



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA
MESTRADO EM FITOTECNIA

DANIELA ALMEIDA DE ASSUNÇÃO

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E PATOGENICIDADE
DE *Colletotrichum plurivorum* E *Colletotrichum truncatum* EM MELOEIRO

MOSSORÓ
2024

DANIELA ALMEIDA DE ASSUNÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E PATOGENICIDADE
DE *Colletotrichum plurivorum* E *Colletotrichum truncatum* EM MELOEIRO**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Fitotecnia do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Fitotecnia.

Linha de Pesquisa: Melhoramento Genético

Orientador: Prof^ª. Dra. Ioná Santos Araújo Holanda

Coorientador: Prof^ª. Dra. Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio

MOSSORÓ

2024

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

AA851 Assunção, Daniela .
c Caracterização morfológica, molecular e
patogenicidade de *Colletotrichum plurivorum* e
Colletotrichum truncatum em meloeiro / Daniela
Assunção. - 2024.
42 f. : il.

Orientadora: Ioná Santos Araújo Holanda.
Coorientadora: Marcia Michelle de Queiroz
Ambrósio.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Fitotecnia, 2024.

1. Cucumis melo L. . 2. Doenças fúngicas . 3.
Mancha foliar. 4. Marcadores moleculares. 5.
Sequenciamento. I. Santos Araújo Holanda, Ioná,
orient. II. de Queiroz Ambrósio, Marcia Michelle ,
co-orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

DANIELA ALMEIDA DE ASSUNÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E PATOGENICIDADE
DE *Colletotrichum plurivorum* e *Colletotrichum truncatum* EM MELOEIRO**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Fitotecnia do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Fitotecnia.

Linha de Pesquisa: Melhoramento Genético

Defendida em: 21 / 02 / 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Ioná Santos Araújo Holanda (UFERSA)
Presidente

Prof^ª. Dra. Ana Veruska Cruz da Silva (UFS)
Membro Examinador

Prof^ª. Dra. Andréia Mitsa Paiva Negreiros (UFERSA)
Membro Examinador



Prof. Dr. Washington Luis da Silva (CAES)
Membro Examinador

A Tio Juraci Batista (In Memoriam).
(Ofereço).

Aos meus pais Mônia Santana e Boaventura Silveira
(Eu dedico)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por abençoar sempre meus caminhos, ter guiado meus passos e tornado possível cada conquista alcançada em minha vida.

A Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela oportunidade da realização deste mestrado e ao acesso a um ensino de qualidade e excelência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa.

À minha orientadora Profª. Dra. Ioná, pelos conselhos e a oportunidade de ter sido sua orientanda durante o mestrado e abrir portas que foram indispensáveis para meu crescimento profissional.

À minha querida Coorientadora Profª. Dra. Márcia Michelle, a quem sou eternamente grata por todo suporte para execução de grande parte desse projeto. Pela amizade, sempre muito prestativa, paciência, carinho, conselhos e por ter sido como anjo na minha trajetória por Mossoró e pra vida.

Ao Professor Dr. Washington Luis, pelos ensinamentos, suporte e parceria que foram de extrema importância para a realização desse trabalho.

Aos meus pais Boaventura e Mônia, por todo apoio, amor, carinho e por estarem sempre muito presentes quando eu mais precisei.

Aos membros da Banca Examinadora pela participação e contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos meus irmãos pelo amor e torcida para a conclusão do meu mestrado, em especial a minha irmã Maria Helena, por ter sido um ombro amigo que me deram suporte para seguir firme nessa jornada.

À Profª. Dra. Ana Veruska, pelo apoio e torcida por todas as minhas conquistas, sua paixão pela pesquisa sempre foi de muita admiração, sou sua fã.

Aos meus amigos Matheus, Atauan, Rodrigo, Pryanka, Deyvid, Anna Maria, Raianny, Felipe Max, Eloy, Loise Marie, Leticia Viana, Beatriz, Alisson, Lucas Amancio, Eduardo, Jefferson, por todo apoio, terem tirado um tempinho do dia de vocês para me ouvirem e serem tão essenciais para mim.

À minha querida Psicóloga Gracielle, exemplo de profissional, que tantos anos me acompanha e sido um grande suporte a minha vida.

Aos meus primos Filipe, Luciano, Carol Lima, Isabela, Bruno, Agenor Neto, Flávio, e aos meus tios Ana Lucia, Luciano, Marilene, Rosangela, Sara, Carlos, Morgana, Moisés, pelo acolhimento e carinho principalmente no final do mestrado terem sido tão importantes e por saber que nunca estou sozinha.

Aos meus amigos e colegas de laboratório que a UFERSA me presenteou: Luiz Fernando e Deisy por terem sido como irmãos pra mim, Breno, Louise, Tatiane, Jarlan, Camila, Silvan, Daniel, Elisandra, Juliano, Vitoria, Maria Helena, Talisson, Jorge, Karem, Emerson pelo apoio e dedicação para o desenvolvimento desse projeto.

E muito obrigado a todos que de alguma forma contribuíram para meu crescimento profissional e realização desse trabalho.

“Até os jovens se cansam e ficam exaustos, e os moços tropeçam e caem, mas aqueles que esperam no Senhor, renovam as suas forças. Voam bem alto como águias; correm e não ficam exaustos, andam e não se cansam”
(Isaiás40:30-31)

RESUMO

O Brasil está entre os dez principais países produtores de melão no mundo, com destaque a região Nordeste, que domina 95% da produção nacional. Um dos principais entraves na produção de melão, é a ocorrência de doenças fúngicas, que limitam o desenvolvimento da cultura. Diante disso, o presente estudo buscou identificar, a nível molecular e morfológico, e analisar a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* coletados em meloeiro. Plantas que apresentaram sintomas semelhantes aos sintomas da antracnose, foram coletadas em áreas comerciais de melão localizadas no estado do Rio Grande do Norte. Em seguida, as amostras foram levadas ao laboratório de Microbiologia e Fitopatologia (LAMIFI) e realizado o isolamento e o cultivo monospórico dos isolados fúngicos pertencentes ao gênero *Colletotrichum*. As culturas monospóricas foram utilizadas para caracterização molecular, morfológica, e patogenicidade dos isolados. Para a caracterização molecular, os isolados foram sequenciados utilizando regiões parciais do espaçador transcrito interno (ITS), gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenado (GAPDH), actina (ACT), beta-tubulina (TUB) e quitina sintase 1 (CHS-1), também foi realizado o estudo da diversidade genética utilizando os marcadores de DNA ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). Para a caracterização morfológica dos isolados, discos contendo estruturas fúngicas foram dispostos em placas de Petri para avaliar a coloração das colônias e análise dos formatos e dimensões dos conídios. Para o teste de patogenicidade, o ensaio foi conduzido em casa de vegetação e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições por isolados. Foram utilizadas mudas de melão amarelo híbrido Goldex, e uma suspensão de 10^6 conídios/mL de cada isolado e pulverizados em folhas feridas com agulhas esterilizadas, e após inoculadas, foram mantidas em câmara úmida. Posteriormente, foi avaliado o surgimento dos sintomas nas folhas e realizado o reisolamento para a confirmação do agente patogênico. Os resultados das análises de sequenciamento permitiram a identificação de duas espécies: *Colletotrichum plurivorum* e *Colletotrichum truncatum*. As colônias dos isolados pertencentes a espécie *C. plurivorum* apresentaram micélio algodonoso, de coloração cinza rosado, e no reverso, marrom escuro rosado, com acérvulos no centro, apresentando, em alguns isolados, halo preto, e os conídios eram hialinos, cilíndricos com extremidades obtusas, com comprimento e largura medindo: (18,94 a 16,67 μ m) e (7,56 a 6,06 μ m). Para isolados da espécie *C. truncatum*, as colônias apresentaram micélio acinzentado rosado pulverulento no anverso, e pontuações preto rosado no reverso. Os conídios eram hialinos, falcados com ápices afilados, com comprimento e largura medindo: (27,86 a 27,14 μ m) e (4,11 a 4,04 μ m). Foi possível observar o surgimento de sintomas de antracnose semelhantes aos observados em campo, em todas as folhas inoculadas com o patógeno, enquanto nenhum sintoma foi observado nas folhas do controle. O reisolamento confirmou as duas espécies como agente causal e o ensaio foi repetido mais uma vez e reproduziu os mesmos resultados.

Palavras-chave: *Cucumis melo* L., Doenças fúngicas, Antracnose.

ABSTRACT

Brazil is among the world's top ten melon-producing countries, emphasizing the Northeast region, which dominates 95% of national production. One of the main obstacles in melon production is the occurrence of fungal diseases, which limit crop development. Given this, the present study sought to identify, at a molecular and morphological level, and analyze the pathogenicity of *Colletotrichum* isolates collected from melon trees. Plants that showed symptoms similar to anthracnose symptoms were collected in commercial melon areas located in the state of Rio Grande do Norte. Then, the samples were taken to the Microbiology and Phytopathology laboratory (LAMIFI), and isolation and monosporic cultivation of fungal isolates belonging to the genus *Colletotrichum* were carried out. Monosporic cultures were used for molecular and morphological characterization, and pathogenicity of the isolates. For molecular characterization, the isolates were sequenced using partial regions of the internal transcribed spacer (ITS), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenated (GAPDH), actin (ACT), beta-tubulin (TUB) and chitin synthase 1 (CHS-1). The study of genetic diversity was also carried out using ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) DNA markers. For the morphological characterization of the isolates, discs containing fungal structures were placed in Petri dishes to evaluate the color of the colonies and analysis of the shapes and dimensions of the conidia. The pathogenicity test was conducted in a greenhouse and the experimental design was completely randomized (DIC) with five replications per isolate. Goldex hybrid yellow melon seedlings were used, and a suspension of 10^6 conidia/mL of each isolate was sprayed on wounded leaves with sterilized needles. After inoculation, plants were kept in a humid chamber. Subsequently, the appearance of symptoms on the leaves was evaluated, and re-isolation was carried out to confirm the pathogenic agent. The sequencing analysis results allowed the identification of two species: *Colletotrichum plurivorum* and *Colletotrichum truncatum*. The colonies of isolates belonging to the species *C. plurivorum* presented cottony mycelium, pinkish gray color, and on the reverse, dark pinkish brown, with acervuli in the center, presenting, in some isolates, a black halo, and the conidia were hyaline, cylindrical with ends obtuse, length and width measuring: (18.94 to 16.67 μ m) and (7.56 to 6.06 μ m). For isolates of the species *C. truncatum*, the colonies showed powdery pinkish-gray mycelium on the obverse and pinkish-black spots on the reverse. The conidia were hyaline, falcate with tapered apices, with length and width measuring: (27.86 to 27.14 μ m) and (4.11 to 4.04 μ m). It was possible to observe the emergence of anthracnose symptoms similar to those observed in the field in all leaves inoculated with the pathogen. No symptoms were observed in the control leaves. Re-isolation confirmed the two species as the causal agent. The test was repeated and the same results were reproduced.

