

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA CENTRO DE
CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**VARIABILIDADE DE *Mycosphaerella* spp. DA BANANEIRA COM
BASE NA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, AGRESSIVIDADE
E PRODUÇÃO DE CERCOSPORINA**

MARIA DE FÁTIMA DE ANDRADE SOUZA

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
JANEIRO – 2018**

**VARIABILIDADE DE *Mycosphaerella* spp. DA BANANEIRA COM
BASE NA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, AGRESSIVIDADE
E PRODUÇÃO DE CERCOSPORINA**

MARIA DE FÁTIMA DE ANDRADE SOUZA

Licenciada em Biologia

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2015

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Dr. Fernando Haddad

Co-Orientador: Dr. Carlos Augusto
Dórea Bragança

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

JANEIRO – 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

S729v

Souza, Maria de Fátima de Andrade.

Variabilidade de mycosphaerella spp. da bananeira com base na caracterização molecular, agressividade e produção de cercosporina / Maria de Fátima de Andrade Souza. - Cruz das Almas, BA, 2018.

94f.; il.

Orientador: Fernando Haddad.

Coorientador: Carlos Augusto Dórea Bragança.

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

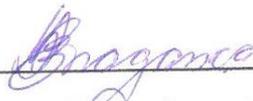
1.Banana – Cultivo. 2.Banana – Doenças e pragas. 3.Genética vegetal – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 634.772

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.
Responsável pela Elaboração – Antonio Marcos Sarmiento das Chagas
(Bibliotecário - CRB5 / 1615). Os dados para catalogação foram enviados
pela usuária via formulário eletrônico.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA CENTRO DE
CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
MARIA DE FÁTIMA DE ANDRADE SOUZA



Prof. Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(Co-Orientador)



Dr. Leandro de Souza Rocha
Embrapa Mandioca e Fruticultura



Dr. Hermínio Souza Rocha
Embrapa Mandioca e Fruticultura

“Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola em _____ conferindo o grau de
Mestre em Microbiologia Agrícola em _____.”

*Dedico este trabalho às pessoas
fundamentais em minha vida: a minha
família. Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pela oportunidade de cursar o mestrado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pelos ensinamentos transmitidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura, pela estrutura na qual pude realizar os experimentos. Assim como, a todos os funcionários desta unidade, que de forma direta ou indireta contribuíram com esse processo formativo.

Ao orientador, Dr. Fernando Haddad. Agradeço à oportunidade que tive de cursar o mestrado sob a sua orientação.

Ao Co-orientador Dr. Carlos Augusto Bragança. Obrigada por sempre oferecer palavras de incentivo, pela orientação acadêmica e profissional.

Ao Dr. Leandro Rocha, grata por cada momento de orientação acadêmica e profissional. “O bem que praticares, em algum lugar, é teu advogado em toda parte, Chico Xavier”.

Ao Dr. Zilton Cordeiro pelas orientações e ensinamentos nos momentos de dúvidas, Grata!

Ao Dr. Hermínio Rocha, pelas orientações, ensinamentos e contribuições. Grata!

Ao querido Dr. Hermes, Deus sempre coloca em nossas vidas pessoas que nos apoiam e nos acolhem com carinho e ternura.

Ao amigo, Francisco Paulo, por todos os ensinamentos, dedicação e ajuda.

Ao amigo adorável, Bizunga, por sempre me ajudar quando precisei. Agradeço-te, pelos ouvidos sempre disponíveis e pela mão amiga.

A todos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em especial a Juliana Ramos.

Aos amigos, Leandro Silva, Paulo Henrique Silva e Jeniffer, obrigada pela ajuda, força e incentivo.

À Maria Almeida, obrigada por ser mais que uma prima, por ser minha irmã e amiga, obrigada por toda ajuda e carinho. Amo-te!

Em especial, a toda a minha família por sempre me apoiar em qualquer circunstância.

