



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FITOTECNIA

**CARACTERIZAÇÃO ETIOLÓGICA, QUANTIFICAÇÃO E ASPECTOS
HISTOPATOLÓGICOS DA PINTA PRETA EM PINHA (*Annona squamosa* L.)**

EVELINE MENDES DA SILVA

VITÓRIA DA CONQUISTA
BAHIA- BRASIL
2026

EVELINE MENDES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO ETIOLÓGICA, QUANTIFICAÇÃO E ASPECTOS
HISTOPATOLÓGICOS DA PINTA PRETA EM PINHA (*Annona squamosa* L.)**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador (a): Quelmo Silva de Novaes

Coorientador (a): Marcel Bellato Spósito

VITÓRIA DA CONQUISTA

BAHIA– BRASIL

2026

S58c

Silva, Eveline Mendes da.

Caracterização etiológica, quantificação e aspectos histopatológicos da pinta preta em pinha (*Annona squamosa* L.) / Eveline Mendes da Silva, 2026.
69p. : il. color.

Orientador (a): Dr. Quelmo Silva de Novaes.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Fitotecnia. Vitória da Conquista, 2026.

Inclui referências.

1. *Cryptophyllachora* sp. nov.. 2. Pinta preta - Pinha. 3. Filogenia molecular. 4. Histopatologia vegetal. 5. Escala diagramática. I. Novaes, Quelmo Silva de. II. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. T.

CDD 634.774

Catálogo na fonte: Karolyne Alcântara Profeta – CRB 5/2134

UESB - Campus Vitória da Conquista – BA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
Área de Concentração em Fitotecnia

Campus de Vitória da Conquista, BA


DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “Caracterização etiológica, quantificação e aspectos histopatológicos da pinta preta em pinha (*Annona squamosa* L.)”.

AUTOR (A): Eveline Mendes da Silva


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTORA EM AGRONOMIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FITOTECNIA, pela seguinte Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente

 **QUELMO SILVA DE NOVAES**
Data: 18/03/2026 14:25:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Quelmo Silva de Novaes, D.Sc. (UESB)

Documento assinado digitalmente

 **ARMÍNIO SANTOS**
Data: 20/03/2026 18:02:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Armínio Santos, D.Sc. (UESB)

Documento assinado digitalmente

 **CARLOS ANDRÉ ESPOLADOR LEITÃO**
Data: 20/03/2026 22:08:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Carlos André Espolador Leitão, D.Sc. (UESB)

Documento assinado digitalmente

 **JOSE LUIZ BEZERRA**
Data: 20/03/2026 17:08:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

José Luiz Bezerra, D.Sc. (UESC)

Documento assinado digitalmente

 **RAFAEL JOSE VILELA DE OLIVEIRA**
Data: 18/03/2026 14:45:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Rafael José Vilela de Oliveira, D.Sc. (CETENE)

Data de realização: 18 de março de 2026.

Estrada do Bem Querer, Km 4, CEP 45031-900, Caixa Postal 95, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil
Telefone: (77) 3425-9383, e-mail: ppgagronomia@uesb.edu.br

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Eva e Ariene, pelo amor incondicional e por serem a base de todas as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força e pela sabedoria concedidas em cada etapa desta jornada.

À minha mãe Eva e ao meu pai Ariene, pelo amor incondicional, pelo exemplo de integridade e por serem o alicerce de todas as minhas conquistas. Aos meus irmãos, Adailton e Everton, pelo apoio constante.

Ao meu companheiro Bruno, pela paciência, pelo incentivo nos momentos de cansaço e por caminhar ao meu lado, tornando este percurso mais leve.

Ao meu orientador, professor Dr. Quelmo Silva de Novaes, pela confiança depositada, pela orientação e por todo o aprendizado compartilhado ao longo desses anos. Da mesma forma, agradeço ao meu coorientador, professor Dr. Marcel Bellato Spósito, pelas valiosas contribuições e pelo auxílio no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao professor Carlos André, pela colaboração essencial e disponibilidade na realização das análises histopatológicas que tanto contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Ao professor Armínio, pelas discussões enriquecedoras.

Às minhas amigas e companheiras de residência, Amanda, Zilda e Isa, pela convivência, conversas, risadas, amizade e apoio. Um agradecimento especial à Joanna, que se tornou uma grande amiga, pela amizade e incentivo constante.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia, pelo ambiente de cooperação.

Às equipes do Laboratório de Fungos Fitopatogênicos e Laboratório de Manejo Sustentável de Doenças de Plantas da Esalq, em especial à Priscila, ao Túlio e à Professora Dra. Thaís, pela acolhida e pelo auxílio fundamental nas análises moleculares.

Ao João, técnico da fazenda, pela disponibilidade durante as etapas experimentais.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA), pela oportunidade de formação e pela infraestrutura concedida. À equipe de campo e aos motoristas da UESB, que garantiram que cada etapa da pesquisa fosse cumprida.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, permitindo a dedicação necessária à execução deste doutorado.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, manifesto minha sincera gratidão.

RESUMO GERAL

SILVA, E. M. **CARACTERIZAÇÃO ETIOLÓGICA, QUANTIFICAÇÃO E ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DA PINTA PRETA EM PINHA (*Annona squamosa* L.)**. Vitória da Conquista – BA, UESB, 2026, 69 p. (Tese: Doutorado em Agronomia; Área de concentração em Fitotecnia) *

A pinta preta é uma doença emergente identificada em pomares no semiárido da Bahia, caracterizada por lesões foliares necróticas e intensa desfolha. O agente etiológico, anteriormente associado ao gênero *Ophiodothella*, foi reclassificado através de análises filogenéticas das regiões ITS, LSU e SSU. Os resultados posicionaram o fungo na ordem Chaetosphaeriales como uma nova espécie de *Cryptophyllachora*. Essa descoberta representa o primeiro registro mundial do gênero em uma Annonaceae, apresentando características morfológicas distintas, como ascósporos fusiformes de dimensões superiores às espécies conhecidas. A investigação da patogênese revelou uma estratégia de infecção altamente agressiva e destrutiva. O fungo apresenta colonização da folha toda com hifas septadas que crescem de forma inter e intracelular, atingindo inclusive os tecidos vasculares de xilema e floema. O ciclo de vida é marcado pela coexistência de fases assexuadas (picnídios) e sexuadas (peritécios) na mesma lesão, com liberação de esporos via cirros. Embora a planta ative defesas, como o acúmulo de compostos fenólicos, essas barreiras mostram-se insuficientes para conter o patógeno, que causa lise celular e redução nas reservas de amido do hospedeiro. Para padronizar a quantificação da doença e reduzir a subjetividade das avaliações visuais, foi desenvolvida e validada uma escala diagramática. A escala compreende oito níveis de severidade, variando de 1,1% a 17,5% de área foliar infectada. A validação demonstrou que o uso dessa ferramenta aumentou significativamente a acurácia, a precisão e a reprodutibilidade das estimativas entre avaliadores. Essa padronização é considerada essencial para o desenvolvimento de estratégias de manejo fitossanitário e monitoramento epidemiológico da cultura no campo.

Palavras-chave: *Cryptophyllachora* sp. nov., Pinta preta, Filogenia molecular, Histopatologia vegetal, Escala diagramática.

*Orientador: Prof. Dr. Quelmo Silva de Novaes, UESB.

ABSTRACT

SILVA, E. M. **ETIOLOGICAL CHARACTERIZATION, QUANTIFICATION, AND HISTOPATHOLOGICAL ASPECTS OF BLACK SPOT ON SUGAR APPLE (*Annona squamosa* L.)**. Vitória da Conquista – BA, UESB, 2026, 69 p. (Thesis: PhD in Agronomy; Concentration area: Plant Science) *

Black spot is an emerging disease identified in orchards in the semi-arid region of Bahia, characterized by necrotic leaf lesions and intense defoliation. The etiological agent, previously associated with the genus *Ophiodothella*, was reclassified through phylogenetic analyses of the ITS, LSU, and SSU regions. The results positioned the fungus in the order Chaetosphaeriales as a new species of *Cryptophyllachora*. This discovery represents the first world record of the genus in an Annonaceae, presenting distinct morphological characteristics, such as fusiform ascospores with dimensions superior to known species. The investigation of pathogenesis revealed a highly aggressive and destructive infection strategy. The fungus exhibits systemic colonization with septated hyphae that grow inter- and intracellularly, reaching even the vascular tissues of xylem and phloem. The life cycle is marked by the coexistence of asexual (pycnidia) and sexual (perithecia) phases in the same lesion, with spore release via cirri. Although the plant activates defenses such as the accumulation of phenolic compounds, these barriers prove insufficient to contain the pathogen, which causes cell lysis and a reduction in the host's starch reserves. To standardize disease quantification and reduce the subjectivity of visual assessments, a diagrammatic scale was developed and validated. The scale comprises eight severity levels, ranging from 1.1% to 17.5% of infected leaf area. Validation demonstrated that the use of this tool significantly increased the accuracy, precision, and reproducibility of estimates among raters. This standardization is considered essential for the development of phytosanitary management strategies and epidemiological monitoring of the crop in the field.

Keywords: *Cryptophyllachora* sp. nov., Black spot, Molecular phylogeny, Plant histopathology, Diagrammatic scale.

*Advisor: Prof. Dr. Quelmo Silva de Novaes, UESB.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO I: Etiologia e caracterização filogenética de uma nova espécie de *Cryptophyllachora* causando pinta preta em *Annona squamosa* no Brasil

Figura 1 Sintomas de *Cryptophyllachora* sp. em *Annona squamosa*. a- Ramo com folhas sintomáticas com lesões necróticas. b- Detalhe ao estereoscópio dos picnídios e peritécios na face adaxial da folha. c- Detalhes dos picnídios e peritécios com cirros em evidência (setas) vistos ao estereoscópio26

Figura 2 Árvore filogenética com sequência do espécime LFN considerando as regiões genômicas ITS, LSU e SSU27

Figura 3 Estruturas reprodutivas do teleomorfo de *Cryptophyllachora* sp. a- Panorama do corte longitudinal do peritécio imerso no mesófilo de *Annona squamosa*, com clipeo em evidência (seta). b- Detalhe dos ascos (setas). c- Detalhe dos ascos em suspensão. d- Detalhe dos ascósporos em suspensão. Barras de escala em micrômetros28

Figura 4 Estruturas vegetativas e reprodutivas do anamorfo de *Cryptophyllachora* sp. crescendo na folha de *Annona squamosa*. a- Detalhe de hifa septada (seta). b- Picnídio se desenvolvendo subjacente à epiderme adaxial do hospedeiro, visualizando cirros (asterisco). c- Detalhe do picnídio mostrando o extravasamento dos cirros com conídios (asteriscos). d- Detalhe dos conídios. Legenda: CPH- célula parenquimática do hospedeiro. Barras de escala em micrômetros.....29

ARTIGO II: Análise histopatológica da interação *Cryptophyllachora* sp. X pinha (*Annona squamosa*): colonização e estruturas reprodutivas

Figura 1 Cortes transversais da lâmina foliar de *Annona squamosa* infestada por *Cryptophyllachora* sp. a- Feixe vascular em corte longitudinal evidenciando hifas septadas (setas) em células do floema. b- Panorama da lâmina foliar com inúmeras hifas em espaços intercelulares (setas longas) e dentro das células do hospedeiro (setas curtas). c- Corte transversal de nervura, evidenciando hifas (setas) em células de todos os tecidos. d- Corte longitudinal de feixe vascular, evidenciando hifa em elemento de vaso. e- Corte longitudinal de feixe vascular, evidenciando hifas em células de todos os tecidos. f- Detalhe de hifas (setas) invadindo a folha através da epiderme da face adaxial. g- Detalhe de hifas (seta) atravessando o estômato e ocupando a câmara subestomática. h- Detalhe de hifa atravessando plasmodesmos entre célula epidérmica e célula de parênquima paliçádico. Legendas: CBF- célula da bainha do feixe, CSE- câmara subestomática, Co- colênquima, Ep- epiderme, Fb- fibras, Flo- floema, IM- idioblasto mucilaginoso, PF- parênquima fundamental, PL- parênquima lacunoso, PP- parênquima paliçádico, Xi- xilema. Barras de escala em micrômetros40

Figura 2 Cortes transversais da lâmina foliar de *Annona squamosa* infestada por *Cryptophyllachora* sp. a- Panorama da lâmina foliar com picnídios e peritécios. b- Panorama da lâmina foliar com dois picnídios, com extravasamento de cirros (asteriscos).

c- Detalhe de região com picnídio extravasando cirros de conídios (asteriscos) d- Panorama da lâmina foliar com dois peritécios, com ascos indicados (setas). e- Detalhe do ostíolo do peritécio com extravasamento de cirros. Legenda: As- ascos, CF- compostos fenólicos, IM- idioblasto mucilaginoso, Per- peritécio, Pic- picnídio. Barras de escala em micrômetros42

Figura 3 Visão geral dos sintomas de *Cryptophyllachora* sp. em *Annona squamosa*. a- Ramo com folhas sintomáticas. b- Detalhe da folha com lesões necróticas (setas). c- Visão ao estereoscópio da lâmina foliar com peritécios com cirros em evidência (setas).43

Figura 4 Cortes transversais da lâmina foliar de *Annona squamosa* com (a, c, d-f) e sem (b, g) sintomas. a- Região necrosada. b- Lâmina com aspecto sadio. c- Região limítrofe de necrose, evidenciando compostos fenólicos (asteriscos). d- Detalhe de região superficial da folha, com hifas em células do parênquima paliçádico contendo compostos fenólicos (asterisco). e- Detalhe de mucilagem com hifas (setas) imersas. f- Panorama da folha sintomática com inconspícuos grãos de amido. g- Panorama de folha assintomática com vários grãos de amido. Legendas: IM- idioblasto mucilaginoso, PL- parênquima lacunoso, PP- parênquima paliçádico. Barras de escala em micrômetros44

ARTIGO III: Escala diagramática para avaliação da severidade da pinta preta em folhas de pinha

Figura 1 Sintomas de pinta preta (*Cryptophyllachora* sp.) em folhas de *Annona squamosa*54

Figura 2 Escala diagramática de área padrão desenvolvida para avaliar a severidade da pinta preta da pinha (*Cryptophyllachora* sp.) em folhas. As manchas pretas representam os sintomas encontrados na superfície adaxial das folhas. Cada valor representa a porcentagem de severidade da pinta preta da pinha59

Figura 3 Validação da escala diagramática. a- Relação entre a severidade real e estimada da pinta preta em folhas de pinha sem escala e com escala; b- relação entre o erro (estimativa - real) das estimativas visuais e estimativas reais (baseadas em software) da severidade da pinta preta em folhas de pinha. Em (a) a linha sólida representa a linha de regressão de melhor ajuste (cinza) a linha pontilhada (vermelha) é linha de concordância (inclinação de 1, intercepto de 0). A linha suave (vermelha) em (b) é o resultado do ajuste da regressão polinomial **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4 Box-plot das estatísticas dos parâmetros do coeficiente de correlação de concordância de lin (LCC) para as estimativas da severidade dos avaliadores sem escala e com escala61

LISTA DE TABELA

ARTIGO III: Escala diagramática para avaliação da severidade da pinta preta em folhas de pinha

Tabela 1 - Distribuição de frequência dos valores de severidade em intervalos unitários (%) da pinta preta da pinha (*Cryptophyllachora* sp.).58

Tabela 2 - Modelo linear generalizado misto para análises estatísticas dos parâmetros do coeficiente de correlação de concordância de Lin (LCC) que representa a precisão (types of bias), precisão (coeficiente de correlação) das estimativas percentuais de severidade da pinta preta da pinha por 8 avaliadores, sem escala ou com uso da escala.61

Tabela 3 - Medidas de confiabilidade entre avaliadores de estimativas da severidade por 8 avaliadores durante avaliação sem e com escala como auxílio para avaliação da severidade da pinta preta em folhas de pinha.62

LISTA DE SÍMBOLOS

- % – Porcentagem (utilizada para concentração de soluções, suporte de *bootstrap*, umidade e níveis de severidade da doença)
- °C – Graus Celsius (temperatura de incubação e fixação)
- μL – Microlitro (volume de reagentes em protocolos de extração e PCR)
- μm – Micrômetro (unidade de medida para estruturas fúngicas e espessura de cortes histológicos)
- C_b* – Fator de correção de viés (medida de exatidão)
- CCG – Correlação de concordância geral (concordância entre múltiplos observadores)
- CCI – Coeficiente de correlação intraclasses (confiabilidade interavaliadores)
- CI – Intervalo de confiança
- ITS – Espaçador transcrito interno (*Internal Transcribed Spacer*)
- LFN – Código do espécime fúngico estudado
- LSU – Grande subunidade do RNA ribossomal (*Large Subunit*)
- M – Molaridade (concentração do tampão fosfato)
- mM L⁻¹ – Milimols por litro (concentração de cloreto de cálcio na solução fixadora)
- mm – Milímetro (utilizado para o diâmetro das lesões foliares)
- P* – Valor de probabilidade estatística
- PAS – Ácido Periódico-Schiff (teste histoquímico para polissacarídeos)
- P_c* – Coeficiente de correlação de concordância de Lin (medida de precisão geral)
- PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
- R* – Coeficiente de correlação de Pearson (medida de precisão)
- SAD – Escala de área padrão (*Standard Area Diagram*)
- sp. nov. – Espécie nova
- SSU – Pequena subunidade do RNA ribossomal (*Small Subunit*)
- TBO – Azul de Toluidina (corante histológico)
- U* – Deslocamento de localização (*Location shift*)
- v* – Deslocamento de escala (*Scale shift*)
- μM – Micromolar (concentração de *primers*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	15
2	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
	ARTIGO I.....	19
	RESUMO	20
	ABSTRACT	21
3.1	INTRODUÇÃO.....	22
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.2.1	Coleta e exame microscópico	22
3.2.2	Extração de DNA genômico.....	24
3.2.3	Amplificação e sequenciamento de DNA	24
3.2.4	Análise filogenética	25
3.3	RESULTADOS	25
3.3.1	Sintomatologia e ecologia	25
3.3.3.2	Filogenia molecular	26
3.3.3	Taxonomia.....	28
3.4	DISCUSSÃO	29
3.5	CONCLUSÕES	31
3.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
	ARTIGO II	34
	RESUMO	35
	ABSTRACT	36
4.1	INTRODUÇÃO.....	37
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.2.1	Coleta das amostras	38
4.2.2	Microscopia óptica	38
4.3	RESULTADOS	39
4.3.1	Invasão micelial e distribuição das hifas	39
4.3.2	Localização e morfologia das estruturas assexuadas (picnídios) e sexuadas	

(peritécios).....	40
4.3.4 Resposta do hospedeiro e degradação tecidual.....	42
4.4 DISCUSSÃO	45
4.5 CONCLUSÕES	47
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ARTIGO III.....	51
RESUMO	52
ABSTRACT	53
5.1 INTRODUÇÃO.....	54
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
5.2.1 Validação da escala diagramática de área padrão (SAD).....	56
5.2.2 Precisão de confiabilidade das estimativas.....	56
5.2.3 Comparação da precisão e confiabilidade entre os métodos	57
5.2.4 Análise estatística	57
5.3 RESULTADOS	58
5.3.1 Desenvolvimento da escala diagramática de área padrão (SAD).....	58
5.3.2 Validação da escala diagramática.....	59
5.4 DISCUSSÃO	62
5.5 CONCLUSÕES	66
5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	69

1 INTRODUÇÃO GERAL

A pinha (*Annona squamosa* L.), também conhecida como fruta-do-conde, destaca-se como uma das anonáceas de maior relevância econômica no Brasil (Queiroga et al., 2023). Sua rusticidade e adaptação às condições climáticas de regiões tropicais e subtropicais, especialmente no semiárido nordestino, tornam o seu cultivo uma fonte de renda vital para pequenos e médios produtores (Oliveira et al., 2016; Queiroga et al., 2023; Fan et al., 2025; Singh et al., 2025).