Keywords: *Cucumis melo* L., Fungal diseases, Anthracnose.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Conídio de *C. plurivorum* germinado no cultivo monospórico..... 30
- Figura 2 – Colônias desenvolvidas em BDA de *C. plurivorum* e *C. truncatum* isolados de folha de meloeiro. 1 a 3 (*C. truncatum*); 4 a 15 (*C. plurivorum*).....33
- Figura 3 – Resultado das reações de amplificações de PCR com iniciador ISSR 8 dos 21 isolados de *C. plurivorum* e *C. truncatum* submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%. ‘M’ nas extremidades do gel representam o marcador de peso molecular de 1kb. As canaletas de 1 a 21 representam cada um dos 21 isolados.....36
- Figura 4 – Dendograma gerado pelo método UPGMA a partir dos iniciadores ISSR com isolados das espécies *C. plurivorum* (CML4, CML5, CML6, CML7, CML8, CML9, CML10, CML11, CML12, CML13, CML14, CML15, CML18, CML19, CML20, CML23, CML24, CML25) e *C. truncatum* (CML26, CML27, CML28).....37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Isolados de <i>C. plurivorum</i> (isolados de 4 a 25) e <i>C. truncatum</i> (isolados de 26 a 28) obtidos de folhas doentes de meloeiro cultivadas em fazendas produtoras localizadas nos municípios Rio Grande do Norte.....	28
Tabela 2	–	Dados dos iniciadores ISSR utilizados.....	32
Tabela 3	–	Caracterização de conídios dos isolados de <i>C. plurivorum</i> e <i>C. truncatum</i>	34
Tabela 4	–	Caracterização dos dados obtidos com iniciadores ISSR quanto ao Total de Locus (TL), Locus Monomórficos (LM), Locus Polimórficos (LP), Porcentagem de Polimorfismo (%P) e Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC).....	36
Tabela 5	–	Matriz de similaridade do coeficiente de Jaccard utilizando oito primers ISSR entre 21 isolados de <i>Colletotrichum</i>	40

Sumário

RESUMO	6
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO GERAL	11
REFERÊNCIAS	14
CAPÍTULO I: PRIMEIRO RELATO DE <i>Colletotrichum plurivorum</i> e <i>Colletotrichum truncatum</i> CAUSANDO ANTRACNOSE EM <i>Cucumis melo</i> L. NO BRASIL	16
REFERÊNCIAS:	18
CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE <i>Colletotrichum plurivorum</i> E <i>Colletotrichum truncatum</i> CAUSANDO ANTRACNOSE EM MELOEIRO CULTIVADO NO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL.	22
1. INTRODUÇÃO	24
2. MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1. Coleta, isolamento e análise morfológica	25
2.2. Extração de DNA	28
2.3. Análise de diversidade genética	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
5. AGRADECIMENTOS	37
6. REFERÊNCIAS	38

INTRODUÇÃO GERAL

O meloeiro é uma espécie de ciclo anual de ampla adaptação climática, com centro origem na África e Ásia (Landau *et al.*, 2020). Pertencente à família das Cucurbitáceas, que compreende 120 gêneros e mais de 800 espécies que incluem as culturas do melão (*Cucumis melo* L.), melancia (*Citrullus lanatus*), pepino (*Cucumis sativus* var. *sativus* L.) e abóbora (*cucurbita moschata* L.) (Anastácio *et al.*, 2021; Nascimento *et al.*, 2021; Rocha *et al.*, 2021).

A cultura do meloeiro pode estar sujeito ao ataque de diversos patógenos, sendo eles, os fungos e oomicetos como os principais agentes patogênicos. Dentre as principais doenças relatadas, podemos mencionar o tombamento de mudas causadas por *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp. e *Phytophthora capsici*, crestamento gomoso causado por *Didymella bryoniae*, oídio causado por *Podosphaera xanthii*, mancha de alternaria causada por *Alternaria cucumerina*, mancha de cercospora causada por *Cercospora citrullina*, míldio causado por *Pseudoperonospora cubensis* e antracnose causado por *Colletotrichum orbiculare* (=Sin. *C. lagenarium*) (Reis; Feitosa, 2022).

Entre os anos de 2022 e 2023, produtores de melão em fazendas comerciais e funcionários de empresa produtoras de melão relataram o surgimento frequente de doenças foliarias com sintomas característicos a sintomas da antracnose, com isso, percebeu-se a necessidade de estudar mais profundamente sobre os casos que vinham surgindo, confirmar a patogenicidade, conhecer as espécies de *Colletotrichum* de ocorrência nessas áreas e a diversidade entre as espécies para que essas informações sirvam como base para estratégias de manejo da doença no meloeiro.

A antracnose é a doença causada por fungos do gênero *Colletotrichum* que tem o seu desenvolvimento favorecido em condições de umidade acima de 80% e temperaturas na faixa de 21 a 27 °C (Reis; Feitosa, 2022). Este gênero está entre os dez mais importantes gêneros de fungos fitopatogênicos do mundo devido a capacidade de infectar e causar doenças em diversas culturas (Dean *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2022).

O *Colletotrichum* é representado por mais de 200 espécies, pertencentes a 15 complexos de espécies que incluem endofíticos, saprófitos e patogênicos, que são responsáveis por causarem doenças em *Carica papaya*, *Glycine max*, *Manihot esculenta* entre outras culturas espalhadas pelo mundo (EFSA *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022).

Condições de alta umidade elevam a maior suscetibilidade do meloeiro a doenças fúngicas além de interferir na produção do fruto, influenciando na formação de frutos de

baixa qualidade e com redução no seu tamanho, o que não é nada interessante para o mercado (Costa, 2017). O meloeiro após infectado pelo patógeno, exibem nas folhas manchas necróticas com ou sem halo amarelado, ou avermelhado. Com o avanço da doença, o patógeno se espalha pela planta, ocasionando queda do tecido foliar, reduzindo a taxa fotossintética, e conseqüentemente, a produção (Reis; Feitosa, 2022).

Estudos sobre a diversidade genética das populações de patógenos são essenciais para se obter informações sobre o nível e distribuição da variabilidade genética de indivíduos que habitam em uma região, uma vez que, esses patógenos caso tenha alta variação gênica, podem apresentar características que os tornam difíceis de controlar (Sasseron, 2015). Portanto, existe a necessidade de estudos sobre a biologia, genética e identificação do patógeno, analisando a sua variabilidade genética, para assim, servir como base para determinar estratégias mais eficientes para o controle do patógeno.

A determinação da diversidade genética dos indivíduos pode ser obtida através de técnicas moleculares e características morfológicas, o que permite a seleção genotípica, a caracterização de germoplasma, além de conhecer a variabilidade genética entre populações e a obtenção de informações sobre as estruturas de características quantitativas (Dotto *et al.*, 2020).

Os marcadores moleculares podem ser obtidos por hibridização, como por exemplo o marcador RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism); ou por amplificação do DNA como o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), STS (Sequence Tagged Sites), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR ou microssatélites (Simple Sequence Repeats) e ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) (Oliveira *et al.*, 2021).

Entre os marcadores, temos o método de repetição de sequência simples intercalada (ISSR), que é eficiente na geração de *locus* polimórficos importantes que contribuem para estudos de diversidade genética. Esse método amplifica um fragmento de DNA, através de primers de sequência repetida em tandem, delimitado por duas regiões de microssatélites invertidos, resultando em marcas com alto nível de polimorfismo que são separadas em eletroforese e analisadas a partir da presença e ausência de bandas de determinado peso molecular (Oliveira, 2012; Lacerda *et al.*, 2002).

Os estudos para identificação de fungos como por exemplo: diversidade, taxonomia via microscopia e chaves, são métodos considerados frágeis a para realização da identificação a nível de espécie, sendo necessário, utilização de técnicas moleculares por apresentarem maior consistência e confiabilidade à classificação (Leão *et al.*, 2021).

As regiões dos espaçadores ITS evoluem rapidamente e variam intraespecificamente nas sequências de base e comprimento, sendo bastante utilizadas para taxonomia de espécies e gêneros de fungos (Menezes *et al.*, 2010). No entanto, para identificações mais precisas são necessários a realização de análises filogenéticas variando nas regiões gênicas associadas com avaliações morfológicas (Pinho; Machado; Firmino, 2016).

Para o sucesso na realização do sequenciamento visando identificar a nível molecular os isolados desse estudo, foram utilizados iniciadores específicos: ITS (“Internal Transcribed Spacer”), GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase), ACT (Actina), TUB (β -tubulina) e CHS-1 (Quitina Sintase 1), que foram suficientes para identificação confiável das duas espécies de *C. truncatum* e *C. plurivorum*.

Com isso, o objetivo do trabalho foi caracterizar a nível morfológico e molecular espécies de *Colletotrichum*, causador da antracnose em meloeiro, e estudar a diversidade desses patógenos.