Obrigada a todos que
contribuíram para o meu crescimento
como pessoa e profissional!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1. Isolados de *Mycosphaerella* spp. utilizados no sequenciamento. Cruz das Almas-BA, Embrapa/UFRB, 2018 ----- 47

Tabela 2. Isolados de *Mycosphaerella* spp. utilizados no teste de severidade da Sigatoka. Cruz das Almas-BA, Embrapa/UFRB, 2018 ----- 49

Tabela 3. Área abaixo da curva de progresso da doença obtida por meio do Índice de doença (Mckinney, 1923) ----- 63

Capítulo 3

Tabela 1. Isolados de *Mycosphaerella* spp. obtidos por meio do isolamento direto e repicagem de isolados provenientes da micoteca do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Cruz das Almas-BA, Embrapa/UFRB, 2018 -
-----76

Tabela 2. Componentes dos meios de cultura utilizados para induzir a produção de Cercosporina. Cruz das Almas - BA, Embrapa/UFRB, 2018 ----- 78

Tabela 3: Resumo da análise de variância para variável absorvância da toxina cercosporina em relação aos tratamentos testados ----- 84

Tabela 4. Médias da absorvância da toxina cercosporina para diferentes isolados de *Mycosphaerella* spp. submetidos a diferentes comprimentos de onda. Cruz das Almas-BA, Embrapa/UFRB, 2018 ----- 85

Tabela 5. Médias das absorvâncias da toxina cercosporina por isolado dentro dos regimes luminosos, P12 (alternância luminosa 12h claro e escuro) e P24 (luz constante). Cruz das Almas-BA, Embrapa/UFRB, 2018 ----- 88

Tabela 6. Comparação das médias das absorvâncias da toxina cercosporina nos períodos (P12), 12h de luz e (P24) 24h de luz, nos três comprimentos de onda testados 480nm, 595 nm e 640 nm. Cruz das Almas-BA, Embrapa/UFRB, 2018 ---
----- 89

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1 - Revisão de Literatura

Figura 1. Ciclo de vida de *Mycosphaerella* spp. em bananeira (Adaptado de AGRIOS, 2005) ----- 26

Capítulo 2

Figura 1. Isolamento do patógeno. A. Manchas características da Sigatoka-amarela. B. Preparo de câmara úmida após assepsia do fragmento vegetal. C. Captura de conídios a partir de esporodóquios na região central das lesões. D. Esporodóquios na região central da lesão ----- 45

Figura 2. Procedimentos de multiplicação do fungo *Mycosphaerella* spp. (A – B). Obtenção de macerado a partir de colônias do fungo. (C) Transferência de alíquota do macerado para cultivo em meio V8. (D) Espalhamento do fungo por toda a placa contendo o meio de cultivo fazendo uso da alça de Drigalski ----- 50

Figura 3. Inoculação do fungo *Mycosphaerella musicola* e *fijiensis*. (A.B.C) Preparo de suspensão de esporos (1.10^1 conídios/mL). (A) Acréscimo de alíquota de água para liberação de esporos. (B) Raspagem das colônias com escova. (C) Filtração da suspensão em peneira de poro fino. (D) Inoculação do fungo nas folhas 1 e 2 na superfície abaxial do limbo. (E) Identificação das folhas inoculadas. (F) Folhas inoculadas em câmara úmida revestidas com sacos plásticos transparentes ----- 51

Figura 4. Escala de severidade para avaliação da intensidade do mal-de-sigatoka em folha de bananeira proposta por Stover (1971) modificada por Gauhl (1994) ----- 53

Figura 5. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento da sequência de DNA do espaçador transcrito interno (ITS) de *Mycosphaerella* spp. ocorrendo em

bananeiras. O filograma baseia-se no método Neighbor-Joining (NJ), com base no modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros. Os valores de suporte Bootstrap de 10000 repetições são mostrados como porcentagem nos nós----- 57

Figura 6. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento da sequência parcial do gene codificador da β -tubulina de *Mycosphaerella* spp. O comprimento dos ramos horizontais é proporcional à distância genética entre as espécies. A árvore foi obtida usando o método NJ (Kimura 2 Parâmetros). Números próximos aos ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de bootstrap (10000) ----- 58

