-da-costa). Em outubro de 2014, observou-se a presença de manchas foliares severas nestas plantas cultivadas no Infectário. Um hifomiceto estava regularmente associado com os sintomas da doença. Uma cultura pura foi obtida e depositada na coleção de cultura da UFV. Os postulados de Koch foram cumpridos demonstrando-se o status patogênico do fungo. A morfologia do fungo em cará-da-costa é semelhante à descrita para *Cercospora apii* sensu lato. Extraiu-se DNA de uma cultura pura do fungo e realizou-se a PCR, obtendo-se, posteriormente as sequências para as regiões ITS e CAL. Comparação com sequências disponíveis no GenBank resultaram na indicação do fungo como pertencendo ao complexo *C. apii*. *C. apii* que inclui isolados obtidos a partir de vários hospedeiros, incluindo *Dioscorea spp*. (mas não *D. cayennensis*). Este foi reconhecido como o primeiro relato de fungo do complexo *C. apii* em cará-da-cost no Brasil. Este relato, como outros de doenças fúngicas e bacterianas tem sido publicados, ou estão em preparação, e demonstram o valor de um jardim como o Infectário da UFV como fonte de novidades e expansão de informação sobre os patógenos de plantas cultivadas que ocorrem no Brasil e são potencialmente relevantes para a ciência e para a agricultura.

Palavras-chave: Dioscoreaceae, novas ocorrências, micologia, taxonomia.

ABSTRACT

The Infectarium of the Universidade Federal de Viçosa has been the source of relevant mycological novelties. A recent example is a leaf spot observed in *Dioscorea cayennensis* (yellow guinea yam). In October 2014, the presence of severe leaf spots was observed attacking a group of these plants grown in the Infectarium. A hyphomycete was regularly associated with disease symptoms. A pure culture was obtained and deposited in the culture collection of UFV. Koch's postulates were fulfilled demonstrating the pathogenic status of the fungus. The morphology of the fungus on yam was the same as that described for *Cercospora apii* sensu lato. Genomic DNA was extracted from a pure culture of the fungus and PCR was performed to obtain sequences for regions ITS and CAL and were deposited in GenBank. BLAST searches confirmed that the fungus belongs to the *C. apii* complex. This is the first report of *C. apii* causing leaf spots on *D. cayennensis* in Brazil. This report, together with others that have been published, or are in preparation, demonstrates that the Infectarium, besides being a source of teaching material and a demonstration area for economic botany and plant pests and diseases is a valuable source of phytopathological and mycological novelties of potential relevance to science and agriculture.

Keywords: Dioscoreaceae, new disease occurrences, mycology, taxonomy

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 07

2 MATERIAL E MÉTODOS 10

2.1 Coleta de amostras 10

2.2 Obtenção da cultura pura 10

2.3 Estudos morfológicos 10

2.4 Estudos moleculares 11

2.5 Teste de patogenicidade 11

2.6 Infraestrutura – Clínica de Doenças de Plantas/DFP/UFV 12

3 RESULTADOS 13

3.1 Estudos morfológicos - Taxonomia 13

3.2 Estudos moleculares 13

3.3 Teste de Patogenicidade 13

4 DISCUSSÃO 14

5 CONCLUSÃO 16

6 REFERÊNCIAS 17

7 ANEXOS 20

1. INTRODUÇÃO

O Infectário consiste em um jardim com área de cerca de 1 hectare onde são cultivadas aproximadamente de 150 espécies de plantas representando as mais importantes culturas para a humanidade e ilustrando uma diversidade de cereais, hortaliças, oleaginosas, fibrosas, estimulantes, frutíferas, ornamentais, condimentares e outras. O Infectário foi idealizado com intuito de servir como área demonstrativa para aulas de fitopatologia e fonte de material para uso em aulas práticas. Desde sua implantação foi feita a observação de numerosas doenças que surgiram espontaneamente atacando as plantas. Algumas representavam novidades científicas. Isso revelou uma utilidade adicional do Infectário, a de servir como "sentinela" para detecção de patógenos ainda não relatados no Brasil ou mesmo novos para a cultura (Figura 1).

Mesmo durante o período de sua implantação diversas ocorrências de doenças de plantas reconhecidas como novidades para o município, o estado, o Brasil ou mesmo mundialmente foram se acumulando. Exemplos recentes são *Ralstonia pseudosolanacearum* (SALCEDO, *et al.,* 2016) e *Cercospora apii*.