REFERÊNCIAS

- ANASTÁCIO, T. D. O. *et al.* Extração das proteínas de sementes e polpa de *Cucurbita maxima*: uma análise experimental / Extraction of proteins from *Cucurbita maxima* seeds and pulp: an experimental analysis. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 6, p. 63252–63264, 25 jun. 2021.
- DEAN, R. *et al.* The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414–430, maio 2012.
- DOTTO, A. B. *et al.* Marcadores moleculares e descritores morfo-agronômicos na avaliação da diversidade genética de bucha (*Luffa cylindrica*). **Colloquium Agrariae**, v. 16, n. 1, p. 66–76, 31 jan. 2020.
- COSTA, N. D.; **Produção de melão e mudanças climáticas**: Sistema convencional de produção de melão no Submédio do Vale do São Francisco. Ed. 1º. Brasília: Embrapa, 2017.
- EFSA PANEL ON PLANT HEALTH (PLH) *et al.* Pest categorisation of *Colletotrichum plurivorum*. **EFSA Journal**, v. 19, n. 11, nov. 2021.
- LACERDA, D. R. *et al.* A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana: International Journal of Biodiversity**, v. 3, n. 2, p. 87–92, 1 jun. 2002.
- LANDAU, E. C.; *et al.* Evolução da Produção de Melão (*Cucumis melo*, Cucurbitaceae). **Embrapa Milho e Sorgo**, Brasília. v. 2, cap. 34, p. 1095-1126. 2020. ISBN 978-65-87380-03-2. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/214955/1/LivroDinamicaAgropecBR-Vol02.pdf>. Acesso em: 13 set. 2022.
- LEÃO, E. U. *et al.* Extração de DNA e identificação molecular de *Olivea neotectonae* (T.S. Ramakrishnan & K. Ramakrishnan) isoladas de folhas de teca (*Tectona grandis* L.f). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 9, n. 2, p. 222–228, 13 jun. 2021.

- LIU, F. *et al.* Updating species diversity of *Colletotrichum*, with a phylogenomic overview. **Studies in Mycology**, v. 101, n. 1, p. 1–56, 1 mar. 2022.
- MENEZES, J. P. *et al.* Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 132–139, fev. 2010.
- NASCIMENTO, A. S. M. D. *et al.* Comercialização socioeconômica de cucurbitáceas nas feiras livres de São Luís - MA. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. e20010615687, 27 maio 2021.
- OLIVEIRA, A. J. *et al.* Principais marcadores moleculares. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e562101523633–e562101523633, 26 nov. 2021.
- PINHO, D.P.; MACHADO, A.R.; FIRMINO, A. L. **Métodos em Fitopatologia: Princípios e Métodos para Identificação Molecular de Fungos**. Ed. 2°. Viçosa-MG: UFV, 2016.
- REIS, Ailton; FEITOSA, MI de S. Antracnose da melancia, melão e pepino: identificação e manejo. **Embrapa**. 2022. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/231647/1/COT-134-final.pdf>>. Acesso em: 09/08/2022.
- ROCHA, R. R. *et al.* Análise agroecômica do arranjo de plantas no cultivo de melão em Nova Mutum, Mato Grosso. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 16, n. 1, p. 33–39, 1 jan. 2021.
- SASSERON, G. R. **Diversidade, Estrutura Genética E Avaliação Da Patogenicidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli ao Feijoeiro Comum**. 2015. 117 p. Tese (Doutorado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônômico, [S. l.], 2015. Disponível em: <https://www.iac.sp.gov.br/areadoinstitutoposgraduacao/repositorio/storage/1020.pdf>. Acesso em: 21 set. 2022;

CAPÍTULO I

PRIMEIRO RELATO DE *Colletotrichum plurivorum* e *Colletotrichum truncatum* CAUSANDO ANTRACNOSE EM *Cucumis melo* L NO BRASIL

Daniela Almeida de Assunção¹, Luiz Fernando Bezerra Evangelista¹, Talison Eugenio da Costa^{1,2}, Jarlan Lucas dos Santos Silva^{1,2}, Elisandra Alves Bento¹, Jorge Alves da Silva Neto¹, Washington Luis da Silva^{1,2,3, †}, Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio^{1, †}, Ioná Santos Araújo Holanda^{1, †}.

¹Departamento de Ciências Agronômicas e Florestais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido- UFERSA, Campos Mossoró, Mossoró, RN 59.625-900, Brazil

²Department of Plant Pathology and Ecology, The Connecticut Agricultural Experiment Station, New Haven, CT 06511, USA.

³Department of Plant Science and Landscape Architecture, The University of Connecticut, Storrs, CT 06569, USA.

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma das culturas mais importante economicamente para o Brasil, com produção em torno de 699.281 toneladas ao ano (FAO, 2024). As doenças fúngicas são um dos maiores entraves à produção de melão (Nascimento et al., 2018). Com base nos relatos de produtores de melão na maior região de produção do Brasil, cerca de 80% das plantas apresentaram sintomas de antracnose em campo. Em junho de 2022 a junho 2023, foram coletadas folhas de meloeiro exibindo sintomas de manchas necróticas marrons com alo amarelado em seis campo de melão (4°58'56"S 37°31'36"W, 4°54'27.2"S 37°24'05.5"W, 4°54'6"S 37°25'58"W, 4°54'41"S 37°26'14"W, 5°40'11"S 37°14'43"W, 5°27'00.7"S 36°42'00.1"W). Foram amostradas aleatoriamente 10 plantas por fazenda. Pequenos fragmentos de folhas sintomáticas foram desinfestados em etanol 70% e NaClO 2,5%, em seguida, os fragmentos foram lavados em água autoclavada, e plaqueados em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) com tetraciclina (0,05g/litro). As placas foram mantidas a 28°C, sob fotoperíodo de 12 horas. Onze isolados de *Colletotrichum* foram repicadas novamente para o meio BDA, e após

crescimento foi realizado o cultivo monospórico para a realização das análises morfológicas, patogenicidade e identificação molecular. Após sete dias, as colônias apresentaram coloração marrom-rosada escuras com acérvulos no centro e micélio algodonoso e apresentavam uma borda preta, lembrando *C. plurivorum* (Zhang et al., 2023). Os conídios dessas colônias eram asseptados, hialinos, cilíndricos com extremidades obtusas e tamanho 17,76 x 7,06 µm (n=50). As outras colônias dos isolado apresentavam micélio cinza-rosados com números microescleródios pretos. Os conídios eram hialinos, falcados e tinham tamanho de 27,28 x 4,10 µm (n=50), assemelhando-se à morfologia de *C. truncatum* (Yu et al., 2023). O DNA dos onze isolados foram extraídos e as regiões parciais do espaçador transcrito interno (ITS), gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenado (GAPDH), actina (ACT), beta-tubulina (TUB) e quitina sintase 1 (CHS-1) foram amplificadas por PCR, sequenciados e submetidos ao Genbank (Tabela eXtra1). A árvore filogenética para maximum likelihood foi gerada com as sequências concatenadas dos cinco genes no Software MEGA (Versão 11.0.10) (Tamura et al., 2021). Os isolados CML5, CML8, CML9, CML10, CML11, CML14, CML15, e CML25 foram agrupados com *Colletotrichum plurivorum* CBS 125474 (Complexo *orchidearum*) e os isolados CML26, CML27 e CML28 com *Colletotrichum truncatum* CBS 15:35 (complexo *truncatum*) com 98% e 84% de suporte de Bootstrap, respectivamente. A patogenicidade foi testada seguindo o método de Baishuan et al. (2023), foram realizados microferimentos em folhas de mudas de melão ‘Goldex Yellow’ e inoculadas com suspensão de esporos de colônias com sete dias de crescimento, com 10⁶ esporos/mL, de todos os isolados, pulverizados até o ponto de escorrimento. Para o controle negativo foi utilizado água destilada autoclavada. Após nove dias, sintomas de antracnose semelhantes aos observados em campo, foram observados em todas as folhas inoculadas com o patógeno, enquanto nenhum sintoma foi observado nas folhas do controle. Foi realizado o reisolamento e a morfologia dos fungos observados foram idênticos aos patógenos observados das plantas coletadas do campo. Foram utilizadas cinco mudas por tratamento e o ensaio foi repetido e reproduzidos os mesmos resultados. A espécie de *C. plurivorum* já foi relatada causando doença em pepino no Brasil (Silva et al., 2023) e *C. plurivorum* e *C. truncatum* em *Citrullus lanatus* na China (Guo et al., 2022). Até onde sabemos, este é o primeiro relato de *C. plurivorum* e *C. truncatum* causando antracnose em meloeiro. Este relato servirá de base para futuros estudos que visarem determinar estratégias de controle de antracnose em meloeiro.

Financiamento

Os autores são gratos a Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), a Connecticut Agricultural Experiment Station (CAES), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Essa pesquisa foi parcialmente financiada pelo programa Special Specialty Crop Block Grant Program (SCBGP) do USDA - Grant Award #23DAG0087AA and by the USDA-NIFA Hatch Grant - Project #1017940.

REFERÊNCIAS:

Baishuan, Lv., et al. 2023. *Plant Disease*. 1:1. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-22-2005-PDN>

FAO. 2024. FAOSTAT Statistical Database. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>

Guo, Z., et al. 2022. *Journal of Fungi*. 1:28. <https://doi.org/10.3390/jof8080790>

Nascimento, P. G. M. L., et al 2018. *European Journal of Plant Pathology*. 1:14. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1488-6>

Silva, R. M. F., et al. 2023. *Plant Disease*. 1:6. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-23-2245-PDN>

Tamura, K., et al. 2021. *Mol. Biol. Evol.* 38:3022.

Yu, J. et al. 2023. *Plant Disease*. 1:1. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-22-0352-PDN>

Zhang, Y., et al. 2023. *Plant Disease*. 1:1. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-22-2774-PDN>

Tabela eXtra1: Número de acesso das sequências depositadas no GenBank para as regiões parciais do espaçador transcrito interno (ITS), gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (GAPDH), actina (ACT), beta-tubulina (TUB) e quitina sintase 1 (CHS-1).