Entretanto, a sustentabilidade da cultura é constantemente ameaçada por patógenos fúngicos que causam danos foliares severos, reduzindo a capacidade fotossintética e, conseqüentemente, a produtividade e qualidade dos frutos (Costa et al., 2019; Zulperi et al., 2026).

Recentemente, uma nova doença, denominada pinta preta, foi observada em pomares no estado da Bahia, sendo classificada como *Ophiodothella annonae* (Bezerra et al., 2006). A doença é caracterizada por lesões necróticas circulares de coloração marrom que, sob condições de alta umidade e temperaturas amenas, coalescem atingindo até 20 mm de diâmetro provocando uma intensa desfolha (Bezerra et al., 2006). Como consequência, compromete o vigor da planta e a qualidade dos frutos.

A identificação precisa do agente etiológico da pinta preta é importante para auxiliar no desenvolvimento de estratégias de controle. A taxonomia de alguns ascomicetos tem passado por revisões com o advento da filogenia molecular. Esse fenômeno de reclassificação ocorreu, por exemplo, no trabalho desenvolvido por Kiss et al. (2018), no qual a espécie *Cryptophyllachora ambrosiae* foi inicialmente descrita e referenciada como *Phyllachora ambrosiae*. Essas mudanças só têm sido possíveis após a análise de sequenciamento de genético, sendo que a correta posição taxonômica é o primeiro passo para compreender a biologia do patógeno e sua relação com o hospedeiro (Presti et al., 2015).

Além da identificação taxonômica, é necessário compreender como o patógeno invade e coloniza os tecidos vegetais. A eficácia da infecção fúngica depende de estratégias de penetração, neutralização das defesas químicas e exploração de recursos fisiológicos (Presti et al., 2015).

Em anonáceas, a presença de barreiras naturais, como mucilagem e compostos fenólicos, constitui uma defesa que o patógeno deve superar para estabelecer a infecção (Bakker e Gerritsen, 1992). A histopatologia vegetal surge como uma ferramenta essencial para visualizar a invasão micelial, o desenvolvimento de estruturas reprodutivas e as respostas celulares do hospedeiro, preenchendo lacunas sobre a dinâmica de colonização em doenças emergentes (Glass et al., 2025).

Além disso, para o desenvolvimento de estratégias de manejo eficazes, é importante a quantificação precisa da severidade da doença (Bock et al., 2022). A avaliação visual humana é frequentemente subjetiva e propensa a erros de estimativa (superestimação ou subestimação) (Del Ponte et al., 2017; Bock et al., 2020; Bock et al., 2022). Nesse contexto, torna-se essencial o desenvolvimento de escalas diagramáticas, para padronizar as avaliações no campo, visando minimizar essa variabilidade.

Essas escalas fornecem referências visuais objetivas que padronizam as avaliações entre diferentes observadores (Bock et al., 2022). Até o momento, a ausência de um método de avaliação padronizado para a pinta preta da pinha limita a confiabilidade de estudos de campo e a eficácia das decisões de controle.

Nesse sentido, os objetivos deste estudo foram caracterizar a etiologia e a filogenética do agente causal (i), analisar a interação histopatológica, descrevendo o padrão de invasão das hifas e o desenvolvimento das fases anamórfica e teleomórfica nos tecidos foliares (ii) e desenvolver e validar uma escala diagramática para permitir estimativas de severidade mais precisas, padronizadas e reproduzíveis (iii).

O conjunto destes estudos busca fornecer base científica necessária para o desenvolvimento de estratégias de manejo fitossanitário eficazes para a cultura da pinha no Brasil.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bakker, M.E.; Gerritsen, A.F. Oil and mucilage cells in *Annona* (Annonaceae) and their systematic significance. **Blumea**, v. 36, p. 411–438, 1992.

Bezerra, J.L.; Freire, F.C.O.; Andrade, D. A new *Ophiodothella* species associated with leaf spots on *Annona squamosa* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 592-594, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582006000600009>

Bock, C.H.; Barbedo, J.G.A.; Del Ponte, E.M.; Bohnenkamp, D.; Mahlein, A.K. From visual estimates to fully automated sensor-based measurements of plant disease severity: status and challenges for improving accuracy. **Phytopathology Research**, v. 2, n. 9, 2020. <https://doi.org/10.1186/s42483-020-00049-8>

Bock, C.H.; Chiang, K.S.; Del Ponte, E.M. Plant disease severity estimated visually: a century of research, best practices, and opportunities for improving methods and practices to maximize accuracy. **Tropical Plant Pathology**, v. 47, p. 25–42, 2022. <https://doi.org/10.1007/s40858-021-00439-z>

Costa, J.F.O.; Kamei, S.H.; Silva, J.R.A.; Miranda, A.R.G.S.; Netto, M.B.; Silva, S.J.C.; Correia K.C.; Lima, G.S.A.; Assunção, I.P. Species diversity of *Colletotrichum* infecting *Annona* spp. in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v.153, p. 1119–1130, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01630-w>

Del Ponte, E.M.; Pethybridge, S.J.; Bock, C.H.; Michereff, S.J.; Machado, F.J.; Spolti, P. Standard area diagrams for aiding severity estimation: Scientometrics, pathosystems and methodological trends in the last 25 years. **Phytopathology**, p. 1–55, 2017. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-17-0069-FI>

Fan, C.L.; Wang, X.Y.; Jiang, Z.E.; Yin, Q.S.; Yang, Z.Q.; Xu, D.Y.; Lu, Y.C.; Tan, D.J.; Wei, Y.R.; Fu, C.; Jiang, T.; Fan, J.L. First report of anthracnose on *Annona squamosa* caused by *Colletotrichum fructicola* in China. **Plant Disease**, v. 109, p. 935, 2025. <https://doi-org.ez84.periodicos.capes.gov.br/10.1094/PDIS-09-24-1967-PDN>

Glass, N.L.; Schmoll, M.; Cate, J.H.D.; Coradetti, S. Plant cell wall deconstruction by Ascomycete fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, p. 477-498, 2013. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150044>

Kiss, L.; Kovács, G.M.; Bóka, K.; Bohár, G.; Bohárné, K.V.; Németh, M.Z.; Takamatsu, S.; Shin, H.D.; Hayova, V.; Nischwitz, C.; Seier, M.K.; Evans, H.C.; Cannon, P.F.; Ash, G.J.; Shivas, R.G.; Müller-Schärer, H. Deciphering the biology of *Cryptophyllachora eurasiatica* gen. et sp. nov., an often cryptic pathogen of an allergenic weed, *Ambrosia artemisiifolia*. **Scientific Reports**, v. 8, p. 10806, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29102-5>

Oliveira, A.S.; Castellani, M.A.; Nascimento, A.S.; Moreira, A.A. Perfil do sistema de produção de pinha nos polos de fruticultura da Bahia, com ênfase nos aspectos fitossanitários da cultura. **Extensão Rural**, v. 23, p. 95-111, 2016. <http://dx.doi.org/10.5902/2318179613034>

Presti, L.L.; Lanver, D.; Schweizer, D.; Tanaka, S.; Liang, L.; Tollot, M.; Zuccaro, A.; Reissmann, S.; Kahmann, R. Fungal Effectors and Plant Susceptibility. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, p. 513-545, 2015. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114623>

Queiroga, V.P.; Gomes, J.P.; Melo, B.A.; Lima, D.C.; Mendes, N.V.B.; Figueirêdo,

R.M.F.; Girão, E.G.; Albuquerque, E.M.B. Sistema Produtivo da Pinheira (*Annona squamosa* L.). **Embrapa**, 15, 2023.

Singh, M.K.; Shankar, U.; Mishra, S.; Maurya, A.; Bawitlung, L.; Singh, S.; Kumar, P.; Pal, A.; Tandon, S.; Verma, R.S. Chemical analysis and biological activity evaluation of custard apple (*Annona squamosa* L.) fruit waste derived essential oil and supercritical carbon dioxide extract. **Waste Biomass Valoriz**, v. 16, p. 6593–6604, 2025. <https://doi-org.ez84.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s12649-025-03074-w>

Zulperi, D.; Saad, N.; Ismail, S.I.; Johari, M.I.H. Annonas: Botany, Production and Uses. **CABI Digital Library**, p. 193–206, 2026. <https://doi.org/10.1079/9781800627628.0011>

ARTIGO I

Etiologia e caracterização filogenética de uma nova espécie de *Cryptophyllachora*
causando pinta preta em *Annona squamosa* no Brasil*

***Situação:** não submetido

Etiologia e caracterização filogenética de uma nova espécie de *Cryptophyllachora* causando pinta preta em *Annona squamosa* no Brasil

RESUMO

A pinha (*Annona squamosa* L.) possui grande relevância econômica no Brasil, porém sua produtividade é limitada por patógenos fúngicos. Recentemente, uma epidemia de pinta preta, caracterizada por lesões coalescentes e intensa desfolha, foi observada em pomares no município de Anagé, Bahia, Brasil. Diante da escassez de informações sobre o agente etiológico, este trabalho objetivou descrever a etiologia e sintomatologia da doença, caracterizar morfológicamente o patógeno e determinar sua posição filogenética. Para isso, folhas sintomáticas foram coletadas e submetidas a exames microscópicos e cortes histológicos processados em resina de glicol-metacrilato. A identificação molecular foi realizada por meio da extração de DNA, amplificação via PCR e sequenciamento das regiões ITS, LSU e SSU, seguidos de análise filogenética de Máxima Verossimilhança. Os resultados posicionaram o espécime (LFN) na ordem Chaetosphaeriales, como uma linhagem distinta dentro do gênero *Cryptophyllachora*, apresentando 99,93% de suporte de bootstrap como grupo irmão de *Cryptophyllachora ambrosiae* e *Cryptophyllachora eurasiatica*. Morfológicamente, o espécime LFN diferenciou-se pelas dimensões superiores de seus ascósporos fusiformes (32,7–45,81 µm). A doença manifestou-se com alta severidade durante a estação chuvosa (março a julho), causando desfolha prematura. Conclui-se que a pinta preta em *A. squamosa* no Brasil é causada por uma nova espécie de *Cryptophyllachora*, configurando o primeiro registro mundial deste gênero em uma anonácea. Esta descoberta preenche uma lacuna taxonômica fundamental e fornece a base científica necessária para o desenvolvimento de estratégias de manejo fitossanitário eficazes para a cultura.

Palavras-chave: Fruta do conde, Pinha, Ascomiceto, *Cryptophyllachora* sp., Annonaceae.

ABSTRACT

Sugar apple (*Annona squamosa* L.) holds great economic relevance in Brazil; however, its productivity is limited by fungal pathogens. Recently, an epidemic of black spot, characterized by coalescing lesions and intense defoliation, was observed in orchards in the municipality of Anagé, Bahia, Brazil. Given the scarcity of information regarding the etiological agent, this study aimed to describe the etiology and symptomatology of the disease, morphologically characterize the pathogen, and determine its phylogenetic position. To achieve this, symptomatic leaves were collected and subjected to microscopic examination and histological sections processed in glycol-methacrylate resin. Molecular identification was performed through DNA extraction, PCR amplification, and sequencing of the ITS, LSU, and SSU regions, followed by Maximum Likelihood phylogenetic analysis. The results positioned the specimen (LFN) within the order Chaetosphaeriales as a distinct lineage within the genus *Cryptophyllachora*, presenting 99.93% bootstrap support as a sister group to *Cryptophyllachora ambrosiae* and *Cryptophyllachora eurasiatica*. Morphologically, the LFN specimen was distinguished by the larger dimensions of its fusiform ascospores (32.7–45.81 μm). The disease manifested with high severity during the rainy season (March to July), causing premature defoliation. It is concluded that black spot on *A. squamosa* in Brazil is caused by a new species of *Cryptophyllachora*, representing the first worldwide record of this genus on an Annonaceae host. This discovery fills a fundamental taxonomic gap and provides the necessary scientific basis for the development of effective phytosanitary management strategies for the crop.

Keywords: Sugar apple, Custard apple, Ascomycete, *Cryptophyllachora* sp., Annonaceae.

3.1 INTRODUÇÃO

A pinha (*Annona squamosa* L.), também conhecida como fruta-do-conde, é uma das anonáceas de maior relevância econômica no Brasil, especialmente na região Nordeste, devido à sua adaptação ao clima semiárido e alto valor comercial (Costa et al. 2002; Lemos 2014; Queiroga et al. 2023). No estado da Bahia, o cultivo da pinha representa uma importante fonte de renda para pequenos e médios produtores (Oliveira et al. 2016; Queiroga et al. 2023). No entanto, a produtividade desta cultura é constantemente afetada por patógenos fúngicos que causam danos foliares e reduzem a capacidade fotossintética das plantas (Costa et al. 2019; Huang et al. 2025; Zulperi et al. 2026).

Em levantamentos fitopatológicos realizados no município de Anagé, Bahia, observou-se uma epidemia de pinta preta em pomares de *A. squamosa* durante a estação chuvosa. Os sintomas eram caracterizados por lesões coalescentes com abundante presença de picnídio e peritécios. Além disso, plantas com folhas sintomáticas apresentavam uma intensa queda foliar.

Com a escassez de conhecimento sobre o agente causal dessa doença, os produtores possuem uma dificuldade de manejo fitossanitário, o que, conseqüentemente, resulta em perdas de produtividade. Desse modo, o conhecimento sobre o patógeno e os impactos que este pode causar na produção são de suma importância para o sucesso no manejo fitossanitário (Kiros-Meles e Abang 2008; Ahmed et al. 2023).

Portanto, este trabalho teve como objetivos: (i) descrever a etiologia e a sintomatologia da nova doença em *A. squamosa*; (ii) caracterizar morfológicamente as fases anamórfica e teleomórfica do agente causal; e (iii) determinar a posição filogenética do patógeno por meio de sequenciamento genético.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Coleta e exame microscópico

Amostras de folhas de pinha (*Annona squamosa*), apresentando sintomas típicos de pinta preta, foram coletadas em pomares comerciais no município de Anagé, Bahia

(14°36'55.9"S, 41°11'47.6"W). O material foi acondicionado em sacos de papel e transportado para o Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), *campus* de Vitória da Conquista. A morfologia das estruturas fúngicas foi examinada utilizando-se lupa estereoscópica e microscopia óptica. Foram coletados os cirros e colocados sobre lâmina com água destilada para observações em microscópio ótico e, em seguida, realizada a medição dos ascos, ascósporos e conídios.

Além disso também foram realizados cortes histopatológicos das folhas sintomáticas. As amostras foram coletadas com o auxílio de uma lâmina de barbear e submetidas imediatamente à fixação em solução constituída por glutaraldeído (2,5%), paraformaldeído (4%), sacarose (3%) e cloreto de cálcio (0,2 mM L⁻¹) em tampão fosfato 0,2 M (pH 7,2) (Karnovsky 1965). Este procedimento ocorreu a 6 °C, durante um período de 24 horas. Na sequência, o material foi lavado em água destilada e foi desidratado parcialmente por meio de uma série progressiva de etanol até a concentração de 95%. A inclusão foi realizada em resina de glicol-metacrilato (Historesin® Leica), seguindo o protocolo do fabricante.