O cará é uma planta monocotiledônea, da família *Dioscoreaceae,* gênero *Dioscorea,* possui cerca de 600 espécies, sendo a espécie *D. cayennensis* Lam. a mais cultivada (SANTOS, 1996; PEDRALLI,1998;2002). No Brasil apenas a espécie *Dioscorea cayennensis*, cará-da-costa ou inhame-da-costa, possui valor comercial. Essa variedade possui caule herbáceo, trepador, e forma tubérculos em seu sistema radicular rizomático (MOURA, 2006; MESQUITA, 2002).

O inhame (*Dioscorea spp*) tem desenvolvimento satisfatório em clima tropical quente e úmido, com pluviosidade de 1000 a 1600 mm anuais, temperatura de 24 a 39ºC e umidade relativa do ar de 60 a 70% (LEBOT, 2009).

Tem grande importância na África Ocidental e Central, que detêm cerca de 96% da produção mundial, fornecendo alimento para mais de 160 milhões de pessoas. Em 2008, a produção mundial foi estimada em 51,7 milhões de toneladas, sendo a Nigéria o maior produtor com 67% (35 milhões de toneladas), seguido por Gana com 6,7% (3,5 milhões de toneladas), enquanto que o Brasil foi o décimo segundo maior produtor mundial dessa cultura e o segundo da América Latina, com 0,484% (250 mil toneladas) (FAO, 2010). A produção média nos países africanos é de 25 toneladas por hectare (KIMARI et al., 1997).

Segundo dados do IBGE, 2010, a região Nordeste foi responsável por 55% da produção brasileira de inhame, sendo o estado de Pernambuco o maior produtor (16.574

toneladas). A cultura do cará-da-costa tem grande importância socioeconômica na região Nordeste, principalmente para os estados de Pernambuco, Paraíba, Alagoas, Bahia e Maranhão, sendo fonte de emprego, renda e alimento para pequenos e médios agricultores (SANTOS et al. 2007).

A multiplicação do inhame (*Dioscorea spp.*) é feita através de tubérculos-sementes (inteiras e partidas) e por mudas. Para produção de tubérculos-sementes com a finalidade de plantio, diferentes métodos podem ser utilizados: Método tradicional de capação (colheita precoce); Método convencional do super adensamento populacional; e pelo processo natural. Para obtenção de mudas para plantio pode-se usar mini tubérculos em sementeira, métodos biotecnológicos e produção de mudas por micro propagação (SANTOS, 2002).

De acordo com Santos (1996), o inhame e uma cultura de ciclo anual que apresenta quatro estádios fenológicos: dormência fisiológica, vegetativo, reprodutivo e maturação fisiológica. A dormência fisiológica é o período do plantio até a brotação dos tubérculos-semente. O estádio vegetativo corresponde ao período da brotação ao início do florescimento, 20 a 180 dias após o plantio (DAP) e tem como característica quatro fases morfológicas: brotação (20 a 80 DAP), aparecimento das primeiras folhas (80 a 90 DAP), formação de ramos primários (90 a 120 DAP) e formação dos ramos secundários (120 a 150 DAP). Com o aparecimento dos ramos primários, entre o terceiro e quarto mês de plantio, tem início a tuberização, que ocorre até o final do ciclo fisiológico da cultura. No período do início da floração ao secamento das flores, estádio reprodutivo (180 a 210 DAP), acontece a maturação parcial dos tubérculos, os quais podem ser colhidos com finalidade comercial (capação). A maturação compreende o período do término da floração até a colheita (210 a 270 DAP).

Dentre os fatores que limitam a produção de cará-da-costa destacam-se a baixa fertilidade dos solos onde o inhame é cultivado e a ausência de manejo nutricional adequado (SANTOS, 2002). Outro importante problema para a produção e a qualidade dos tubérculos é a ocorrência de doenças, dentre elas: Mosaico do Inhame (Dasheen mosaic vírus – DsMV); Queima-das-folhas (*Curvularia eragrostidis*); Podridão Verde (*Penicillium sclerotigenum*); Podridão Aquosa (*Rhizopus oryzae*); Casca Preta (*Scutellonema bradys, Pratylenchus brachyurus, P. coffeae*); e Meloidoginose (*Meloidogyne incognita, Meloidogyne javanica, Meloidogyne arenariai*) (KIMARI et al., 1997).