Patógeno	Localização	Coordenadas	Hospedeiro	Isolado	ACT	CHS	GADPH	ITS	TUB
<i>C. plurivorum</i>	Mossoró	4°54'27.2"S 37°24'05.5"W	<i>Cucumis melo</i> L.	CML5	OR343422	OR343440	OR343458	OR333913	OR343476
<i>C. plurivorum</i>	Mossoró	4°54'27.2"S 37°24'05.5"W	<i>Cucumis melo</i> L.	CML8	OR343425	OR343443	OR343461	OR333916	OR343479
<i>C. plurivorum</i>	Tibau	4°54'6"S 37°25'58"W	<i>Cucumis melo</i> L.	CML9	OR343426	OR343444	OR343462	OR333917	OR343480
<i>C. plurivorum</i>	Tibau	4°54'6"S 37°25'58"W	<i>Cucumis melo</i> L.	CML10	OR343427	OR343445	OR343463	OR333918	OR343481
<i>C. plurivorum</i>	Tibau	4°54'6"S 37°25'58"W	<i>Cucumis melo</i> L.	CML11	OR343428	OR343446	OR343464	OR333919	OR343482
<i>C. plurivorum</i>	Upanema	5°40'11"S 37°14'43"W	<i>Cucumis melo</i> L.	CML14	OR343431	OR343449	OR343467	OR333922	OR343485
<i>C. plurivorum</i>	Upanema	5°40'11"S 37°14'43"W	<i>Cucumis melo</i> L.	CML15	OR343432	OR343450	OR343468	OR333923	OR343486
<i>C. plurivorum</i>	Tibau	4°54'6"S 37°25'58"W	<i>Cucumis melo</i> L.	CML25	OR343438	OR343456	OR343474	OR333929	OR343492
<i>C. truncatum</i>	Afonso Bezerra	5°27'00.7"S 36°42'00.1"W	<i>Cucumis melo</i> L.	CML26	PP105756	PP105759	PP118308	PP097204	PP105753
<i>C. truncatum</i>	Afonso Bezerra	5°27'00.7"S 36°42'00.1"W	<i>Cucumis melo</i> L.	CML27	PP105757	PP105760	PP118309	PP097205	PP105754
<i>C. truncatum</i>	Afonso Bezerra	5°27'00.7"S 36°42'00.1"W	<i>Cucumis melo</i> L.	CML28	PP105758	PP105761	PP118310	PP097206	PP105755

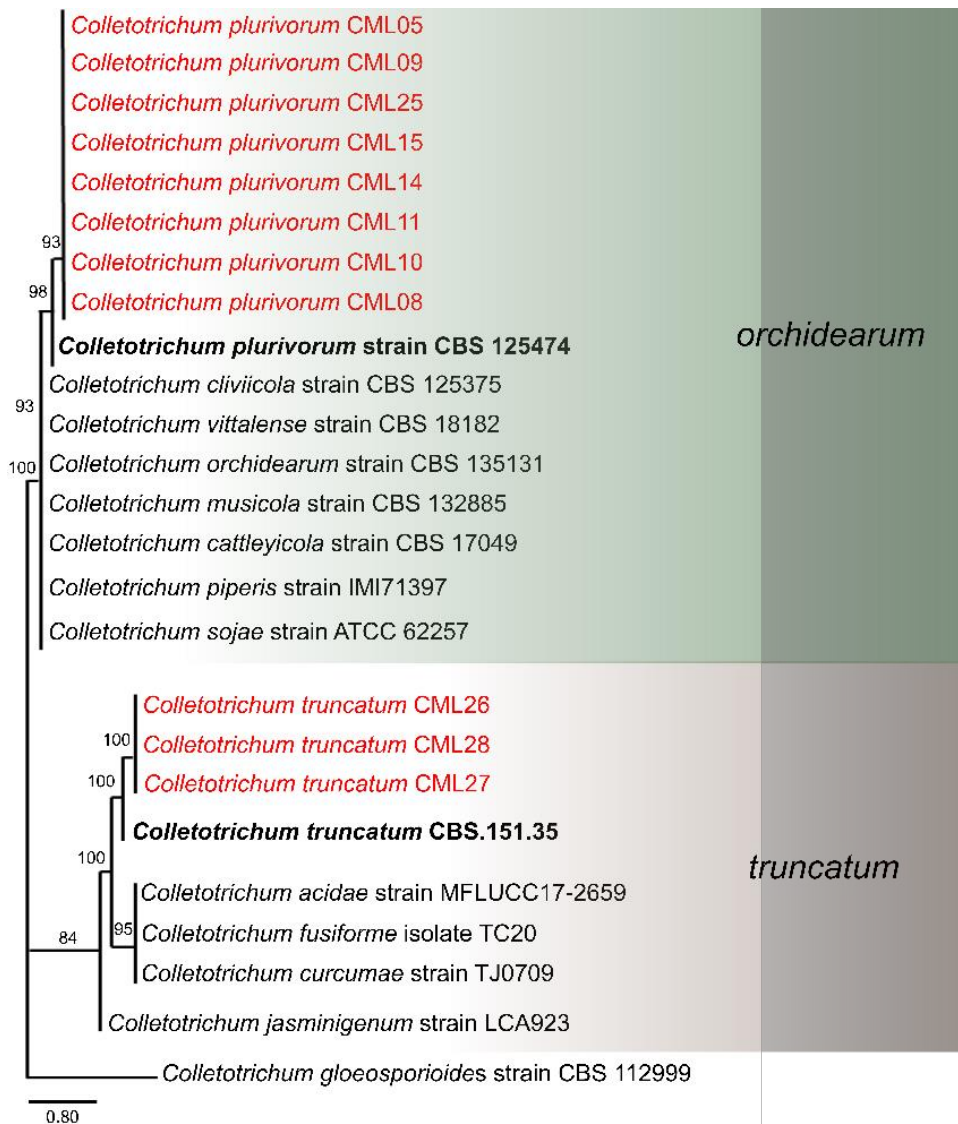


Fig. Supplemental S1. Árvore de máxima verossimilhança construída com sequências concatenadas de cinco sequências parciais das regiões genômicas ITS, GAPDH, ACT, TUB, CHS-1, dos onze isolados CML5, CML8, CML9, CML10, CML11, CML14, CML15, CML25, CML26, CML27, CML28. Os números nos nós indicam os valores de Bootstrap.

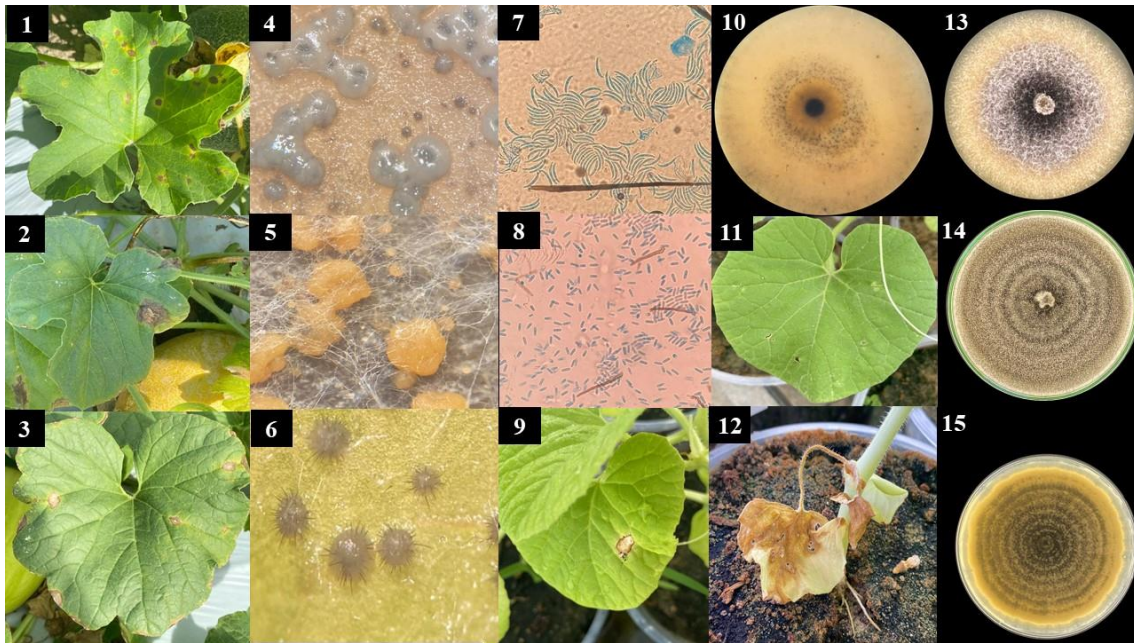


Fig. suplementar S2. Sintomas de antracnose em folhas de meloeiro observados em campo (1;2;3). Acérvulo *C. truncatum* observados em microscópio estereoscópico (40X) (4;6). Conidiomatas de *C. plurivorum* observados em microscópio estereoscópico (40X) (L). Conídios e seta de *C. truncatum* observados em microscópio óptico (100x) (7). Conídios e seta de *C. plurivorum* observados em microscópio óptico (100x). Folhas de meloeiro inoculadas com os isolados de *C. truncatum*(9), *C. plurivorum* (12), controle (11) com sintomas similares aos observados em campo. Colônia de *C. plurivorum* (10;13). Colônias de *C. truncatum* (14;15).

CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Colletotrichum plurivorum* E *Colletotrichum truncatum* CAUSANDO ANTRACNOSE EM MELOEIRO CULTIVADO NO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL.

Resumo: Fungos fitopatogênicos do gênero *Colletotrichum* são responsáveis por causar a doença antracnose em diversas culturas de importância agrícola em todo o mundo. Por tanto, é tão necessário a identificação correta dos agentes para assim, traçar métodos de manejo eficientes para o controle do patógeno. Os Estudos de diversidade genética utilizando marcadores moleculares, são utilizados elucidar sobre o nível de variabilidade genética de indivíduos, pois caso haja uma variação gênica, pode significar que esses organismos podem ser difíceis de serem controlado. Com isso, o objetivo desse trabalho foi caracterizar morfológicamente e avaliar a diversidade genética de *C. plurivorum* e *C. truncatum* utilizando marcadores moleculares ISSR. Em 2022 e 2023 foram coletados no total de 21 isolados de *Colletotrichum* de folhas de meloeiro em seis fazendas localizadas em cinco cidades pertencentes ao estado do Rio Grande do Norte. Foram coletadas folhas de meloeiro com sintomas característicos de antracnose e conduzidas para o laboratório para realização do isolamento e purificação para a realização da análise morfológica, avaliando a coloração das colônias e mensuração dos conídios de cada isolado. Foi realizada extração de DNA de cada isolado para amplificação utilizando oito iniciadores moleculares ISSR para o rastreamento do polimorfismo de 21 isolados de *Colletotrichum*. Para as reações de amplificação, foram realizadas com um volume final de 12 μ L contendo: Tampão de Buffer 1x (50 mM de KCl; 200 mM de Tris-HCl, pH 8,4), 1,5 mM de $MgCl_2$, 2mM de cada dNTP, 0,2 μ M de cada primer separadamente, 1U de *Taq* DNA polimerase, 5 μ g de BSA e 10 ng de DNA. Os produtos da PCR foram aplicados em gel agarose a 2% e submetidos a eletroforese horizontal em tampão TBE (1X) sob uma voltagem de 120V por 2h. Os géis foram corados em solução de brometo de etídio (0,5 μ g/mL) durante 10 min e visualizados sob luz UV, usando o sistema de documentação em gel (Proteinsimple-AlphaImager HP). Foi possível observar dois tipos de conídios totalmente distintos, sendo todos asseptados. Os conídios da espécie *C. plurivorum* eram hialinos, cilíndricos com extremidades obtusas e com comprimento e largura variando de (18,94 a 16,67 μ m) e (7,56 a 6,06 μ m) As colônias apresentaram micélio algodinoso, de coloração cinza rosado, e no reverso, marrom escuro rosado, com acérvulos no centro, apresentando, em alguns isolados, halo preto. Os conídios da espécie *C. truncatum* eram hialinos, falcados com ápices afilados, com comprimento e largura variando de (27,86 a 27,14 μ m) e (4,11 a 4,04 μ m), as colônias apresentaram micélio acinzentado rosado pulverulento no anverso, e pontuações preto rosado no reverso. Os isolados presentes em fazendas distribuídas nas principais cidades produtoras de meloeiro do Rio Grande do Norte, Brasil, utilizados nesse estudo, apresentam grande diversidade genética. Apesar dos valores moderadamente alto do PIC, eles apresentaram suporte para acessar a diversidade genética devido ao coeficiente de similaridade baixo 0,318 (intervalo = 0,287 a 0,379). A similaridade genética, gerou um coeficiente variando de 0,10 (isolados 27 e 25) a 0,94 (isolados 26 e 28), podendo-se observar a formação dos cinco grupos com 33% de nível de similaridade produzido pelo método UPGMA.