Figura 7. Sigatoka-amarela, sintomas da doença: (A, B, C) A - Sintomas iniciais, B - Lesões necróticas elípticas, deprimidas com centro cinza e halo amarelado, C - Seca das folhas devido as lesões necróticas. Sigatoka-negra, sintomas da doença (Iso 188): (D,E,F) D e E - Lesões iniciais em forma de listras marrom café na fase abaxial da folha, em (E) Lesões ao longo da nervura principal; F – Progressão das lesões por toda a superfície foliar, do limbo foliar para a nervura principal ----- 60

Figura 8. Distribuição dos isolados *Mycosphaerella* spp. inoculados em cultivares de bananeira Prata Anã e Grande Naine, ordenados com base na AACPD (Área abaixo da curva de progresso da doença). As AACPD foram agrupadas pelo método k-means, elipses indicam grupos formados de acordo com agrupamento k-means ----- 61

Capítulo 3

Figura 1. Colônias de *Mycosphaerella* spp. aos 15 dias de produção da toxina. (A) Seta indicando halo vermelho característico da produção de cercosporina no meio de cultivo (ALCD), isolado 66 sobre luz constante. (B) Seta indicando o crescimento micelial versus tamanho do halo. (C) Produção de cercosporina, isolado 34 sob fotoperíodo de 24h. (D) Produção de cercosporina, isolado 34 sobre fotoperíodo de 12h ----- 81

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO GERAL	16
REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO 1- Revisão de Literatura	20
Cultura da bananeira.....	21
Sigatoka-amarela e Sigatoka-negra.....	21
Etiologia.....	22
Epidemiologia.....	23
Sintomatologia.....	26
Metabólitos secundários produzidos por fitopatógenos.....	28
Cercosporina.....	29
Diversidade genética de <i>Mycosphaerella musicola</i> e <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	30
REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO 2 - Caracterização molecular e agressividade de isolados de <i>Mycosphaerella</i> spp. da bananeira (<i>Musa</i> spp.)	39
RESUMO	40
ABSTRACT	41
INTRODUÇÃO	42
MATERIAL E MÉTODO	44
Obtenção dos isolados.....	44
Extração do DNA.....	45
Amplificação e sequenciamento da região ITSs e gene β -tubulina.....	46
Tratamento dos dados moleculares.....	48
Teste de patogenicidade, avaliação da agressividade dos isolados e busca por correlação com produção cercosporina - Condições de cultivo para inoculação.....	48
Preparo de suspensão de esporos e inoculação em plantas teste.....	50
Teste de Patogenicidade e avaliação da agressividade.....	52

Avaliação do progresso da doença.....	52
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
Identificação e caracterização molecular.....	54
Relações filogenéticas com base na região ITS e gene β - tubulina.....	55
Teste de Patogenicidade, avaliação da agressividade dos isolados e estabelecimento de correlação entre a produção cercosporina.....	59
CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS.....	65
CAPÍTULO 3 - Caracterização de isolados de <i>Mycosphaerella</i> spp. quanto à produção de cercosporina <i>in vitro</i>	69
RESUMO.....	70
ABSTRACT.....	71
INTRODUÇÃO.....	72
MATERIAL E MÉTODOS.....	74
Origem dos isolados de <i>Mycosphaerella</i> spp.....	74
Isolamento direto de estruturas do patógeno.....	75
Repicagem de isolados da Micoteca do laboratório de Fitopatologia.....	75
Indução da produção de Cercosporina – Seleção de meio de cultivo.....	77
Extração e quantificação da Cercosporina.....	78
Análise Estatística.....	79
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
Indução da produção de Cercosporina – Seleção de meio de cultivo.....	80
Análise quantitativa da produção de cercosporina por meio de espectrofotometria.....	84
CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS.....	91
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94

RESUMO

SOUZA, M.F.A. VARIABILIDADE DE *Mycosphaerella* spp. DA BANANEIRA COM BASE NA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, AGRESSIVIDADE E PRODUÇÃO DE CERCOSPORINA