Posteriormente, foi realizado o seccionamento dos blocos contendo as amostras em um micrótomo rotativo Leitz 1212 (Ernst Leitz Wetzlar). Os cortes foram obtidos com espessura de 3 µm (Leitão 2021), visando a otimização dos protocolos histoquímicos (Leitão 2018).

Uma lâmina de cada amostra foi reservada sem coloração para servir como "branco", enquanto as demais foram destinadas a técnicas de coloração e histoquímica: A caracterização estrutural e as inferências histoquímicas foram realizadas por meio da coloração com azul de toluidina (TBO) a 0,025% em tampão McIlvaine (pH 4,0), durante 15 minutos (O'Brien et al. 1964; Ribeiro e Leitão 2020). A identificação de polissacarídeos insolúveis foi realizada via teste de ácido periódico-Schiff (PAS) (McManus 1948; Maia 1979).

Finalizada as etapas de coloração/histoquímica, as lâminas foram lavadas em água destilada, secas ao ar e devidamente armazenadas. As observações e os registros fotográficos foram realizados em microscópio de luz Leica DM750, mediante a confecção de lâminas em água destilada, com auxílio do sistema de captura ICC50HD (Leica

Microsystems) acoplado a um microcomputador, usando o *software* Leica LAS EZ.

3.2.2 Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de picnídios e peritécios retirados diretamente de tecidos foliares, utilizando-se o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), seguindo o protocolo do fabricante com modificações.

Cerca de 1 mg de picnídios e peritécios foram macerados com 1 mg de areia de aquário autoclavada, acrescidos de 600 µL de Nuclei Lysis Solution, em cadinho. Os picnídios e peritécios macerados foram transferidos para microtubos de 1,5 mL e incubados a 65 °C, por 15 minutos, em banho-maria. Foram adicionados 3 µL de RNase, seguidos de incubação em banho-maria a 37 °C, por 15 minutos, e posteriormente mantidos por 5 minutos em temperatura ambiente.

Adicionaram-se 200 µL de *Protein Precipitation Solution*, homogeneizou-se em vórtex e a amostra foi submetida à centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos. Cerca de 600 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo e acrescidos de 600 µL de isopropanol. Em seguida, realizou-se a mistura por inversão para precipitação do ácido nucleico, seguida de centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto.

O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 600 µL de etanol 70%, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto. O etanol foi removido e o pellet foi seco à temperatura ambiente.

Por fim, o pellet foi ressuscitado em 50 µL de DNA Rehydration Solution.

3.2.3 Amplificação e sequenciamento de DNA

As amplificações das regiões ITS, LSU (primers LROR e LR5) e SSU (primers NS1 e NS4) do DNA foram realizadas em 25 µl de misturas de PCR contendo 8,5 µl de Nuclease Free Water, 12,5 µl de Master Mix, 2 µl de DNA molde e 1 µl de cada primer (10 µM). O programa de ciclo térmico da PCR foi uma etapa inicial de 3 min, a 94°C, seguida por 35 ciclos de 30 s a 94°C, 58 s a 30°C, e 1 min a 72°C, com uma extensão final de 10 min a 72°C.

As sequências obtidas foram editadas para a construção de sequências consenso e

submetidas a buscas de similaridade no banco de dados GenBank, via ferramenta BLASTn, para identificação preliminar em nível de gênero.

3.2.4 Análise filogenética

A árvore filogenética de inferência Bayesiana foi reconstruída a partir do alinhamento combinado das sequências de ITS, LSU e SSU do espécime de *Cryptophyllachora* sp. nov.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Sintomatologia e ecologia

A doença manifesta-se inicialmente como pequenas lesões marrons, dispersas na lâmina foliar (Fig. 1a) que, em condições de alta umidade e temperaturas amenas, coalescem atingindo até 20 mm de diâmetro. As lesões são circulares, marrom-claras, apresentando frequentemente ruptura do tecido central e a presença de 15 a 90 clipeos e picnídios na face adaxial da folha (Fig. 1b). Além disso foi possível observar a produção de cirros como dispersão dos esporos, tanto nos picnídios como nos peritécios (Fig. 1c). A ocorrência foi observada principalmente durante os meses de março a julho, no semiárido baiano, podendo causar queda prematura das folhas em infecções severas.



Fig. 1 Sintomas de *Cryptophyllachora* sp. em *Annona squamosa*. a. Ramo com folhas sintomáticas com lesões necróticas; b. Detalhe ao estereoscópio dos picnídios e peritécios na face adaxial da folha; c. Detalhes dos picnídios e peritécios com cirros em evidência (setas) vistos ao estereoscópio.

3.3.3.2 Filogenia molecular

A análise filogenética, baseada no conjunto de dados combinados (ITS, LSU e SSU), posicionou o espécime LFN dentro da ordem Chaetosphaeriales (*incertae sedis*). Na árvore filogenética, o espécime LFN foi recuperado como membro do clado com o gênero *Cryptophyllachora*, apresentando um suporte de 99,93% (Figura 2). A topologia indica que o espécime fúngico de *Annona squamosa* representa uma linhagem distinta, situada como grupo irmão de *C. ambrosiae* e *C. eurasiatica* (Kiss et al. 2018). A divergência genética observada, somada à distância filogenética entre os hospedeiros

(Annonaceae vs. Asteraceae), sustenta a proposição de um novo táxon.

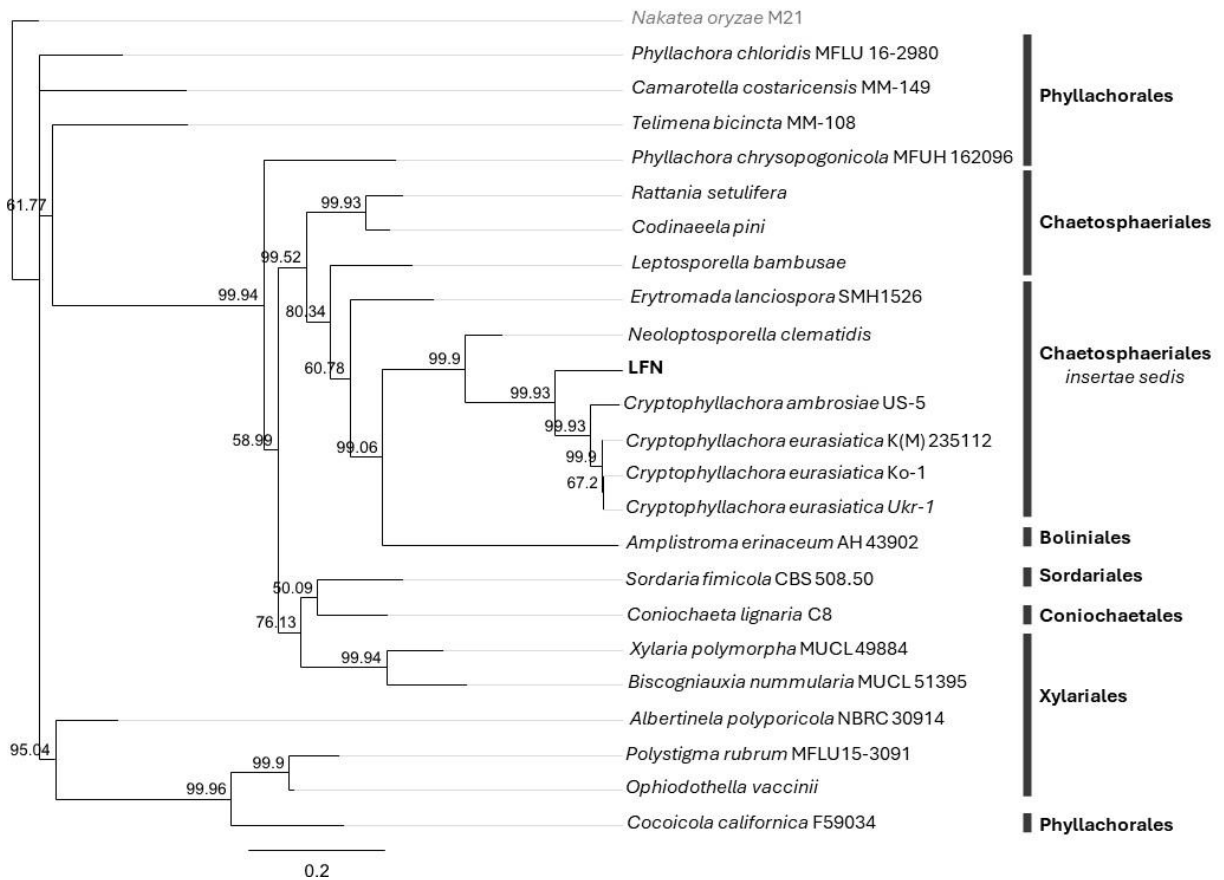


Fig. 2 Árvore filogenética com sequência do espécime LFN considerando as regiões genômicas ITS, LSU e SSU. O espécime de *Cryptophyllachora* sp. nov. está destacado em negrito como LFN. A barra de escala representa o número de alterações esperadas por sítio.

O patógeno associado a esta doença foi inicialmente descrito como *Ophiodothella annonae*, com base somente nas características morfológicas. Contudo, de acordo com as análises filogenéticas baseadas nas sequências de ITS, LSU e SSU, não foi revelado nenhum parente próximo do espécime, previamente classificado e identificado como *O. annonae*. Portanto, esta espécie foi caracterizada neste trabalho como *Cryptophyllachora longispora*.

3.3.3 Taxonomia

Cryptophyllachora longispora comb. nov.

Etimologia: Refere-se à característica de conídios alongados desta espécie.

As estruturas estromáticas (clípeos) são de coloração negra intensa (Fig. 3a), ocorrendo de forma isolada ou coalescidas sobre o tecido necrótico. Já os peritécios são imersos no mesofilo, subglobosos a subpiriformes, com 130–238 μm de largura e 152–255 μm de altura e recobertos por um clípeo negro (Fig. 3a), ligeiramente elevado. Ascospores amplamente cimbiformes, unitunicados, de paredes finas, com 8 esporos (Fig. 3b, c), medindo 61,6–88,9 μm x 11,6–27,9 μm . Ascóspores hialinos, fusiformes, e ligeiramente curvos, afinando-se gradualmente em direção às extremidades, medindo 32,7–45,81 x 4,2–5,0 μm , unicelulares, de paredes finas e lisas, com vacúolos (Fig. 3d).

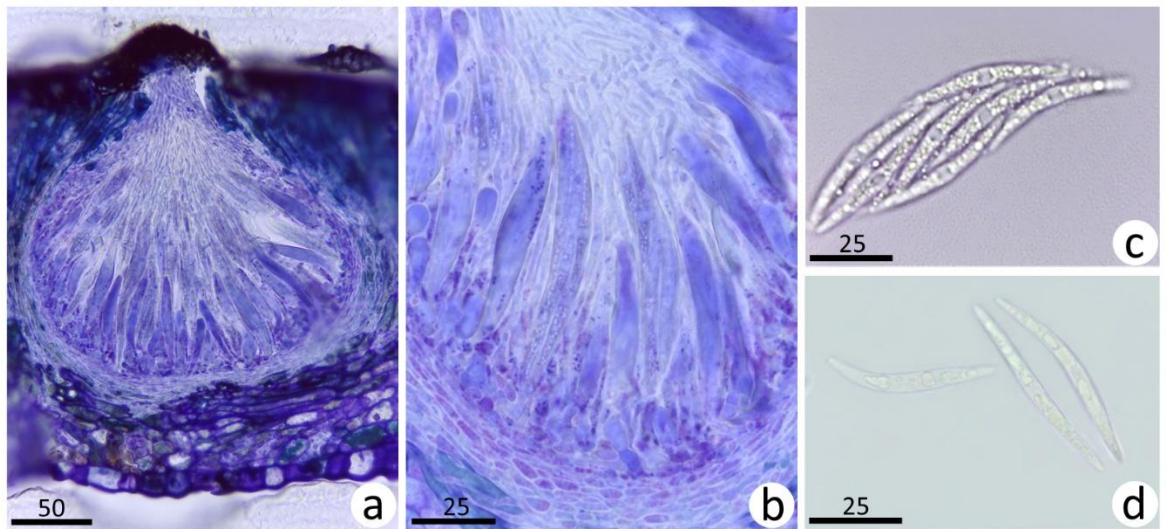


Fig. 3 Estruturas reprodutivas do teleomorfo de *Cryptophyllachora* sp. a. Panorama do corte longitudinal do peritécio imerso no mesofilo de *Annona squamosa*, com clípeo em evidência (seta); b. Detalhe dos ascos (setas); c. Detalhe dos ascos em suspensão. d. Detalhe dos ascóspores em suspensão. Barras de escala em micrômetros (μm).

O anamorfo possui picnídios subglobosos ou achatados, marrom-escuros, ligeiramente erumpentes, 130–327,5 μm de largura. Desenvolvem-se abaixo à epiderme adaxial (Fig. 4b), com produção de cirros (Fig. 4 c). Conídios filiformes, hialinos, lisos, unicelulares, medindo 11,3–17,3 x 0,9–1,3 μm (Fi. 4d). Além disso, possui hifas septadas

presentes em todo o mesófilo (Fig. 4a).

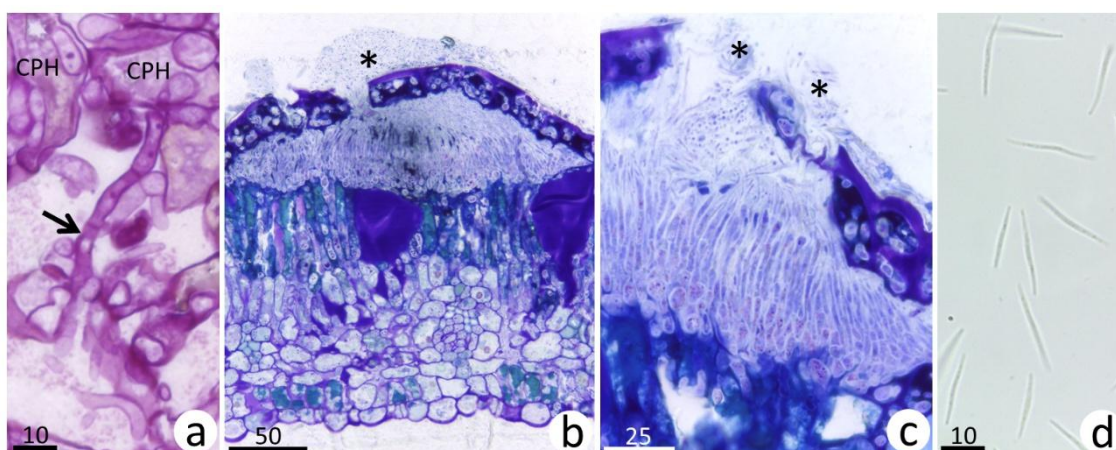


Fig. 4 Estruturas vegetativas e reprodutivas do anamorfo de *Cryptophyllachora* sp. crescendo na folha de *Annona squamosa*. a. Detalhe de hifa septada (seta); b- Picnídio se desenvolvendo subjacente à epiderme adaxial do hospedeiro, visualizando cirros (asterisco); c. Detalhe do picnídio mostrando o extravasamento dos cirros com conídios (asteriscos); d. Detalhe dos conídios. Legenda: CPH – célula parenquimática do hospedeiro. Barras de escala em micrômetros.

3.4 DISCUSSÃO

A classificação taxonômica do espécime LFN exemplifica os desafios históricos na identificação de ascomicetos biotróficos foliares. Com base somente nas características micromorfológicas, este patógeno, associado à *Annona squamosa*, no Brasil foi originalmente identificado e descrito como *Ophiodothella annonae* por Bezerra et al. (2006). A semelhança morfológica das estruturas, aliada ao formato dos ascósporos, levou ao seu posicionamento inicial na família Phyllachoraceae (Cannon 1991; Cannon e Evans 1999).

Contudo, os gêneros de *Phyllachora* não possuem a presença de clipeo, como foi observado no *Cryptophyllachora longispora*. Sendo essa uma característica importante para a descrição e diferenciação.

Esse fenômeno de reclassificação é análogo ao ocorrido com o trabalho desenvolvido por Kiss et al. (2018), no qual a espécie *C. ambrosiae* foi inicialmente descrita e referenciada dentro do gênero *Phyllachora* (especificamente como *P. ambrosiae*). Assim como no caso do espécime LFN, a transição de *Phyllachora*

(Phyllachorales) para *Cryptophyllachora* (Chaetosphaeriales) só foi possível após a análise de sequenciamento de DNA.

A identificação do espécime LFN como uma nova espécie de *Cryptophyllachora* expande significativamente o conhecimento sobre a diversidade e a gama de hospedeiros deste gênero recentemente estabelecido. Os resultados deste trabalho confirmam que o patógeno da pinha (*A. squamosa*), no Brasil, pertence ao clado de ordem Chaetosphaeriales (*incertae sedis*), distanciando-se filogeneticamente do gênero *Phyllachora* (Phyllachorales).

Até o momento, as espécies conhecidas de *Cryptophyllachora* foram relatadas principalmente em hospedeiros das famílias Asteraceae, em regiões da Eurásia e América do Norte, sendo relatadas como *Cryptophyllachora eurasiatica* e *Cryptophyllachora ambrosiae* (Kiss et al. 2018).

Há poucas informações sobre *Cryptophyllachora*, aparentemente biotrófico obrigatório, sendo este o primeiro estudo sobre sua morfologia e desenvolvimento na cultura da pinha (*Annona squamosa*) e no hemisfério Sul. A ocorrência de membros deste gênero em anonáceas permanecia, até então, desconhecida.