Palavras-chave: Diversidade genética; Fitopatógenos; Marcadores moleculares.

CHAPTER II: MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Colletotrichum plurivorum* and *Colletotrichum truncatum* CAUSING ANTHRACNOSE ON MELON TREES CULTIVATED IN THE STATE OF RIO GRANDE DO NORTE, BRAZIL.

ABSTRACT: Brazil is among the world's top ten melon-producing countries, emphasizing the Northeast region, which dominates 95% of national production. One of the main obstacles in melon production is the occurrence of fungal diseases, which limit crop development. Given this, the present study sought to identify, at a molecular and morphological level, and analyze the pathogenicity of *Colletotrichum* isolates collected from melon trees. Plants that showed symptoms similar to anthracnose symptoms were collected in commercial melon areas located in the state of Rio Grande do Norte. Then, the samples were taken to the Microbiology and Phytopathology laboratory (LAMIFI), and isolation and monosporic cultivation of fungal isolates belonging to the genus *Colletotrichum* were carried out. Monosporic cultures were used for molecular and morphological characterization, and pathogenicity of the isolates. For molecular characterization, the isolates were sequenced using partial regions of the internal transcribed spacer (ITS), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenated (GAPDH), actin (ACT), beta-tubulin (TUB) and chitin synthase 1 (CHS-1). The study of genetic diversity was also carried out using ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) DNA markers. For the morphological characterization of the isolates, discs containing fungal structures were placed in Petri dishes to evaluate the color of the colonies and analysis of the shapes and dimensions of the conidia. The pathogenicity test was conducted in a greenhouse and the experimental design was completely randomized (DIC) with five replications per isolate. Goldex hybrid yellow melon seedlings were used, and a suspension of 10^6 conidia/mL of each isolate was sprayed on wounded leaves with sterilized needles. After inoculation, plants were kept in a humid chamber. Subsequently, the appearance of symptoms on the leaves was evaluated, and reisolation was carried out to confirm the pathogenic agent. The sequencing analysis results allowed the identification of two species: *Colletotrichum plurivorum* and *Colletotrichum truncatum*. The colonies of isolates belonging to the species *C. plurivorum* presented cottony mycelium, pinkish gray color, and on the reverse, dark pinkish brown, with acervuli in the center, presenting, in some isolates, a black halo, and the conidia were hyaline, cylindrical with ends obtuse, length and width measuring: (18.94 to 16.67 μ m) and (7.56 to 6.06 μ m). For isolates of the species *C. truncatum*, the colonies showed powdery pinkish-gray mycelium on the obverse and pinkish-black spots on the reverse. The conidia were hyaline, falcate with tapered apices, with length and width measuring: (27.86 to 27.14 μ m) and (4.11 to 4.04 μ m). It was possible to observe the emergence of anthracnose symptoms similar to those observed in the field in all leaves inoculated with the pathogen. No symptoms were observed in the control leaves. Reisolation confirmed the two species as the causal agent. The test was repeated and the same results were reproduced.

Keywords: Genetic diversity; Phytopathogens; Molecular markers.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil está na oitava posição dos países mais produzem melões no mundo, com sua produção em torno de 699 mil toneladas no ano de 2022 (FAOSTAT, 2022), tendo como representantes os estados Rio Grande do Norte, Ceará e Bahia como os principais estados produtores. O estado do Rio Grande do Norte produziu 442 mil toneladas de melões, sendo as cidades de Mossoró, Baraúna e Tibau como destaques (IBGE, 2022).

O meloeiro está sujeito ao ataque de diversos patógenos, e o relato de novas doenças afetando esta cultura tem sido frequente, tal como as doenças causadas por *Cladosporium tenuissimum* (Gomes *et al.*, 2023) e *Lasiodiplodia brasiliensis* (Silva *et al.*, 2024).

No ano de 2022 e 2023 foram frequentes as queixas dos produtores de melão no estado do Rio Grande do Norte sobre o surgimento de sintomas de necrose foliar típico de Antracnose, tornando necessário uma investigação sobre os casos relatados. Apesar de constar na literatura que a Antracnose é uma das principais doenças na cultura do melão ocasionadas pelos patógenos *Colletotrichum orbiculare* e *Colletotrichum gloeosporioides*, no Brasil, ainda não existem estudos comprovando esta afirmação.

O *Colletotrichum* pode infectar as plantas em qualquer fase fenológica, desde a raiz ao fruto, podendo sobreviver no solo e em restos de cultura por anos. Os sintomas mais comuns são manchas foliares, necróticas, podendo ser circulares com ou sem halo amarelo, e nos frutos, apresentam lesões circulares ou elípticas e de aspecto deprimido com massa alaranjada no centro das lesões (Nick; Borém, 2019).

As espécies *C. truncatum* e *C. plurivorum* que estão sendo relatado como os agentes causais da antracnose em meloeiro. Foi relatado por Silva *et al.* (2023) a espécie *C. plurivorum* causando antracnose em pepino (*Cucumis sativus*), sendo esta cultura da mesma família do meloeiro, indicando que as espécies das Cucurbitáceas podem estar suscetíveis ao ataque desse agente patogênico.

Para a identificação dos microrganismos, são avaliadas as características morfológicas junto com identificação a nível molecular, utilizando técnicas através da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Entre as técnicas moleculares, temos os marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), que é uma técnica de baixo custo de desenvolvimento, fornecem muita informação sobre polimorfismo, de alta reprodutibilidade e são amplamente utilizados para estudar a diversidade genética dentro e entre espécies, que podem fornecer informações sobre possíveis variações genéticas

entre os indivíduos, sendo assim utilizados para elucidar e traçar métodos de manejos mais adequados para o controle do patógeno (Silva Neto *et al.*, 2022; Felix *et al.*, 2020).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta, isolamento e análise morfológica

Entre 2022 e 2023 foram coletados no total de 21 isolados de *Colletotrichum spp.* de meloeiro em seis áreas produtoras localizadas no estado do Rio Grande do Norte (Tabela 1). Foram coletadas folhas de meloeiro com sintomas característicos de antracnose, embaladas em saco plásticos e etiquetadas e conduzidas para o laboratório de microbiologia e fitopatologia (LAMIFI) pertencente a Universidade Federal Rural do Semi-Árido

Tabela 1. Isolados de *C. plurivorum* (isolados de 4 a 25) e *C. truncatum* (isolados de 26 a 28) obtidos de folhas doentes de meloeiro cultivadas em fazendas produtoras localizadas nos municípios Rio Grande do Norte.

Isolados	Hospedeiro	Tecido vegetal	Data da coleta	Localização	Município
CML4				4°54'27.2"S	
CML 5	<i>Cucumis melo L.</i>	Folha	09/06/2022	37°24'05.5"	Mossoró
CML 8				W	
CML 6	<i>Cucumis melo L.</i>	Folha	20/06/2022	4°58'56"S	Baraúna
CML 7				37°31'36"W	
CML 9					
CML 10					
CML 11	<i>Cucumis melo L.</i>	Folha	11/07/2022	4°54'6"S	Tibau
CML 19				37°25'58"W	
CML 20					
CML 25					
CML 12				4°54'41"S	
CML 13	<i>Cucumis melo L.</i>	Folha	11/07/2022	37°26'14"W	Mossoró
CML 23					

CML 14					
CML 15	<i>Cucumis melo L.</i>	Folha	13/07/2022	5°40'11"S	Upanema
CML 18				37°14'43"W	
CML 24					
CML 26				5°27'00.7"S	
CML 27	<i>Cucumis melo L.</i>	Folha	13/06/2023	36°42'00.1"	Afonso
CML 28				W	Bezerra

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Para o isolamento fúngico, foi realizado corte na zona de transição (área limítrofe) entre a área doente e sadia da folha e submetidos a desinfestação: imersão em etanol 70% e imediatamente retirado e imerso sobre solução de hipoclorito de sódio à 2,5% por um minuto e colocados em água destilada esterilizada.

Os fragmentos foram transferidos, com auxílio de uma pinça, para papel filtro esterilizado para absorver o excesso de água e colocados em placas de Petri com meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), previamente autoclavado e suplementado com antibiótico Cloridrato de Tetraciclina (0,025 g/L) e armazenada em BOD a 28°C durante 48h sob fotoperíodo de 12h.

Após 48h do isolamento, foi realizada repicagem retirando um pequeno fragmento contendo o micélio do fungo desenvolvido e transferido para novas placas de BDA com antibiótico, afim de se obter isolados separados isoladamente, para posterior purificação.

Para garantir a purificação e uniformidade dos isolados, foi realizado o cultivo monospórico utilizando o método descrito por Pinho (2016): após a repicagem de cada isolado crescido separadamente durante sete dias para se obter alta esporulação, foram utilizadas placas de Petri contendo meio Ágar-Ágar e em seguida, desenha-se um círculo no fundo dessas placas e adiciona 20 µL de água destilada sobre o meio de cultura (no centro da circunferência).