A cultura da bananeira, cultivada em regiões tropicais e subtropicais, assume importante papel econômico e social em mais de 136 países. No Brasil, a banana é cultivada em todas as regiões, com destaque para região Nordeste, principal produtora, onde o estado da Bahia se destaca como líder nacional na produção. Dentre as principais doenças fúngicas em que a bananeira é acometida destacam-se a Fusariose, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), a Sigatoka-amarela causada pelo fungo *Mycosphaerella musicola*, Leach, e a Sigatoka-negra causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis*, Morelet. O agente causal das sigatokas provoca a morte prematura das folhas devido ao comprometimento da capacidade fotossintética afetando o desenvolvimento e a produtividade das plantas. Este estudo tem como objetivo identificar e caracterizar isolados de *Mycosphaerella* spp. por meio de análises do DNA ribossomal (ITS1-ITS4) e do gene β -tubulina, assim como, caracterizar os isolados por meio da indução e quantificação da toxina cercosporina pelo fungo *Mycosphaerella* spp. provenientes de três estados brasileiros. Os isolados de *Mycosphaerella* spp. foram caracterizados baseado na identificação molecular, indução e produção da toxina cercosporina. A correlação entre agressividade versus produção de cercosporina também foi avaliada. Os resultados da caracterização molecular, demonstraram alto índice de suporte bootstrap, formação de clados distintos e o alinhamento com sequências depositadas no banco de dados tanto para as análises ITS e β -tubulina, confirmando e caracterizando os isolados em estudo como *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis*. Em relação à produção de cercosporina, os resultados evidenciaram a indução e produção do metabólito pelos patógenos *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis*.

Palavras-chave: Cercosporiose; Diagnose; Micotoxinas.

ABSTRACT

SOUZA, M.F.A. VARIABILITY OF *Mycosphaerella* spp. OF BANANEIRA BASED ON MOLECULAR CHARACTERIZATION, AGRICULTURE AND PRODUCTION OF CERCOSPORIN

Banana cultivation, cultivated in tropical and subtropical regions, assumes an important economic and social role in more than 136 countries. In Brazil, banana is grown in all regions, with emphasis on the Northeast region, the main producer, where the state of Bahia stands out as the national leader in production. Among the major fungal diseases in which the banana is affected Fusariose, caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), yellow Sigatoka caused by the fungus (*Mycosphaerella musicola*, Leach) and black Sigatoka caused by the fungus (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet). The causal agent of sigatokas causes premature death of the leaves due to the compromising of the photosynthetic capacity affecting the development and productivity of the plants. Diagnosis of pathogens has been performed through the analysis of different regions of the genome, such as analyzes of the ITS region and the β -tubulin gene. Molecular tools such as the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, is based on the use of specific primers to amplify different genes, thus favoring the characterization of pathogens, understanding of phylogenetic relationships and genetic diversity of fungal populations. The isolates of *Mycosphaerella* spp. were characterized based on molecular identification, induction and production of cercosporine toxin. The correlation between aggressiveness versus cercosporine production was also evaluated. The results of the molecular characterization showed a high bootstrapping index, formation of distinct clades and alignment with sequences deposited in the database for both ITS and β -tubulin analyzes, confirming and characterizing the isolates studied as *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella fijiensis* . Regarding the production of cercosporin, the results evidenced the induction and production of the metabolite by the pathogens *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella fijiensis*.

Key words: Cercosporiosis - Diagnosis - Mycotoxins.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil assume a posição de um dos maiores produtores de frutas, em destaque a banana. Uma fruta bastante consumida entre indivíduos de diferentes níveis sociais. A importância do fruto se dá principalmente por estar incluído na dieta alimentar, tendo em vista que o fruto é rico em potássio, vitaminas do complexo B, magnésio, fibras e outros componentes. Além das propriedades nutricionais do fruto, a bananicultura tem gerado empregos e renda no país (FAO, 2017).

A cultura da bananeira (*Musa spp.*), cultivada em regiões tropicais e subtropicais, destaca-se no âmbito econômico e social em mais de 136 países (FAO, 2017). O Brasil em 2015, ocupou a posição de quinto maior produtor mundial de banana, sendo encontrados plantios da cultura em todas as regiões do país. A região Nordeste assume a posição de principal produtora, sendo o estado da Bahia líder nacional na produção de banana. Apesar da elevada produção da fruta no país, grande parte desta produção é destinada ao mercado interno, o que potencializa a importância econômica, alimentar e social da cultura (FGV, 2017).

