

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**

**ESTUDO DA OCORRÊNCIA E AGRESSIVIDADE DE
Mycosphaerella fijiensis NA BAHIA**

JULIANA BARROS RAMOS

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
FEVEREIRO - 2018**

ESTUDO DA OCORRÊNCIA E AGRESSIVIDADE DE *Mycosphaerella fijiensis* NA BAHIA

JULIANA BARROS RAMOS

Eng. Agrônoma

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2016.

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança

Coorientador: Dr. Fernando Haddad

Coorientador: Dr. Leandro de Souza Rocha

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

FEVEREIRO – 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

R175e

Ramos, Juliana Barros.

Estudo da ocorrência e agressividade de *Mycosphaerella fijiensis* na Bahia / Juliana Barros Ramos. – Cruz das Almas, BA, 2018.
62f.; il.

Orientador: Carlos Augusto Dórea Bragança.
Coorientador: Fernando Haddad.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Banana – Doenças e pragas. 2.Banana – Fitopatologia. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Rocha, Leandro Souza. III.Título.

CDD: 634.772

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**

**ESTUDO DA OCORRÊNCIA E AGRESSIVIDADE DE
Mycosphaerella fijiensis NA BAHIA**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
JULIANA BARROS RAMOS**

Realizada em 02 de Fevereiro de 2018

Prof. Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / UFRB
Examinador Interno (Orientador)

Dr. Hermínio Souza Rocha
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Examinador Externo

Dra. Thaís Emanuelle Feijó de Lima
Bolsista DCR-Fapesb/CNPq – UFRB
Examinador Externo

Aos meus amados pais, M^a das Graças e Joaquim por todo amor que me oferecem, por terem me ensinado a viver a vida com humildade e dignidade, por todo incentivo, perseverança e por sempre acreditarem no meu potencial.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida, por sempre me conduzir no caminho certo, fortalecendo-me principalmente nos momentos mais difíceis e por ter me dado à capacidade para concretização de mais esse sonho;

Aos meus pais M^a das Graças e Joaquim, que sempre me deram apoio e força na minha vida acadêmica, por todo amor e confiança, pelos ensinamentos e formação do meu caráter;

Ao meu orientador Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança pela orientação, oportunidade, conselhos e todos os ensinamentos transmitidos, contribuindo para o meu desenvolvimento pessoal e intelectual;

Aos meus coorientadores, Dr. Fernando Haddad e Dr. Leandro Rocha, pelo apoio, incentivo e ensinamentos contribuindo para minha formação acadêmica;

Ao Dr. Hermínio Rocha e Dr. Zilton Cordeiro pelos ensinamentos, acessibilidade em todos os momentos contribuindo com o desenvolvimento do trabalho;

A todos os meus amigos pela descontração e companheirismo, em especial Mariana, Diego, Milene, Josivania, Rodrigo, Davi, Renan, João Gabriel e ao “Sarau entre amigos” pelo afeto e ajuda na superação dos desafios;

A M^a de Fátima, M^a do Rosário, Paulo Henrique, Leandro Silva e Renan Bedra pelo apoio e ajuda na execução do trabalho;

Aos colegas e funcionários da Embrapa e Laboratório de Fitopatologia pela ajuda na execução do trabalho em especial Dr. Hermes, F. Paulo, Raimundo “Bizunga” e Rafael;

Aos meus amigos e colegas da Clínica Fitossanitária da UFRB em especial Carolina Yamamoto, Linika e Daniel;

Aos funcionários do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da UFRB, em especial Deyse, pela amizade e disposição.

Aos mestres do Curso de Pós-graduação em Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas da UFRB pelo conhecimento científico;

À Embrapa Mandioca e Fruticultura pela concessão do espaço e recursos financeiros para execução do trabalho;

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, por ter me concedido a oportunidade de cursar o mestrado;

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo aporte financeiro fundamental para o desenvolvimento do projeto;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, que oraram por mim, que torceram e me incentivaram.

Muito obrigada!

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso ou pessoas fracassadas. O que existe são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”

Augusto Cury

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

REFERENCIAL TEÓRICO..... 11

ARTIGO 1

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Mycosphaerella fijiensis*28

ARTIGO 2

AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Mycosphaerella fijiensis* EM CULTIVARES
DE BANANEIRA46

CONSIDERAÇÕES FINAIS62

ESTUDO DA OCORRÊNCIA E AGRESSIVIDADE DE *Mycosphaerella fijiensis* NA BAHIA

Autor: Juliana Barros Ramos

Orientador: Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança

RESUMO: A Sigatoka-negra, causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet) é uma das doenças mais importantes na cultura da bananeira por causar epidemias severas. Além disso, o patógeno é mais agressivo, quando comparado ao agente causal da Sigatoka-amarela. Requer alta frequência de aplicações de fungicidas para o controle e as principais cultivares comerciais de bananeira são suscetíveis. Desse modo, o objetivo deste estudo foi conhecer a distribuição e ocorrência de *M. fijiensis* e avaliar a agressividade de isolados de *M. fijiensis*, oriundos de diferentes municípios da Bahia, em quatro cultivares de bananeira que apresentam diferentes níveis de resistência. Para conhecer a distribuição e ocorrência, foram feitas coletas de folhas com sintomas de Sigatoka-negra. Após obtenção dos isolados, a identificação do patógeno se deu por meio da comparação de sequências de ITS e β -tubulina com sequências disponíveis no banco de dados do Genbank. Além disso, as sequências foram utilizadas para reconstruções filogenéticas. Os resultados obtidos nesse estudo evidenciam a ocorrência de *M. fijiensis* no estado da Bahia. Sequências geradas neste estudo agruparam no mesmo clado de *M. fijiensis*. Para avaliação da agressividade dos diferentes isolados de *M. fijiensis*, foi calculada a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) nas cultivares Grande Naine, Prata Anã, Terra e BRS Princesa. As médias das AACPD's das cultivares Prata Anã e Grande Naine não diferiram entre si. O período de incubação variou de 15 a 21 dias, exceto na cultivar BRS Princesa, que não apresentou sintomas. Este é o primeiro trabalho na Bahia sobre a Sigatoka-negra fornecendo informações importantes para futuros estudos de monitoramento da agressividade de isolados e subsidiando o programa de melhoramento da bananeira para obtenção de cultivares resistentes a *M. fijiensis*.

Palavras-chave: *Pseudocercospora fijiensis*, Sigatoka-negra, *Musa* spp..

STUDY OF THE OCCURRENCE AND AGGRESSIVENESS OF *Mycosphaerella fijiensis* IN BAHIA

Author: Juliana Barros Ramos

Adviser: Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança

ABSTRACT: Black Sigatoka, caused by the fungus *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet), is one of the most important diseases in banana plantations because it causes severe epidemics. In addition, the pathogen is more aggressive, compared with the causative agent of yellow Sigatoka. It requires high frequency of fungicide applications for the control, and the main commercial banana cultivars are susceptible. Thus, the objective of this study was to know the distribution and occurrence of *M. fijiensis* and to evaluate the aggressiveness of *M. fijiensis* isolates from different Bahia municipalities in four banana cultivars with different levels of resistance. In order to know the distribution and occurrence, leaves with symptoms of black Sigatoka were collected. After obtaining the isolates, the pathogen was identified by comparing sequences of ITS and β tubulin with sequences available in the Genbank database. In addition, the sequences were used for phylogenetic reconstructions. The results obtained in this study evidenced the occurrence of *M. fijiensis* in the state of Bahia. Sequences generated in this study grouped in the same clade of *M. fijiensis*. In order to evaluate the aggressiveness of the different isolates of *M. fijiensis*, the area under the disease progress curve (AUDPC) was calculated for the cultivars Grande Naine, Prata Anã, Terra and BRS Princesa. The mean AUDPC's of the cultivars Prata Anã and Grande Naine did not differ from one another. The incubation period ranged from 15 to 21 days, except in the BRS Princesa cultivar, which showed no symptoms. This is the first work in Bahia on black Sigatoka. In addition, it will provide important information for future studies to monitor the aggressiveness of isolates and will support the banana breeding program to obtain cultivars resistant to *M. fijiensis*.

Key-words: *Pseudocercospora fijiensis*, black Sigatoka, *Musa* spp.

REFERENCIAL TEÓRICO

Importância da cultura da banana (*Musa spp.*).

A bananeira segundo classificação botânica é uma monocotiledônea pertencente à classe Liliopsida, ordem Scitaminea, família Musaceae, subfamília Musoideae e gênero *Musa*. Apresenta-se de grande importância por constituir-se de espécies com uma ampla distribuição geográfica, adaptando-se em diferentes regiões e por envolver inúmeras espécies comestíveis (DANTAS & SOARES FILHO, 2000). A banana é um importante alimento na dieta básica de milhões de pessoas, sendo uma enorme fonte de renda para países em desenvolvimento na África, América Latina e Ásia (AURORE et al., 2009). A área total cultivada no mundo corresponde a 5,1 milhões de hectares, alcançando uma produção de 113 milhões de toneladas. Cerca de 87% das bananas que são produzidas no mundo são consumidas pelos produtores ou vendidas em mercados locais ou regionais. O restante, cerca de 13%, são exportados pelos países produtores movimentando US\$ 8,9 bilhões (FAO, 2016).

Segundo levantamento da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), sobre a produção de banana no mundo, a Índia é responsável por 25,7% da produção mundial com 29,1 milhões de toneladas. A China ocupa o segundo lugar com 13,3 milhões (11,7%), seguido da Indonésia, com 7 milhões (6,2%); Brasil, com 6,8 milhões (6%); Equador, com 6,5 milhões (5,8%) e Filipinas, com 5,8 milhões (5,1%) (FAO, 2016).

O cultivo da bananeira está entre as atividades agrícolas mais importantes para o Brasil. Em 2016 a sua área plantada atingiu 474 mil hectares, com produção de 6,9 milhões de toneladas, obtendo um rendimento médio de 14,6 toneladas por hectare. As principais regiões produtoras são: Sudeste, responsável por 33% da produção nacional, seguida pelo Nordeste com 32%. Entre os Estados, São Paulo e a Bahia aparecem empatados com uma produção de 1,1 milhão de toneladas, seguidos por Minas Gerais com 772 mil toneladas (IBGE, 2016). A bananicultura também apresenta importante papel social no Brasil, uma vez que é considerada fonte de renda, principalmente para pequenos produtores (MASCARENHAS, 1997). As variedades mais cultivadas de banana são: tipo

Prata (Prata, Pacovan, Prata-Anã), Tipo Terra (Terra, Terrinha, Terra-Maranhão e D' Angola), Maçã (mercado interno) e as do subgrupo Cavendish (Nanica, Nanicao e Grande Naine) (SILVA et al., 2004).

A bananeira é hospedeira de diversos patógenos causadores de doenças que geram elevados níveis de perdas na produção (CORDEIRO, 2004). Os principais problemas fitossanitários ocasionados no cultivo da bananeira são provocados por bactérias, nematóides, vírus e fungos (GASPAROTTO et al., 2006). Porém, os fungos destacam-se, causando diversas enfermidades como a doença vascular conhecida como murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) e as manchas foliares, que são representadas principalmente pela Sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) e Sigatoka-amarela, (*Mycosphaerella musicola* Leach) (PLOETZ, 2006).

A maioria das cultivares de bananeiras comerciais é suscetível à Sigatoka-negra e Sigatoka-amarela, onde a aplicação de fungicidas ainda é o principal método de controle, prática esta que aumenta consideravelmente o custo de produção, além de ser extremamente prejudicial ao ambiente e ao homem (CORDEIRO et al. 2001).

Importância das sigatokas

As doenças foliares mais importantes da bananeira são ocasionadas pelas espécies fúngicas *M. fijiensis* e *M. musicola* agentes causadores das Sigatoka-negra e Sigatoka-amarela, respectivamente. A origem do nome Sigatoka vem do Vale de Sigatoka, onde está localizado na ilha Viti Levu, principal ilha Fiji (JONES, 2003).

Os danos associados às sigatokas são à morte prematura das folhas, resultando na baixa capacidade fotossintética e conseqüentemente no enfraquecimento da planta, não permitindo a transformação de energia luminosa em energia química. Com isso, ocorrem danos diretos na produção, como a redução do número e da qualidade dos frutos (SIMMONDS, 1986). Deste modo, a Sigatoka-amarela pode gerar redução de até 50% da produção, enquanto a Sigatoka-negra pode ocasionar redução de até 100%. Por isso, esta última é considerada a doença foliar mais destrutiva na cultura da bananeira, pois o

patógeno apresenta maior agressividade, podendo afetar a grande maioria das cultivares comerciais (STOVER & SIMMONDS, 1987).

O controle da Sigatoka-negra é feito principalmente por meio de aplicação de fungicidas. No entanto, este método de controle é responsável pelo aumento no custo da produção (PLOETZ, 1999). Dentre os métodos de controle, o genético vem destacando-se como mais importante para os produtores (CORDEIRO et al., 2004).