Com auxílio de um bisturi, encosta-o no micélio na região com alta esporulação e posteriormente, encosta a ponta do bisturi com os esporos na água destilada contida no meio e espalha com auxílio da alça de Drigalski. No final, observa-se no microscópio a presença do esporo e coloca as placas em B.O.D. por 24h a temperatura de 28°± 2°C, sob fotoperíodo de 12 horas.

Após o período de incubação, e com auxílio de microscópio estereoscópico, foram visualizados os conídios germinando (Figura 1), e então, estes transferidos individualmente para o centro de placas de petri, contendo BDA e incubados durante sete dias, sob as mesmas condições de temperatura e luminosidade, e preservados, transferindo entre seis a oito discos para tubos criogênicos com água destilada esterilizada e armazenadas na geladeira com suas respectivas identificações.



Figura 1. Conídio de *Colletotrichum plurivorum* germinado no cultivo monospórico. (Arquivo pessoal).

Para a caracterização morfológica, foram selecionados 15 isolados representativos para avaliação. Discos contendo micélio dos isolados foram colocados em placas de BDA e mantidas a 28°C com fotoperíodo de 12 horas até que o fungo atinja as bordas das placas. Foram observadas a coloração, comprimento e largura dos conídios no microscópio óptico.

Para caracterização morfológica, foram avaliadas a colorações das colônias, avaliação dos conídios (morfologia e tamanho), presença e ausência de setas de cada isolado. Foi preparada uma suspensão de esporos de cada indivíduo, e adicionados em câmara de Neubauer para obtenção da imagem dos conídios e mensurado o comprimento e largura de 50 conídios, escolhidos aleatoriamente, identificados por microscópio óptico, utilizando o software image J, versão 1.52a.

2.2. Extração de DNA

Para a extração de DNA, foram utilizados massa micelial de cultivo monospórico de isolados fúngicos de *Colletotrichum* spp. crescidos em meio BDA por sete dias a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. A extração, para a obtenção do material genômico, foi realizado pelo método de Ferreira; Grattapaglia (1998), com modificações. Inicialmente o micélio foi macerado em almofariz, na presença de nitrogênio líquido, em seguida, são adicionados 700 μL de tampão de extração (NaCl 1,4M; Tris HCl pH 8,0 100 mM; EDTA 20 mM; SDS 0,5%; β -Mercaptoetanol 0,2% e água Milli-Q) e incubados a 65°C por 60 min. Posteriormente, foi adicionado uma solução de Clorofórmio: Álcool Isoamílico (24:1, v/v) com posterior precipitação com 400 mL de álcool isopropílico. As amostras precipitadas foram centrifugadas a 15.000 g durante 10 minutos. Os precipitados formados, foram lavados em etanol gelado a 70, 80 e 90% respectivamente, e secos em temperatura ambiente. Por fim, as amostras foram suspensas em água Milli-Q com adição de RNA'se e, em seguida, submetidas a banho maria a 37°C por 30 minutos e armazenadas a -20°C . O DNA obtido foi quantificado em eletroforese em gel de agarose a 1% e corado com brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g. mL}^{-1}$) em tampão TBE a 120V por 30 min e visualizado sob luz UV usando o sistema de documentação em gel (Proteinsiple-AlphaImager HP).

2.3. Análise de diversidade genética

Para a diversidade genética, foram utilizados oito iniciadores ISSR (DiCA5'CY; DiGA3'RC; DiGA5'CR; TriCAAC3'RC; TriGTG; TriGTG3'YC; TriGTG5'CY e TriAGG3'RC), para o rastreamento do polimorfismo de 21 isolados de *Colletotrichum* spp. As reações de amplificação com os iniciadores ISSR, foram realizadas em um volume final de 12 μL contendo: Tampão de Buffer 1x (50 mM de KCl; 200 mM de Tris-HCl, pH 8,4), 1,5 mM de MgCl_2 , 2mM de cada dNTP, 0,2 μM de cada primer separadamente, 1U de *Taq* DNA polimerase, 5 μg de BSA e 10 ηg de DNA. As condições de amplificações-consistiram em uma etapa inicial de desnaturação de 94°C por 1min, seguida de 35 ciclos a 94°C por 40s, temperatura de anelamento de cada iniciador a 72°C por 40s e 72°C por 1 min e uma etapa final de extensão de 72°C por cinco minutos. Os produtos da PCR foram separados em gel agarose a 2% e submetidos a eletroforese horizontal em tampão TBE (1X) sob uma voltagem de 120V por 1,5-2h. Os géis foram

corados em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) durante 10 min e visualizados sob luz UV, usando o sistema de documentação em gel (Proteinsimple-AlphaImager HP). O tamanho dos fragmentos amplificados será comparado a partir do padrão de peso molecular de 100 pb “DN Ladder Plus” (Thermofisher) (Tabela 2).

Os resultados das ampliações com os iniciadores ISSR nos 21 isolados foram analisados em sistema binário para a presença de bandas “1” ou ausência “0”, sendo consideradas somente bandas nítidas e reproduzíveis. Para cada marcador selecionado, será gerado o conteúdo de informações polimórficos (PIC). Um dendograma será construído com base no coeficiente de similaridade de Jaccards utilizando o método de agrupamento de pares não ponderadas (UPGMA) pelo programa NTSYS (ROHLF, 1998).

Tabela 2. Dados dos iniciadores ISSR utilizados para estudo de diversidade genética de isolados de *C. plurivorum* e *C. truncatum*.

Nº do primer	Primer ISSR	Sequência do iniciador (5' → 3')	Temperatura de anelamento (° C)
3	DiCA5'CY	GTGGTGGTGGTGGTG	55
5	DiGA3'RC	CyGTGGTGGTGGTGGTG	55
7	DiGA5'CR	CRGAGAGAGAGAGAGAGA	55
8	TriCAAC3'RC	TCCTCCTCCTCCTCCRC	55
9	TriGTG	CGACGACGACGACGARC	55
10	TriGTG3'YC	GTGGTGGTGGTGGTGGTYC	55
11	TriGTG5'CY	CYGTGGTGGTGGTGGTG	55
18	TriAGG3'RC	AGGAGGAGGAGGAGGRC	55

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As avaliações das características morfológicas resultaram em três grupos distintos para os 15 isolados de *C. plurivorum* e *C. truncatum*. O grupo I (Isolados CML5, CML7, CML8, CML9, CML10, CML11, CML12, CML14, CML15, CML19, CML20 e CML25) apresentaram micélio algodonososo cinza rosado com acérvulos no centro no anverso e marrom escuro rosado no reverso, com a presença de um halo preto bem formado.

O grupo II (Isolado 25) micélio aveludado preto no anverso e preto no reverso. Entretanto, o Grupo III (Isolados 26, 27, 28) apresentou micélio acinzentado rosado pulverulento no anverso, e pontuações preto rosado no reverso (Figura 2).

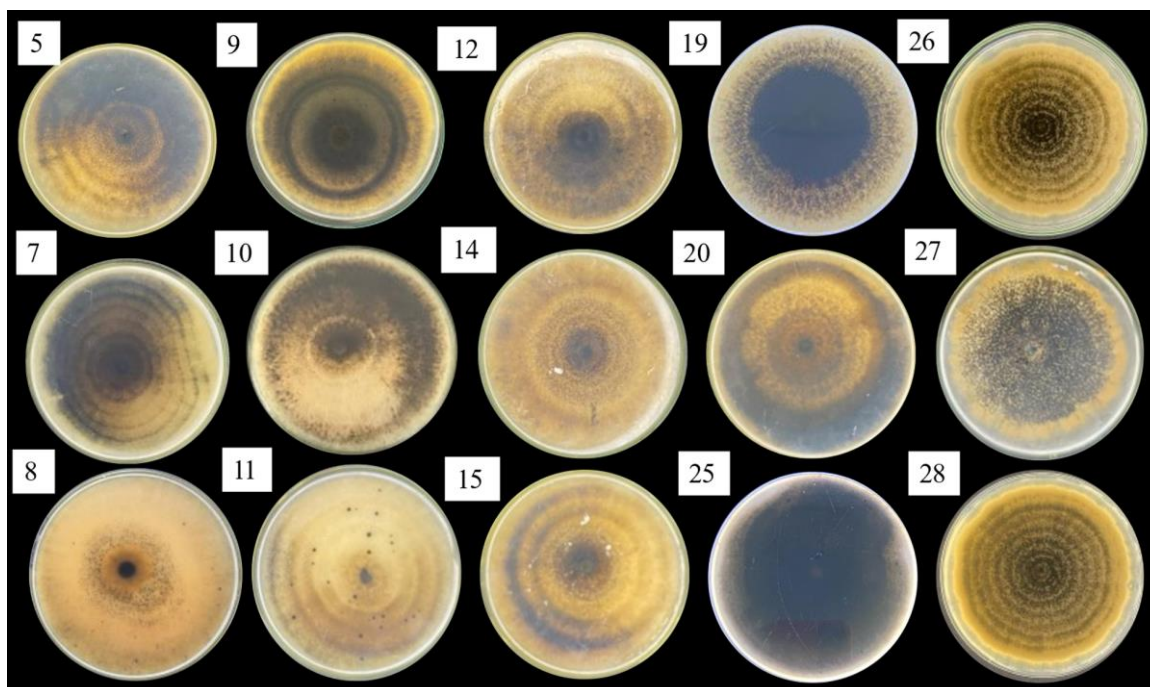


Figura 2. Colônias desenvolvidas em BDA de *Colletotrichum plurivorum* e *C. truncatum* isolados de folhas de meloeiro. 5 a 25 (*C. plurivorum*) e 26 a 28 (*C. truncatum*). (Arquivo pessoal)

Foi possível observar dois tipos de conídios totalmente distintos, sendo todos asseptados. Os conídios da espécie *C. plurivorum* eram hialinos, cilíndricos com extremidades obtusas e com comprimento e largura variando de (18,94 a 16,67 μm) e (7,56 a 6,06 μm). Os conídios da espécie *C. truncatum* eram hialinos, falcados com ápices afilados, com comprimento e largura variando de (27,86 a 27,14 μm) e (4,11 a 4,04 μm). Todos os isolados apresentaram setas de coloração marrom asseptados (Tabela 3).