A bananicultura é habitualmente acometida por diversos problemas fitossanitários. Existem inúmeros registros de uma variedade de doenças que afetam a bananeira nos seus diferentes órgãos (raiz, rizoma, pseudocaule, folhas e frutos). Tais doenças são ocasionadas por bactérias, vírus, nematoides e principalmente fungos. Dentre as principais doenças fúngicas que afetam a bananeira, destacam-se a Sigatoka-amarela, Sigatoka-negra e a Fusariose (KIMATI et al., 1997).

A Sigatoka-amarela foi descrita pela primeira vez em Java, no ano de 1902. A doença é causada pelo fungo *Mycosphaerella musicola* Leach, o qual provoca a morte prematura das folhas em hospedeiros afetados. Estima-se que os danos da bananicultura nacional, devido a Sigatoka-amarela estejam na faixa de 50 % da produção. Já a Sigatoka-negra, foi identificada no Brasil na década de 90, inicialmente no estado do Amazonas, e posteriormente disseminou-se para outras regiões produtoras do país, estima-se que os danos causados pelo patógeno *Mycosphaerella fijiensis* no bananal, podem impactar na perda de 100% da produção, em epidemias severas (CORDEIRO et al., 2016).

Ambos os fungos, *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis* afetam a atividade fotossintética do hospedeiro, resultando na morte precoce das folhas e conseqüentemente no enfraquecimento ou morte da planta, reduzindo drasticamente a produtividade. Do ponto de vista econômico e social, os prejuízos iniciais decorrentes da Sigatoka-amarela foram relatados nas Ilhas Fiji, no Vale de Sigatoka no ano de 1912. No Brasil, a presença da doença foi constatada em 1944, nos estados da Região Norte, no Amazonas disseminando-se, posteriormente, a todos os estados brasileiros. Um dos fatores que favoreceram a disseminação da doença foi à suscetibilidade das variedades cultivadas no país (PEREIRA; GASPAROTTO, 2005).

Uma variedade de fitopatógenos apresentam mecanismos específicos para a produção de substâncias tóxicas, dentre eles encontramos os fungos causadores de Cercosporiose. Dentre as toxinas, está a cercosporina, a qual apresenta atividade tóxica contra um amplo espectro de organismos, tais como, plantas, bactérias, fungos e ratos (BATCHEVAROVA et al., 1992; DAUB, 1987; DAUB; EHRENSHAFT, 2000; DAUB; CHUNG, 2007). A toxidez da cercosporina se dá devido à produção de espécies reativas de oxigênio, deste modo, acredita-se que tal toxina desempenha papel importante na patogenicidade e na formação de lesões (DAUB; CHUNG, 2007).

Diante do exposto, pesquisas que visam compreender os mecanismos de atuação da toxina *in vitro* e *in vivo*, como também, investigar as prováveis interações entre patógeno-hospedeiro visando medidas que favoreçam o controle das doenças foliares no meio agrícola, são imprescindíveis. Apesar de existirem várias tentativas de combater a doença, nenhuma das medidas empregadas são totalmente eficientes. O programa de combate é composto por várias práticas, a exemplo do uso de variedades resistentes a doença, controle cultural e o controle químico.

Todavia, considerando-se que a maioria das variedades de bananeiras são suscetíveis as sigatokas, o controle químico através do uso de fungicidas ainda é a técnica mais usada, apesar dos seus impactos econômicos e ambientais. Diante do exposto, considera-se que o desenvolvimento de pesquisas que visam o aprofundamento sobre o modo de atuação do patógeno, e as variáveis que influenciam no estabelecimento da infecção, fundamentais para o conhecimento

da biologia do mesmo e desenvolvimento de medidas que visem à prevenção e o controle da doença.

Neste sentido, visando o desenvolvimento de novas estratégias relacionadas ao combate às sigatokas, são medidas necessárias, identificar e caracterizar molecularmente, conhecer as relações filogenéticas e estrutura genética de populações desses patógenos, assim como, sua interação com a planta. Este conhecimento contribui para a seleção de genes de resistência subsidiando programas de melhoramento, além de auxiliar o monitoramento de epidemias, contribui para a rápida identificação e diagnóstico evitando a tomada de decisões tardias, reduzindo assim os impactos na produção e produtividade da cultura.