Ocorrência das sigatokas

Até a descoberta da Sigatoka-negra, a Sigatoka-amarela era considerada a doença foliar mais importante da bananeira (MOURICHON & FULLERTON, 1990), a qual foi descrita pela primeira vez em Java, próximo a Buitenzorg no ano de 1902. O próximo relato da doença foi feito no ano de 1912, na ilha de Viti Levu em Fiji, onde foi observada pela primeira vez em condição de epidemia (PHILPOTT & KNOWLES, 1913). Subsequentemente, a doença foi relatada no ano de 1919 no Sri Lanka, em 1924 na Austrália e, no período de 1933 a 1937, na maioria das áreas produtoras da América Central, Ásia, na América do Sul (Colômbia) e na América do Norte (México). A doença teve o seu primeiro relato no Equador no ano de 1950, mesma época em que se tornou um grande problema na África (MEREDITH & LAWRENCE, 1969). Daí em diante foi notificada na maioria das áreas produtoras de banana, caracterizando-a como uma das principais doenças dessa cultura (MOURICHON et al., 1997). No Brasil, a Sigatoka-amarela foi relatada no ano de 1944 no estado do Amazonas e em 1952 nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro. De acordo com Cordeiro (2011), a doença encontra-se disseminada em todas as áreas produtoras de banana do país.

Já a Sigatoka-negra teve o seu primeiro relato no ano de 1963 nas Ilhas Fiji (STOVER, 1972). Atualmente, a doença apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrada na Ásia e em um grupo de Ilhas no Pacífico. Na África, essa doença encontra-se disseminada em várias regiões desde 1973 (MOURICHON et al., 1997), enquanto que na América Central só foi descrita em 1972 em Honduras, em 1979 na Costa Rica e Nicarágua, em 1981 no México e Panamá

em 1981, em Cuba em 1990, na Jamaica em 1995 e na República Dominicana em 1996 (JONES, 2003).

Seu primeiro relato na América do Sul foi na Colômbia em 1981, passando a ser relatada também em 1986 no Equador, na Venezuela em 1991, no Peru em 1994 e na Bolívia em 1996 (CARLIER et al., 2000). No Brasil, a Sigatoka-negra só foi constatada a partir de 1998 nos estados do Amazonas e do Acre (PEREIRA et al., 1998; TRINDADE et al., 2002; GASPAROTTO et al., 2001). Na sequência, a Sigatoka-negra também foi constatada em Rondônia e Mato Grosso em 1999 e no Pará, Roraima e Amapá, em 2000 (TRINDADE et al., 2002; SOUZA & FEGURI, 2004). Após quatro anos, em 2004, um novo avanço do patógeno foi detectado, constatando-se a doença no Vale do Ribeira em São Paulo, importante região produtora de banana no País (PEREIRA & GASPAROTTO, 2005), no Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (GASPAROTTO, et al., 2006). No estado da Bahia, a doença foi recentemente identificada em 2015 (EMBRAPA, 2016). Entre as duas sigatokas, sem dúvidas a Sigatoka-negra é a doença mais onerosa e destrutiva nas regiões produtoras de banana (MOULIOM-PEFOURA et al., 1996). O ciclo rápido e severidade elevada da Sigatoka-negra, em áreas onde há incidência dos dois patógenos, acabam mascarando os sintomas de Sigatoka-amarela (FERNANDES et al, 2006).

Sintomatologia das sigatokas

Embora a Sigatoka-negra tenha sido descrita pela primeira vez em 1963, uma descrição detalhada dos sintomas não havia sido publicada por Meredith e Lawrence até 1969. Os sintomas iniciais apresentados pela doença aparecem na face abaxial da folha em forma de pequenas pontuações claras. Essas progridem formando estrias, com aproximadamente 2 a 3 mm de comprimento e passando a ter uma coloração marrom-clara. Conforme a progressão da doença, as estrias se expandem radial e longitudinalmente podendo atingir até 3 cm de comprimento, ainda com coloração marrom-clara podendo ser vista na face adaxial da folha. A partir desse estágio, as estrias somente se expandem radialmente adquirindo coloração marrom-escura na face abaxial. Nos estádios mais avançados, as estrias marrom-escuras assumem o formato de manchas irregulares que coalescem, dando a folha uma coloração próxima à negra. Dessas manchas

negras e a partir das bordas inicia-se o processo de morte prematura de toda folha. Na face adaxial da folha, surgem pontuações escuras representadas pelas frutificações, correspondentes a fase sexuada do patógeno. As manchas ocasionadas pela Sigatoka-negra são mais numerosas por unidade de superfície que as da Sigatoka-amarela (PEREIRA et al., 2003).

Apesar dos sintomas da Sigatoka-negra serem semelhantes aos da Sigatoka-amarela, existem formas de diferenciar ambas as doenças no campo (CORDEIRO et al., 2001). Os primeiros sintomas apresentados pela Sigatoka-amarela são manchas levemente descoloridas que aparecem entre as nervuras da segunda até a quarta folha, essas se expandem radialmente formando estrias com coloração amarela e em seguida essas estrias se transformam em manchas necróticas assumindo formato elíptico-alongadas, que ficam dispostas nas nervuras secundárias da folha. Quando a doença atinge esse estágio, as manchas começam a apresentar um halo amarelo a sua volta, apresentando centro deprimido e a parte central se torna acinzentada, podendo ser observada as frutificações do fungo em forma de pontuações negras. Em estádios mais avançados as lesões tendem a coalescer, podendo ocasionar a seca total da folha (MOURICHON et al., 1997; PEREIRA et al., 2003).

Etiologia das sigatokas

O agente causal da Sigatoka-negra é o fungo *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet). Pertencente ao filo Ascomycota, apresenta duas fases ou tipos de reprodução, teleomórfica ou sexuada, e anamórfica ou assexuada representada por *Paracercospora fijiensis* (M. Morelet) Deighton ou *Pseudocercospora fijiensis* (M. Morelet) Deighton, sendo o segundo nome atualmente utilizado para designar a forma anamórfica do patógeno. Ambas as fases são importantes no desenvolvimento da doença (CROUS et al., 2003). O patógeno propaga-se por meio de dois tipos de esporos, conhecidos como conídios (esporos assexuados) e ascósporos (esporos sexuados). Os conídios são hialinos, obclavados a cilíndricos, retos ou ligeiramente curvos, medindo de 20 a 132 µm de comprimento e 2,5 a 5 µm de largura, com seis a nove septos, delgados em seu ápice e mais largos na base, com uma cicatriz no hilo basal do conídio. Os conidióforos apresentam coloração escura e podem emergir diretamente do

estroma de maneira individual ou em pequenos grupos de duas a oito unidades, podendo ser formados tanto na face abaxial quanto na adaxial da folha, encontrando-se em maior quantidade na face adaxial. Os ascósporos são hialinos, fusiformes, clavados, bicelulares e ligeiramente constrictivos no septo, medindo de 14 a 20 μm de comprimento e 4 a 6 μm de largura. Os mesmos estão presentes em pseudotécios nas lesões maduras, os quais são comuns em folhas velhas e mortas. Os pseudotécios estão presentes em ambos os lados do limbo foliar, encontrando-se em maior quantidade na parte adaxial da folha, produzindo numerosos ascos, cada um contendo oito ascósporos (STOVER & SMMONDS, 1987; PLOETZ, 1999; MARIN et al., 2003).

Já o agente causal da Sigatoka-amarela é o fungo *Mycosphaerella musicola* R. Leach ex J. L. Mulder, com forma anamórfica ou assexuada conhecida por *Pseudocercospora musae* (Zimm.) Deighton. Assim como *M. fijiensis*, o patógeno produz conídios e ascósporos. Os conídios de *M. musicola* são normalmente cilíndricos obclavados, retos ou curvos, com um a oito septos, apresentando a mesma espessura ao longo do comprimento, medindo de 10 a 80 μm de comprimento e 2 a 6 μm de largura, sendo produzidos conidióforos curtos e escuros que emergem de células estromáticas, a partir de esporodóquios fasciculados. Os conídios não apresentam cicatriz basal, característica que os diferenciam dos de *M. fijiensis*. Os conidióforos são formados tanto na face abaxial quanto na face adaxial das folhas, mas também são encontrados em maiores quantidades na face adaxial da folha (STOVER, 1980; FULLERTON, 1994).

Tanto *M. fijiensis* como *M. musicola*, comportam-se igualmente quanto as suas características culturais e apresentam dificuldade em serem isoladas, cultivadas e esporuladas *in vitro* (STOVER, 1980).

Epidemiologia das sigatokas

As formas sexuadas e assexuadas de *M. fijiensis* e *M. musicola* podem ser encontradas respectivamente em uma planta ou até na mesma folha (CARLIER et al., 2000), sendo a forma assexuada de ambas as espécies de *Mycosphaerella* mais frequentes de serem encontradas. A forma sexuada de *M. fijiensis* é considerada a mais importante na disseminação da doença, devido a alta

produção de ascósporos que é responsável por disseminação a longas distâncias (STOVER, 1980; PEREIRA et al., 2003).

Os ascósporos são disseminados principalmente pelo vento, sendo depositados nas folhas superiores da planta e nas três folhas mais jovens, as quais são as mais suscetíveis aos patógenos. A produção de ascósporos é mais elevada durante a época de chuva (PLOETZ, 1999; MARIN et al., 2003). Os conídios também são disseminados pelo vento, chuva e até mesmo pela água da irrigação, esses também conseguem sobreviver em diferentes materiais (STOVER & SIMMONDS, 1987; HANADA et al., 2002).

A disseminação da doença a curtas distâncias está associada aos conídios que são dispersos pela água da chuva, já a disseminação a longas distâncias é atribuída aos ascósporos que são transportados pelo vento (MARIN et al., 2003). Outra forma eficaz na disseminação a longa distância, é o uso de folhas infectadas entre os cachos de banana para evitar danos ao fruto, como ferimentos durante o transporte (GASPAROTTO et al., 2001).

Ambas as espécies de *Mycosphaerella* apresentam as mesmas características de disseminação por longas distâncias por meio do vento, na forma de ascósporos, e localmente na forma de conídios. Já a disseminação entre continentes é provavelmente resultado de transferência de material vegetal infectado (MOURICHON & FULLERTON, 1990).

A infecção de ambas as espécies de *Mycosphaerella* também se inicia com a deposição dos esporos nas superfícies das folhas da bananeira. Os esporos germinam em torno de 2 a 3 horas após a deposição, se houver a presença de água ou se a umidade for elevada. A temperatura ideal para a germinação dos conídios varia entre 25 e 29 °C e para os ascósporos entre 25 e 26 °C. O tubo germinativo cresce epifiticamente por vários dias (4-6 dias) antes da penetração nas folhas via estômatos em resposta hidrotópica através da formação de apressórios sobre os estômatos (Figura 1) (STOVER, 1980).

A coexistência e distribuição de ambas as espécies de *Mycosphaerella* está aparentemente ligada à umidade e temperatura, que por sua vez é influenciada pela altitude (CHURCHILL, 2011). Em dois estudos realizados para investigar a distribuição de espécies de *Mycosphaerella*, *M. fijiensis* foi dominante em baixas altitudes e *M. musicola* desenvolveu-se melhor em altitudes elevadas. Estudos relacionados a germinação de conídios, período de incubação e ciclo de

vida de *M. fijiensis* e *M. musicola* mostram que em baixa altitude com temperatura em torno de 21 a 33 °C, ambas as doenças foram encontradas, mas a Sigatoka-negra era dominante. Enquanto que em áreas de terras altas com temperaturas entre 15 a 18 °C, *M. musicola* teve um período de incubação mais curto do que *M. fijiensis* e foi predominante (MOULIOM PEFOURA et al., 1996; GOMES et al., 2013).