Morfologicamente, o espécime LFN apresenta características diagnósticas que o separam das *C. eurasiatica* e *C. ambrosiae*, descritas por Kiss et al. (2018). Enquanto *C. eurasiatica* e *C. ambrosiae* possuem ascósporos cilíndricos que variam entre 12 e 22 µm de comprimento (Kiss et al. 2018), o espécime LFN apresenta ascósporos fusiformes e ligeiramente curvos, consideravelmente mais longos, medindo 32,7–45,81 µm. A posição filogenética do espécime LFN com as espécies *C. eurasiatica* e *C. ambrosiae* formaram um ramo como grupo irmão da ordem Chaetosphaeriales, com alto suporte de bootstrap (99,93%).

Diferentemente das observações de *C. eurasiatica*, cuja infecção muitas vezes é utilizada para o biocontrole de plantas daninhas, a nova espécie *Cryptophyllachora* sp. em *A. squamosa* demonstrou alta virulência, sob condições favoráveis. A ocorrência está associada à estação chuvosa e com temperaturas mais amenas na região de Anagé-BA, iniciando no final do verão (março), com aumento na incidência no outono (março a junho) e, no inverno (junho a setembro), os sintomas da doença começam a desaparecer.

Com o avanço da doença na pinha, há uma rápida coalescência das lesões atingindo 20 mm, com formação de clipeos densos e uma desfolha prematura. Indicando que o fungo interfere na capacidade fotossintética da planta e, como consequência, reduz a produtividade. Estas características indicam um dano destrutivo similar ao relatado em 1935 para *C. ambrosiae* nos EUA (Kiss et al. 2018). Estes aspectos demonstram o risco fitossanitário para os pomares de anonáceas no semiárido.

Este trabalho representa o primeiro registro de *Cryptophyllachora* sp. causando doença em uma Annonaceae (*Annona squamosa*) no Brasil. A descoberta de uma fase anamórfica coexistindo com o teleomorfo fornece uma visão completa do ciclo de vida deste patógeno. A ausência de sequências similares no GenBank (>90%), para o espécime LFN, destaca a necessidade de maiores inventários micológicos para este gênero descrito recentemente.

3.5 CONCLUSÕES

A pinta preta em *Annona squamosa*, no Brasil, é causada por uma nova espécie de *Cryptophyllachora*, representando o primeiro registro mundial deste gênero em uma Annonaceae.

A análise filogenética multigênica e a caracterização morfológica confirmaram que o espécime LFN constitui uma linhagem distinta, diferenciando-se das espécies descritas em Asteraceae.

A identificação precisa deste agente etiológico preenche uma lacuna taxonômica fundamental e fornece uma base científica para o desenvolvimento de estratégias de manejo fitossanitário eficazes para a cultura da pinha no Brasil.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed, N, Alam, M, Saeed, M, Ullah, H, Junaid, M, Kanwal, M, Ahmed, S. (2023). Role of Plants in Managing Diseases. In: Öztürk, M., Sridhar, K.R., Sarwat, M., Altay, V. (eds) Ethnic Knowledge and Perspectives of Medicinal Plants. *Apple Academic Press*, 26.

Bezerra, JL, Freire, FCO, Andrade, D. (2006). A new *Ophiodothella* species associated with leaf spots on *Annona squamosa* in Brazil. *Fitopatologia brasileira*, 31, 592-594. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582006000600009>

- Cannon, PF (1991). A revision of *Phyllachora* and some similar genera on the host family Leguminosae. *Mycological Papers*, 163, 1-302.
- Cannon, PF, Evans, HC (1999). Biotrophic species of Phyllachoraceae associated with the angiosperm family Erythroxylaceae. *Mycological Research*, 103, 577-590. <https://doi.org/10.1017/S0953756298007527>
- Costa, JFO, Kamei, SH, Silva, JRA, Miranda, ARG, Netto, MB, Silva, SJC, Correia, KC, Lima, GSA, Assunção, IP (2019). Species diversity of *Colletotrichum* infecting *Annona* spp. in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 153, 1119–1130 <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01630-w>
- Costa, SL, Carvalho, AJC, Pessanha, PGO, Monnerat, PH, Marinho, CS (2002). Produtividade da cultura da pinha (*Annona squamosa* L.) em função de níveis de adubação nitrogenada e formas de aplicação de boro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24, 543-546. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452002000200052>
- Huang, Q, Wan, J, Li, X, Zhao, S, Liu, G, Li, Y, Xiao, S. (2025). First report of *Phakopsora cherimoliae* causing rust disease on *Annona squamosa* in China. *Plant Disease*, 109, 2241-2450. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-25-0817-PDN>
- Karnovsky, MJ (1965). A formaldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27, 137–138.
- Kiros-Meles, A, Abang, MM (2008). Farmers' knowledge of crop diseases and control strategies in the Regional State of Tigray, northern Ethiopia: implications for farmer–researcher collaboration in disease management. *Agriculture and Human Values*, 25, 433–452. <https://doi.org/10.1007/s10460-007-9109-6>
- Kiss, L, Kovács, GM, Bóka, K, Bohár, G, Bohárné, KV, Németh, MZ, Takamatsu, S, Shin, HD, Hayova, V, Nischwitz, C, Seier, MK, Evans, HC, Cannon, PF, Ash, GJ, Shivas, RG, Müller-Schärer, H (2018). Deciphering the biology of *Cryptophyllachora eurasiatica* gen. et sp. nov., an often cryptic pathogen of an allergenic weed, *Ambrosia artemisiifolia*. *Scientific Reports*, 8, 10806. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29102-5>
- Leitão, CAE (2018). Working optimally with serial sections in glycol-methacrylate resin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018180103>
- Leitão, CAE (2021). Craftsmanship and low-cost machines and abrasives for sharpening steel knife with C edge, and procedures for obtaining 3 µm thick glycol-methacrylate resin sections. *Perspectivas da Ciência e Tecnologia*, 13, 174–196. <https://doi.org/10.22407/1984-5693.2021.v13.p.174-196>
- Lemos, EEP (2014). A produção de anonáceas no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36, 77-85. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452014000500009>

- Maia, VT (1979). Técnica histológica. Atheneu, São Paulo.
- McManus, JFA (1948). Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology*, 23, 99–108. <https://doi.org/10.3109/10520294809106232>
- O'Brien, TP, Feder, N., McCully, ME (1964). Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine blue O. *Protoplasma*, 59, 368–373. <https://doi.org/10.1007/BF01248568>
- Oliveira, AS, Castellani, MA, Nascimento, AS, Moreira, AA (2016). Perfil do sistema de produção de pinha nos polos de fruticultura da Bahia, com ênfase nos aspectos fitossanitários da cultura. *Extensão Rural*, 23, 95-111. <http://dx.doi.org/10.5902/2318179613034>
- Queiroga, VP, Gomes, JP, Melo, BA, Lima, DC, Mendes, NVB, Figueirêdo, RMF, Girão, EG, Albuquerque, EMB (2023). Sistema Produtivo da Pinheira (*Annona squamos* L.). *Embrapa*, 15.
- Ribeiro, VC, Leitão, CAE (2020). Utilisation of Toluidine blue O pH 4.0 and histochemical inferences in plant sections obtained by free-hand. *Protoplasma*, 257, 993–1008. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01473-0>
- Zulperi, D., Saad, N., Ismail, SI, Johari, MIH (2026). Annonas: Botany, Production and Uses. *CABI Digital Library*, 193–206. <https://doi.org/10.1079/9781800627628.0011>

ARTIGO II

Análise histopatológica da interação *Cryptophyllachora* sp. X pinha (*Annona squamosa*): colonização e estruturas reprodutivas*

***Situação:** não submetido

Análise histopatológica da interação *Cryptophyllachora* sp. X pinha (*Annona squamosa*): colonização e estruturas reprodutivas

RESUMO

A pinha (*Annona squamosa*) é uma frutífera de elevada importância econômica, cuja produtividade é frequentemente limitada por doenças foliares. Nesse sentido, o presente trabalho objetivou caracterizar a interação histopatológica entre o patógeno emergente *Cryptophyllachora* sp. e folhas de *A. squamosa*, visando elucidar os mecanismos de patogênese e as respostas estruturais do hospedeiro. Folhas sintomáticas foram submetidas ao processamento histológico convencional, com cortes transversais corados com azul de toluidina e utilizado o teste de ácido periódico-Schiff. A análise microscópica revelou uma colonização de toda a folha e de forma agressiva, com hifas septadas apresentando crescimento inter e intracelular nas camadas do mesófilo. Notavelmente, o patógeno invadiu os feixes vasculares, colonizando tanto o xilema quanto o floema, o que fundamenta a severa necrose e a desfolha precoce, observadas macroscopicamente. O fungo exibiu um ciclo caracterizado pela coexistência de picnídios subepidérmicos e peritécios imersos profundamente no parênquima, ambos exsudando esporos via cirros. Uma característica interessante observada foi a presença da mucilagem fisiológica presente nos idioblastos e a associação das hifas do patógeno próximas e inseridas nessa mucilagem. Embora o hospedeiro tenha ativado respostas de defesa, evidenciadas pelo acúmulo de compostos fenólicos, essas barreiras foram insuficientes para conter o avanço do patógeno. Conclui-se que *Cryptophyllachora* sp. possui um alto nível de especialização e virulência, utilizando estratégias de invasão vascular e exploração metabólica de recursos do hospedeiro para estabelecer uma infecção agressiva.

Palavras-chave: Annonaceae, Histoquímica, Interação planta-patógeno, Mucilagem.

ABSTRACT

Sugar apple (*Annona squamosa*) is a fruit crop of high economic importance, whose productivity is frequently limited by foliar diseases. This study aimed to characterize the histopathological interaction between the emerging pathogen *Cryptophyllachora* sp. and leaves of *A. squamosa*, seeking to elucidate pathogenesis mechanisms and host structural responses. Symptomatic leaves were subjected to conventional histological processing, with cross-sections stained with toluidine blue and the periodic acid-Schiff test. Microscopic analysis revealed an aggressive and systemic colonization, with septate hyphae exhibiting inter- and intracellular growth throughout the mesophyll layers. Notably, the pathogen invaded the vascular bundles, colonizing both the xylem and the phloem, which underlines the severe necrosis and premature defoliation observed macroscopically. The fungus exhibited a cycle characterized by the coexistence of subepidermal pycnidia and perithecia deeply immersed in the parenchyma, both exuding spores via cirri. An interesting feature observed was the presence of physiological mucilage within idioblasts and the association of the pathogen's hyphae near and embedded within this mucilage. Although the host activated defense responses, evidenced by the accumulation of phenolic compounds, these barriers were insufficient to contain the pathogen's advancement. It is concluded that *Cryptophyllachora* sp. possesses a high level of specialization and virulence, utilizing vascular invasion strategies and metabolic exploitation of host resources to establish an aggressive infection.

Keywords: Annonaceae, Histochemistry, Plant-pathogen interaction, Mucilage.

4.1 INTRODUÇÃO

Nativa da América tropical, a pinha, também conhecida como fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.), é cultivada em diversas regiões devido à sua capacidade de adaptação. Sua tolerância a diferentes tipos de solo e regimes climáticos permite que seja explorada comercialmente em zonas de clima tropical e subtropical (Moura et al. 2021; Fan et al. 2025; Singh et al. 2025).

No entanto, a produtividade e a longevidade dos pomares têm sido severamente limitadas pela ocorrência de doenças fúngicas foliares, que comprometem a capacidade fotossintética e induzem a desfolha precoce das plantas (Costa et al. 2019; Huang et al. 2025; Zulperi et al. 2026). Entre os patógenos emergentes associados a essa cultura, o fungo *Cryptophyllachora* sp. tem despertado atenção devido à sua agressividade e à complexidade de suas interações com o hospedeiro.

Embora a sintomatologia macroscópica dessas manchas foliares seja descrita por lesões necróticas circulares, os mecanismos celulares da patogênese desse fungo em *A. squamosa* ainda são pouco compreendidos. A eficácia de uma colonização fúngica depende de várias estratégias que incluem a penetração nos tecidos, a neutralização das defesas químicas do hospedeiro e a exploração de recursos fisiológicos para o crescimento micelial (Ferreira et al. 2006; Presti et al. 2015). Em anonáceas, a presença de estruturas glandulares e o acúmulo de substâncias, como a mucilagem e compostos fenólicos, constituem barreiras potenciais que o patógeno deve superar para estabelecer a infecção (Bakker e Gerritsen 1992).

A histopatologia vegetal é uma ferramenta importante para elucidar essas interações, permitindo a visualização direta da invasão tecidual e do desenvolvimento das estruturas reprodutivas (Agrios 2008; Glass et al. 2025). Contudo, para o patossistema *A. squamosa* – *Cryptophyllachora* sp., há uma lacuna de informações sobre a dinâmica de colonização micelial.

Diante desse cenário, o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização histopatológica da infecção por *Cryptophyllachora* sp. em folhas de *A. squamosa*. Buscou-se analisar o padrão de invasão das hifas, a localização e desenvolvimento das estruturas reprodutivas (picnídios e peritécios), bem como as

respostas estruturais e bioquímicas do hospedeiro, visando preencher a lacuna existente e auxiliar na compreensão da patogênese e o futuro desenvolvimento de estratégias de manejo fitossanitário.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Coleta das amostras

Foram coletadas folhas de pinha (*Annona squamosa* L.) apresentando sintomas típicos de infecção por *Cryptophyllachora* sp. com manchas foliares necróticas, bem como folhas de aspecto sadio, em pomar comercial em Anagé - BA.

4.2.2 Microscopia óptica

As amostras foram removidas com uma lâmina de barbear e imediatamente fixadas em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído, 3% de sacarose e 0,2 mM L⁻¹ de cloreto de cálcio em tampão fosfato 0,2 M a pH 7,2 (Karnovsky 1965) a 6 °C, por 24 h. Posteriormente, as amostras foram lavadas em água destilada, parcialmente desidratadas em uma série progressiva de etanol até 95% e incluídas em resina de glicol-metacrilato (Historesin® Leica), de acordo com as instruções do fabricante.

Os blocos contendo as amostras foram seccionados em um micrótomo rotativo Leitz 1212 (Ernst Leitz Wetzlar), ajustado para 3 µm (Leitão 2021), obtendo-se cortes seriados de forma otimizada para histoquímica (Leitão 2018).

Para cada amostra, uma das lâminas contendo cortes histológicos foi mantida sem coloração para servir de “branco”. As demais lâminas foram submetidas a técnicas de coloração e histoquímica: para caracterização estrutural e inferências histoquímicas, as lâminas foram coradas com azul de Toluidina (TBO) a 0,025% em tampão McIlvaine pH 4,0, por 15 minutos (O'Brien et al. 1964; Ribeiro e Leitão 2020).

Para a detecção de polissacarídeos insolúveis, utilizou-se o teste com ácido periódico-Schiff (PAS) (McManus 1948; Maia 1979). Após a coloração, as lâminas com os cortes foram lavadas em água destilada, secas ao ar e armazenadas em estojos apropriados.

Para a observação e aquisição de micrografias, as lâminas foram montadas com uma lamínula e água destilada, e analisadas com um microscópio de luz Leica DM750, equipado com um sistema de captura de imagem digital ICC50HD (Leica Microsystems), acoplado a um microcomputador, usando o *software* Leica LAS EZ.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Invasão micelial e distribuição das hifas

A análise dos cortes histológicos de folhas de *Annona squamosa* infectadas com *Cryptophyllachora* sp. revelou uma colonização fúngica extensa no interior dos tecidos do hospedeiro.

As estruturas vegetativas do patógeno foram consistentemente identificadas como hifas septadas (Fig. 1a) que exibiram um padrão de crescimento tanto intercelular quanto intracelular (Fig. 1b).

A distribuição das hifas foi observada de forma abrangente em todas as camadas do mesofilo, tanto no parênquima lacunoso, quanto no parênquima paliçádico (Fig. 1c, d, e, h). As hifas também se encontravam presentes na epiderme, na face adaxial (Fig. 1f) e na face abaxial, nos estômatos (Fig. 1g), indicando possíveis locais de entrada do patógeno. Além disso, as hifas foram identificadas colonizando os feixes vasculares, tanto o floema quanto o xilema (Fig. 2c, d, e).