Para a diagnose de patógenos, estão sendo empregadas técnicas moleculares, por meio de marcadores moleculares, assim como por meio da utilização de primers específicos para a identificação, caracterização e conhecimento da diversidade e variabilidade de espécies de microrganismos.

Desta forma, este trabalho buscou identificar e caracterizar isolados de *Mycosphaerella* spp. por meio de análises do DNA ribossomal (ITS1-ITS4) e do gene β -tubulina, sequenciando essas regiões, estabelecendo as relações filogenéticas existentes por meio da construção de árvores filogenéticas, assim como, caracterizar os isolados por meio da indução e quantificação da toxina cercosporina pelo fungo *Mycosphaerella* spp. provenientes de três estados brasileiros.

REFERÊNCIAS

BATCHVAROVA, R. B.; REDDY, V. S.; BENNETT, J. Cellular resistance in rice to cercosporin, a toxin of *Cercospora*. **Phytopathology**, v. 82, n. 6, p. 642-646, 1992.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; HADDAD, F. Melhoramento genético. (Org). O agronegócio da banana. Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2016, p.559-563.

DAUB, M. E. Resistance of fungi to the photosensitizing toxin, cercosporin. **Phytopathology**, v. 77, n. 11, p.1515-1520, 1987.

DAUB, M. E.; EHRENSHAFT, M. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: contributions to plant disease and fundamental biology. **Annual Review of Phytopathology**, v.38, n. 1, p. 461-490, 2000.

DAUB, M. E.; CHUNG, K. R. Cercosporin: A photoactivated toxin in plant disease. **Online. APSnet Features**, v.10, p. 2007-0207, 2007.

FAOSTAT (2017). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/> >.

FGV. Fundação Getúlio Vargas. FGV/Dados. Preços recebidos pelos produtores: média anual para os anos fechados e para 2015, preços médios de janeiro a julho. Disponível em < http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/acs/Valor-Bruto-Producao.xlsx >.

GOODMAN, R. N.; KIRÁLY, A.; WOOD, K. R. **The Biochemistry and physiology of plant disease**. Columbia: University of Missouri Press, 1986. 433 p.

JENNS, A. E.; DAUB, M. E.; UPCHURCH, R. G. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. **Phytopathology**, v. 79, n.2, p. 213-219, 1989.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMI, A. F.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 3.ed. São Paulo: **Agronômica Ceres**, 1997, v.2, 725p.

PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L. Contribuição para o reconhecimento da Sigatoka-amarela e da Sigatoka-negra da bananeira (*Musa* spp.). **Circular Técnica 24**. Embrapa Amazônia Ocidental-Livro técnico, Manaus, 2005.

CAPÍTULO 1
REVISÃO DE LITERATURA

Cultura da bananeira

A bananeira (*Musa* spp.) pertencente à família botânica Musaceae, tem origem no Sudeste Asiático (SIMMONDS, 1962). De acordo com Borges et al, (2006), a maior parte das cultivares de bananeira originaram-se a partir da evolução das espécies selvagens *Musa acuminata* Colla e *Musa balbisiana* Colla.

A fruta apresenta-se como uma fonte alimentar acessível e bastante energética, sendo rica em vitaminas A, B2, B6 e C, além de carboidratos e sais minerais, tais como fósforo, potássio, sódio e magnésio. Possui expressiva importância na alimentação mundial, sendo, a cultura responsável pela geração de emprego e renda para uma parcela representativa da população mundial (PERRIER et al., 2011).

A banana está entre os oito alimentos mais importantes do mundo, ocupa a quarta posição, considerando-se apenas países em desenvolvimento, em especial no continente africano (PLOETZ; EVANS, 2015). Em 2015, o Brasil produziu sete milhões de toneladas da fruta, cultivada em aproximadamente 478 mil hectares, ocupando a quinta posição no cenário mundial. Essa produção gerou uma receita bruta ao país de aproximadamente 9,5 bilhões de reais (FGV, 2017).