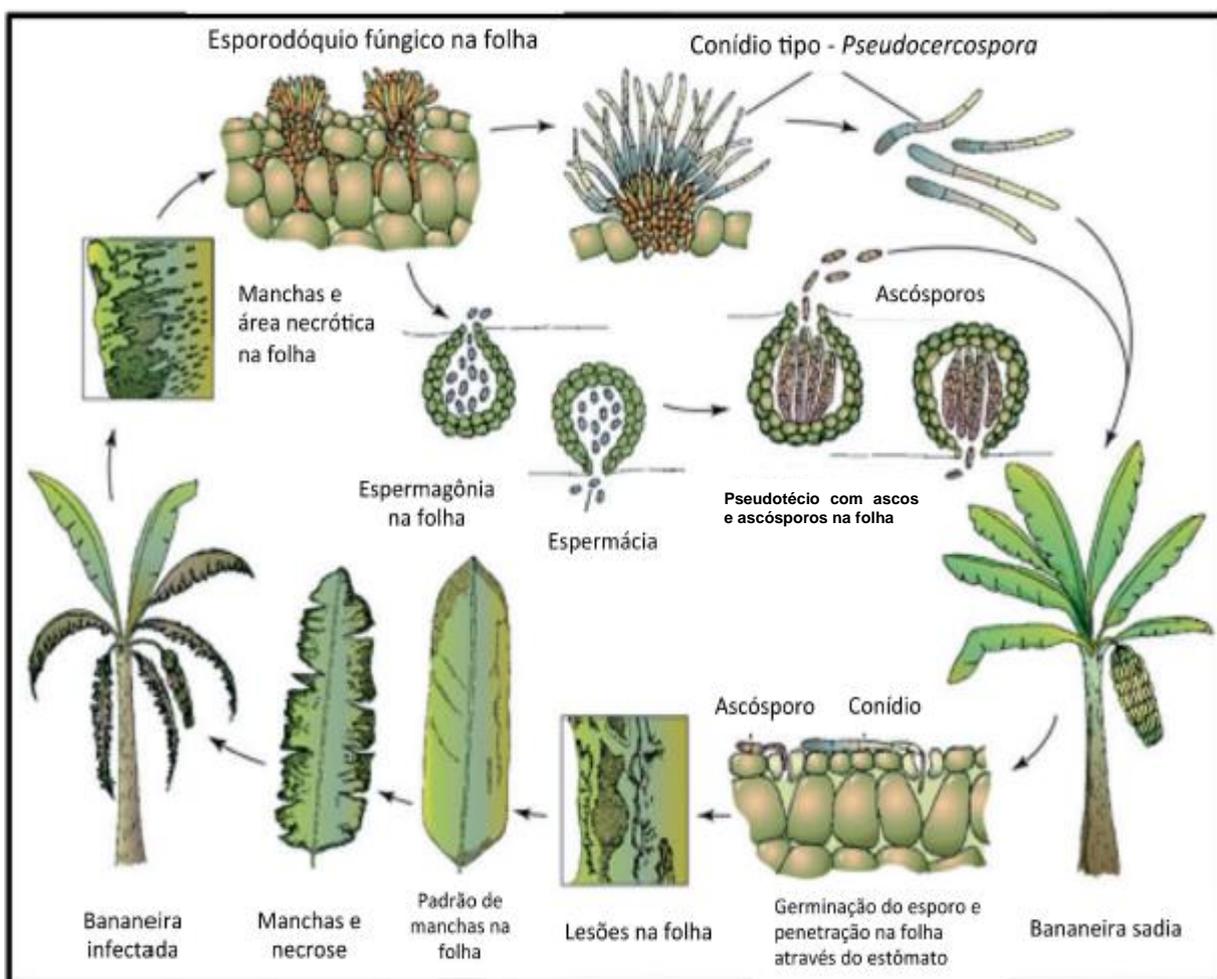


Figura 1: Ciclo de vida de *Mycosphaerella* spp. em bananeira (adaptado de AGRIOS, 2005).

Identificação de *Mycosphaerella*

A detecção e identificação dos patógenos é um importante elemento para o adequado manejo de doenças. As Sigatoka-negra e Sigatoka-amarela são diagnosticadas de acordo com os sintomas que as doenças apresentam e características morfológicas (ARZANLOU et al., 2007; GOMES et al., 2013). No entanto, as duas espécies de *Mycosphaerella* apresentam sintomas similares,

podendo ser vistos na mesma folha de bananeira, o que dificulta o diagnóstico da doença (GOMES et al., 2013). A maior diferença morfológica encontrada entre as espécies é notada na sua fase assexuada. Conidióforos de *M. musicola* produzem denso esporodóquios em um estroma negro, enquanto os conidióforos de *M. fijiensis* emergem solitariamente ou em poucas quantidades (JACOME & SCHUCH, 1992).

Análises moleculares somadas às observações de características morfológicas têm sido utilizadas como importantes ferramentas para a resolução de problemas taxonômicos, possibilitando a correta identificação e distinção de patógenos estreitamente relacionados. Alguns métodos moleculares baseados em *Southern blot* e hibridização foram inicialmente utilizados para a diagnose e distinção de *M. musicola* e *M. fijiensis* (CARLIER et al., 1994). No entanto, por serem altamente trabalhosos e exigirem grandes quantidades de DNA, caíram em desuso, sendo substituídos por técnicas mais rápidas, fáceis e sensíveis a baixas concentrações de DNA, como a PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A adoção dessa importante ferramenta molecular para a análise de diferentes regiões do genoma pode aumentar nossa compreensão sobre relações filogenéticas e diversidade genética de populações de fungos (QUEIROZ et al., 2013). Análises da região ITS (*Internal transcribed spacer*) do DNA ribossômico, dos genes da actina (ACT), β -tubulina (β TUB) e da histona H3 (HIS) têm sido frequentemente aplicadas em estudos de relações filogenéticas entre espécies de *Mycosphaerella* e seus anamorfos de diferentes plantas hospedeiras (ARZANLOU et al., 2008; CROUS et al., 2009).

Considerada atualmente como um código de barras para a identificação molecular de fungos (SCHOCH et al., 2012), a região ITS (ITS1 e ITS2) vem sendo usada há mais de duas décadas, devido ao seu alto grau de variabilidade interespecífica, presença de sítios conservados para *primers* e por apresentar múltiplas cópias naturais no genoma (BLAALID et al., 2013). Em fungos, a região ITS varia, com algumas exceções, entre aproximadamente 450 a 750 pares de base de comprimento (CROUS et al., 2011, BLAALID et al., 2013). A identificação de *M. musicola* e sua diferenciação de fungos estreitamente relacionados, como *M. fijiensis* e *M. eumusae*, tem sido realizada com base no polimorfismo da região ITS do rDNA genômico (CROUS et al., 2001; HAYDEN et al., 2003).

Métodos de Controle

Tanto a Sigatoka-negra quanto a Sigatoka-amarela, são doenças de difícil controle. Entre os métodos de controle, o químico é o mais utilizado no manejo das doenças, sendo baseado nas aplicações de fungicidas sistêmicos e protetores (GASPAROTTO et al., 2001). As consequências do uso excessivo de fungicidas são o aumento do custo da produção, o impacto negativo no ambiente e os danos causados a saúde humana, além do risco de seleção de populações mais insensíveis aos fungicidas, o que demonstra a necessidade de redução do emprego desses produtos, buscando outras medidas de controle (MORANDI & BETTIOL, 2009).

Embora exista um grande número de variedades de banana no Brasil, atendendo a preferência dos consumidores, produtividade, altura de planta e resistência às doenças, poucas apresentam potencial agrônomico que podem ser indicadas para fins comerciais. As mais difundidas são cultivares do subgrupo Cavendish, como Nanica, Nanicão e Grande Naine; do subgrupo prata como, Prata, Prata-Anã e Pacovan; do subgrupo Terra como, Terra e D'Angola e a Maçã. Contudo, todas apresentam pelo menos uma característica indesejável, como altura de planta inadequada ou suscetibilidade a alguma doença (SILVA et al., 1999).

Esses fatores demonstram a necessidade de pesquisas para desenvolvimento de tecnologias de controle da doença como, o desenvolvimento de variedades resistentes. Deste modo, o controle genético, visando encontrar variedades resistentes se torna uma importante alternativa para o controle dessas doenças que vem aumentando sua dispersão no mundo e com grande impacto econômico (OROZCO-SANTOS, 1998).

Desde a primeira ocorrência da Sigatoka-negra, a Embrapa vêm pesquisando alternativas não-agressivas ao meio ambiente, para o controle da doença, entre elas o uso de cultivares resistentes. Por meio de estudos baseados no controle da Sigatoka-negra, foram recomendadas algumas variedades de banana tipo prata (BRS Preciosa e BRS Maravilha) e tipo maçã (BRS Princesa).

Para melhorar a eficiência do uso dessas variedades citadas anteriormente se faz necessário o manejo integrado da doença. Este por sua vez é composto por varias atividades de manejo que buscam aumentar a produção e reduzir os

danos ao meio ambiente (GASPAROTTO & PEREIRA, 2009). Deste modo o manejo de Sigatoka-negra se dá através de áreas plantadas com mistura de cultivares, adubação balanceada, uso de controle biológico com *Trichoderma*, manejo da irrigação, desfolha de folhas velhas permitindo a redução de inoculo presente (CAVERO et al., 2015).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. Amsterdam: Elsevier Academic. 2005.

ARZANLOU, M.; GROENEWALD, J.Z.; FULLERTON, R.A.; ABELN, E.C.A.; CARLIER, J.; ZAPATER, M.F.; BUDDENHAGEN, I.W.; VILJOEN, A.; CROUS, P.W. Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on banana. **Persoonia**, v. 20, p. 19-37, 2008.

ARZANLOU, M.; ABELN, E.C.A.; KEMA, G.H.J.; WAALWIJK, C.; CARLIER, J. de VRIES I.; GUZMÁN, M.; CROUS, P.W. Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. **Phytopathology**, v. 97, p. 1112-1118, 2007.

AUORE, G.; PARFAIT, B.; FAHRASMANE, L. Bananas, raw materials for making processed food products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 78-91, 2009.

BLAALID, R.; KUMAR, S.; NILSSON, R.H.; ABARENKOV, K.; KIRK, P.M.; KAUSERUD, H. ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, p. 1-7, 2013.

CARLIER J.; ZAPATER, F.; LAPEYRE, D.R.; JONES; MOURICHON, X. Septoria leaf spot of banana: A newly discovered disease caused by *Mycosphaerella eumusae* (anamorph *Septoria eumusae*). **Phytopathology**, v. 90, p. 884-890, 2000.

CARLIER, J.; MOURICHOM, X.; GONZALES de LEÓN, D.; ZAPATER, M.F.; LEBRUN, M.H. DNA restriction fragment length polymorphisms in *Mycosphaerella* sp. causing banana leaf spot diseases. **Molecular Plant Pathology**, v. 84, p. 751-756, 1994.

CAVERO, P.A.S., HANASA, R.E.; GASPAROTTO, L.; COELHO NETO, R. A.; SOUZA, J.T. Biological control of banana black Sigatoka disease with *Trichoderma*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, p. 951-957, 2015.

CHURCHILL, A.C.L. *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, p. 307-328, 2011.

CORDEIRO, Z.J.M.; MATOS, A.P.de.; MEISSNER FILHO, P.E. Doenças e métodos de controle. **O cultivo da bananeira**, v.1, p. 146-182, 2004.

CORDEIRO, Z.J.M.; MATOS, A.P.de; FERREIRA, D.M.V. **Manual para identificação da Sigatoka-negra**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, (Documentos, 96). 16p. 2001.

CORDEIRO, Z.J.M.; ROCHA, H.S.; ARAÚJO, A.G., **Metodologias para Manuseio de *Mycosphaerella musicola* em Laboratório**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, (Documentos, 198). 32p. 2011.

CROUS, P.W.; SCHOCH, C.L.; HYDE, K.D.; WOOD, A.R.; GUEIDAN, C.; HOOG, de G.S.; GROENEWALD, J.Z.; Phylogenetic lineages in the Capnodiales. **Studies Mycology**, v. 64, p. 17-47, 2009.

CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; APTROOT, A.; BRAUN, U. X.; CARLIER, J. Integrating morphological and molecular data sets on *Mycosphaerella*, with specific reference to species occurring on *Musa*. In: Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San Jose, 2002, Costa Rica. ***Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook**. Montpellier: INIBAP. p. 43-

57, 2003.

CROUS, P.W.; TANAKA, K.; SUMMERELL, B.A.; GROENEWALD, J.Z. Additions to *Mycosphaerella* complex. **IMA Fungus**. v. 2, p. 49–64, 2011.

CROUS, P.W.; KANG, J.C.; BRAUN, U.A. phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on ITS rDNA sequence and morphology. **Mycologia**. v. 93, p. 1081–1101, 2001.

DANTAS, J.L.L.; SOARES FILHO, W.S.S. Classificação botânica, origem e evolução. CORDEIRO, Z.J.M. **Banana produção: aspectos técnicos**. Brasília: EMBRAPA, p. 12-16, 2000.

EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/11204552/sigatoka-negra-e-tema-de-reuniao-entre-mapa-embrapa-e-adab>> Acesso em 25 nov. 2017

FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Agricultural Database**, 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acesso em: 30 nov. 2017.

FERNANDES, C. de F.; COSTA, J. N. M.; HOLANDA-FILHO, Z. F.; SOUZA, F. de F. **Doenças da bananicultura: Sigatoka-amarela**. Circular técnica 85. Porto Velho, RO. ISSN 0103-9334, 2006.

FULLERTON, R.A. Sigatoka leaf diseases. In: PLOETZ, et al. (eds.). **Compendium of Tropical Fruit Diseases**. St. Paul Minnesota: The American Phytopathological Society, p. 12-14, 1994.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R. Manejo integrado da Sigatoka-negra da bananeira. Nota técnica. Embrapa Amazônia Ocidental, 10 p., 2009.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R.; COSTA, M.M.; PEREIRA, M.C.N. Fungicidas para o controle da Sigatoka negra da bananeira. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 434 (Abstract 636), 2001.

GASPAROTTO, L. PEREIRA, J.C.R.; HANADA, R.E.; MONTARROYOS, A.V.V. **Sigatoka-negra da bananeira**. Brasília, Embrapa, 177 p, 2006.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R.; TRINDADE, D.R. Situação atual da Sigatoka negra da bananeira no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 449, 2001.

GOMES, L. I. S.; DOUHAN, G.W.; BIBIANO, L.B.J.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G. *Mycosphaerella musicola* Identified as the Only Pathogen of the Sigatoka Disease Complex Present in Minas Gerais State, **Plant Disease**, v. 97, p. 1537-1543, 2013.

HANADA, R.E.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 170-173, 2002.

HAYDEN, H.L.; CARLIER, J.; AITKEN, E.A.B. Population differentiation in the banana leaf spot pathogen *Mycosphaerella musicola*, examined at a global scale. **Plant Pathology**, v. 52, p. 713-719, 2003.