Recentemente, uma mancha foliar evoluindo para necrose extensa na folha foi observada em folhas de *Dioscorea cayennensis* no Infectário do DFP/UFV. Em associação

constante com essas lesões observou-se uma abundância de estruturas assexuadas de um hifomiceto. Em consulta à literatura não foi encontrado nenhum relato de fungo com as características observadas causando doença nessa espécie. O objetivo desse trabalho foi esclarecer a identidade do agente causal da mancha foliar em *D. cayennensis* e demonstrar sua patogenicidade para o hospedeiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta das amostras

Amostras de folhas de *Dioscorea cayennensis*, apresentando sintomas severos de manchas foliares, foram coletadas no Infectário do Departamento de Fitopatologia e levadas para a Clínica de Doenças de Plantas. Após uma primeira análise, sob microscópio estereoscópico, foram selecionadas folhas apresentando esporulação fúngica abundante para fins de preparo de lâminas para exame microscópico e isolamento em cultura pura. Material representativo foi selecionado, colocado em prensa botânica para secagem. Após a secagem, o material herborizado foi colocado em envelopes, identificado e depositado no Herbário da Universidade Federal de Viçosa (VIC).

2.2. Obtenção da cultura pura

Para a obtenção da cultura pura do fungo procedeu-se o isolamento direto, com o auxílio de uma agulha de ponta fina, esterilizada, pela transferência de esporos presentes na superfície das lesões em folhas para o meio de cultura em placa de Petri. Os meios de crescimento utilizados foram: batata dextrose-ágar (BDA) e o caldo de vegetais-ágar (CVA). Após o isolamento e crescimento da cultura, o isolado foi depositado na coleção de culturas da UFV, Coleção Octávio Almeida Drummond, (COAD).

2.3 Estudos morfológicos

Lâminas foram preparadas e montadas em lactoglicerol e lactofucsina. Para isso, foi utilizado um bisturi e realizado o procedimento de raspagem de estruturas fúngicas presentes na superfície do tecido foliar. Prontas, as lâminas foram observadas sob microscópio de luz (Olympus, BX53) adaptado com iluminação por contraste diferencial e equipado com sistema de captura digital (Olympus Q-Color 5™).

2.4 Estudos moleculares

DNA genômico foi extraído de uma cultura pura do fungo, cultivada em CVA a 25 ° C sob um fotoperíodo de 12 h, durante 1 semana. Aproximadamente 50 mg de micélio foi raspado da superfície do CVA e colocados num ependorf esterilizado, contendo esferas de zircônio, este ependorf foi colocado no equipamento próprio para triturar (L-Beader-3). Após triturado, a extração foi realizada de acordo com o protocolo Wizard Genomic DNA Purification Kit. A amostra foi, em seguida, armazenada a -20 ° C para uso posterior.

A reação de PCR (amplificação de DNA) foi realizada de acordo com Pinho et al. 2012. Os primers ITS4 e ITS5 (WHITE *et al.*, 1990) foram usados para amplificar a região ITS e o gene 5.8S rRNA , e parte de calmodulina(CAL) foi amplificado com os primers CAL228F e CAL737R (CARBONE & KOHN, 1999). Os produtos de PCR foram analisados em géis de agarose 2% corados com GelRed ™ (Biotium Inc., Hayward, CA, E.U.A.) e visualizadas sob luz UV para verificar o tamanho e pureza de amplificação. Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados pela Macrogen Inc., Coreia do Sul (http://www.macrogen.com). As sequências de nucleotideos foram editadas com o software DNA Dragon (HEPPERLE 2011). Todas as sequências foram verificadas manualmente e nucleotídeos com posições ambíguas foram esclarecidas usando sequências iniciadoras em ambas as direções. As sequências obtidas foram depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.5 Teste de patogenicidade

Tubérculos foram adquiridos em um mercado local e cultivados em casa de vegetação para obtenção de mudas (Figura 3A). Dois meses após o plantio, quatro plantas sadias de *Dioscorea cayennensis* foram selecionadas para realização do teste de patogenicidade. Uma suspensão de conídios na concentração de 10^6 conídios/mL, (concentração ajustada com o auxílio de uma Câmara de Neubauer) foi inoculada em duas das plantas por pincelamento das folhas. Outras duas plantas foram pinceladas apenas com água estéril. Após a inoculação as plantas foram mantidas em câmara úmida a 26 ± 3°C por dois dias e então transferidas para bancadas em casa de vegetação, onde permaneceram e foram observadas diariamente até a constatação dos sintomas e sinais do fungo (Figura 3B).