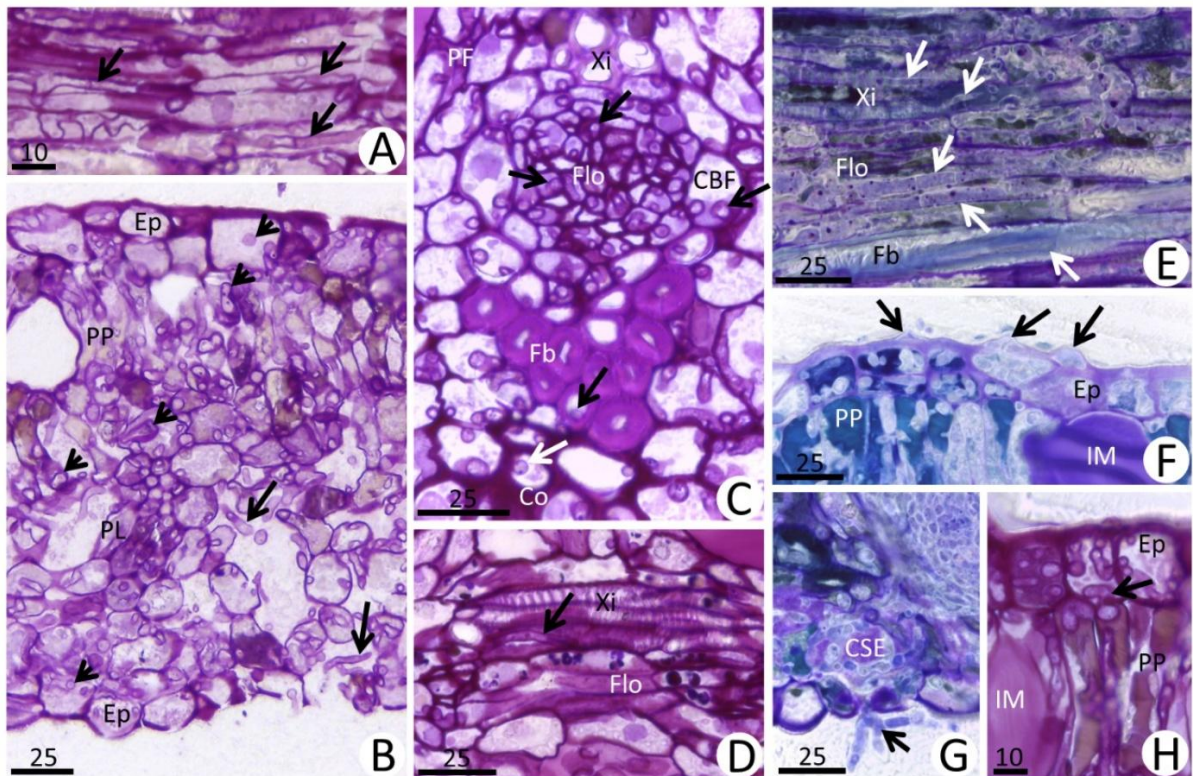


Fig. 1 Cortes transversais da lâmina foliar de *Annona squamosa* infestada por *Cryptophyllachora* sp. a. Feixe vascular em corte longitudinal evidenciando hifas septadas (setas) em células do floema; b. Panorama da lâmina foliar com inúmeras hifas em espaços intercelulares (setas longas) e dentro das células do hospedeiro (setas curtas); c. Corte transversal de nervura, evidenciando hifas (setas) em células de todos os tecidos; d. Corte longitudinal de feixe vascular, evidenciando hifa em elemento de vaso; e. Corte longitudinal de feixe vascular, evidenciando hifas em células de todos os tecidos; f. Detalhe de hifas (setas) invadindo a folha através da epiderme da face adaxial; g. Detalhe de hifas (seta) atravessando o estômato e ocupando a câmara subestomática; h. Detalhe de hifa atravessando plasmodesmos entre célula epidérmica e célula de parênquima paliçádico. Legendas: CBF - célula da bainha do feixe, CSE - câmara subestomática, Co - colênquima, Ep - epiderme, Fb - fibras, Flo - floema, IM - idioblasto mucilaginoso, PF - parênquima fundamental, PL - parênquima lacunoso, PP - parênquima paliçádico, Xi - xilema. Barras de escala em micrômetros

4.3.2 Localização e morfologia das estruturas assexuadas (picnídios) e sexuadas (peritécios)

Foi observada a presença de picnídios e peritécios coexistindo nas mesmas lesões (Fig. 2a). As estruturas de reprodução assexuada, identificadas como picnídios, foram observadas consistentemente, desenvolvendo-se nas células epidérmicas do hospedeiro

(Fig. 2b). À medida que a massa de conídios atingiu a maturação, a pressão exercida resultou no rompimento das paredes anticlinais e elevação da parede periclinal externa com posterior ruptura dela. Como consequência, observou-se o extravasamento da massa de conídios, caracterizado como cirro (Fig. 2c).

Em contraste com os picnídios, as estruturas de reprodução sexuada, os peritécios, foram localizados em camadas mais profundas do tecido foliar (Fig. 2d). Estas estruturas estavam totalmente imersas e bem estabelecidas no mesofilo, tanto no parênquima paliádico como no lacunoso. Apesar de sua localização mais interna, também foi observada a ruptura da epiderme acima dos peritécios maduros. Similarmente aos picnídios, a liberação dos ascósporos ocorreu pela exsudação da massa de esporos em forma de cirros (Fig. 2e), o que possibilitou a exposição e eventual liberação dos ascósporos para o meio externo.

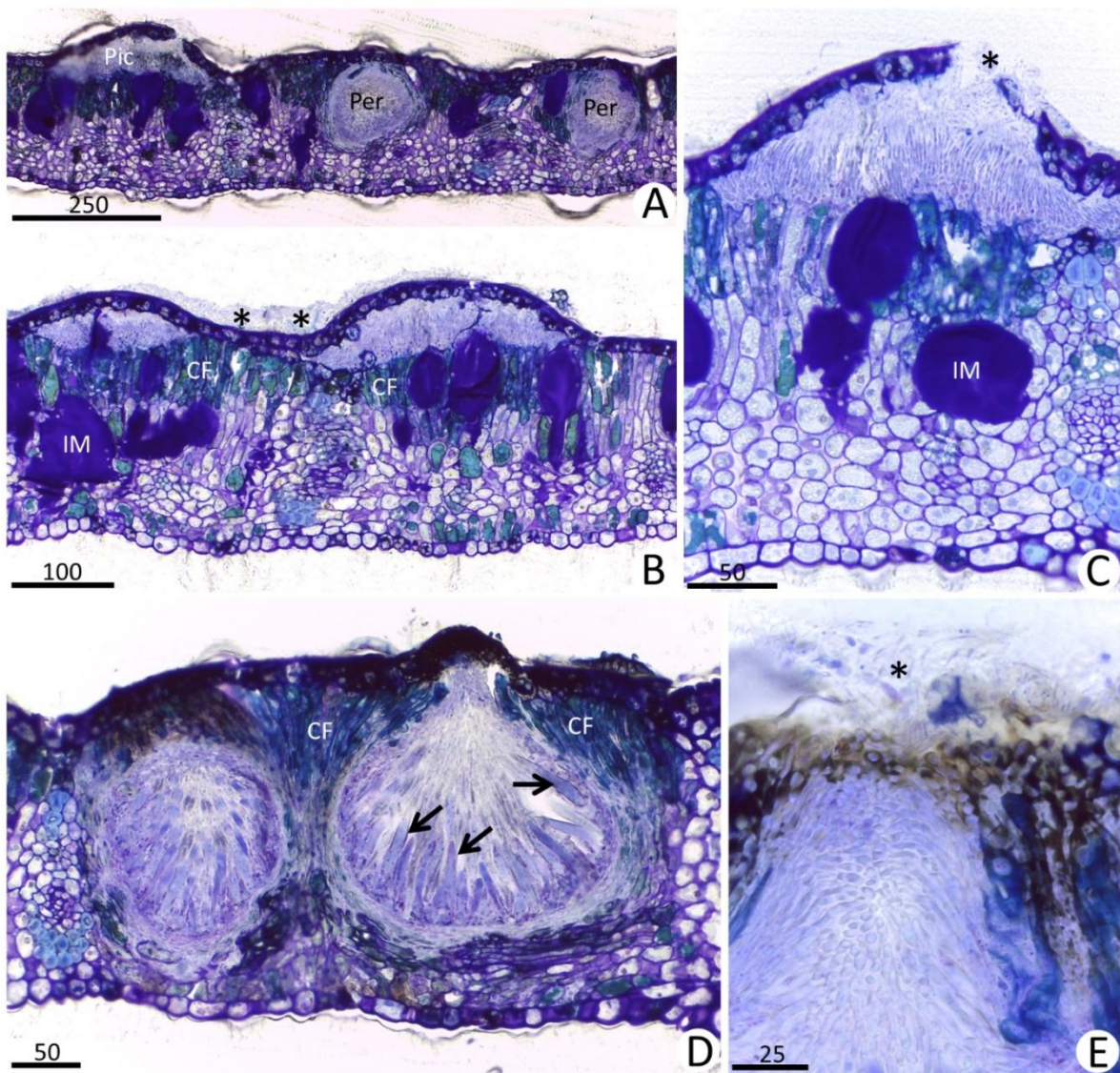


Fig. 2 Cortes transversais da lâmina foliar de *Annona squamosa* infestada por *Cryptophyllachora* sp. a. Panorama da lâmina foliar com picnídios e peritécios; b. Panorama da lâmina foliar com dois picnídios, com extravasamento de cirros (asteriscos); c. Detalhe de região com picnídio extravasando cirros de conídios (asteriscos); d. Panorama da lâmina foliar com dois peritécios, com ascos indicados (setas); e. Detalhe do ostíolo do peritécio com extravasamento de cirros. Legenda: As - ascos, CF - compostos fenólicos, IM - idioblasto mucilaginoso, Per - peritécio, Pic - picnídio. Barras de escala em micrômetros

4.3.4 Resposta do hospedeiro e degradação tecidual

A infecção pelo patógeno fúngico induziu uma resposta destrutiva e intensa nos tecidos foliares. Macroscopicamente, esta atividade culminou na formação de manchas

foliares necróticas (Fig. 3a, b), evidenciando a morte celular extensa nas áreas adjacentes à formação dos corpos de frutificação (picnídios e peritécios) e produção de cirros (Fig. 3c).

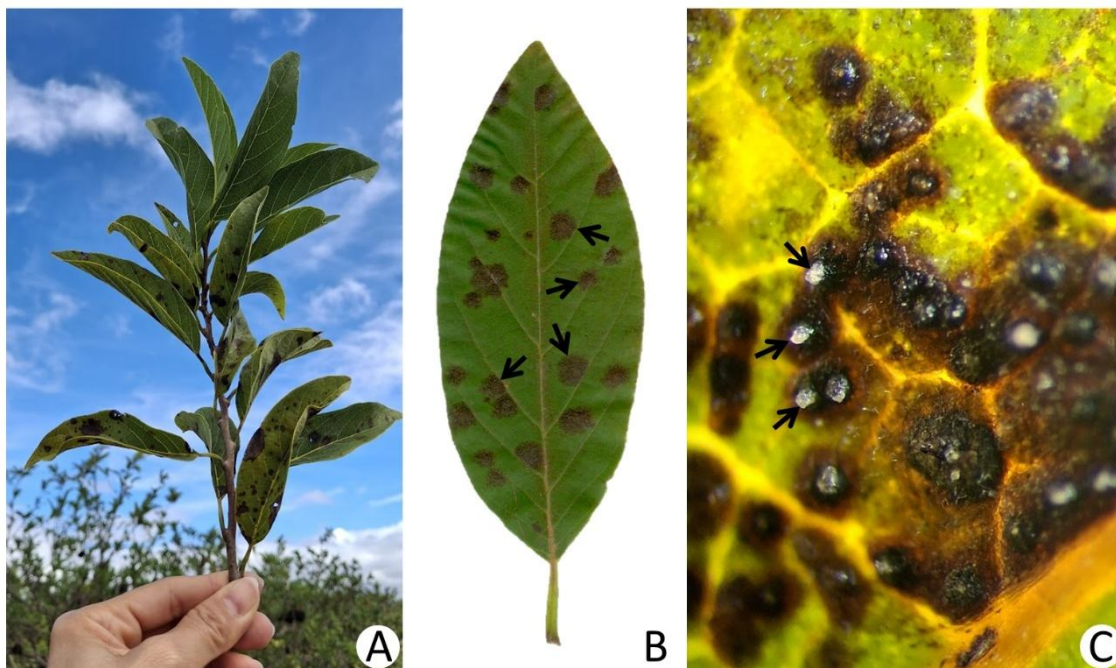


Fig. 3 Visão geral dos sintomas de *Cryptophyllachora* sp. em *Annona squamosa*. a. Ramo com folhas sintomáticas; b. Detalhe da folha com lesões necróticas (setas); c. Visão ao estereoscópio da lâmina foliar com peritécios com cirros em evidência (setas).

O dano celular em folhas doentes foi significativo, caracterizado pela destruição da arquitetura do mesofilo. Observou-se o colapso estrutural e a lise celular do parênquima paliádico e do parênquima lacunoso (Fig. 4a, c), quando comparado ao tecido sadio (Fig. 4b), correlacionando-se com a presença de hifas intercelulares e intracelulares, além dos corpos de frutificação.

Em lâminas histológicas, tanto de tecidos infectados quanto de tecidos sadios, foi observada a presença de estruturas contendo grande quantidade de mucilagem localizadas no parênquima lacunoso e o extravasamento dessa mucilagem, dispersando-se nos espaços intercelulares.

No entanto, em áreas de infecção, foi notada uma interação direta entre o patógeno

e a mucilagem. Hifas fúngicas foram observadas adjacentes e até mesmo penetrando a massa de mucilagem (Fig. 4e).

Também foi possível observar a diferença entre o acúmulo de amido em folhas sadias e doentes, com uma redução na presença de amido em plantas com ataque do *Cryptophyllachora* sp. (Fig. 4f, g).

Em adição, foi observada microscopicamente a presença de compostos fenólicos. Estes compostos, detectados pela cor verde-azulada (utilizando o corante azul de toluidina), estavam localizados em células circundantes às hifas e aos corpos de frutificação nas amostras sintomáticas com necrose (Fig. 4d).

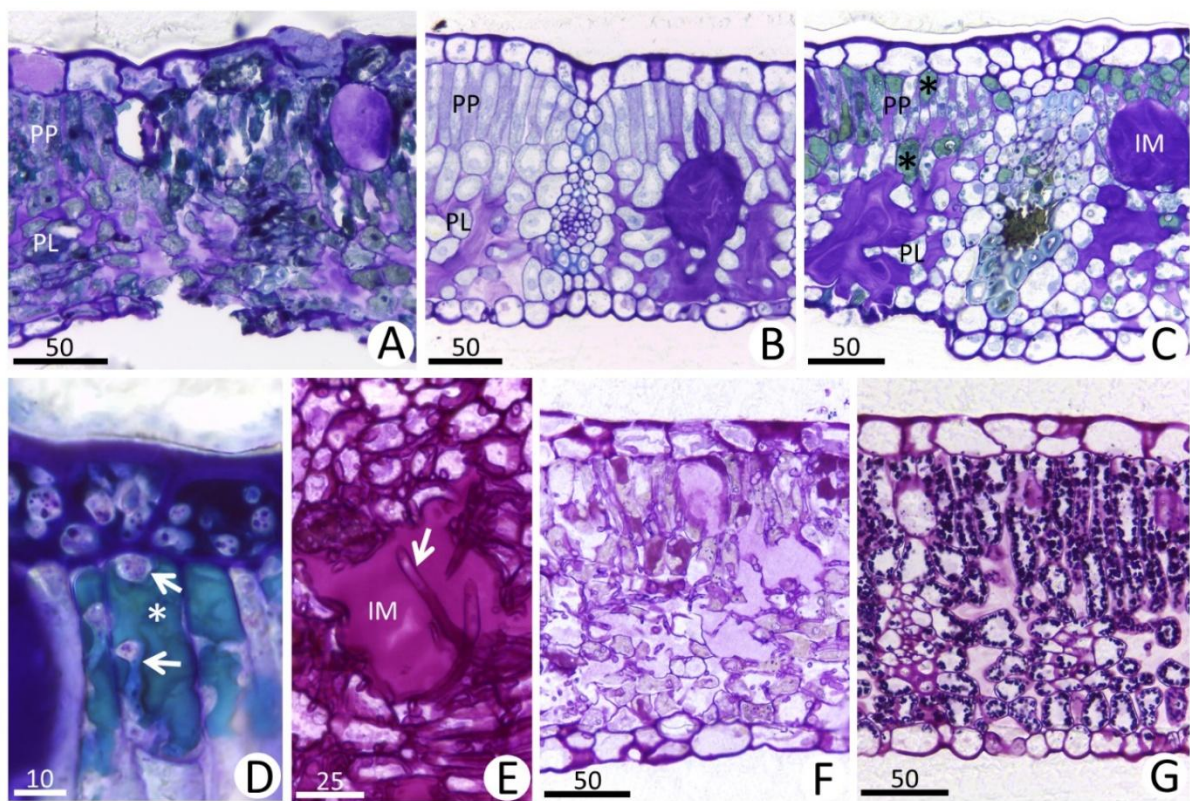


Fig. 4 Cortes transversais da lâmina foliar de *Annona squamosa* com (a, c, d-f) e sem (b, g) sintomas. a. Região necrosada; b. Lâmina com aspecto sadio; c. Região limítrofe de necrose, evidenciando compostos fenólicos (asteriscos); d. Detalhe de região superficial da folha, com hifas em células do parênquima paliçádico contendo compostos fenólicos (asterisco); e. Detalhe de mucilagem com hifas (setas) imersas; f. Panorama da folha sintomática com inconspícuos grãos de amido; g. Panorama de folha assintomática com vários grãos de amido. Legendas: IM - idioblasto mucilaginoso, PL - parênquima lacunoso, PP - parênquima paliçádico. Barras de escala em micrômetros

4.4 DISCUSSÃO

Investigações histopatológicas das interações planta-patógeno são necessárias para a compreensão de doenças emergentes em plantas. As observações detalhadas da interação entre o *Cryptophyllachora* sp. e as folhas de pinha (*Annona squamosa*) fornecem uma base sólida para a compreensão da patogênese e da agressividade deste fungo. A análise microscópica revelou um padrão de infecção altamente destrutivo, caracterizado pela colonização generalizada do mesófilo e pela presença de estruturas reprodutivas assexuadas e sexuadas.