IBGE - **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA** – IBGE, SIDRA, 2016. <<http://www.ibge.org.br>> Acesso dia 25 nov. 2017.

JACOME, L. H.; SCHUH, W. Effects of leaf wetness duration and temperature on development of black sigatoka disease on banana infected by *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. **Phytopathology**, v. 82, p. 515-520, 1992.

JONES, D.R. The distribution and importance of the *Mycosphaerella* leaf spot diseases of banana. In: Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San Jose, 2002, Costa Rica. ***Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook**. Montpellier: INIBAP, p. 25-41, 2003.

MARÍN, D.H.; ROMERO, R.A.; GUZMÁN, M.; SUTTON, T.B. Black Sigatoka: na increasing treat to banana cultivation, **Plant Disease**, v. 87, p. 208-222, 2003.

MASCARENHAS, G. **Análise do mercado brasileiro de banana**. Preços Agrícolas, v. 134, p. 4-12, 1997.

MEREDITH, D. S.; LAWRENCE, J. S. Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): Symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 52, p. 459-476, 1969.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, p. 7-14, 2009.

MOULIOM-PEFOURA, A.; LASSOUDIÈRE, A.; FOKO, J.; FONTEM, D.A. Comparison of development of *Mycosphaerella fijiensis* and *Mycosphaerella musicola* on banana and plantain in the various ecological zones in Cameroon. **Plant Disease**, v. 80, p. 950-953, 1996.

MOURICHON, X.; CARLIER, J.; FOURÉ, E. Sigatoka leaf spot diseases. Montpellier: INIBAP. Musa Disease Fact. Sheet, 8. Disponível em: <<http://www.cgiar.org/opgri/inibap>> acesso dia 25 de Nov. de 2017, 1997.

MOURICHON, X.; FULLERTON, R.A. Geographical distribution of the two species *Mycosphaerella musicola* Leach (*Cercospora musae*) and *M. fijiensis* Morelet (*C. 28 fijiensis*), respectively, agents of Sigatoka disease and black leaf streak disease in bananas and plantains. **Fruits**, v. 45, p. 213-218, 1990.

OROZCO-SANTOS, M. **Manejo integrado de la Sigatoka Negra del Plátano**. Tecomán, Colima, México: SAGAR/INIFAP/CIPAC, 95p. (Folheto Técnico, 1), 1998.

PEREIRA, J.C.R.; GASPAROTTO, L.; COELHO, A.D.S.; URBEN, A.F. Ocorrência da Sigatoka negra no Brasil. **Fitopatologia brasileira**, v. 23, p. 295, 1998.

PEREIRA, J.C.R.; GASPAROTTO, L. **Contribuição para o reconhecimento das**

sigatokas negra e amarela e das doenças vasculares da bananeira. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2005.

PEREIRA, J.C.R.; GASPAROTTO, L.; COELHO, A.F.S.; VÉRAS, S. de M. **Doenças da bananeira no Estado do Amazonas.** EMBRAPA - CPAA, 12 p. (Circular Técnica, n. 20), 2003.

PHILPOTT, J.C.; KNOWLES, C.H. **Report on a visit to Sigatoka.** Fiji: Phamphlet Of the Department of Agriculture, v. 3, 1913.

PLOETZ, R.C. Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Phytopathology**, v. 96, p. 653-656, 2006.

PLOETZ, R. Black Sigatoka of Banana: The most important disease of a most importante fruit. **APSnet Plant Pathology.** Disponível em: <<http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/pages/blacksigatoka.aspx>> acesso dia 22 de Nov. de 2017, 1999.

QUEIROZ, C.B.; MIRANDA, E.C.; HANADA, R.E.; SOUSA, N.R.; GASPAROTTO, L.; SOARES, M.A.; SILVA, G.F. Distribution of mating-type alleles and M13 PCR markers in the black leaf spot fungus *Mycosphaerella fijiensis* of bananas in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, p. 443-452, 2013.

SCHOCH, C.L.; SEIFERT, K.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J.L.; LEVESQUE, C.A.; CHEN, W. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, p. 6241-6246, 2012.

SILVA, S. DE O.; SHEPHERD, K.; ALVES, E.J.; DANTAS, J.L.L. **Cultivares de banana.** In: ALVES, E. J. A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. Brasília: EMBRAPA-SPI, p.85-105, 1999.

SILVA, S. de O.; SANTOS-SEREJO, J.A.; CORDEIRO, Z.J.M. **Variedades.** In: O

cultivo da bananeira. (Eds. A. L. Borges e L. S. Souza). Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 279, 2004.

SIMMONDS, N.W. Bananas *Musa* cvs. In: SIMMONDS, N.W. (ed.). **Breeding for durable resistance**. Rome, Italy: FAO, p. 17-24, (FAO Plant Production and Protection, Paper 70), 1986.

SOUZA, N.S.; FEGURI, E. Ocorrência de Sigatoka Negra em bananeira causada por *Mycosphaerella fijiensis* no Estado de Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 781, 2004.

STOVER, R.H. **Banana, Plantain and abaca diseases**. London: Commonwealth Mycological Institute, p. 316, 1972.

STOVER, R.H. Sigatoka leaf spot of bananas and plantains. **Plant Disease**, v. 64, p. 750-755, 1980.

STOVER, R.H.; SIMMONDS, N.W. **Bananas**. 3. ed. New York: Longemon, p.486, 1987.

TRINDADE, D.R.; POLTRONIERI, L.S.; MENEZES A.J.E. A. Sigatoka Negra da banana no estado do Pará, **Fitopatologia brasileira**, v. 27, p. 323, 2002.

ARTIGO 1

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Mycosphaerella fijiensis*¹

¹Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Plant Disease, em versão na língua inglesa.

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Mycosphaerella fijiensis*

RESUMO: A Sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis* (Morelet)) é a principal doença foliar da bananeira. Por ser mais severa que a Sigatoka-amarela, plantios podem sofrer perdas de até 100%. Considerando sua maior agressividade, faz-se necessário o diagnóstico preciso e confiável para auxiliar na elaboração de medidas de manejo visando reduzir os problemas dessa ameaça à bananicultura. O diagnóstico por meio das características morfológicas tem se tornado um método impreciso, devido à similaridade das espécies de *Mycosphaerella* que infectam a bananeira. Dessa forma, objetivou-se conhecer a distribuição e ocorrência de isolados de *M. fijiensis*, provenientes de diferentes municípios produtores de banana no estado da Bahia, por meio de comparação das sequências de ITS e β -tubulina. Foram utilizados 30 isolados de *M. fijiensis*, para a extração do DNA. Os produtos de PCR das regiões ITS e do gene β -tubulina foram purificados e sequenciados. As sequências obtidas foram alinhadas com sequências disponíveis no GenBank para reconstrução filogenética por meio de inferência Bayesiana. Os isolados A02, A03, A07, A10, A68, A71 e A72 coletados em diferentes municípios amostrados agruparam com sequências de *M. fijiensis* em ambas as árvores obtidas. Os resultados apresentados neste trabalho evidenciam a ocorrência de *M. fijiensis* no estado da Bahia. A diagnose da Sigatoka-negra por meio de sequenciamento é técnica precisa e confiável.

Palavras chaves: Filogenia, Sigatoka-negra, ITS.

IDENTIFICATION MOLECULAR OF *Mycosphaerella fijiensis*

ABSTRACT: Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* (Morelet)) is the main leaf disease of the banana tree. Because it is more severe than yellow Sigatoka, plantations may suffer losses of up to 100%. Considering its greater aggressiveness, the accurate and reliable diagnosis is necessary to assist in the elaboration of management measures to reduce the problems of this threat to banana farming. The diagnosis through morphological characteristics has become an imprecise method due to the similarity among the *Mycosphaerella* species that infect the banana tree. The objective of this study was to determine the distribution and occurrence of *M. fijiensis* isolates from different banana producing municipalities in the state of Bahia, by comparing the ITS and β -tubulin sequences. Thirty isolates of *M. fijiensis* were used for DNA extraction. The PCR products of the ITS regions and the β -tubulin gene were purified and sequenced. The sequences obtained were aligned with GenBank sequences available for phylogenetic reconstruction by Bayesian inference. The isolates A02, A03, A07, A10, A68, A71 and A72 collected in different sampled municipalities grouped with *M. fijiensis* sequences in both trees. The results presented in this study show the occurrence of *M. fijiensis* in the state of Bahia. The diagnosis of black Sigatoka by means of sequencing is a precise and reliable technique.

Key words: Phylogeny, black Sigatoka, ITS.

INTRODUÇÃO

A bananeira (*Musa* spp.) destaca-se como uma das principais fruteiras tropicais, sendo cultivada em mais de 100 países localizados nas regiões tropicais e subtropicais (DANTAS et al., 1999). A cultura da bananeira é afetada por várias doenças, dentre elas as Sigatoka-negra e Sigatoka-amarela causadas pelos fungos *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet) e *Mycosphaerella musicola* (Leach), respectivamente (JONES, 2003).

A família Mycosphaerellaceae representa milhares de espécies de fungos que estão associadas a doenças em uma ampla gama de hospedeiros de plantas. Compreender a taxonomia de seus gêneros e espécies é, portanto, de extrema importância, dado seu impacto na agricultura, horticultura e silvicultura (VIDEIRA, 2017). Na cultura da bananeira conhecem-se três espécies de *Mycosphaerella* causadores de manchas foliares e que causam similares sintomas, podendo coexistir em uma mesma folha, dificultando o diagnóstico da doença. Além disso, a morfologia conservada na fase sexual entre estas espécies não apresentam diferenças mesmo quando comparadas com os ascósporos ou pseudotécios o que impossibilita um diagnóstico preciso (ARZANLOU et al., 2007, GOMES et al., 2013).

Técnicas moleculares se tornaram fundamentais na identificação de fungos que apresentam baixa variabilidade morfológica entre espécies, bem como, para diferenciar espécies crípticas. Técnicas como o sequenciamento de regiões conservadas, como aquelas presentes nas regiões internas transcritas (ITS) dos genes ribossomais (rDNA) tem auxiliado na identificação e separação de espécies (WHITE et al. 1990; BENGTTSSON-PALME et al., 2013). O sequenciamento por meio da região ITS é tido como a primeira opção entre os micologistas na identificação de espécies, uma vez que as regiões dos espaçadores (ITS1 e ITS2) são bem variáveis, e gênero-específico (em muitos casos espécie-específico), e a região intercalar 5.8S é bastante conservada entre as espécies. Devido às características citadas, esta região foi proposta recentemente como sendo a mais adequada para utilização como “código de barras” (*DNA Barcoding*) para fungos (SCHOCH et al., 2012).

O presente trabalho teve como objetivo conhecer a distribuição e ocorrência de isolados de *M. fijensis* coletados em diferentes municípios produtores de banana no estado da Bahia, por meio de comparação das sequências de ITS e β -tubulina.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de folhas de bananeira, de diferentes cultivares, que apresentavam sintomas típicos de Sigatoka-negra foram coletadas em diferentes municípios produtores de banana no estado da Bahia. Todas as coletas tiveram suas informações georreferenciadas (GPS - Global Positioning System). As folhas coletadas foram transportadas em sacos de papel, identificadas e acondicionadas em caixas de isopor até a Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia, para posterior isolamento.

O isolamento foi realizado no laboratório de Fitopatologia da Embrapa e na Clínica Fitossanitária da UFRB. Para a obtenção dos isolados, folhas de bananeira com sintomas típicos de Sigatoka-negra, foram lavadas em água corrente e com auxílio de algodão hidrofílico, para a retirada de impurezas e contaminantes. Em seguida, as folhas foram mantidas em caixas plásticas contendo papel de filtro umedecido em condição ambiente por 48 horas seguido de verificação de esporulação do patógeno com auxílio de microscópio estereoscópio. Os esporos do patógeno foram retirados cuidadosamente das lesões e transferidos para placas de Petri contendo meio batata, dextrose e ágar (BDA) e incubadas a 25 °C.

Foram coletadas 109 amostras de diferentes municípios produtores de banana no Estado da Bahia. Das amostras coletadas, foram obtidos 30 isolados que foram preservados dando origem a coleção de *Mycosphaerella* (Tabela 1).

Tabela 1: Isolados de *Mycosphaerella*, obtidos de diferentes cultivares de bananeira em diferentes municípios da Bahia, utilizados para os estudos filogenéticos.