2.6 Infraestrutura utilizada

2.6.1 Clínica de Doenças de Plantas/ DFP/ UFV

A Clínica das Doenças das Plantas, onde foram realizados os estudos, localiza-se a Vila Giannetti, casa 36, e pertence ao Departamento de Fitopatologia da UFV. Trabalhos de pesquisa são realizados sob a orientação do Professor Robert Weingart Barreto, e além de pesquisas, na clínica também são realizadas análises de material vegetal para diagnose de doenças fúngicas.

3 RESULTADOS

3.1. Estudos morfológicos

As lesões eram inicialmente circulares ou irregulares, com até 10 mm de diâmetro e circundadas por uma borda marrom escuro à avermelhada. Manchas mais velhas muitas vezes apresentavam centros acinzentados e coalesciam, levando à necrose extensa das folhas.

O fungo apresentou a seguinte morfologia: conidióforos cilíndricos, geniculados, com proliferação simpodial, 92 a 255 µm de comprimento e 2,5 a 5 µm de diâmetro 4 a 8 septos, cicatrizes de conídios espessadas e escuras, lisos, castanhos; conídios aciculares a filiformes, 47 a 135 µm de comprimento 2,5 a 3,5 µm de diâmetro, 5 a 15 septos, hilo espesso e escuro, hialinos, de parede fina e lisa. (Figura 2).

Material examinado: Brasil, MG, Minas Gerais, Viçosa, em folhas de *D. cayennensis*. Coletor: A.A.Colman, 30 nov. 2014 (VIC 42926, COAD 1833).

3.2 Estudos moleculares

As regiões ITS e CAL, depositadas no GenBank (KT381465 e KX015957) foram comparadas com sequências disponíveis no GenBank resultando em 100% de identidade para a região ITS, e 99% de identidade para a região de CAL com sequência de fungo do complexo C. apii (tratado provisoriamente como Cercospora sp. Q, no estudo sobre esse complexo).

3.3 Teste de Patogenicidade

Os primeiros sintomas foram observados nas plantas de *Dioscorea cayennesis* sete dias após a inoculação. Estes sintomas se caracterizaram por pequenas pontuações amarronzadas nas folhas. A presença de estruturas fúngicas (conídios e conidióforos) foi confirmada. Os sintomas e sinais observados nas plantas inoculadas foram semelhantes aos presentes naquelas observadas em campo infectadas naturalmente. Plantas pinceladas apenas com água estéril não apresentaram sintomas. O fungo *Cercospora apii* foi reisolado a partir de colônias formadas em tecidos doentes das plantas inoculadas.

4 DISCUSSÃO

Dentre os muitos patógenos de plantas que existem, os Cercosporoides, que são hifomicetos habitantes de folhas, formam um dos maiores grupos, abrangendo mais de 2000 indivíduos distribuídos no mundo todo. A distinção entre espécies tem se mostrado de difícil solução, estudos morfológicos, especificidade do hospedeiro e produção de toxinas foram avaliados, e mesmo assim houve pouco sucesso (CROUS & BRAUN 2003).

A denominação *Cercospora apii* é a mais antiga para o complexo de espécies morfologicamente indistintas (JOHNSON & VALLEAU, 1949), e foi chamado de *Cercospora apii sensu lato* por Crous & Braun (2003). O complexo é composto de espécies que geralmente causam manchas foliares, mas algumas delas podem crescer em tecidos necrosados como saprófitos e ainda ocorrer como invasores em manchas causadas por outros fungos. Tratando-se de fungos pertencentes ao complexo *C. apii* três condições devem ser levadas em consideração: o fato de uma única espécie de *Cercospora* ocorrer em uma ampla gama de hospedeiros; as espécies de *Cercospora* serem altamente específicas em relação ao hospedeiro; ou, uma espécie polífaga pode coexistir em uma mesma lesão com uma espécie hospedeiro-específica. Acredita-se que a fase sexuada de *C. apii* seja única e uniforme, e que a fase assexuada de *C. apii* de diferentes substratos se conecta a ela. Isso fundamenta a possibilidade de estarmos lidando com uma única espécie que pode ter variedades, forma specialis e raças que tem especificidade com diferentes hospedeiros. De qualquer forma existe a possibilidade de que *Cercospora apii sensu lato* seja composto por diferentes táxons, polífagos e especializados, com fase sexuada morfologicamente distinta, entretanto com a fase assexuada morfologicamente indistinta (Groenewald, 2007).

Houve alguns registros da ocorrência de *C. apii* em outras espécies de *Dioscorea* (FARR E ROSSMAN, 2015). É difícil antecipar se *C. apii* se tornará um patógeno importante para a cultura do cará-da-costa no futuro.