Tabela 3. Caracterização de conídios dos isolados de *C. plurivorum* e *C. truncatum*.

Isolado	Conídios		Forma mais encontrada
	Comprimento	Largura	
CML5	16,92	7,03	1
CML 7	18,25	6,65	1
CML 8	17,07	6,95	1
CML 9	18,94	7,56	1
CML 10	16,68	7,32	1
CML 11	17,75	6,47	1
CML 12	18,73	7,12	1
CML 14	16,67	6,98	1
CML 15	18,42	7,04	1
CML 19	17,71	6,06	1
CML 20	18,39	7,41	1
CML 25	18,06	6,43	1
CML 26	27,14	4,07	2
CML 27	27,14	4,11	2
CML 28	27,86	4,10	2

Formas mais encontradas: Conídios: 1- cilíndricos com extremidades obtusas; 2- Falcados com ápices afiladas. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

As características das colônias quanto a coloração, podem variar a depender da espécie, do ambiente e do meio de cultura que é utilizado, como no caso o que foi observado no presente estudo, onde as características morfológicas entre as duas espécies *C. truncatum* e *C. plurivorum*, foram totalmente distintas quando comparadas em relação a formação de colônias e formato dos conídios.

Os fungos pertencentes ao gênero *Colletotrichum* podem causar antracnose em diversas plantas no mundo todo, temos a espécie desse estudo, *C. truncatum*, como a mais importante causando doença a cultura da soja (Brito, 2018).

No Brasil, o *C. truncatum* também já foi relatada causando doença em mandioca (Machado *et al.*, 2021) e em cebola (Matos *et al.*, 2017), essas cepas apresentaram características semelhantes em coloração, formato de conídios predominantemente falcados, hialinos, asseptados com pontas afiladas.

A espécie *C. plurivorum* é relativamente nova, sendo detectada pela primeira vez em 2016 por Liu et al. (2016). Já foi relatada no mundo ela causando doença também em mandioca, soja, mamão (EFSA, 2021) e recentemente causando antracnose em pepino (Silva et al., 2023).

As características morfológicas dos conídios dos isolados de *C. plurivorum* causando doença em pepino no Brasil observado por Silva et al. (2023), em mamão no México observado por García et al. (2019) e em mamão em Taiwan observado por Sun; Damm; Huang (2019), apresentaram formato cilíndrico com extremidades obtusas, asseptados e unicelulares com coloração das colônias cinza, preto-acinzentadas ou marrom, com micélios aéreos brancos semelhantes ao observado em laboratório da espécie *C. plurivorum* causador da antracnose em meloeiro.

Os oito iniciadores ISSR utilizados produziram 132 *loci*, dos quais 127 eram polimórficos. Desses oitos iniciadores, seis apresentaram 100% de polimorfismo (DiCA5'CY; DiGA3'RC; DiGA5'CR; TriCAAC3'RC; TriGTG; TriGTG3'YC; TriGTG5'CY e TriAGG3'RC), com o iniciador TriCAAC3'RC produzindo maior número de bandas (26 bandas), porém apresentou menor taxa (88,46%) devido a presença de três bandas monomórficas. Foram calculados os valores de PIC para todos os iniciadores com valor médio de 0,318, onde o TriGTG apresentou maior valor (0,379) e o TriAGG3'RC, o menor (0,283) (Figura 3) e (Tabela 4).

Naveen et al. (2021) estudando a diversidade genética de *C. truncatum* causando antracnose em pimenta no Sul da Índia, utilizando marcadores moleculares ISSR, produziram cerca de 108 bandas polimórficas separando os 30 isolados em quatro principais grupos, conseguindo observar a diversidade genética entre os isolados estudados, porém não conseguiram diferenciá-los quanto a origem geográfica, informando que isso pode ter ocorrido devido as condições climáticas que as pimenteiras, de onde foram obtidos os isolados, estavam expostas.

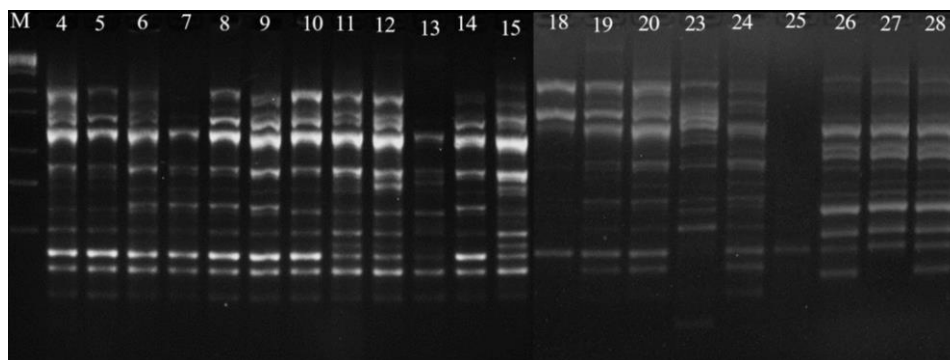


Figura 3. Resultado das reações de amplificações de PCR com iniciador ISSR 8 dos 21 isolados de *C. plurivorum* e *C. truncatum* submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%. ‘M’ nas extremidades do gel representam o marcador de peso molecular de 1kb. As canaletas de 1 a 21 representam cada um dos 21 isolados. (Arquivo pessoal).

Tabela 4. Caracterização dos dados obtidos com iniciadores ISSR quanto ao total de locus (TL), locus monomórficos (LM), locus polimórficos (LP), porcentagem de polimorfismo (%P) e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC).

Primer	TL	LM	LP	%P	PIC
3	8	0	8	100	0,339
5	12	0	12	100	0,337
7	15	0	15	100	0,302
8	26	3	23	88,46	0,303
9	14	0	14	100	0,379
10	18	2	16	88,89	0,317
11	18	0	18	100	0,287
18	21	0	21	100	0,283
Total	132	5	127	-	-
Média	16,5	0,62	15,88	97,17	0,318

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A partir do dendrograma com a combinação dos iniciadores ISSR indicou a formação de cinco grupos: os três isolados da espécie *C. truncatum* estão agrupados no grupo 1 (isolados: 26, 27 e 28), os demais isolados da espécie de *C. plurivorum* estão distribuídos nos demais grupos: grupo 2 (isolado 25), grupo 3 (isolado 14 e 15), grupo 4 (isolado 23), e o maior grupo (grupo 5) com 14 isolados (isolado 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 19, 20, 24 e 18). A similaridade genética, gerou um coeficiente variando de 0,10

(isolados 27 e 25) a 0,94 (isolados 26 e 28), podendo-se observar a formação dos cinco grupos com 33% de nível de similaridade produzido pelo método UPGMA (Figura 4).

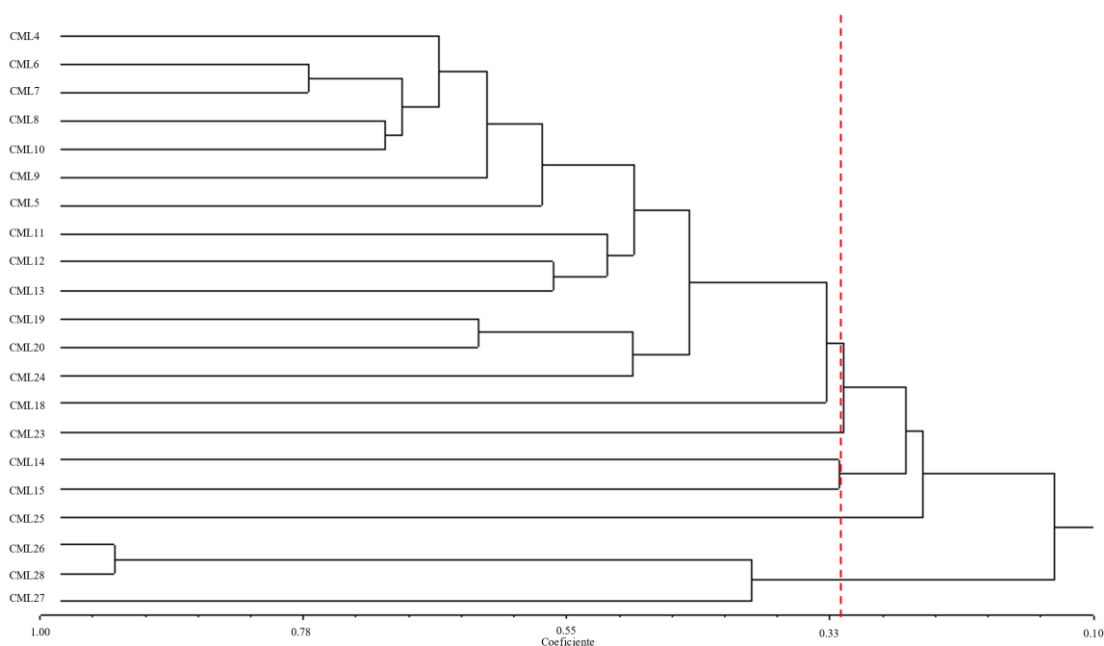


Figura 4. Dendrograma gerado pelo método UPGMA a partir dos iniciadores ISSR com isolados das espécies *C. plurivorum* (CML4, CML5, CML6, CML7, CML8, CML9, CML10, CML11, CML12, CML13, CML14, CML15, CML18, CML19, CML20, CML23, CML24, CML25) e *C. truncatum* (CML26, CML27, CML28). (Arquivo pessoal).

A incidência da diversidade genética entre as espécies de *Colletotrichum* estudadas por meio de marcadores moleculares ISSR demonstraram eficiência para identificação de diversidade. Foi possível observar maior similaridade (0,94) entre os indivíduos 26 e 28, que apresentaram mesmas características nas suas estruturas fúngicas e coletadas a mesma localização geográfica (Tabela 5).

Os isolados a pesar de separados com base na sua localização geográfica (Tabela 1), no agrupamento do dendrograma baseado no conjunto dos iniciadores ISSR, não foi possível ser totalmente associado ao seu local de origem, pois alguns dos isolados coletados na mesma região, ficaram distribuídos em grupos distintos como no caso dos isolados CML12 e CML13 pertencentes ao grupo 5, e o isolado 23 pertencente ao grupo 4, ambos coletados em Mossoró (4°54'41"S 37°26'14"W).