ESPÉCIE	ISOLADO	CULTIVAR	LOCAL DE COLETA	COORDENADAS GEOGRÁFICAS		GENBANK ITS/ β TUB
<i>M. fijiensis</i>	A 01	Prata	Sapucainha	S 12° 39' 04.4"	W 39° 03' 03.8"	----/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 02	Nanica	Encruzilhada	S 15° 32' 20.8"	W 40° 54' 50.3"	MG679477/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 03	Prata	Cândido Sales	S 15° 30' 00.1"	W 41° 14' 14.7"	MG679483/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 04	Prata	Aracatu	S 14° 25' 55.25"	W 41° 27' 56.5"	MG679489/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 05	Prata	Cruz das Almas/UFRB	S 12° 39' 26.9"	W 39° 04' 55.71"	MG679491/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 06	Prata	Valença	S 13° 21' 49.3"	W 39° 05' 34.4"	MG679480/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 07	Maçã	São Francisco	S 12° 38' 45.5"	W 39° 01' 00.4"	MG679488/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 08	Terra	Valença	S 13° 21' 49.3"	W 39° 05' 34.4"	----/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 09	Terra	São Felipe	S 12° 39' 46.0"	W 38° 57' 31.9"	----/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 10	Terra	São Francisco	S 12° 38' 45.5"	W 39° 01' 00.4"	MG679492/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 24	Prata	UNA	S 15° 20' 35.2"	W 39° 07' 14.6"	----/ ----
<i>M. musicola</i>	A 25	Prata	Wagner	S 12° 17' 35.4"	W 41° 10' 23.5"	MG679500/ ----
<i>M. musicola</i>	A 26	Prata	Utinga	S 12° 06' 31.9"	W 41° 06' 39.6"	MG679501/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 27	Prata	Nova Canaã	S 14° 47' 28.5"	W 40° 09' 59.8"	MG679494/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 31	Prata	Iguaí	S 14° 44' 29.4"	W 40° 04' 50.0"	MG679478/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 38	Prata	Potirágua	S 15° 35' 45.0"	W 39° 51' 27.0"	MG679495/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 39	Prata	São Felipe	S 12° 46' 35.6"	W 39° 02' 56.8"	MG679482/ ----

<i>M. fijiensis</i>	A 40	Prata	Maragojipe	S 12° 47' 10.4"	W 39° 01' 45.5"	MG679484/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 41	Terra	Conceição do Almeida	S 12° 49' 12.8"	W 39° 09' 58.6"	MG679485/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 42	Prata	Sapeaçu	S 12° 45' 21.8"	W 39° 13' 29.6"	MG679496/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 43	Prata	Cabaceira do Paraguaçu	S 12° 32' 59.11"	W 39° 11' 27.37"	MG679486/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 46	Prata	Nova Viçosa	S 17° 58' 39.4"	W 40° 00' 11.4"	MG679487/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 55	Prata	Serra Dourada	S 12° 43' 51.6"	W 43° 56' 37.8"	MG679490/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 59	Prata	Canápolis	S 13° 04' 12.5"	W 44° 10' 53.7"	MG679497/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 68	Prata	Amélia Rodrigues	S 12° 24' 08.3"	W 38° 47' 06.8"	MG679479/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 71	Prata	Santo Amaro	S 12° 34' 27.7"	W 38° 45' 14.5"	MG679481/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 72	Prata	Rio Contas	S 13° 27' 31.9"	W 41° 50' 21.1"	MG679499/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 75	Prata	São Francisco do Conde	S 12° 36' 54.4"	W 38° 39' 35.0"	MG679493/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 76	Prata	São Felipe	S 12° 39' 46.0"	W 38° 57' 31.9"	MG679498/ ----
<i>M. fijiensis</i>	A 97	Prata	Jussara	S 11° 03' 15.2"	W 41° 58' 33.9"	----/ ----

Preservação dos Isolados

Foram utilizados três métodos de preservação para os isolados de *Mycosphaerella*, sendo eles Castellani, Glicerol a 15% e tiras de papel com Sílica gel. Para o método de preservação em Castellani, discos de micélio do fungo foram transferidos para microtubos (2 mL) contendo 1 mL de água destilada autoclavada. Os microtubos foram devidamente identificados e armazenados a 4 °C. A preservação em Glicerol, discos de micélio foram transferidos para microtubos (2 mL), com 1 mL de Glicerol a 15%. A preservação em Tiras de papel com sílica gel foi adicionada tiras de papel filtro (0,4 cm x 2,0 cm) sobre o meio de cultura BDA, em seguida o fungo foi repicado. Após 10 dias, as tiras de papel colonizadas foram mantidas em placas de Petri por 30 min para secagem em temperatura ambiente, posteriormente as mesmas foram transferidas para microtubos (2 mL), que já haviam sido preenchidos até $\frac{3}{4}$ da sua capacidade com sílica gel. Os microtubos das amostras preservadas pelos métodos sílica gel e Glicerol a 15% foram armazenados a -18 °C.

Extração de DNA

Para extração do DNA e identificação molecular, os isolados de *Mycosphaerella* spp. foram cultivados em meio BDA por 30 dias a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. O DNA foi extraído seguindo o protocolo de extração CTAB modificado (DOYLE & DOYLE, 1987). Para isso, o micélio retirado do meio de cultura foi seco em câmara de exaustão por 24 horas, macerado com nitrogênio líquido e misturado com 1500 µL da solução de tampão de extração (CTAB a 10%; NaCl a 5 M; Tris HCl a 1 M, pH 8,0; EDTA a 0,5 M; β-mercaptoetanol 1%; PVP 1% – polivinilpirrolidona) pré-aquecida a 65 °C. Após a homogeneização por 5 minutos, os tubos foram mantidos em banho-maria a 65 °C por 60 minutos (homogeneizando a cada 10 minutos). Em seguida, foram adicionados 800 µL de clorofórmico: álcool isoamílico (24:1) e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para novos tubos de 1,5 mL. Adicionou-se a cada tubo 600 µL de álcool isopropílico, equivalente a aproximadamente 2/3 do volume coletado, homogeneizado e incubando em seguida a -20 °C por 30 minutos. Efetuou-se nova centrifugação a

10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (pellet) foi lavado com 500 µL de etanol 70% e então centrifugados a 10.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco à temperatura ambiente por 30 minutos, dentro da capela de exaustão. Após secagem, o pellet foi ressuspendido com 100 µL de TE (Tris 1mM, EDTA 0,1mM, pH 8,0) contendo 2 µL de ribonuclease (RNase 10 mg/mL) e incubado em estufa a 37 °C por 30 minutos. O DNA purificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% na presença de brometo de etídio (1 µg/mL) e quantificado visualmente por comparação com o marcador padrão de 1kb (Ladder®). As amostras foram submetidas a um campo elétrico a 110 V por 60 minutos e posteriormente o gel foi visualizado no transiluminador para a determinação da quantidade do DNA, ao fim as amostras foram armazenadas a -20 °C.

Amplificação e sequenciamento

A amplificação da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA dos isolados foi feita utilizando os *primers* universais ITS1 5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3' e ITS4 5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3' e a amplificação da região β-tubulina do DNA foi utilizado os *primers* universais T1 5' AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT 3' e Bt2b 5' ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3' . Em microtubos plásticos de 200 µL adicionaram-se: 50 ng de DNA; Tris-HCl a 1M (pH 8,0); 1,5 mM de MgCl₂; 60 µM de dNTP; 0,2 µM de cada *primer* e 1,5 U da *Taq* DNA polimerase. As reações foram constituídas de uma fase inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos compostos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, 45 segundos de anelamento a 52 °C e extensão a 72 °C por 2 minutos e uma fase de extensão final de 72 °C por 7 minutos. Logo após, a temperatura foi reduzida a 4 °C até a retirada das amostras. A amplificação foi realizada em termociclador Veriti™ 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Os produtos amplificados nas reações foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, a 100 V, em tampão TAE 1 mM (Tris 0,89 M; ácido bórico 0,89 M; EDTA 0,02 M) por aproximadamente duas horas e corados em solução de brometo de etídio a 0,15 mg/L. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em sistema digital de

Fotodocumentação Vilber Lourmat. Os produtos da reação de PCR foram purificados com auxílio de Kit de purificação (UltraClean®) por coluna, e em seguida encaminhados para sequenciamento na empresa Macrogen em duas direções (direta e reversa).

Análises filogenéticas

As sequências de DNA direta e reversa foram alinhadas com auxílio do programa Bioedit (HALL, 1999) para obtenção da sequência consenso. Para a identificação dos isolados, as sequências consenso geradas foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados GenBank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information website*), por meio da ferramenta BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*), para confirmação da espécie de cada um dos isolados. O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado com auxílio do programa MEGA v.7 (KUMAR et al., 2016) e editado manualmente. Dois conjuntos de sequências foram utilizados nas análises filogenéticas. O primeiro continha 117 sequências da região ITS, sendo 25 geradas nesse estudo e 91 obtidas no GenBank representando espécies de *Mycosphaerella* e, como grupo externo, foi utilizada a sequência de *Davidiella*. O segundo conjunto de dados continha 36 sequências de β TUB, sendo 28 geradas nesse estudo e oito no GenBank representando espécies de *Mycosphaerella*.

Os modelos de evolução foram estimados com auxílio do MrModeltest v.3.7 (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001; RONQUIST & HUELSENBECK, 2003) e por meio do critério de informação Akaike. Para reconstrução da filogenia, a análise bayesiana foi conduzida no programa MrBayes v.3.2 (RONQUIST et al., 2012) usando o algoritmo de Monte Carlo via cadeias markov (MCMC) para obtenção das probabilidades *a posteriori* de Bayes (PPB). Na análise foram utilizadas 4 cadeias MCMC com for 1×10^7 gerações. As amostras foram obtidas a cada 1000 gerações. Foram descartadas 25% das árvores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

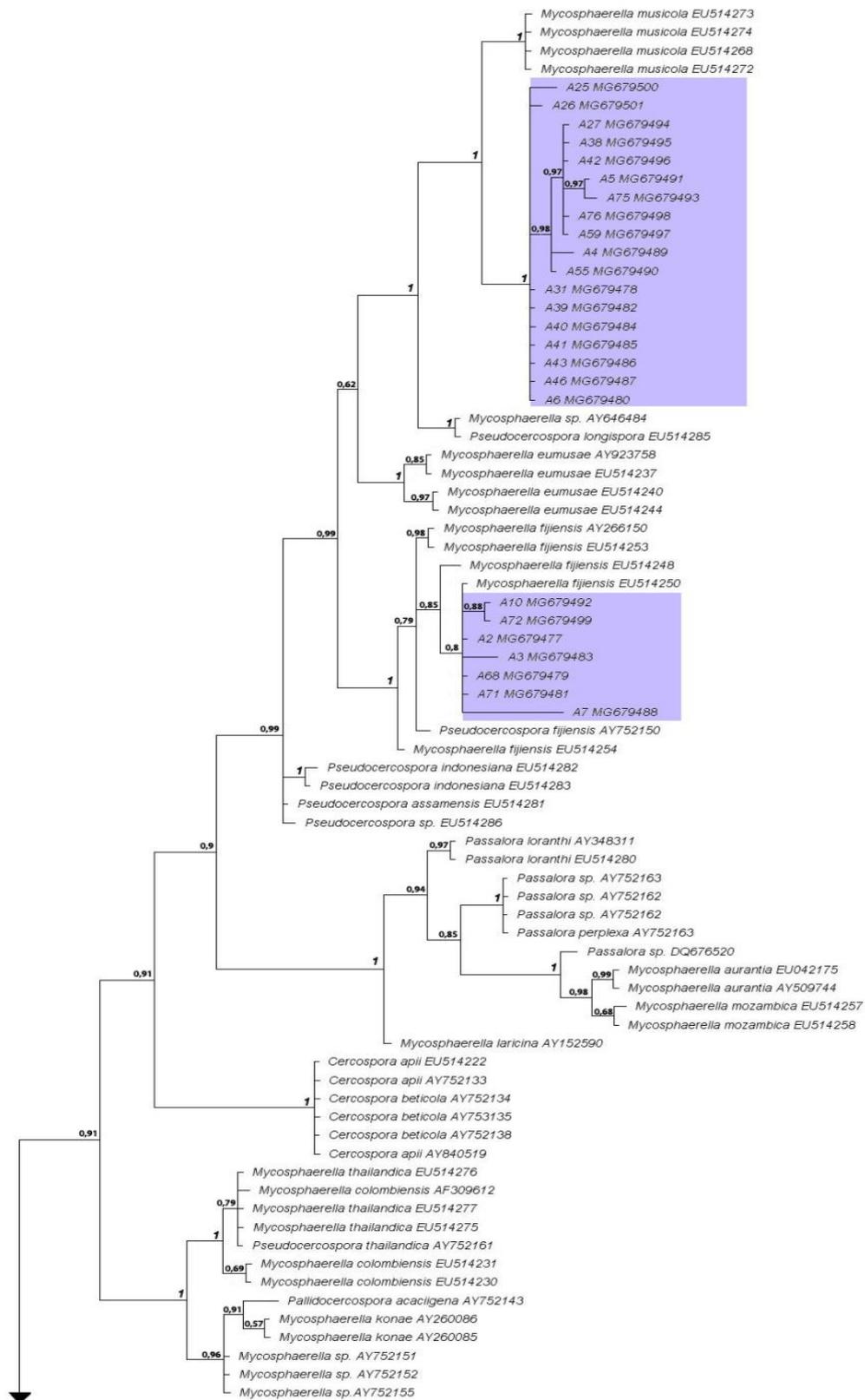
O conjunto de dados para o alinhamento da região ITS consistiu em um número total de 117 sequências (incluindo um *outgroup*), 619 caracteres foram submetidos a análises. Destes caracteres, 197 foram parcimônio informativo e 50 foram únicos. Já o segundo alinhamento constituiu por meio de 36 sequências de β -tubulina contendo 851 caracteres, onde 322 foram parcimônio informativo e 43 foram únicos. Foram selecionados os seguintes modelos de evolução: GTR + G (*General time reversible* + Gama) para ITS, HKY + G (Hasegawa Kishino Yano + Gama) para β TUB.