Este relato, como outros que tem sido publicado, ou estão em preparação, são o resultado da observação constante dos pesquisadores do DFP/UFV da ocorrência de doenças das plantas que são cultivadas no Infectário e demonstram o valor dele como fonte de novidades fitopatológicas/micológicas, potencialmente relevantes para a ciência e para a agricultura.

5 CONCLUSÃO

Este é o primeiro relato de *Cercospora apii* causando mancha foliar em *Dioscorea cayennensis* no Brasil e apenas uma dentre as novidades que o Infectário tem produzido em pouco tempo. Os potenciais benefícios da existência do Infectário já são evidentes sob o ponto de vista didático e científico.

6 REFERÊNCIAS

BRAUN, Uwe; CROUS, Pedro W.; NAKASHIMA, Chiharu**. Cercosporoid fungi Mycosphaerellaceae) 2. species on monocots (Acoraceae to Xyridaceae, excluding Poaceae)**. IMA fungus, v. 5, n. 2, p. 203-390, 2014.

CROUS, P. W. & Braun, U.: **Mycosphaerella and its anamorphs: Names published in Cercospora and Passalora**. CBS Biodiversity Series No. 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht 2003.

FARR, D. F., and Rossman, A. Y**.** 2015. **Fungal Databases. Syst. Mycol. Microbiol. Lab. ARS, USDA**. Acesso em 22 Abr. 2015.

FAO. FAOSTAT – **Agricultural statistics database. [online]. Rome: World agricultural information center 2010.** Disponível em: http://www.fao.org/ acesso em: 10 nov. 2016.

GROENEWALD, M. **Molecular characterization of Cercospora beticola and its relatives**. P. 11-13. 2007.

HEPPERLE, D. DNA Dragon 1.4. 1–DNA Sequence Contig Assembler Software. Available at: www. dna-dragon. com. Acesso em 15 jun. 2015, v. 25, p. 2010, 2011.

IBGE. SIDRA – **Sistema IBGE de recuperação automática [online]. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010.** (Censo Agropecuário do Brasil, 2006). Disponível em http://www.sidra.ibge.gov.br acesso em: 10 novembro, 2016.

JOHNSON, E. M. et al. Synonymy in some common species of Cercospora. **Phytopathology**, v. 39, n. 10, p. 763-770., 1949.

KIMATI, H., AMORIM, L., REZENDE, J. A. M., BERGAMIM FILHO, A., & CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: Volume 2: doenças das plantas cultivadas.** Agronômia Ceres. 1997.

LEBOT, V. **Tropical root and tuber crops cassava, sweet potatoe, yams and aroids.** Crop Production Science in Horticulture Series; 17; MPG books group, 2009.

MESQUITA, A. S. **Inhame- *Dioscorea cayennenesis* Lam. e taro *Colacassia esculenta* (L) Schott – Cenários dos mercados brasileiros e internacional.** In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO,2., 2. João Pessoa. Anais. João Pessoa: EMEPA-PB,2002. v.1, p. 215-238. 2002.

MOURA, R. M. **Principais doenças do inhame-da-costa no Nordeste do Brasil.** Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, v. 3, p. 180-199, 2006.

PEDRALLI, G. **Dioscoreaceae e Araceae: aspectos taxonômicos, etnobotânicos e espécies nativas com potencial para melhoramento genético.** Anais, 2° Simpósio Nacional sobre as Culturas do Inhame e do Taro, João Pessoa, PB. 2002. v.2.

PEDRALLI, G. **Revisão taxonômica das espécies de Dioscoreaceae** (R.Br.) Lindley da Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais e Bahia, Brasil. (Tese de Doutorado). São Paulo. Universidade de São Paulo. 1998.

SALCEDO S. S, SANTIAGO T.R, COLMAN A.A, BARRETO R.W**. First report of bacterial wilt of chickpea caused by *Ralstonia pseudosolanacearum* in Brazil**. Plant Disease 2016.

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

SANTOS E.S. **Manejo Sustentável da Cultura do Inhame (Dioscorea sp.) no Nordeste do Brasil.** In: Simpósio nacional sobre as culturas do inhame e taro, 2. João Pessoa, PB. *Anais*. João Pessoa: EMEPA-PB. 2002.

SANTOS, E.S., CAZÉ FILHO, J., LACERDA, J.T., CARVALHO, R.A. **Inhame (*Dioscorea* sp.) tecnologias de produção e preservação ambiental.** Tecnologia & Ciência Agropecuária 1 (1): 31-36. 2007.