Observou-se simultaneamente a presença de picnídios (estrutura assexuada) e peritécios (estrutura sexuada) nas mesmas lesões foliares, ambos liberando esporos em cirros. Este mecanismo de liberação exsudativa é importante, pois protege os esporos contra o dessecamento, visto que a matriz mucilaginosa que envolve os esporos atua como um agente higroscópico (Griffiths e Peverett 1980; Mondal e Parbery 2005; Qu et al. 2017). Além disso, facilita a dispersão no ambiente, sugerindo um aumento do potencial de incidência da doença em campo.

A coexistência das fases sexuada e assexuada é importante, pois pode conferir ao patógeno maior adaptabilidade e variabilidade, fatores que podem estar relacionados à patogenicidade e à capacidade de superar resistências do hospedeiro (Ashu e Xu 2015; Madhushan et al. 2025).

A resposta de defesa da *A. squamosa* foi indicada pelo acúmulo de compostos fenólicos, detectados tanto em tecidos sadios (defesa constitutiva) quanto infectados (defesa induzida). A presença constitutiva de fenólicos sugere que a espécie possui um acúmulo bioquímico pré-formado (Dias et al. 2023).

A deposição de fenólicos é uma resposta de defesa do hospedeiro, uma vez que tais metabólitos possuem propriedades antimicrobianas e antioxidantes que auxiliam as plantas na neutralização de espécies reativas de oxigênio (EROs). Também servem como precursores para a lignificação das paredes celulares, o que pode reforçar as barreiras físicas contra a penetração fúngica (Kumar et al. 2020; Rashad et al. 2020). O aumento na concentração de compostos fenólicos, como mecanismo de defesa em resposta à

invasão fitopatogênica, é relatado em diversos patossistemas (Braga et al. 2019; Kumar et al. 2020; Braga et al. 2021; Khanday et al. 2024).

O sistema de defesa vegetal é ativado, quando receptores de reconhecimento de padrões identificam a ameaça. A resposta local inicial torna-se sistêmica por intermédio de sinalização molecular, o que permite a ativação de diversas vias de defesa em toda a extensão da planta (Kumar et al. 2020; Rashad et al. 2020).

No entanto, os resultados indicam que essa barreira química foi insuficiente para inibir o desenvolvimento de *Cryptophyllachora* sp. A progressão da infecção, resultando em intensa destruição do parênquima, sugere que o patógeno possui mecanismos de virulência eficientes (Shalaby e Horwitz 2015). Esse comprometimento da estrutura foliar pode explicar a desfolha precoce observada em plantas de pinha acometidas por esse patossistema.

Além disso, existe ainda a probabilidade de que a degradação e subsequente morte dos tecidos celulares representem uma reação de hipersensibilidade (Coll et al. 2011). Essa resposta fisiológica tem como objetivo a inibição da colonização fúngica, dificultando o acesso do fungo a tecidos saudáveis (Beardmore et al. 1983; Niks e Rubiales 2002).

A análise histoquímica também revelou uma alteração metabólica nos tecidos infectados, caracterizada pela redução no acúmulo de grãos de amido em comparação às folhas saudáveis. Em tecidos saudáveis, a presença abundante de amido no mesófilo reflete a eficiência do metabolismo e a manutenção das reservas energéticas da planta (Smith e Zeeman 2020). Contudo, foi possível perceber que a colonização por *Cryptophyllachora* sp. resultou em um menor armazenamento de amido.

Isto pode ser atribuído ao comprometimento do aparato fotossintético decorrente da lise celular e da invasão dos tecidos vasculares, o que interrompe a síntese de fotoassimilados. Essa invasão interrompe o transporte de água e a síntese de fotoassimilados, que são essenciais para a produção de amido. A síntese de amido em plantas está intimamente ligada à fotossíntese, uma vez que o amido é produzido a partir do carbono fixado durante o dia e serve como reserva de carbono (Cho e Kang 2020; Smith e Zeeman 2020), desempenhando um papel na manutenção do crescimento vegetal

e nas respostas a estresses (Rojas et al. 2014; AbdElgawad et al. 2020).

Um aspecto interessante do parasitismo observado reside na interação do patógeno com a mucilagem. A presença de células mucilaginosas é típica de representantes da família Annonaceae, inclusive já estudada em *A. squamosa* (Bakker e Gerritsen 1992). A observação de hifas próximas à mucilagem e, em alguns casos, inseridas nela foi identificada com frequência.

A higroscopicidade acentuada da mucilagem interferiu na estabilidade dos cortes histológicos, promovendo distorções focais em determinadas áreas. Tais variações dificultaram a obtenção de um plano focal homogêneo, resultando em perda de nitidez em campos microscópicos onde o extravasamento desse conteúdo era mais denso.

4.5 CONCLUSÕES

A investigação histopatológica da interação entre *Cryptophyllachora* sp. e *Annona squamosa* demonstra que o patógeno possui uma estratégia de infecção altamente agressiva. A coexistência de picnídios e peritécios, com liberação de esporos via cirros, assegura a disseminação eficiente e a persistência do inóculo no campo.

A colonização de toda a folha, que atinge inclusive os tecidos vasculares de xilema e floema, fundamenta o colapso estrutural e a severa necrose foliar que levam à desfolha precoce da cultura.

A capacidade do fungo de superar a barreira química imposta pelos compostos fenólicos sugere elevada capacidade infectiva do patógeno nesse patossistema. Este trabalho fornece subsídios importantes para futuras estratégias de manejo fitossanitário da pinha atacada por *Cryptophyllachora* sp..

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AbdElgawad H, Avramova V, Baggerman G, Raemdonck GV, Valkenborg D, Ostade XV, Guisez Y, Prinsen E, Asard H, Ende WV, Beemster GTS (2020) Starch biosynthesis contributes to the maintenance of photosynthesis and leaf growth under drought stress in maize. *Plant Cell Environ* 43:2254–2271. <https://doi.org/10.1111/pce.13813>

Agrios GN (2008) *Fitopatologia* (5ª ed.). Burlington: Elsevier Academic Press.

- Ashu EE, Xu J (2015) The roles of sexual and asexual reproduction in the origin and dissemination of strains causing fungal infectious disease outbreaks. *Infect Genet Evol* 36:199-209. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.09.019>
- Bakker ME, Gerritsen AF (1992) Oil and mucilage cells in *Annona* (Annonaceae) and their systematic significance. *Blumea*: 36:411–438.
- Beardmore J, Ride JP, Granger JW (1983) Cellular lignification as a factor in the hypersensitive resistance of wheat to stem rust. *Physiol Plant Pathol* 22:209–220. [https://doi.org/10.1016/S0048-4059\(83\)81010-8](https://doi.org/10.1016/S0048-4059(83)81010-8)
- Braga ZV, Muniz LF, Manarim GR, Aguiar CR, Glória BA (2021) Anatomical and biochemical changes in leaves of *Vitis labrusca* L. cv. Niagara Rosada in response to infection by *Elsinoë ampelina* Shear. *Braz J Bot* 44:187–196. <https://doi.org/10.1007/s40415-020-00677-6>
- Braga ZV, Santos RF, Amorim L, Glória BA (2019) Histopathology of infection and colonisation of *Elsinoë ampelina* on grapevine leaves. *Eur J Plant Pathol* 54:1009–1019. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01721-2>
- Cho Y-G, Kang K-K (2020) Functional analysis of starch metabolism in plants. *Plants* 9:1152. <https://doi.org/10.3390/plants9091152>
- Coll N, Epple P, Dangl J (2011) Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ*, 18:1247–1256. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.37>
- Costa, JFO, Kamei, SH, Silva, JRA, Miranda, ARG, Netto, MB, Silva, SJC, Correia KC, Lima GSA, Assunção IP (2019) Species diversity of *Colletotrichum* infecting *Annona* spp. in Brazil. *Eur J Plant Pathol* 153:1119–1130 <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01630-w>
- Dias MG, Spósito MB, Tessmer MA, Appezzato-da-Glória B (2023) Investigating biochemical and histopathological responses between raspberries and *Aculeastrum americanum*. *J Fungi* 9:337. <https://doi.org/10.3390/jof9030337>
- Fan CL, Wang XY, Jiang ZE, Yin QS, Yang ZQ, Xu DY., Lu YC, Tan DJ, Wei YR, Fu C, Jiang T, Fan JL (2025) First report of anthracnose on *Annona squamosa* caused by *Colletotrichum fructicola* in China. *Plant Dis* 109:935. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-24-1967-PDN>
- Ferreira RB, Monteiro S, Freitas R, Santos CN, Chen Z, Batista LM, Teixeira AR (2006) Fungal Pathogens: The Battle for Plant Infection. *Crit Rev Plant Sci* 25:505–524. <https://doi.org/10.1080/07352680601054610>
- Glass NL, Schmoll M, Cate JHD, Coradetti S (2013) Plant cell wall deconstruction by Ascomycete fungi. *Annu Rev Microbiol* 67:477-498. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150044>

- Griffiths E, Peverett H (1980) Effects of humidity and cirrus extract on survival of *Septoria nodorum* spores. *Trans Br Mycol Soc*, 75:147-150. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(80\)80205-1](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(80)80205-1)
- Huang Q, Wan J, Li X, Zhao S, Liu G, Li Y, Xiao S (2025) First report of *Phakopsora cherimoliae* causing rust disease on *Annona squamosa* in China. *Plant Dis* 109:2241-2450. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-25-0817-PDN>
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137–138.
- Khanday AH, Badroo IA, Wagay NA, Rafiq S (2024) Role of Phenolic Compounds in Disease Resistance to Plants. In: Lone R, Khan S, Mohammed Al-Sadi A (eds) *Plant Phenolics in Biotic Stress Management*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-99-3334-1_19
- Kumar S, Abedin MM, Singh AK, Das S (2020). Role of Phenolic Compounds in Plant-Defensive Mechanisms. In: Lone R, Shuab R, Kamili A (eds) *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture*. Springer, Singapore, 517–532. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1_22
- Leitão CAE (2018) Working optimally with serial sections in glycol-methacrylate resin. *Braz Arch Biol Technol* 61. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018180103>
- Leitão CAE (2021) Craftsmanship and low-cost machines and abrasives for sharpening steel knife with C edge, and procedures for obtaining 3 µm thick glycol-methacrylate resin sections. *Perspect Ciênc Tecnol*, 13:174–196. <https://doi.org/10.22407/1984-5693.2021.v13.p.174-196>
- Madhushan A, Weerasingha DB, Ilyukhin E, Taylor PWJ, Ratnayake AS, Liu JK, Maharachchikumbura SSN (2025) From natural hosts to agricultural threats: The Evolutionary Journey of Phytopathogenic Fungi. *J Fungi* 11. <https://doi.org/10.3390/jof11010025>
- Maia VT (1979) *Técnica Histológica*. Atheneu, São Paulo.
- McManus JFA (1948) Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol* 23:99–108. <https://doi.org/10.3109/10520294809106232>
- Mondal AH, Parbery DG (2005) The protective role of the spore matrix of *Colletotrichum musae* during rehydration and exposure to extreme temperatures and UV radiation. *Australas Plant Pathol* 34:229–235. <https://doi.org/10.1071/AP05030>
- Moura EA, Chagas PC, Oliveira RR, Taveira DLL, Grigio ML, Araújo WF (2021) Determination of the harvest time of sugar apples (*Annona squamosa* L.) in function of carpel interspace. *Acta Sci Agron* 43. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v43i1.48732>
- Niks RE, Rubiales D (2002) Potentially durable resistance mechanisms in plants to specialised fungal pathogens. *Euphytica* 124:201–216. <https://doi.org/10.1023/A:1015634617334>

- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368–373. <https://doi.org/10.1007/BF01248568>
- Presti LL, Lanver D, Schweizer D, Tanaka S, Liang L, Tollot M, Zuccaro A, Reissmann S, Kahmann R (2015) Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu Rev Plant Biol* 66:513-545. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114623>
- Qu J, Zou, X Yu J, Zhou Y (2017) The conidial mucilage, natural film coatings, is involved in environmental adaptability and pathogenicity of *Hirsutella satumaensis* Aoki. *Sci Rep* 1301. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01368-1>
- Rashad Y, Aseel D, Hammad S (2020) Phenolic Compounds Against Fungal and Viral Plant Diseases. In: Lone R, Shuab R, Kamili A (eds) *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture*. Springer, Singapore, 201–219. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1_9
- Ribeiro VC, Leitão CAE (2020) Utilisation of Toluidine blue O pH 4.0 and histochemical inferences in plant sections obtained by free-hand. *Protoplasma* 257:993–1008. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01473-0>
- Rojas CM, Senthil-Kumar M, Tzin V, Mysore KS (2014) Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Front Plant Sci* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00017>
- Shalaby S, Horwitz BA (2015) Plant phenolic compounds and oxidative stress: integrated signals in fungal–plant interactions. *Curr Genet* 61:347–357. <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0458-6>
- Singh, M.K., Shankar, U., Mishra, S., Maurya, A., Bawitlung, L., Singh, S., Kumar, P., Pal A, Tandon S, Verma RS (2025) Chemical analysis and biological activity evaluation of custard apple (*Annona squamosa* L.) fruit waste derived essential oil and supercritical carbon dioxide extract. *Waste Biomass Valoriz* 16:6593–6604. <https://doi.org.ez84.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s12649-025-03074-w>
- Smith AM, Zeeman SC (2020) Starch: A flexible, adaptable carbon store coupled to plant growth. *Annu Rev Plant Biol* 71:217-245. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100241>
- Zulperi D, Saad N, Ismail SI, Johari MIH (2026) *Annonas: Botany, Production and Uses*. CABI Digital Library 193–206. <https://doi.org/10.1079/9781800627628.0011>

ARTIGO III

Escala diagramática para avaliação da severidade da pinta preta em folhas de pinha*

***Situação:** não submetido

Escala diagramática para avaliação da severidade da pinta preta em folhas de pinha

RESUMO

A demanda pelo cultivo da fruta-do-conde (*Annona squamosa*) tem crescido, evidenciando sua importância socioeconômica no Brasil. Contudo, doenças como a pinta preta (*Cryptophyllachora* sp.) têm causado perdas significativas na produtividade dessa cultura. Para avaliar a intensidade da pinta preta em pomares de pinha, é necessário desenvolver escalas diagramáticas que auxiliem na avaliação precisa e padronizada da severidade da doença, reduzindo, assim, a subjetividade das estimativas. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar uma escala diagramática para avaliação da severidade da pinta preta em folhas de pinha. Regressão linear e coeficiente de correlação de concordância de Lin foram utilizados para avaliar a confiabilidade e a precisão dos avaliadores. Quarenta e sete folhas naturalmente infectadas, com diferentes níveis de severidade, foram utilizadas em um pomar localizado no município de Caetanos, BA, Brasil. A proporção da área foliar infectada foi determinada utilizando o *software* ImageJ, permitindo a quantificação da severidade da doença. Assim, desenvolveu-se uma escala diagramática com oito níveis de severidade (1,1, 1,6, 2,4, 3,7, 5,5, 8,3, 12,1, 17,5%), sendo 1,1% a menor e 17,5% a maior severidade observada em campo. Para validação, oito avaliadores realizaram duas avaliações: uma sem a escala e outra sete dias depois, utilizando a escala desenvolvida. O uso da escala melhorou a precisão ($r = 0,69$ e $0,14$, com e sem a escala) e a acurácia, evidenciada pelo fator de correção de viés ($C_b = 0,93$ e $0,36$, com e sem a escala) dos avaliadores. A concordância interavaliadores foi superior nas estimativas de gravidade realizadas com a escala ($ICC = 0,78$; $OCC = 0,73$), em comparação com as avaliações sem o seu uso ($ICC = 0,45$; $OCC = 0,18$). Assim, a escala diagramática desenvolvida mostrou-se eficaz para estimar a gravidade da pinta preta da pinha, fornecendo estimativas de gravidade da doença mais precisas, padronizadas e reproduzíveis.

Palavras-chave: *Annona squamosa*, *Cryptophyllachora* sp., Avaliação de doenças, Fitopatometria.

ABSTRACT

The demand for sugar apple (*Annona squamosa*) cultivation has been growing, highlighting its socioeconomic importance in Brazil. However, diseases such as black spot (*Cryptophyllachora* sp.) have caused significant yield losses in this crop. To assess the intensity of black spot in sugar apple orchards, it is necessary to develop diagrammatic scales that aid in the accurate and standardized evaluation of disease severity, thereby reducing the subjectivity of estimates. The objective of this study was to develop and validate a diagrammatic scale for assessing the severity of black spot on sugar apple leaves. Linear regression and Lin's concordance correlation coefficient approaches were used to evaluate the reliability and precision of raters. Forty-seven naturally infected leaves with different severity levels were used from an orchard located in the municipality of Caetanópolis, BA, Brazil. The proportion of the infected leaf area was determined using the ImageJ software, allowing for the quantification of disease severity. Thus, a diagrammatic scale with eight severity levels (1.1, 1.6, 2.4, 3.7, 5.5, 8.3, 12.1, 17.5%) was developed, with 1.1% being the lowest and 17.5% being the highest severity observed in the field. For validation, eight raters performed two assessments: one without the scale and another, seven days later, using the developed scale. The use of the scale improved the precision ($r = 0.69$ and 0.14 , with and without the scale) and the accuracy, evidenced by the bias correction factor ($C_b = 0.93$ and 0.36 , with and without the scale) of the raters. Inter-rater agreement was superior in the severity estimates performed with the scale (ICC = 0.78; OCC = 0.73), compared to assessments without its use (ICC = 0.45; OCC = 0.18). Thus, the developed diagrammatic scale proved effective for estimating the severity of sugar apple black spot, providing more accurate, standardized, and reproducible disease severity estimates.

Keywords: *Annona squamosa*, *Cryptophyllachora* sp., Disease assessment, Phytotometry.