Para as sequências da região ITS foram obtidos cladogramas bem suportados com valores de *bootstrap* significativos. Os isolados A02, A03, A07, A10, A68, A71 e A72 agruparam em um clado de *M. fijiensis*, o mesmo foi evidenciado no alinhamento em β TUB (Figura 1 e 2).

A ocorrência de mais de uma espécie de *Mycosphaerella* em uma mesma folha, o lento crescimento micelial, a dificuldade na esporulação em meios de cultura e a semelhança do fungo entre espécies dificultam sua identificação, onde se torna cada vez mais difícil identificar as espécies desse gênero (CROUS et al., 2004; CROUS et al., 2006). Deste modo, o uso de técnicas moleculares vem contribuindo muito para o aumento do número de espécies descritas nos últimos anos (SILVA et al., 2009). Sequências de nucleotídeos de DNA podem diferir entre espécies de *Mycosphaerella*, por isso o uso de marcadores moleculares vem sendo amplamente utilizadas em estudos taxonômicos e filogenéticos deste gênero por apresentar neutralidade fenotípica, além de ser uma técnica segura e reproduzível (WHITE et al., 1990; CROUS et al., 2001).

Segundo Crous et al. (2006), ao empregar várias sequências de DNA de *Mycosphaerella* spp., observou-se que a região ITS oferece suporte satisfatório na distinção de espécies. Porém, apesar dessa região ser amplamente empregada para identificação molecular de fungos, frequentemente na família Mycosphaerellaceae a utilização da região ITS é insuficiente para distinguir espécies estreitamente relacionadas sugerindo-se o sequenciamento de outros *loci* mais variáveis tais com β -tubulina, actina e fator alongação (VIDEIRA et al., 2017). No presente estudo, foram empregadas sequências de DNA das regiões ITS e β TUB para as comparações filogenéticas e identificação dos isolados

obtidos nas coletas. Os isolados A02, A03, A07, A10, A68, A71 e A72 foram identificados como *M. fijiensis* por meio de reconstrução filogenética das regiões ITS e β TUB.



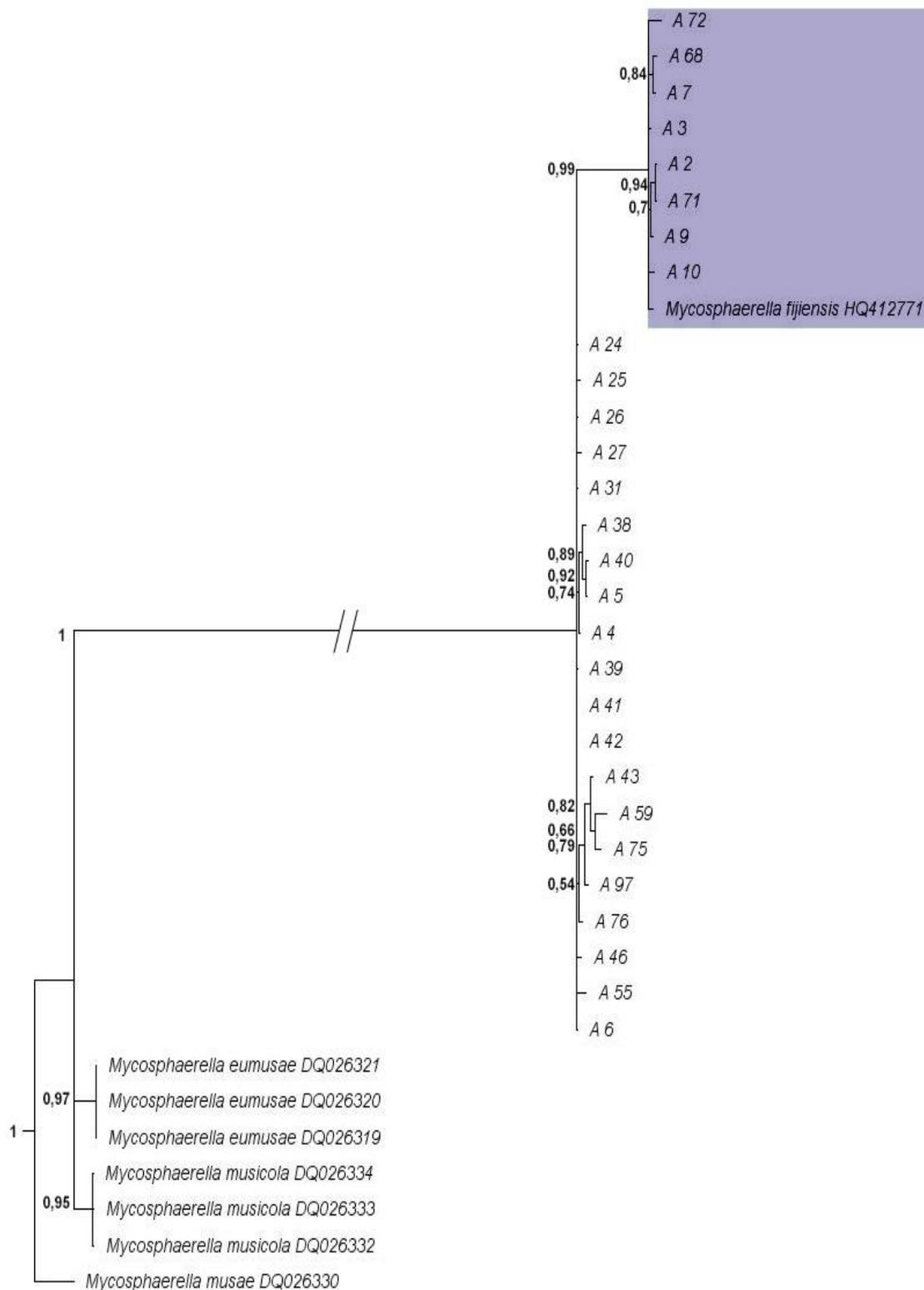


Figura 2: Árvore filogenética da região β -tubulina reconstruída por meio de inferência Bayesiana. Os valores acima dos ramos em negrito indicam a probabilidade *a posteriori*. A árvore foi enraizada com *Mycosphaerella musae* (DQ026330). Os isolados que agruparam com *M. fijiensis* estão em destaque. // indica redução do ramo em 50% do seu tamanho original.

Em estudos moleculares voltados para identificação de espécies de *Mycosphaerella*, patogênicas a bananeira, Arzanlou et al. (2007) desenvolveram uma ferramenta de fácil aplicação para a diferenciação de isolados de *M. fijiensis*, *M. musicola* e *M. eumusae*. Com a utilização de iniciadores desenhados a partir do gene de β -tubulina foi possível a separação dessas espécies, permitindo que com apenas a amplificação de aproximadamente 142 bp, fosse realizada a identificação dos patógenos.

As espécies de *M. fijiensis* e *musicola* apresentam poucas características morfológicas para distinção, no entanto, apresentam alta variação molecular em função do modo de reprodução mista, ou seja, apresentam reprodução sexuada e assexuada representando maior risco de evolução, pois esses patógenos apresentam características de ambos os tipos de reprodução (MCDONALD & LINDE, 2002).

A identificação molecular do complexo de sigatokas é de extrema importância, devido à alta similaridade em relação à morfologia das espécies de *Mycosphaerella* que causam doenças foliares na bananeira. No ano de 2005 com base em sintomas e características morfológicas a Sigatoka-negra foi notificada erroneamente no estado de Minas Gerais. Mas só em 2013, com o uso de sequenciamento de genes, foi possível afirmar que a doença não estava presente no estado. Gomes et al. (2013) consideraram que esse falso relato pode estar relacionado à incorreta identificação do patógeno, pois em estudos eles comprovam que no estado há ocorrência apenas de Sigatoka-amarela. Deste modo a identificação molecular é uma importante ferramenta para a defesa vegetal, pois evita falsos relatos de doenças que apresentam alta similaridade com relação aos sintomas, como é o caso das sigatokas negra e amarela.

O entendimento sobre o complexo de doenças da bananeira “Sigatoka” é um desafio para os fitopatologistas. Assim, o conhecimento sobre a identificação das espécies de *Mycosphaerella* é fundamental para compreender melhor a dinâmica desses patógenos permitindo um melhor manejo desse complexo da doença (ARZANLOU et al., 2007).

CONCLUSÕES

Há ocorrência de *Mycosphaerella fijiensis* no estado da Bahia.

É possível a identificação da espécie de *M. fijiensis* por meio da análise de sequências das regiões ITS e β -tubulina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARZANLOU, M.; ABELN, E.C.A.; KEMA, G.H.J.; WAALWIJK, C.; CARLIER, J. de VRIES I.; GUZMÁN, M.; CROUS, P.W. Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. **Phytopathology**, v. 97, p. 1112-1118, 2007.

BENGTSSON-PALME, J.; RYBERG, M.; HARTMANN, M.; BRANCO, S.; WANG, Z.; GODHE, A.; NILSSON, R.H. Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. **Methods Ecology Evolution**, v. 4, p. 914-919, 2013.

CROUS, P.W.; HONG, L.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. ITS rDNA phylogeny of selected *Mycosphaerella* species and their anamorphs occurring on Myrtaceae. **Mycological Research**, v. 105, p. 425-431, 2001.

CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; MANSILLA, J.P.; HUNTER, G.C.; WINGFIELD, M.J. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 195-214, 2004.

CROUS, P.W.; WINGFIELD, M.J.; MANSILHA, J.P.; ALFENAS, A.C.; GROENEWALD, J.Z. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 99-131, 2006.

DANTAS, J.L.L.; SHEPHERD, K.; SILVA, S. de O.; SOUZA, A. da S.; ALVES, E.J.; CORDEIRO, Z.J.M.; SOARES FILHO, W. dos S. Citogenética e melhoramento genético. In: ALVES, E.J. (coord.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Brasília: EMBRAPA-SPI/Cruz das Almas: EMBRAPACNPMF, p. 107-150, 1999.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1987.

GOMES, L.I.S.; DOUHAN, G.W.; BIBIANO, L.B.J.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G. *Mycosphaerella musicola* Identified as the Only Pathogen of the Sigatoka Disease Complex Present in Minas Gerais State. **Plant Disease**, v. 97, p. 1537-1543, 2013.

HALL, T. A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics**, v. 17, p. 754-755, 2001.

JONES, D.R. The distribution and importance of the *Mycosphaerella* leaf spot diseases of banana. In: Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San Jose, 2002, Costa Rica. ***Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook**. Montpellier: INIBAP, p.25-41, 2003.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 1870-1874, 2016.

MCDONALD, B.A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, v. 124, p. 163-180, 2002.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. Mrbayes 3: Bayesian phylogenetic

inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572-1574, 2003.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D.L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539-42, 2012.

SILVA, M.; MACHADO, H.; PHILLIPS, A.J.L. *Mycosphaerella* species occurring on *Eucalyptus globulus* in Portugal. **European Journal Plant Pathology**, v. 125, p. 425-433, 2009.

SCHOCH, C.L.; SEIFERT, K.A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J.L.; LEVESQUE, C.A. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, p. 6241-6246, 2012.

VIDEIRA, S.I.R.; GROENEWALD, J.Z.; NAKASHIMA, C.; BRAUN, U.; BARRETO, R. W.; DE WIT, P.J.G.M.; CROUS, P.W. *Mycosphaerellaceae* – Chaos or clarity? **Studies in Mycology**, v. 87, p. 257 – 421, 2017.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, J.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. (eds), PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego, California, USA. **Academic Press**, p. 315–322, 1990.

ARTIGO 2

AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Mycosphaerella fijiensis* EM CULTIVARES DE BANANEIRA²

²Artigo a ser submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Tropical Plant Pathology, em versão na língua inglesa.

AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Mycosphaerella fijiensis* EM CULTIVARES DE BANANEIRA

RESUMO: Dentre os problemas fitossanitários que afetam a bananicultura, a Sigatoka-negra causa sérios prejuízos econômicos. Estudos de agressividade são de fundamental importância para o conhecimento que auxilie no controle de doenças. Deste modo este trabalho teve como objetivo avaliar a agressividade de isolados de *M. fijiensis*, oriundos de diferentes municípios no estado da Bahia por meio da severidade da doença em quatro cultivares de bananeira. Plantas de bananeira das cultivares Prata Anã, BRS Princesa, Grande Naine e Terra foram inoculadas com uma suspensão de 1×10^4 conídios mL⁻¹ na superfície abaxial do limbo, até o ponto de escorrimento. A severidade da doença foi avaliada por meio de escala descritiva por um período de 49 dias após inoculação em intervalos de sete dias. A partir dos dados de severidade, calculou-se a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD). Os valores da AACPD foram agrupados por cultivares pelo teste de Kruskal Wallis, onde as cultivares Grande Naine e Prata Anã não diferiram entre si. O período de incubação dos isolados variou de 15 a 21 dias em todas as cultivares, exceto na BRS Princesa. Os resultados revelam diferença no nível de resistência das cultivares e na agressividade dos isolados. Os isolados A9 e A10 foram os mais agressivos nas cultivares Grande Naine, Prata Anã e Terra.