A pesar dos isolados coletados em mesma localização estarem separados em grupos distintos, as maiores distâncias genéticas foram verificadas entre os isolados separados pelas maiores diferenças de latitude (Isolado CML25 e Isolado CML27), e as

distancias genéticas mais curtas, foram observadas entre os isolados obtidos em latitudes semelhantes (Isolado CML26 e CML28).

Resultados obtidos por Dias *et al.* (2019) estudando a diversidade genética de isolados de *C. truncatum* de ocorrência no Brasil e Argentina, causando antracnose em soja. Foi possível observar que os isolados coletados em locais distintos eram próximos geneticamente, como aconteceu com os isolados do grupo 5 e grupo 4, e isolados com maiores latitudes e mais distantes geneticamente como isolados do grupo 2 e grupo 1.

A menor semelhança (0,00) foi possível observar entre os isolados CML25 e CML27, onde são de espécies diferentes CML25 (*C. plurivorum*) e CML27 (*C. truncatum*). Estes isolados apresentaram características morfológicas totalmente distintas, quanto a coloração, formação de conídios e localização geográfica onde foram coletados.

O isolado CML25 apresentou sua colônia de coloração preta, com micélio aveludado e conídios cilíndricos com extremidades obtusas, enquanto o CML27 apresentou sua colônia com micélio acinzentado rosado com numerosos microescleródios pulverulento com conídios falcados e pontudos nas extremidades.

A maior semelhança (0,94) foi possível observar entre os isolados CML26 e CML28, sendo indivíduos da mesma espécie *C. truncatum* com características morfológicas muito idênticas, como pode ser observado na Figura 2, e semelhantes ao observado na caracterização morfológica do isolado CML27 pertencente a mesma espécie, podendo ser comprovado pelos resultados que foram obtidos com as análises moleculares com os iniciadores ISSR confirmando essa afirmação (Figura 4).

A combinação dos oitos iniciadores ISSR exibiram eficiência ao evidenciar a ocorrência de diversidade genética entre os 21 isolados pertencentes as duas espécies de *C. plurivorum* e *C. truncatum* desse presente estudo. O dendrograma obtido apresentou correlação significativa ($r=0,95$) na matriz de dados cofenéticos e na análise de agrupamento, mostrando-se positiva.

O PIC (Valor de conteúdo de informações de Polomorfismo) são essenciais para estudos de diversidade genética. O valor médio obtido dos primers ISSR foi de 0,318 (intervalo = 0,287 a 0,379). DAS *et al.* (2021) avaliando a diversidade genética de populações de *Colletotrichum* causadores de antracnose em fruteiras na Índia, apresentou resultados superiores ao observados no presente trabalho, com PIC médio de 0,76 com intervalo de 0,83 e o menor 0,66. Entretanto, apesar dos valores abaixo do que encontrado observado nesse trabalho, eles apresentam suporte para acessar a diversidade genética de *C. plurivorum* e *C. truncatum*.

Tabela 5. Matriz de similaridade do coeficiente de Jaccard utilizando oito primers ISSR entre 21 isolados de *Colletotrichum*.

ISOLADO																					
ISOLADO	CML4	CML5	CML6	CML7	CML8	CML9	CML10	CML11	CML12	CML13	CML14	CML15	CML18	CML19	CML20	CML23	CML24	CML25	CML26	CML27	CML28
CML4	1,0000																				
CML5	0,6296	1,0000																			
CML6	0,6825	0,6000	1,0000																		
CML7	0,6949	0,6071	0,7705	1,0000																	
CML8	0,6349	0,5500	0,6818	0,7213	1,0000																
CML9	0,6167	0,4500	0,5441	0,6500	0,6721	1,0000															
CML10	0,6230	0,5893	0,6462	0,7119	0,7049	0,6066	1,0000														
CML11	0,4262	0,5098	0,3971	0,4355	0,4839	0,3651	0,5714	1,0000													
CML12	0,5357	0,5510	0,4688	0,5714	0,4918	0,4655	0,5263	0,5306	1,0000												
CML13	0,4853	0,4677	0,4533	0,5373	0,5362	0,5385	0,5224	0,5000	0,5614	1,0000											
CML14	0,2581	0,2364	0,1781	0,1765	0,2206	0,2222	0,1970	0,2407	0,2453	0,2656	1,0000										
CML15	0,2982	0,3617	0,2813	0,3103	0,2951	0,2807	0,3158	0,3696	0,4419	0,3509	0,3171	1,0000									
CML18	0,3134	0,3448	0,3714	0,3235	0,3478	0,2985	0,3485	0,3750	0,2881	0,3188	0,1333	0,2549	1,0000								
CML19	0,4776	0,3692	0,4658	0,4853	0,4648	0,4203	0,4925	0,4194	0,3810	0,4783	0,2344	0,2500	0,4127	1,0000							
CML20	0,5000	0,3559	0,4412	0,5333	0,4615	0,4833	0,4918	0,3621	0,5600	0,5246	0,2500	0,2692	0,3115	0,6250	1,0000						
CML23	0,2895	0,2941	0,3418	0,3333	0,3553	0,3108	0,3026	0,2985	0,2464	0,3467	0,2381	0,1746	0,2754	0,3944	0,3043	1,0000					
CML24	0,4098	0,4340	0,4030	0,4915	0,4219	0,4167	0,4746	0,3393	0,3962	0,3906	0,2222	0,2157	0,2063	0,4262	0,5600	0,2836	1,0000				
CML25	0,3061	0,2857	0,2203	0,2453	0,2545	0,3125	0,2500	0,2045	0,3333	0,2182	0,1892	0,2903	0,1489	0,2264	0,3023	0,1429	0,2381	1,0000			
CML26	0,1772	0,1528	0,1882	0,2025	0,1951	0,1948	0,1750	0,1714	0,1739	0,2152	0,0896	0,0615	0,1067	0,1463	0,1972	0,1923	0,1912	0,0727	1,0000		
CML27	0,0758	0,1091	0,1286	0,1231	0,1014	0,0938	0,1077	0,0909	0,0536	0,1045	0,0200	0,0217	0,0702	0,0435	0,0500	0,1094	0,0727	0,0000	0,4043	1,0000	
CML28	0,1852	0,1622	0,2093	0,1951	0,2024	0,1875	0,1687	0,1644	0,1667	0,2073	0,1014	0,0588	0,1026	0,1548	0,2055	0,1852	0,2000	0,0690	0,9362	0,3800	1,0000

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesse estudo, revelam que os isolados de *C. plurivorum* e *C. truncatum* presentes em fazendas produtoras de meloeiro no estado do Rio Grande do Norte, Brasil, apresentam diversidade genética.

Pesquisas sobre a caracterização de espécies de *Colletotrichum*, são imprescindíveis e úteis para serem utilizadas como base para estudos futuros sobre epidemiologia e estratégias de manejo do patógenos em áreas de cultivo do meloeiro.

5. AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), The Connecticut Agricultural Experiment Station (CAES), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

6. REFERÊNCIAS

DAS, A. *et al.* Analysis of genetic diversity of *Colletotrichum* population causing anthracnose in fruit crops using ISSR markers. **Indian Phytopathology**, v. 74, n. 1, p. 69–80, mar. 2021.

DIAS, M. D. *et al.* Current Status of Soybean Anthracnose Associated with *Colletotrichum truncatum* in Brazil and Argentina. **Plants**, v. 8, n. 11, p. 459, 29 out. 2019.

EFSA PANEL ON PLANT HEALTH (PLH) *et al.* Pest categorisation of *Colletotrichum plurivorum*. **EFSA Journal**, v. 19, n. 11, nov. 2021.

FAOSTAST – Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics. 2022. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>>. Acesso em: 25/01/2023.

FELIX, F. C. *et al.* APPLICATIONS OF ISSR MARKERS IN STUDIES OF GENETIC DIVERSITY OF *Pityrocarpa moniliformis*. **Revista Caatinga**, v. 33, p. 1017–1024, 23 nov. 2020.

GARCÍA, R. S. E. *et al.* First Report of Papaya (*Carica papaya*) Anthracnose Caused by *Colletotrichum plurivorum* in Mexico. **Plant Disease**, v. 104, n. 2, p. 589–589, fev. 2020.

GOMES, I. R. F. *et al.* First Report of *Cladosporium tenuissimum* Causing Spot Diseases on Leaves and Fruits of Cucurbits in Brazil. **Plant Disease**, v. 107, n. 8, p. 2540, 1 ago. 2023.

IBGE. Instituto brasileiro de geografia e estatística- **IBGE**. 2022. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/melao/br>>. Acesso em: 25/01/2023.

MACHADO, S. D. C. S. *et al.* First Report of *Colletotrichum truncatum* Causing Anthracnose in Cassava in Brazil. **Plant Disease**, v. 105, n. 11, p. 3745, 1 nov. 2021.

MATOS, K. S. *et al.* First Report of Anthracnose on Welsh Onion (*Allium fistulosum*) in Brazil Caused by *Colletotrichum theobromicola* and *C. truncatum*. **Plant Disease**, v. 101, n. 6, p. 1055, jun. 2017.

NAVEEN, J. *et al.* Pathological, biochemical and molecular variability of *Colletotrichum truncatum* incitant of anthracnose disease in chilli (*Capsicum annuum* L.). **Microbial Pathogenesis**, v. 152, p. 104611, mar. 2021.

NICK, C.; BORÉM, A. **Melão: do plantio à colheita**. 1. ed. [s.l.]. Viçosa: UFV, 2019.

SILVA NETO, J. A. D. *et al.* Morphological, Molecular and Pathogenic Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* Isolated from Mango. **Revista Caatinga**, v. 35, p. 514–527, 22 ago. 2022.

SILVA, R. M. D. *et al.* First Report of *Lasiodiplodia brasiliensis* Causing Root Rot in Melon Plants in Northeastern Brazil. **Plant Disease**, p. PDIS-07-23-1443-PDN, 12 jan. 2024.

SILVA, R. M. F. *et al.* First report of *Colletotrichum plurivorum* causing anthracnose on *Cucumis sativus* in Brazil. **Plant Disease**, p. PDIS-10-23-2245-PDN, 12 nov. 2023.

SUN, Y. C.; DAMM, U.; HUANG, C. J. *Colletotrichum plurivorum*, the Causal Agent of Anthracnose Fruit Rot of Papaya in Taiwan. **Plant Disease**, v. 103, n. 5, p. 1040, maio 2019.