Dentre as variedades cultivadas no Brasil as cultivares triploides do grupo AAB, tais como Macã, Pacovan, Prata Anã, Prata, Mysore, D'Angola e Terra (Plátanos), são comercializadas no mercado interno. Já as variedades do grupo AAA, tais como Nanica, Nanicão e Grande Naine são destinadas ao mercado interno e externo. Dentre as cultivares mencionadas predominam no cultivo brasileiro a Pacovan, Prata e Prata Anã, são responsáveis por cerca de 60% da área cultivada no país (SILVA et al., 2016).

A cultura da bananeira é afetada constantemente por variados patógenos que causam diversos problemas fitossanitários. Os fungos representam o grupo de microrganismo que mais causa danos à cultura. Dentre tais patógenos destacam-se *Mycosphaerella musicola*, Leach (Sigatoka-amarela), *Mycosphaerella fijiensis*, Morelet, (Sigatoka-negra) e o *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, (Murcha de Fusarium).

A maioria das cultivares utilizadas pelos produtores e de maior aceitação pelos consumidores são suscetíveis a estes fitopatógenos, o que pode ser um

fator limitante para o cultivo desses materiais (KIMATI et al., 1997; CORDEIRO et al., 2005).

Sigatoka-amarela e Sigatoka-negra

A Sigatoka-amarela foi notada pela primeira vez em Java por Zimmermann no ano de 1902. No ano de 1912 surgiram novos relatos de ocorrência da doença no distrito de Sigatoka na ilha de Viti Levu, em Fiji. Posteriormente, foram observados casos da doença na Ásia, África, Américas Central e do Sul e Caribe, tornando-se ligeiramente um dos mais importantes problemas fitossanitários que afetam a cultura da bananeira (MEREDITH, 1970).

No Brasil a presença da doença foi constatada inicialmente nos estados da Região Norte, em 1944 no Amazonas, disseminando-se, posteriormente, a todos os estados brasileiros. Atualmente o agente causal da Sigatoka-amarela, o fungo *Mycosphaerella musicola* encontra-se disseminado em todas as regiões de cultivo da bananicultura no Brasil e no mundo, gerando prejuízos na produção de frutos, resultando em impactos econômicos e sociais (CORDEIRO; MATOS; KIMATI, 2005, CORDEIRO et al., 2011 apud FOURÈ, 1994).

Já a Sigatoka-negra foi descrita pela primeira vez nas Ilhas Fiji, vale de Sigatoka, em 1963, denominada por estria negra. Na década de 1970 ocasionou a primeira epidemia em Honduras, exibindo maior agressividade comparando-se a Sigatoka-amarela. No ano de 1979 chegou à Costa Rica, onde acredita-se ter encontrado condições propícias para o seu estabelecimento. A Sigatoka-negra encontra-se disseminada por toda a América Central, algumas regiões da África, da Ásia e, na América do Sul, já foi relatada na Colômbia, Equador e Venezuela.

De acordo com Pereira et al. (1998) no Brasil, a Sigatoka-negra foi relatada inicialmente no ano de 1998 no estado do Amazonas. Posteriormente, no mesmo ano, a doença foi constatada no estado do Acre. No ano de 1999, a doença foi constatada em Rondônia e Mato Grosso. Em 2000 houve relatos no estado do Pará, Roraima e Amapá. No ano de 2004, o patógeno foi detectado, no Vale do Ribeira em São Paulo. Posteriormente, no mesmo ano, a presença do fungo foi constatada no Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso do Sul, Sul de Minas Gerais e Santa Catarina (PEREIRA; GASPAROTTO, 2005; GASPAROTTO et al.,

2006). Recentemente, no ano de 2015, a doença foi identificada no estado da Bahia (EMBRAPA, 2016).

Etiologia

O fungo *Mycosphaerella musicola*, Leach, agente causal da Sigatoka-amarela, corresponde à forma perfeita ou sexuada de *Pseudocercospora musae* (Zimm) Deighton, que corresponde à forma imperfeita ou assexuada do mesmo fungo. A doença se origina através de necroses causadas por dois tipos de esporos, um corresponde à fase sexuada, conhecido como ascósporo (bicelular e hialino), e outro correspondente a fase assexuada, conhecido como conídio (longos e multiseptados, produzidos em conidióforos reunidos em esporodóquio) (CORDEIRO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2014).