Palavras chaves: AACPD, *Pseudocercospora fijiensis*, resistência.

AGRESSIVENESS OF *Mycosphaerella fijiensis* ISOLATES IN BANANA CULTIVARS

ABSTRACT: Among the phytosanitary problems that affect banana farming, black Sigatoka causes serious economic losses. Studies on aggressiveness are fundamental for the knowledge that aids in the control of diseases. The objective of this work was to evaluate the aggressiveness of *M. fijiensis* isolates from different municipalities in the state of Bahia through the severity of the disease in four banana cultivars. Banana plants of the cultivars Prata Anã, BRS Princesa, Grande Naine and Terra were inoculated with a suspension of 1×10^4 conidia mL⁻¹ on the abaxial leaf surface, until runoff. The severity of the disease was evaluated by a descriptive scale for 49 days after inoculation at 7-day intervals. From the severity data, the area under the disease progress curve (AUDPC) was calculated. The AUDPC values were grouped by cultivars using the Kruskal Wallis test, according to which the cultivars Grande Naine and Prata Anã did not differ. The incubation period of the isolates ranged from 15 to 21 days in all cultivars, except in BRS Princesa. The results show a difference in the resistance level of the cultivars and in the aggressiveness of the isolates. Isolates A9 and A10 were the most aggressive in the Grande Naine, Prata Anã and Terra cultivars.

Key words: AUDPC, *Pseudocercospora fijiensis*, resistance.

INTRODUÇÃO

A bananeira é afetada por diversos problemas fitossanitários causados por fungos, bactérias, vírus, nematóides e insetos (CORDEIRO et al., 2004). Porém, as doenças fúngicas destacam-se como as mais destrutivas. Assim como ocorre em todos os países produtores de banana, no Brasil, a Sigatoka-negra e Sigatoka-amarela e a murcha de fusarium são os principais problemas fitossanitários da cultura, ocasionando perdas que podem chegar até 100%, no caso da Sigatoka-negra (ROCHA et al., 2012). As espécies *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet) e *Mycosphaerella musicola* (Leach), são agentes causais das doenças foliares em bananais, conhecidas como Sigatoka-negra e Sigatoka-amarela respectivamente. Doenças essas que inviabilizam o plantio de cultivares suscetíveis, como a Grande Naine e a Prata que são de grande aceitação no mercado nacional.

Estas doenças afetam a qualidade e quantidade da produção, onde as perdas podem ser drásticas quando encontram condições favoráveis ao seu desenvolvimento (MONTARROYOS, 2005). A cultura da bananeira é fortemente influenciada pelos fatores ambientais, sendo a temperatura um dos fatores mais relevantes no aparecimento e desenvolvimento de doenças como as sigatokas (STOVER & SIMMONDS, 1987). A temperatura pode interferir diretamente no ciclo do patógeno, podendo aumentar ou reduzir o período de incubação, o qual afetará o número de ciclos do patógeno por ciclo da cultura (ROCHA et al., 2012).

Sendo ambas as sigatokas, doenças policíclicas, a produção de estruturas de reprodução é contínua, o que acaba gerando vários ciclos da doença durante o mesmo plantio da cultura (POZZA, 2000). Desse modo o aumento da população do patógeno, em um hospedeiro suscetível, pode gerar um aumento da área foliar lesionada pela doença num curto intervalo de tempo, se as condições ambientais forem favoráveis. Deste modo, o manejo de doenças policíclicas requer maior atenção devido às características de reprodução desses patógenos (VALE et al., 2004).

A agressividade é componente quantitativo da patogenicidade e seu papel na adaptação de patógenos das plantas ainda não é suficientemente estudado. Devido aos prejuízos causados pelos fungos surge a necessidade do

conhecimento de seu comportamento, que pode auxiliar os programas de melhoramento para resistência, possibilitando a criação de estratégias de controle da doença (PARIAUD et al., 2009).

Estudos que se referem à agressividade de isolados de *Mycosphaerella fijiensis* em plantas de bananeira infectadas ainda são escassos. Sendo assim esse trabalho teve como objetivo avaliar a agressividade de isolados de *M. fijiensis* oriundos de diferentes regiões produtoras no estado da Bahia e comprovar o nível de resistência das cultivares em estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a inoculação foram utilizadas trezentos e sessenta mudas de bananeira, sendo elas Prata Anã, Grande Naine, BRS Princesa e Terra, obtidas na biofábrica da Embrapa Mandioca e Fruticultura (Tabela 1). Estas foram levadas para telado, onde foram transplantadas em sacos de polietileno contendo substrato e irrigadas duas vezes ao dia por sistema de aspersão. As plantas foram adubadas com uréia no substrato após o transplântio para acelerar o seu desenvolvimento e foram mantidas no telado sujeito as condições ambientes. Os ensaios foram realizados no período de julho a dezembro e nesse período a temperatura variou de 22 a 35 °C.

Foram utilizados 14 isolados escolhidos aleatoriamente da micoteca de *Mycosphaerella* (Tabela 2). Em câmara de fluxo laminar, após 15 dias de incubação em BOD, procedeu-se à maceração de colônias de isolados de *M. fijiensis* adicionando-se 4 mL de água destilada esterilizada formando assim, uma suspensão do fungo. Em seguida, foram distribuídas 1000 µL da suspensão por toda a superfície das 10 placas de Petri contendo meio V8 para cada isolado. Após 10 dias de incubação, adicionaram-se 5 mL de água destilada esterilizada sobre as colônias e procedeu-se à liberação dos conídios utilizando uma escova com movimentos suaves.

Tabela 1: Relação das cultivares de bananeiras avaliadas no presente estudo e suas características frente às doenças foliares mais importantes da bananicultura brasileira.

CULTIVARES	CARACTERÍSTICAS ¹			
	GG	PORTE ²	SA	SN
Prata Anã	AAB	MD/BX	S	AS
Grande Naine	AAA	MD/BX	S	AS
Terra	AAB	ALTO	R	S
BRS Princesa	AAAB	ALTO	R	R

¹GG: grupo genômico; SA: Sigatoka-amarela; SN: Sigatoka-negra; S: suscetível; AS: altamente suscetível; R: resistente. ²MD/BX: médio a baixo. (Adaptado de CORDEIRO et al., 2001).

Tabela 2: Isolados de *M. fijiensis* utilizados no teste de patogenicidade com as respectivas cultivares de bananeiras amostradas, local de coleta, coordenadas geográficas e códigos das sequencias depositadas no banco de dados do Genbank.

ISOLADO	CULTIVAR	LOCAL DE COLETA	COORDENADAS GEOGRAFICAS		ESPÉCIE	COD. GENBANK ITS
A 02	Nanica	Encruzilhada	S 15° 32' 20.8"	W 40° 54' 50.3"	<i>M. fijiensis</i>	MG679477
A 03	Prata	Cândido Sales	S 15° 30' 00.1"	W 41° 14' 14.7"	<i>M. fijiensis</i>	MG679483
A 05	Prata	Cruz das Almas	S 12° 39' 26.9"	W 39° 04' 55.7"	<i>M. fijiensis</i>	MG679491
A 08	Terra	Valença	S 13° 21' 49.3"	W 39° 05' 34.4"	<i>M. fijiensis</i>	----
A 09	Terra	São Felipe	S 12° 39' 46.0"	W 38° 57' 31.9"	<i>M. fijiensis</i>	----
A 10	Terra	São Francisco	S 12° 38' 45.5"	W 39° 01' 00.4"	<i>M. fijiensis</i>	MG679492
A 27	Prata	Nova Canaã	S 14° 47' 28.5"	W 40° 09' 59.8"	<i>M. fijiensis</i>	MG679494
A 38	Prata	Potirágua	S 15° 35' 45.0"	W 39° 51' 27.0"	<i>M. fijiensis</i>	MG679495
A 40	Prata	Maragojipe	S 12° 47' 10.4"	W 39° 01' 45.5"	<i>M. fijiensis</i>	MG679484
A 46	Prata	Nova Viçosa	S 17° 58' 39.4"	W 40° 00' 11.4"	<i>M. fijiensis</i>	MG679487
A 68	Prata	Amélia Rodrigues	S 12° 24' 08.3"	W 38° 47' 06.8"	<i>M. fijiensis</i>	MG679479
A 71	Prata	Santo Amaro	S 12° 34' 27.7"	W 38° 45' 14.5"	<i>M. fijiensis</i>	MG679481
A 72	Prata	Rio de Contas	S 13° 27' 31.9"	W 41° 50' 21.1"	<i>M. fijiensis</i>	MG679499
A 97	Prata	Jussara	S 11° 03' 15.2"	W 41° 58' 33.9"	<i>M. fijiensis</i>	----

A inoculação foi realizada por atomização de uma suspensão de esporos calibrada para 10^4 conídios/mL na face inferior (abaxial) das folhas 1 e 2 de cada planta, em seguida as mesmas foram incubadas em câmara úmida num período de 72 horas (Figura 1) e posteriormente mantidas em telado, mediante irrigação por aspersão sobre as copas das plantas três vezes ao dia, para garantir a umidade necessária para o desenvolvimento dos sintomas (CORDEIRO et al., 2001).



Figura 1: (A) Inoculação de *Mycosphaerella fijiensis*, nas folhas 1 e 2 de cultivares de bananeira. (B) Folhas inoculadas e incubadas em câmara úmida.

Avaliação da severidade e cálculo do Índice de doença (ID)

Para a avaliação da severidade da doença nas plantas inoculadas, foi utilizada a escala descritiva posposta por Stover (1971) e modificada por Gauhl (1994), descrita na Figura 2 e no texto seguinte.

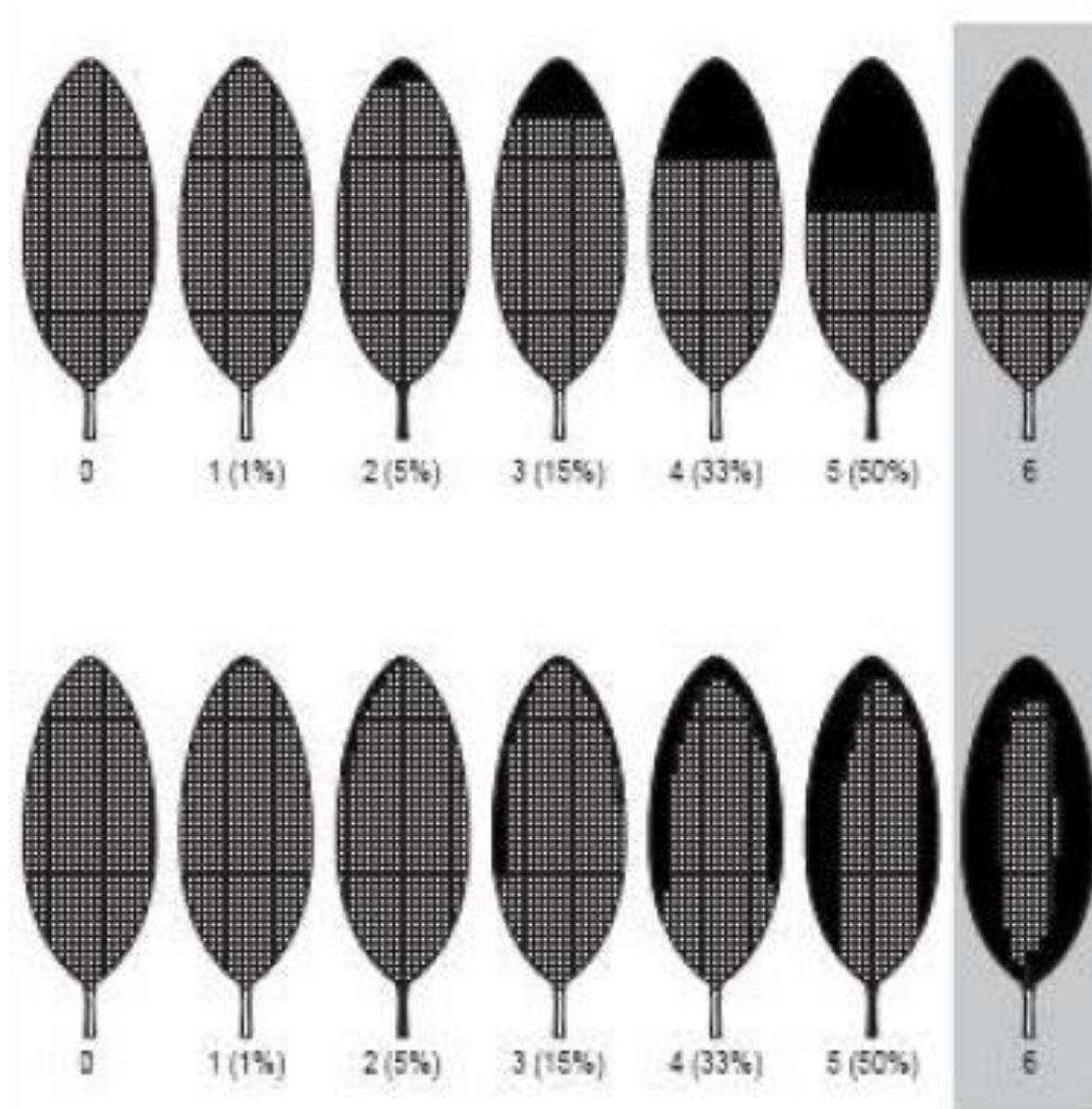


Figura 2: Escala de severidade para avaliação da intensidade do mal-de-sigatoka em folha de bananeira proposta por Stover (1971) modificada por Gauhl (1994).