5.1 INTRODUÇÃO

A família Annonaceae compreende cerca de 130 gêneros e 2300 espécies de árvores e arbustos (Moreira et al. 2013). As espécies de Annonaceae são proeminentes em muitas regiões do Brasil e do mundo, notadamente pela produção de frutos comercialmente atrativos, como a pinha (*Annona squamosa* L.).

Apesar do crescente comércio e da demanda, problemas fitossanitários têm levado a perdas significativas na produção e na qualidade dos frutos (Thite et al. 2024). Entre esses problemas, a pinta preta, causada pelo fungo *Cryptophyllachora* sp., é particularmente notável por sua alta incidência e sintomas severos no campo (Figura 1).



Fig. 1 Sintomas de pinta preta (*Cryptophyllachora* sp.) em folhas de *Annona squamosa*.

Em plantas de pinha, a pinta preta compromete o desenvolvimento foliar e a eficiência fotossintética. Folhas infectadas exibem lesões arredondadas de coloração marrom-clara e com bordos escurecidos e podem cair prematuramente (Bezerra et al. 2006). Com a desfolha, conseqüentemente, ocorre a redução na produção e qualidade dos frutos formados, o que tem desmotivado muitos agricultores a continuar com o cultivo desta cultura. As doenças foliares representam um dos principais desafios para a produção agrícola, afetando a saúde das plantas e reduzindo significativamente a produtividade das culturas. A quantificação de doenças de plantas é fundamental para o estudo e análise de epidemias, bem como para a avaliação de diferentes estratégias de manejo no campo e

comparação de variedades quanto à resistência (Madden et al. 2007).

A avaliação visual da severidade de doenças foliares é uma prática comum no campo, porém está sujeita a altos graus de subjetividade, variações entre avaliadores e tendência à superestimação ou subestimação da severidade da doença (Bock et al. 2022). As estimativas de porcentagem dependem da percepção de cores no espectro visível, precisando identificar os sintomas e atribuir valores percentuais próximos ao valor da severidade real da doença (Bock et al. 2020). Para minimizar esses problemas, o desenvolvimento de escalas diagramáticas tem se mostrado uma ferramenta essencial.

Escalas diagramáticas são representações visuais que padronizam a avaliação da severidade das doenças, fornecendo uma referência objetiva para avaliadores, independentemente de sua experiência (Del Ponte et al. 2017). Diversos estudos demonstram que o uso de escalas diagramáticas melhora a precisão e a acurácia das avaliações, contribuindo para uma gestão mais eficaz das doenças e para a tomada de decisões de manejo fitossanitário (Chiang e Bock 2022; Del Ponte et al. 2017).

Apesar de sua importância, ainda não existe uma escala diagramática desenvolvida especificamente para a avaliação da pinta preta em pinha, o que destaca a necessidade de ferramentas que contemplem as particularidades dessa doença. Diante desse contexto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e validar uma escala diagramática para a avaliação da severidade da pinta preta em folhas de pinha. A nova escala visa reduzir a variabilidade nas estimativas visuais e aumentar a confiabilidade dos dados obtidos, oferecendo um recurso valioso para pesquisadores e agricultores na identificação e manejo da doença.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Para desenvolver os diagramas, foram coletadas folhas de plantas de pinha, naturalmente infectadas por *Cryptophyllachora* sp., apresentando diferentes níveis de severidade de pinta preta. As folhas foram coletadas em áreas de produção localizadas no município de Caetanos, Bahia, Brasil, (14°25'S, 41°04' W, altitude de 378 m), durante a temporada 2022-2024. Posteriormente, quarenta e sete folhas de pinha naturalmente infectadas foram digitalizadas com uma impressora (HP Smart Tank 584, Brasil) sobre

um papel branco e ao lado uma folha de papel quadriculado, com dimensões conhecidas.

Para cada folha digitalizada, a proporção de área doente foi estimada por meio do *software* ImageJ, um *software* de código aberto utilizado para análise de imagens, comumente aplicado em estudos científicos para medir a área de interesse em imagens digitais (Schneider et al. 2012). Os valores mínimo e máximo de severidade observados nas amostras foram utilizados para determinar os limites inferior e superior da escala diagramática (SAD). A partir dos valores máximo e mínimo encontrados, foram determinados seis outros valores intermediários de severidade com base em incrementos logarítmicos (Horsfall e Barratt 1945; Kranz 1988; Bock et al. 2010).

Para o desenvolvimento da representação gráfica da escala diagramática, foi utilizado o *software* de edição de imagens PAINT (<https://www.microsoft.com/pt-br/p/paint>). Uma imagem representativa de uma folha de pinha foi utilizada como modelo. As características da folha, incluindo forma, tamanho e padrão espacial das lesões, foram cuidadosamente inseridas manualmente em cada diagrama, reproduzindo fielmente as lesões observadas em uma folha doente real.

5.2.1 Validação da escala diagramática de área padrão (SAD)

Um grupo de oito avaliadores, com e sem experiência, avaliaram as mesmas 47 imagens das folhas utilizadas para a confecção da escala, com diferentes intensidades da doença. Para validar a SAD, foram fornecidas instruções sobre como reconhecer os sintomas e como avaliar a severidade da pinta preta da pinha (porcentagem de área foliar sintomática).

As imagens foram exibidas de maneira aleatória, em *slides* individuais no *software* *Microsoft PowerPoint*, durante duas etapas distintas. Na primeira etapa, os avaliadores procederam a avaliação da severidade da doença sem utilizar a SAD. Uma semana depois, na segunda etapa, os avaliadores repetiram o processo, porém, desta vez, utilizando a SAD para fornecer estimativas sobre o mesmo conjunto de imagens.

5.2.2 Precisão de confiabilidade das estimativas

A precisão geral das estimativas, que se refere à proximidade das estimativas de

severidade com a severidade real (Madden et al. 2007; Bock et al. 2016), foi determinada para cada avaliador e condição (sem e com SAD) (Without, with SAD) com base no coeficiente de correlação de concordância de Lin (LCC, pc; Lin 1989), conforme sugerido para dados de doenças de plantas (Madden et al. 2007; Bock et al. 2010). Além disso, os componentes de precisão (precisão e fator de correção de viés) foram explorados para investigar as ramificações dos erros.

5.2.3 Comparação da precisão e confiabilidade entre os métodos

Um modelo linear misto generalizado foi ajustado aos dados dos parâmetros do LCC para cada avaliador. As avaliações (Sem, Com SAD) foram consideradas efeitos fixos e os avaliadores foram considerados efeitos aleatórios no modelo. As médias dos mínimos quadrados de cada parâmetro do LCC, sob as condições dos métodos de avaliação, foram comparadas usando-se o teste de Tukey com um nível de significância de 5%.

A confiabilidade ou reprodutibilidade interavaliadores foi avaliada por dois métodos diferentes: o coeficiente de correlação intraclasse (CCI; Shoukri e Pause 1999) e a correlação de concordância geral (CCG), que é um método aprimorado do LCC para múltiplos avaliadores (Barnhart et al. 2002). Os CCIs foram comparados com base no intervalo de confiança.

A relação entre o erro (desvio) das estimativas (gravidade estimada - gravidade verdadeira) e a gravidade verdadeira, bem como a distribuição de densidade dos erros de estimativa foram retratadas para cada avaliação (Sem, Com SAD). Por fim, explorou-se a relação entre o ganho/perda (SAD - Sem) na precisão geral e na precisão basal (Sem) para cada avaliador.

5.2.4 Análise estatística

Todo o processamento e análise de dados, bem como os gráficos foram realizados utilizando-se o *software* R (R Development Core Team, 2024). O pacote Tidyverse (Wickham et al. 2019) foi utilizado para preparação, transformação e visualização dos dados. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando-se os pacotes lme4, emmeans,

epiR, irr, car e broom.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Desenvolvimento da escala diagramática de área padrão (SAD)

O SAD foi desenvolvido com o propósito de abranger a totalidade da escala de severidade da pinta preta da pinha, conforme observado em condições de campo. Foram estabelecidos oito níveis intermediários de severidade, a partir de 47 folhas (Tabela 1), os quais representam as diferentes fases da progressão da doença, variando de 1,1 a 17,5%, com valores intermediários de 1,6; 2,4; 3,7; 5,5; 8,3 e 12,1% (Figura 2).

Tabela 1 - Distribuição de frequência dos valores de severidade em intervalos unitários (%) da pinta preta da pinha (*Cryptophyllachora* sp.)

Grau do intervalo (%)	Frequência	Frequência acumulada
0-1,1	1	1
1,2-1,6	1	2
1,7-2,4	1	3
2,5-3,7	10	13
3,8-5,5	9	22
5,6-8,3	9	31
8,4-12,1	11	42
12,2-17,5	5	47

As imagens representam a superfície adaxial das folhas de pinha, onde os sintomas da infecção por *Cryptophyllachora* sp. são mais evidentes. O estágio inicial da infecção é caracterizado por pequenas lesões de coloração marrom-clara, com bordas mais escuras, distribuídas ao longo da lâmina foliar. Com o avanço da doença, as lesões aumentam em número e tamanho, frequentemente rompendo o tecido central das áreas afetadas. À medida que a doença progride, observa-se a coalescência das lesões, formando áreas necrosadas maiores. Essas características foram fielmente reproduzidas nos diagramas da escala, refletindo o padrão natural de evolução da doença em campo.

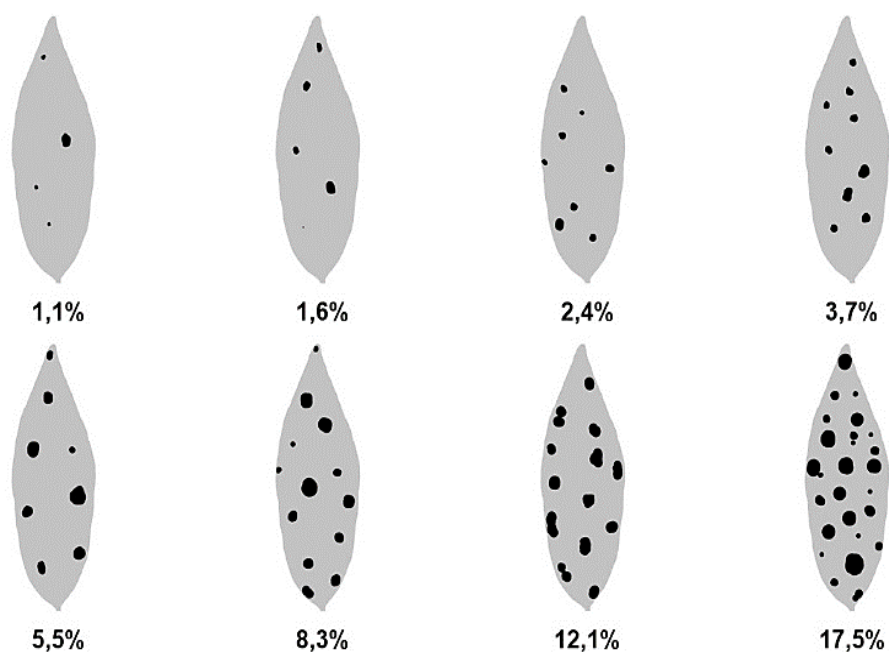


Fig. 2 Escala diagramática de área padrão desenvolvida para avaliar a severidade da pinta preta da pinha (*Cryptophyllachora* sp.) em folhas. As manchas pretas representam os sintomas encontrados na superfície adaxial das folhas. Cada valor representa a percentagem de severidade da pinta preta da pinha.

5.3.2 Validação da escala diagramática

Verificou-se uma relação linear positiva entre as estimativas visuais de severidade da pinta-preta, obtidas com e sem a utilização da escala diagramática, em comparação com os valores de severidade real. Contudo, a aplicação da escala resultou em estimativas mais acuradas da área foliar lesionada, apresentando maior proximidade em relação aos valores observados (Figura 3a). No que se refere ao erro de estimativa (estimado – real), observou-se redução consistente com o emprego da SAD (Figura 3b). Sem a utilização da escala, os resíduos apresentaram amplitude de –10 a 82,9, enquanto, com a adoção da SAD proposta para a pinta-preta, essa variação foi restringida ao intervalo de –9,6 a 7, evidenciando maior precisão e menor dispersão dos dados em torno de zero (Figura 3b).

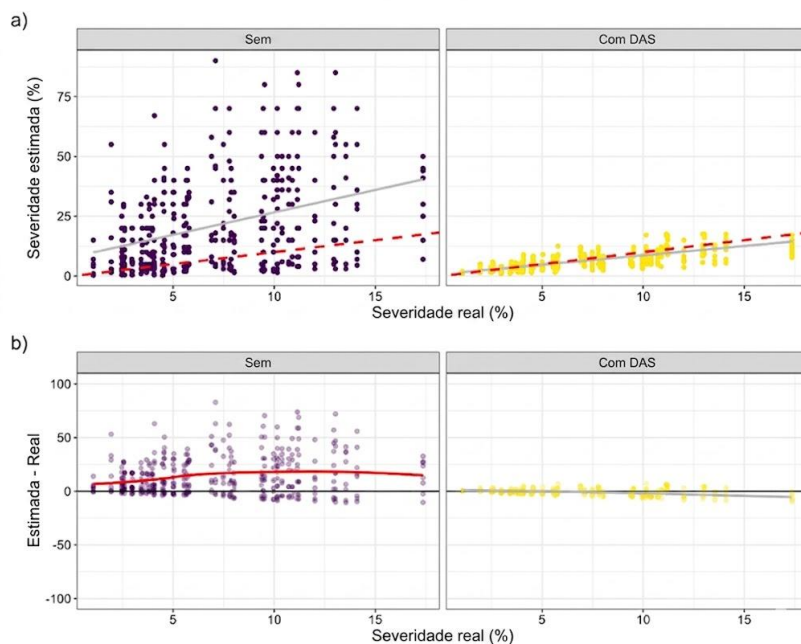


Fig. 3 Validação da escala diagramática. a. Relação entre a severidade real e estimada da pinta preta em folhas de pinha sem escala e com escala; b. Relação entre o erro (estimativa - real) das estimativas visuais e estimativas reais (baseadas em *software*) da severidade da pinta preta em folhas de pinha. Em (a) a linha sólida representa a linha de regressão de melhor ajuste (cinza), a linha pontilhada (vermelha) é linha de concordância (inclinação de 1, intercepto de 0). A linha suave (vermelha) em (b) é o resultado do ajuste da regressão polinomial.

A análise do box-plot, referente às estatísticas dos parâmetros do coeficiente de correlação de concordância de Lin (LCC) para as estimativas de severidade, evidenciou maior exatidão e precisão das avaliações realizadas com o uso da SAD proposta. A utilização da escala resultou em menor amplitude dos valores dos parâmetros do LCC entre os avaliadores, indicando maior consistência nas estimativas. Ademais, os valores obtidos aproximaram-se dos parâmetros de referência ($\mu = 0$, $v = 1$, $C_b = 1$, $r = 1$ e $\rho_c = 1$), demonstrando maior concordância com os valores reais de severidade (Figura 4).

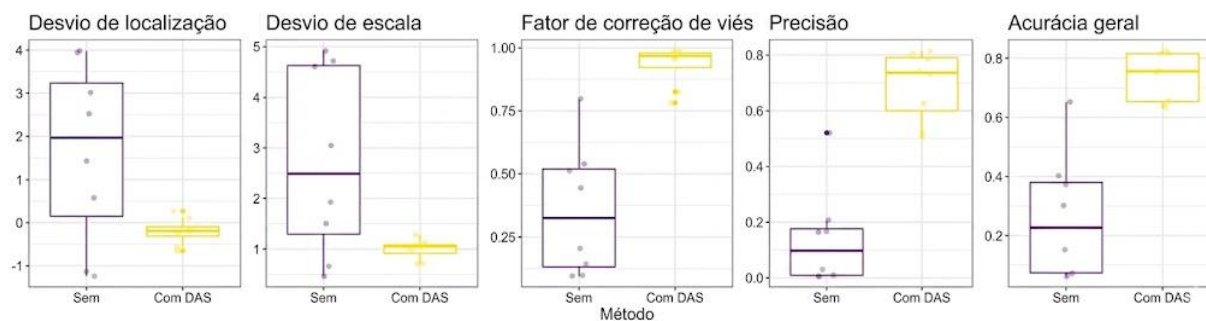


Fig. 3 Box-plot das estatísticas dos parâmetros do coeficiente de correlação de concordância de lin (LCC) para as estimativas da severidade dos avaliadores sem escala e com escala.

Nas avaliações realizadas com a utilização da SAD, observou-se melhora expressiva nos parâmetros do coeficiente de correlação de concordância de Lin (LCC), que se apresentaram mais próximos dos valores de referência, em comparação às estimativas obtidas sem o uso da escala. A maior acurácia das estimativas com a SAD foi evidenciada pelo fator de correção dos desvios ($C_b = 0,93$), associado à maior precisão ($r = 0,69$), o que resultou em concordância global superior ($\rho_c = 0,74$). Por outro lado, nas avaliações sem a utilização da escala, verificou-se maior variabilidade dos parâmetros do LCC (μ , v , C_b , r e ρ_c), indicando inconsistência entre os avaliadores. Já com a aplicação da SAD, a menor amplitude dos parâmetros reforçou a maior estabilidade das estimativas, confirmando a redução do erro (estimado – real) e, conseqüentemente, a maior acurácia e precisão na quantificação da severidade da doença (Tabela 2).