WHITE, T.J., BRUNS T., TAYLOR J.W. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

6 ANEXOS

Figura 1: Infectário.

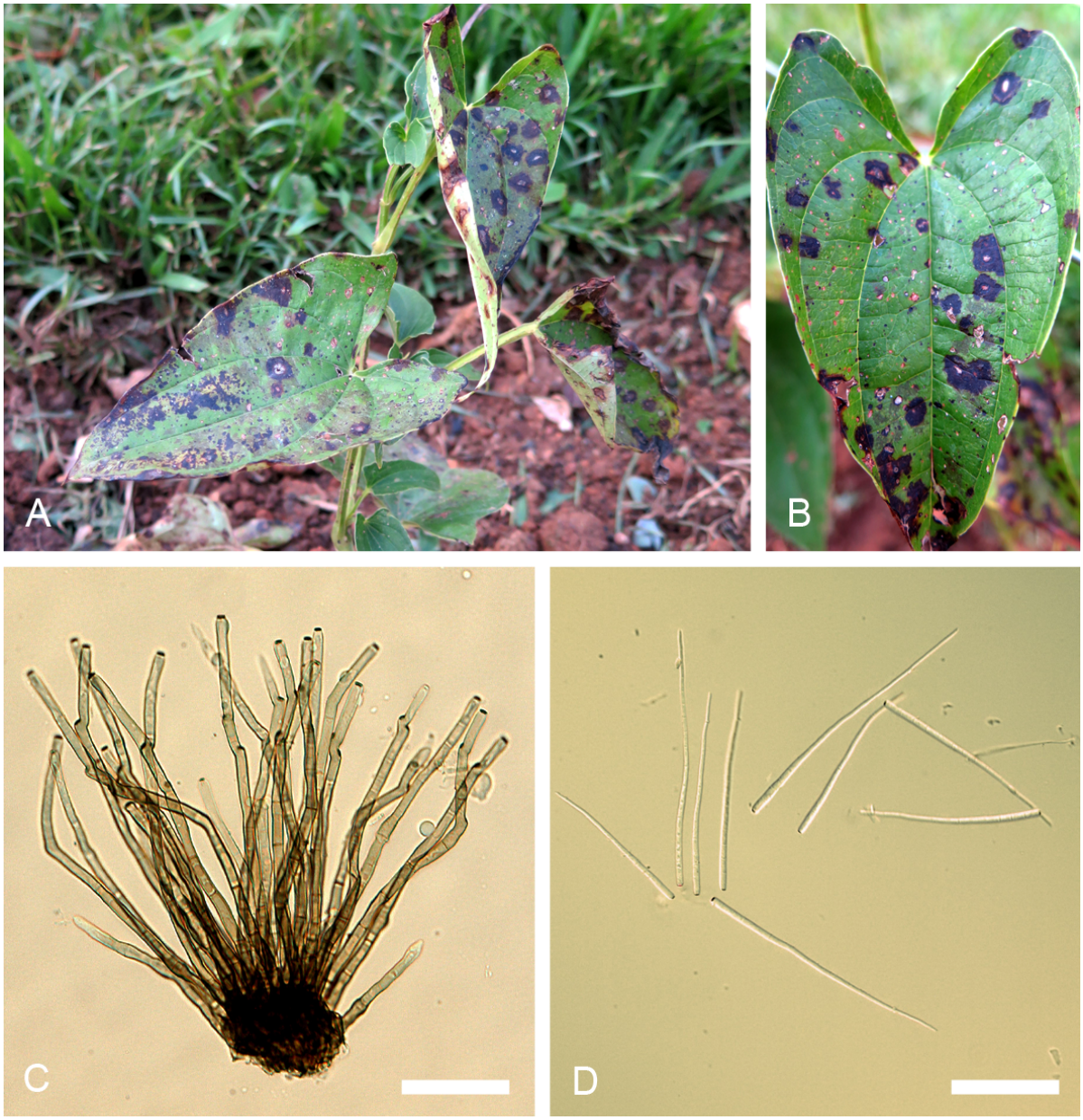

Figura 2: *Cercospora apii* em *Dyoscorea cayennensis*. Mancha foliar **(A-B)**; Conidióforos **(C)**; Conídios **(D)**. Barra = 50 µm.

Figura 3: Cultivo de plantas para inoculação **(A)**; Plantas em câmara úmida **(B)**. Janeiro/2015.