Descrição das notas da Figura 2:

- 0** - Ausência de sintomas;
- 1** - Menos de 1% da lâmina foliar com sintomas (presença de estrias/ou superior a 10 manchas);
- 2** - De 1 a 5% da lâmina foliar com sintomas;
- 3** - De 6 a 15% da lâmina foliar com sintomas;
- 4** - De 16 a 33% da lâmina foliar com sintomas;
- 5** - De 34 a 50% lâmina foliar com sintomas;
- 6** - De 51 a 100% da lâmina foliar com sintomas;
- - Indica ausência de folha, folha morta ou caída junto ao pseudocaule.

Os escores atribuídos às folhas com sintomas nas avaliações de severidade, foram transformados em seguida em índice de doença, calculado mediante a fórmula $ID = (nb/(N-1)T) \times 100$, onde:

n: número de folhas em cada nível da escala de Stover modificada por Gauhl;

b: nota da infecção;

N: número de graus usados na escala;

T: total de folhas avaliadas.

Após a obtenção do índice de doença, esses valores foram aplicados na fórmula da AACPD descrita abaixo. Os valores de AACPD foram agrupados por cultivar e comparados por meio do teste Kruskal Wallis.

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1} + 1}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Onde:

AACPD = área abaixo da curva de progresso da doença;

y_i = proporção da doença na i-ésima observação;

t_i = tempo em dias na i-ésima observação;

n = número total de observações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença significativa quanto à resistência das cultivares testadas. A cultivar BRS Princesa foi a mais resistente a *M. fijiensis*, enquanto que Grande Naine foi a mais suscetível. Com relação à AACPD, a cultivar Grande Naine apresentou maior média em comparação às demais, no entanto não diferiu estatisticamente da cultivar Prata Anã (Tabela 3).

Tabela 3: Médias das áreas abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), de isolados de *Mycosphaerella fijiensis*.

CULTIVARES	AACPD ¹
Grande Naine	1620,49 a
Prata Anã	1506,60 ab
Terra	1369,11 b
BRS Princesa	0,00 c

¹Letras diferentes indicam que as cultivares diferiram pelo teste de Kruska-Wallis (p-valor < 0.05, ajustado pelo método de Bonferroni).

Os isolados em estudos foram agrupados em 3 grupos de acordo com a sua agressividade. Os isolados mais agressivos que apresentaram maior AACPD foram agrupados no grupo rosa, os isolados agrupados no grupo em azul apresentam uma maior uniformidade em relação àqueles presentes no grupo verde (Figura 3).

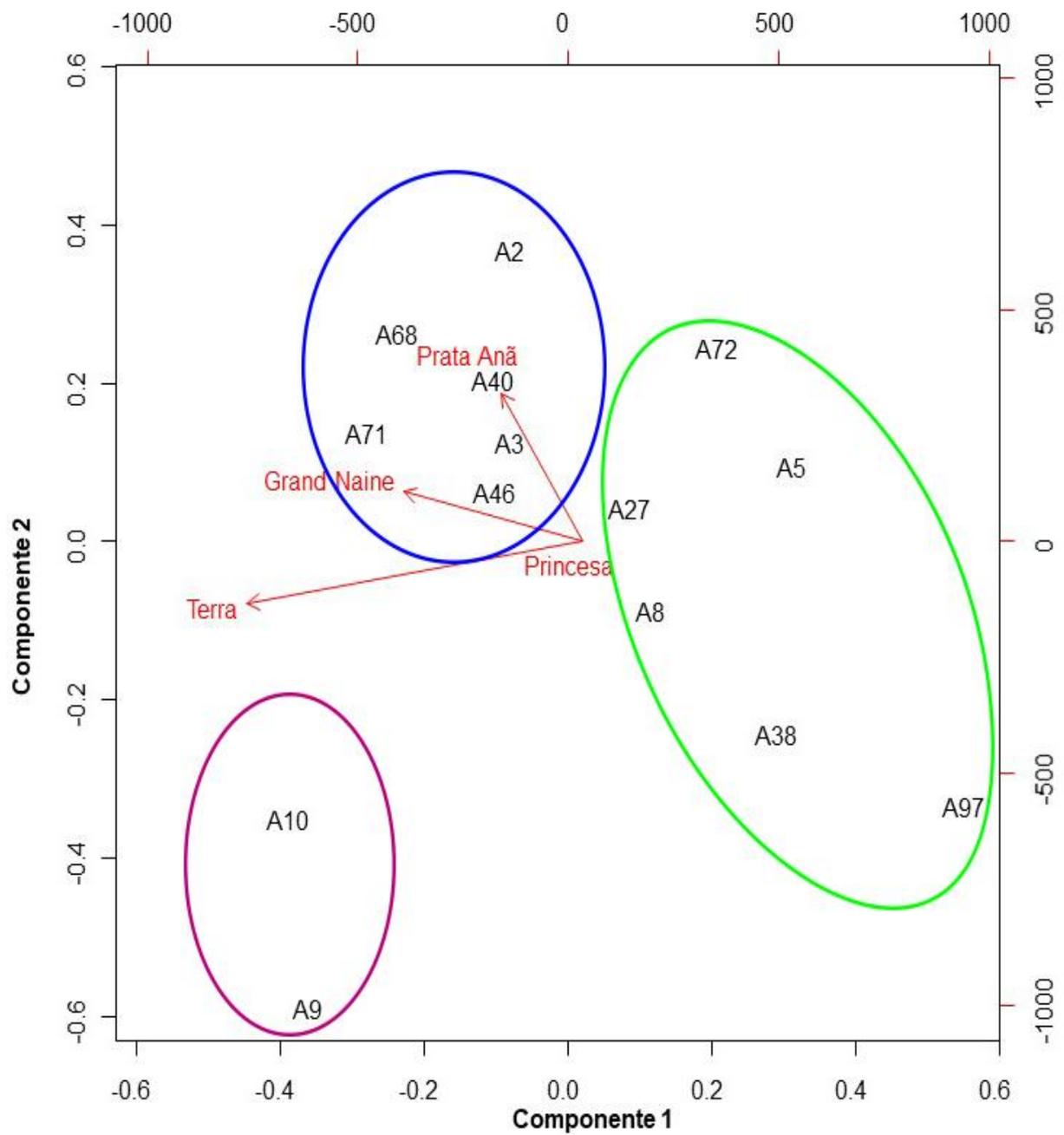


Figura 3: Mapa fatorial de cultivares de banana ordenados com AACPD (área abaixo da curva do progresso da doença) de isolados de *Mycosphaerella fijiensis*.

O período de incubação dos isolados variou entre 15 a 21 dias em todas as cultivares, exceto na cultivar BRS Princesa que não ocorreu infecção do patógeno. O período de incubação, que é considerado o tempo compreendido entre a inoculação e o surgimento dos primeiros sintomas, tem se mostrado extremamente variável em função do ambiente, tendo registro de 15 até 76 dias (CORDEIRO et al., 2005).

Mesmo a agressividade, que é um componente quantitativo da patogenicidade, ainda é pouco estudada em relação ao seu papel na adaptação de patógenos das plantas. Entender como os patógenos prejudicam seus hospedeiros é um foco central na fitopatologia e é de extrema importância para o melhoramento de plantas (PARIAUD et al., 2009). Fry (1982) relata que o conhecimento do progresso da doença em populações é importante para auxiliar na escolha de estratégias de controle. Assim, compreender os componentes epidemiológicos que influenciam a agressividade de isolados de *M. fijiensis* torna-se uma ferramenta importante para o manejo da mesma.

Observa-se que as cultivares Prata Anã (AAB) e Grande naine (AAA) apresentam alto grau de suscetibilidade à Sigatoka-negra, ocasionando perdas de até 100%, enquanto na cultivar Terra (AAB) a doença chega a causar danos de até 70% (GASPAROTTO, 2006). A resistência da cultivar BRS Princesa aos isolados de *M. fijiensis* pode estar relacionada a resistência horizontal.

O estudo da agressividade do patógeno é de fundamental importância para doenças que têm a utilização de cultivares resistentes como estratégia para controle, em que os isolados que apresentam maior agressividade podem ser utilizados nas avaliações desses cultivares pelos programas de melhoramento visando sua resistência. Os resultados indicam que os isolados A9 e A10, que apresentaram maiores AACPD em todas as cultivares em estudo, exceto na BRS Princesa, são promissores para seleção de cultivares resistente a Sigatoka-negra. Patógenos que apresentam reprodução mista como *M. fijiensis* podem apresentar maiores níveis de agressividade, uma vez que esses patógenos apresentam ambas formas de reprodução (sexuada e assexuada). Durante o seu ciclo sexuado, novas combinações de alelos são criadas por meio da recombinação, onde características como adaptação e resistência, por exemplo, podem ser transmitidas, enquanto que no ciclo assexuado o aumento da frequência do novo

alelo ocorre mais rapidamente (MCDONALD & LINDE, 2002). Portanto, o monitoramento da agressividade de populações é conhecimento importante para garantir manejo mais eficiente das doenças.

CONCLUSÕES

Os isolados A9 e A10 são recomendados para testes de resistência em programas de melhoramento da bananeira visando resistência a *M. fijiensis*.

Independente do isolado, as cultivares Grande Naine e Prata Anã apresentam alta suscetibilidade, enquanto a cultivar BRS Princesa apresenta resistência a *M. fijiensis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CORDEIRO, Z.J.M.; MATOS, A.P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira. In: KIMATI & GALLI (eds.) **Manual de Fitopatologia: doenças da e plantas cultivadas**. São Paulo. Ed. Agronômica Ceres. v.2. p.99-117, 2005.

CORDEIRO, Z.J.M.; KIMATI, H.; DIAS, C.T.S. Variabilidade patogênica em *Mycosphaerella musicola*. **Summa Phytopathológica**, v. 27, p. 291-295. 2001.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; MEISSNER FILHO, P. E. Doenças e Métodos de Controle. In: BORGES, A.L.; SOUZA, L.S. **O Cultivo da Bananeira**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 279, 2004.

FRY, W.E. **Principles of plant disease management**. New York: Academic, 1982.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R.; HANADA, R.E.; MONTARROYOS, A.V.V. **Sigatoka negra da bananeira**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 177p. 2006.

GAUHL, F. **Epidemiology and ecology of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on plantain and banana (*Musa* spp.) in Costa Rica, Central América**. Montpellier: INIBAP, 120 p. 1994.

MCDONALD, B.A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, v. 124, p. 163-180, 2002.

MONTARROYOS, A.V.V. **Análise da diversidade genética e patogênica de *Mycosphaerella fijiensis* e *Mycosphaerella musicola* no Brasil**. 163 f. Tese (Doutorado em ciências biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2005.

PARIAUD, B.; RAVIGNÉ, V.; HALKETT, F.; GOYEAU, H.; CARLIER, J.; LANNOU, C. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. **Plant Pathology**, v.58, p. 409–424, 2009.

POZZA, E.A. **Manejo de epidemias de doenças de plantas**. Lavras:UFLA, 2000.

ROCHA, H.S.; POZZA, E.A.; UCHÔA, C.D.N.; CORDEIRO, Z.J.M.; DE SOUZA, P. E.; SUSSEL, Â.A.B.; DE REZENDE, C.A. Temporal Progress of Yellow Sigatoka and Aerobiology of *Mycosphaerella musicola* Spores. **Journal of Phytopathology**, v. 160, p. 277–285, 2012.

STOVER, R.H. A proposed international scale for estimating intensity of banana leaf spot (*Mycosphaerella musicola*). **Tropical Agriculture**, v. 48, p. 185-196, 1971.

STOVER, R.H.; SIMMONDS, N.W. **Bananas**. 3 ed. Harlow, United Kingdom England: Longman Scientific & Technical. 1987.

VALE, F.X.R. do; ZAMBOLIM, L.; COSTA, L.C.; LIBERATO, J.R.; DIAS, A.P.S. Influência do clima no desenvolvimento de doenças de plantas. In: VALE, F.X.R. do; JESUS JUNIOR, W.C. de; ZAMBOLIM, L. (Ed.) **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Editora Perffil, cap. 2, p.47-87, 2004.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabe-se que somente a alta qualidade de frutos produzidos livres de pragas e doenças é capaz de conquistar novos mercados. Por essa razão, a correta identificação do complexo de “sigatokas” que infectam bananeira é o primeiro passo para escolha de uma medida de controle eficiente. Os sintomas de Sigatoka-amarela e Sigatoka-negra são semelhantes, deste modo, se faz necessário estudos que auxiliem no entendimento desses patógenos, visando conhecer aspectos biológicos e suas interações bem como a agressividade.

Os resultados obtidos nesse estudo abrem novos caminhos para pesquisas que irão auxiliar os programas de melhoramento genético que visam resistência à doença em busca de cultivares resistentes.