Tabela 2 - Modelo linear generalizado misto para análises estatísticas dos parâmetros do coeficiente de correlação de concordância de Lin (LCC) que representa a precisão (types of bias), precisão (coeficiente de correlação) das estimativas percentuais de severidade da pinta preta da pinha por 8 avaliadores, sem escala ou com uso da escala

Método	N	U	v	Cb	r	Pc
Sem escala	8	1,64 b	2,73 b	0,36 b	0,14 b	0,26 b
Com escala	8	- 0,20 a	0,99 a	0,93 a	0,69 a	0,74 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes. (Tukey HSD com nível de significância de 5%);

Deslocamento de localização (u, 0 = sem viés em relação à linha de concordância);

Deslocamento de escala (v, 1 = sem viés em relação à linha de concordância);

Fator de correção de viés (Cb) mede o quanto a linha de melhor ajuste se desvia de 45° e é uma medida de precisão;

Coefficiente de correlação como medida de precisão (r);

Coefficiente de correlação de concordância de Lin (LCC), que combina medidas de precisão (r) e precisão (Cb) para medir a precisão geral (concordância) com o valor verdadeiro.

Com base nos resultados das análises estatísticas (ICC e OCC), verificou-se melhoria geral na confiabilidade entre avaliadores, quando utilizada a SAD. A concordância interavaliadores, expressa pelos valores de ICC e OCC, foi superior nas estimativas de severidade realizadas com a escala (ICC = 0,78; OCC = 0,73), em comparação às avaliações sem sua utilização (ICC = 0,45; OCC = 0,18). Esses resultados evidenciam que a aplicação da SAD aumentou substancialmente a consistência e a confiabilidade das estimativas de severidade entre avaliadores (Tabela 3).

Tabela 3 - Medidas de confiabilidade entre avaliadores de estimativas da severidade por 8 avaliadores durante avaliação sem e com escala como auxílio para avaliação da severidade da pinta preta em folhas de pinha

Método	Coefficiente de correlação intraclasse (ICC) ^p [95% CI] ^a	Correlação de concordância geral (OCC) ^b
Sem escala	0,45 [0,34 – 0,59]	0,18
Com escala	0,78 [0,70 - 0,85]	0,73

^a Calculado com base nas decisões do modelo ICC (Schwanck e Del Ponte, 2014).

^b Estatísticas gerais de concordância baseadas em Lin (1989) e Barnhart et al. (2002) para avaliar a concordância entre múltiplos observadores.

5.4 DISCUSSÃO

Este estudo representa a primeira abordagem focada no desenvolvimento e validação de uma escala diagramática destinada à avaliação da pinta preta em folhas de pinha. Apesar de apresentar baixos níveis de severidade, a doença pode alcançar uma incidência potencial de 100% em condições severas, o que pode comprometer significativamente a produtividade, visto que a área com sintomas visíveis representa apenas um dos indicadores da doença, não correspondendo à totalidade da área colonizada. A área colonizada é maior, pois abrange o crescimento do fungo, tanto nas regiões intracelulares quanto intercelulares do tecido foliar, o que não é detectável a olho

nu. A progressão da doença resulta na queda das folhas infectadas, o que explica a ausência de áreas maiores com sintomas visíveis em estágios avançados, assim como ocorre com a ferrugem do cafeeiro, como descrito por Figueiredo et al. (2022).

A avaliação visual da severidade da pinta preta na pinha ainda é limitada pela escassez de estudos, dado que esta doença é pouco investigada, o que justifica a necessidade de ferramentas padronizadas de monitoramento. A criação da escala diagramática neste estudo representa um avanço significativo, pois oferece uma metodologia precisa para estimar a severidade da doença de forma mais objetiva. A implementação desta ferramenta auxiliará no monitoramento, visto que atualmente não há nenhum método de avaliação padronizado para avaliação da pinta preta da pinha. Contribuirá também para o desenvolvimento de estratégias de manejo mais eficazes e para a implementação de medidas preventivas ou de controle, minimizando os impactos da doença na produção de pinha, pois aumentará a confiabilidade dos estudos epidemiológicos e de manejo da doença.

A escala diagrama (SAD) que foi desenvolvida é considerada representativa, uma vez que foi construída com base em amostras de folhas naturalmente infectadas em condições de campo, isentas de quaisquer outros danos que possam afetar a avaliação. Foi então estabelecido oito níveis de severidade (1,1% a 17,5%) para abranger a totalidade da faixa de sintomas observados. Além disso, todas as diretrizes propostas nas práticas para a validação de escalas diagramáticas foram rigorosamente seguidas (Del Ponte et al. 2017), sendo adotada uma representação de folha de pinha com oito níveis de severidade ilustrando as áreas sintomáticas (pretas) e áreas assintomáticas (cinzas).

Os resultados indicam que a escala diagramática, desenvolvida para avaliar a severidade da pinta preta da pinha, oferece uma ferramenta precisa e acurada para a estimativa da severidade da doença foliar causada por *Cryptophyllachora* sp.. A SAD demonstrou um desempenho significativamente superior às avaliações realizadas sem o auxílio da escala, proporcionando maior acurácia e precisão.

A análise de regressão linear confirmou a eficácia da SAD, com melhor precisão e acurácia entre os avaliadores, o que é evidenciado pela proximidade dos valores de concordância da inclinação (1) e do intercepto (0). Esses resultados corroboram outros

estudos que destacam a importância das escalas diagramáticas como ferramentas na padronização das avaliações de diversos patossistemas, reduzindo a variabilidade entre avaliadores, como cancro do caule (*Neoscytalidium dimidiatum*) na pitaya (Dutra et al. 2024), ferrugem (*Hemileia vastatrix*) no café (Figueiredo et al. 2022), estria bacteriana foliar (*Xanthomonas vasicola*) no milho (Braga et al. 2020), mancha-alvo (*Corynespora cassiicola*) no algodão (Fantin et al. 2018), mancha angular (*Pseudocercospora griseola*) em feijão (Librelon et al. 2015).

A redução significativa nos erros das estimativas, ao utilizar a SAD, reflete uma melhoria na estimativa da severidade da doença. Todas as estimativas da severidade realizadas pelos avaliadores com o auxílio da SAD estavam mais próximas dos valores reais, enquanto as avaliações sem o auxílio da escala apresentaram grande variação. Os resíduos sem o uso da escala variaram de -10 a 82,9, enquanto com o auxílio da escala, essa amplitude foi reduzida significativamente, ficando entre -9,6 a 7. Isso demonstra que a SAD não só minimiza a tendência de superestimação ou subestimação dos sintomas observados, mas, também, promove uma maior concordância entre os avaliadores e a severidade real da doença. Estes resultados são consistentes com outros estudos que demonstram que amplitudes residuais mais baixas indicam melhor precisão e eficácia de escalas diagramáticas, pois reduz a variabilidade entre as avaliações (Nutter e Schultz 1995; Librelon et al. 2015; Camargo et al. 2019; Dias et al. 2022).

Esses resultados são consistentes com a literatura, que frequentemente destaca a importância das escalas diagramáticas na melhoria da precisão das estimativas visuais (Del Ponte et al. 2017; Pereira et al. 2020; Dias et al. 2022). A precisão aprimorada, proporcionada pela SAD, tem implicações práticas significativas, especialmente para programas de manejo integrado de doenças, cuja avaliação acurada da severidade é crucial para a tomada de decisões eficazes de controle (Correia et al. 2017).

Embora as análises de regressão linear sejam o método tradicionalmente empregado para determinar a precisão e a acurácia das estimativas de severidade de doenças em estudos de validação de escalas diagramáticas (Braga et al. 2020), tem-se utilizado também o coeficiente de correlação de concordância de Lin (LCC). Este coeficiente se destaca por oferecer uma medida integrada, avaliando simultaneamente a

precisão e a acurácia do grau de concordância entre os avaliadores (Fantin et al. 2018; Braga et al. 2020).

Portanto, o uso destes dois métodos em conjunto possibilita verificar com maior confiabilidade os resultados provenientes do uso da escala diagramáticas. A análise comparativa revelou que os dois métodos geraram resultados similares, o que atesta o aprimoramento das avaliações de gravidade com o uso da escala SAD.

A aplicação da escala proposta resultou em uma redução na amplitude dos valores dos parâmetros de LCC entre os avaliadores. Essa menor variação indica uma maior confiabilidade das estimativas. Sendo assim, a escala demonstrou sua eficácia ao aprimorar as estimativas de concordância entre os avaliadores, indicando que diferentes avaliadores tendem a gerar resultados mais próximos ao analisar a mesma amostra. Resultados similares foram encontrados em estudos anteriores, como os de Braga et al. (2020) e Hilton et al. (2024).

Além disso, a maior precisão (r) foi observada com o uso da SAD, que atingiu 0,69, evidenciando a confiabilidade da escala como uma ferramenta indispensável e indicando que a ferramenta não apenas padroniza as avaliações, mas também reduz a subjetividade inerente às estimativas visuais. Assim, a SAD desenvolvida neste estudo se revela uma ferramenta valiosa para a avaliação da severidade da pinta preta da pinha, com aplicações práticas em estudos epidemiológicos e no controle da doença.

A escala diagramática, desenvolvida para avaliar a severidade da pinta preta da pinha, demonstrou ser uma ferramenta importante, pois elevou os níveis de exatidão e precisão das avaliações. A obtenção precisa de dados de doenças é essencial para evitar conclusões equivocadas que possam resultar em decisões de manejo inadequadas (Bock et al. 2010). Além disso, a precisão nas avaliações viabiliza o desenvolvimento e a implementação de novas técnicas de manejo, como a definição do momento ideal para aplicação de fungicidas.

Dessa forma, a implementação da escala diagramática proposta tem o potencial de contribuir com as avaliações da pinta preta em folhas de pinha, pois possibilita melhorar a confiabilidade interavaliador e intravaliador, além de aumentar a precisão das medições.

5.5 CONCLUSÕES

Neste estudo, a aplicação da escala diagramática, desenvolvida para avaliar a severidade da pinta preta em plantas de pinha, mostrou ser uma ferramenta eficaz e confiável. A escala proposta permitiu uma avaliação mais precisa, exata e reprodutível da doença, melhorando significativamente a acurácia das estimativas realizadas.

Isto destaca a escala como uma ferramenta valiosa para o manejo fitossanitário da cultura da pinha, contribuindo para diagnósticos mais confiáveis e estratégias de controle mais eficazes, beneficiando produtores e pesquisadores na mitigação dos impactos causados por *Cryptophyllachora* sp..

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barnhart HX, Haber M, Song J (2002) Overall concordance correlation coefficient for evaluating agreement among multiple observers. *Biomet*, 58:1020–1027. <https://doi.org/10.1111/j.0006-341X.2002.01020>

Bezerra JL, Freire FCO, Andrade D (2006) A new *Ophiodothella* species associated with leaf spots on *Annona squamosa* in Brazil. *Fit brasil* 31:592-594. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582006000600009>

Bock CH, Chiang KC, Del Ponte EM (2016) Accuracy of plant specimen disease severity estimates: concepts, history, methods, ramifications and challenges for the future. *CAB Rev* 11:1–21. <https://doi.org/10.1079/PAVSNR201611032>.

Bock CH, Barbedo JGA, Del Ponte EM, Bohnenkamp D, Mahlein AK (2020) From visual estimates to fully automated sensor-based measurements of plant disease severity: status and challenges for improving accuracy. *Phytop Res*, 2, 9. <https://doi.org/10.1186/s42483-020-00049-8>

Bock CH, Chiang KS, Del Ponte EM (2022) Plant disease severity estimated visually: a century of research, best practices, and opportunities for improving methods and practices to maximize accuracy. *Trop Plant Pathol*, 47:25–42. <https://doi.org/10.1007/s40858-021-00439-z>

Bock CH, Poole GH, Parker PE, Gottwald TR (2010) Plant disease severity estimated visually, by digital photography and image analysis, and by hyperspectral imaging. *Crit Rev Plant Sci*, 29:59–107. doi:10.1080/07352681003617285

Braga K, Fantin LH, Roy JMT, Canteri MG, Custódio AAP (2020) Development and validation of a diagrammatic scale for the assessment of the severity of bacterial leaf

streak of corn. *Eur J Plant Pathol*, 157:367–375. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02008-7>

Camargo MP, Momesso BV, Hahn MH, Duarte HSS (2019) Development and validation of a standard area diagram set to estimate severity of grapevine downy mildew on *Vitis labrusca*. *Eur J Plant Pathol*, 155:1033–1038 <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01806-y>

Campbell CL, Madden LV (1990) *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. John Wiley & Sons, New York.

Chiang KS, Bock CH (2022) Understanding the ramifications of quantitative ordinal scales on accuracy of estimates of disease severity and data analysis in plant pathology. *Trop Plant Pathol* 47:58–73. <https://doi.org/10.1007/s40858-021-00446-0>

Del Ponte EM, Pethybridge SJ, Bock CH, Michereff SJ, Machado FJ, Spolti P (2017). Standard area diagrams for aiding severity estimation: Scientometrics, pathosystems and methodological trends in the last 25 years. *Phytopathol* 1–55. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-17-0069-FI>

Dias MG, Ribeiro RR, Barbosa CMA, Jesus JMI, Spósito MB (2022) Diagrammatic scale for improved late leaf rust severity assessments in raspberry leaves. *Can J Plant Pathol* 45:140–147. <https://doi.org/10.1080/07060661.2022.2147587>

Dutra PSS, Rocha MGC, Duarte HSS, Zhang S (2024) A standard area diagram set for assessing severity of dragon fruit (*Hylocereus spp.*) stem canker caused by *Neoscytalidium dimidiatum*. *Eur J Plant Pathol* 169:857–865 <https://doi.org/10.1007/s10658-024-02876-3>

Fantin LH, Braga K, Canteri MG, Dias AR, Borges EP (2018) Development and validation of diagrammatic scale to assess target spot severity in cotton. *Australas Plant Pathol* 47:491–497. <https://doi.org/10.1007/s13313-018-0576-6>

Figueiredo YF, Oliveira JM, Almeida KA, Pereira PF, Pedroso LA, Guimarães MRF, Costa MM, Pozza EA (2022) Coffee leaf rust assessment: comparison and validation of diagrammatic scales for *Coffea arabica*. *Eur J Plant Pathol* 164:411–427. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02570-2>

Horsfall JC, Barrat, RW (1945). An improved grading system for measuring plant diseases. *Phytopathol* 35:665.

Kranz J (1988) *Measuring Plant Disease*. In: Kranz J, Rotem J, editors. *Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology*. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer, pp 35–50. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-95534-1>

Librelon SS, Souza EA, Pereira R, Pozza EA, Abreu AFB (2015) Diagrammatic scale to evaluate angular leaf spot severity in primary leaves of common bean. *Australas Plant*

Pathol 44:385–395 <https://doi.org/10.1007/s13313-015-0360-9>

Lin LI (1989) A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometric* 45: 255-268. <https://doi.org/10.2307/2532051>

Madden LV, Hughes G, Van Den Bosch F (2007) *The Study of Plant Disease Epidemics*. <https://doi.org/10.1094/9780890545058>

Moreira IC, Roque NF, Vilegas, W, Zalewski CA, Lago JHG, Funasaki M (2013) Genus *Xylopi*a (Annonaceae): Chemical and Biological Aspects. *Chem Biodivers* 10: 1921-1943. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100308>

Nutter FW, Schultz PM (1995) Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. *Can J Plant Pathol* 17:174–184. <https://doi.org/10.1080/07060669509500709>

Pereira WEL, Andrade SMP, Del Ponte EM, Esteves MB, Canale MC, Takita MA, Coletta-Filho HD, Souza AA (2020) Severity assessment in the *Nicotiana tabacum*-*Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* pathosystem: design and interlaboratory validation of a standard area diagram set. *Trop Plant Pathol* 45:710–722. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00401-5>

R Development Core Team (2024) *R: The R Project for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Santos RF, Spósito MB (2018) Improving assessments of anthracnose severity on grapevine leaves through the development of a standard area diagram set. *Australas Plant Pathol* 47:357–364. <https://doi.org/10.1007/s13313-018-0566-8>

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675.

Shoukri MM, Pause CA (1999) *Statistical Methods for Health Science*, 2nd edition. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.

Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan LD, François R (2019) Welcome to the Tidyverse. *J Open Source Softw* 4:1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A etiologia da doença foi esclarecida, revelando que a pinta preta em *Annona squamosa* é causada por uma nova espécie de *Cryptophyllachora*. Esta descoberta é um marco científico, representando o primeiro registro mundial deste gênero em uma anonácea.

Através de análises filogenéticas multigenéticas (ITS, LSU e SSU), o patógeno foi posicionado na ordem Chaetosphaeriales, modificando identificações históricas baseadas apenas em morfologia, que o associavam à ordem Phyllachorales.

A investigação histopatológica demonstrou que o fungo possui alta virulência, realizando uma colonização de toda a área foliar que atinge os tecidos vasculares (xilema e floema). Essa invasão vascular justifica o colapso estrutural, a necrose severa e a desfolha observada no campo.

O patógeno apresenta um ciclo completo com a coexistência de fases assexuadas (picnídios) e sexuadas (peritécios). A liberação de esporos ocorre via cirros.

Embora a pinha ative mecanismos de defesa, como o acúmulo de compostos fenólicos, estes mostraram-se insuficientes para conter o avanço do fungo.

A escala diagramática desenvolvida mostrou-se uma ferramenta eficaz e confiável, elevando significativamente a acurácia, precisão e reprodutibilidade das avaliações de severidade da doença.

Estas conclusões fornecem a base científica essencial para o desenvolvimento de estratégias de manejo fitossanitário para a cultura da pinha no Brasil.