Quanto à morfologia dos conidióforos, apresentam-se quase retilíneos, hialinos, apresenta septação ou ramificação e a cicatriz do esporo não é evidente. Já em relação aos conídios, estes são cilíndricos obclavados, retos ou curvos, claros a claro-oliváceos, apresentam septos os quais variam entre um a seis e o hilo basal apresenta-se indistinto (STOVER,1972).

Em relação à Sigatoka-negra, o agente causal da doença é o fungo *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet). Assim como, o agente causal da Sigatoka-amarela, este apresenta dois tipos de reprodução, sexuada ou teleomórfica, e assexuada ou anamórfica representada por *Paracercospora fijiensis* (M. Morelet) Deighton ou *Pseudocercospora fijiensis* (M. Morelet) Deighton (CORDEIRO et al., 2011). Atualmente a nomenclatura *Pseudocercospora fijiensis* (M. Morelet) Deighton, tem sido utilizada para designar a forma anamórfica do fungo (CROUS et al., 2003).

O estágio assexual (conidial) do fungo *Mycosphaerella fijiensis* se faz presente nos primeiros estádios da lesão (estrias, manchas), onde pode ser observada a presença em quantidade reduzida de conidióforos, principalmente na superfície abaxial da folha. Quanto à morfologia, os conídios são hialinos a clavos-oliváceos, obclavados a cilíndricos, retos ou curvos, apresentam septos, podendo variar entre um a dez, apresentam hilo basal ligeiramente espessado, com cicatriz evidente (STOVER,1972).

Quanto à morfologia dos ascósporos, apresentam-se fusiformes, clavados hialinos, bicelulares e ligeiramente constrictivos no septo, medindo de 14 a 20 µm de comprimento e 4 a 6 µm de largura. Tanto a fase sexuada ou teleomórfica, quanto à fase assexuada ou anamórfica são consideradas relevantes para o desenvolvimento da doença. Todavia, a fase sexual (*Mycosphaerella fijiensis*) é relatada como mais importante para a reprodução da doença, tendo em vista, o número expressivo de ascósporos que são produzidos nos peritécios (CORDEIRO et al., 2011).

Epidemiologia

Diversos fatores estão associados à dispersão dos patógenos *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis*, a longas e pequenas distancias. Cordeiro et al. (2011), mencionam que a dispersão da Sigatoka-negra entre os diversos continentes, ocorreu provavelmente pela movimentação de material infectado, sendo inclusive, uma das causas relacionadas à rápida dispersão do patógeno *Mycosphaerella fijiensis* na América Central. Desta maneira, à movimentação de folhas de bananeiras infectadas, é um dos fatores que estão relacionados à rápida dispersão e disseminação do patógeno entre continentes (MOURICHON; FULLERTON, 1990).

Os esporos de ambos os fungos, são disseminados por meio de fatores ambientais como o escorrimento da água da chuva, por meio do orvalho presente na superfície foliar, além da dispersão por meio do vento o qual desloca os ascósporos a longas distâncias e os conídios a pequenas distâncias (CORDEIRO et al., 2005). Em relação à sobrevivência destes patógenos, os mesmos podem sobreviver na superfície de frutos, nos variados tipos de embalagens, em veículos que circulam nas áreas de plantio, além de vestimenta de trabalhadores. Sendo deste modo, fatores que influenciam de maneira efetiva na dispersão destes microrganismos, tanto a curtas quanta a longas distâncias (CORDEIRO et al., 2011)

As condições climáticas para ocorrência das sigatokas são: clima úmido, alta pluviosidade e temperaturas em torno de 25°C, nas condições mencionadas, o fungo *Mycosphaerella musicola*, encontra um ambiente propício para o

estabelecimento da doença. Nas condições anteriormente citadas, ocorre à produção de esporos assexuados (conídios) de forma contínua. Ao ocorrer à deposição do esporo sobre a superfície foliar, ocorrerá a germinação em presença de um filme de água.

Sobre a Sigatoka-amarela, Cordeiro et al. (2005) mencionam que temperaturas abaixo de 21°C provocam considerável declínio na taxa de infecção e no desenvolvimento da doença, mesmo em condições de umidade adequadas. O mesmo ocorre em estações secas com baixa produção de orvalho à noite, mesmo em temperatura adequada. A produção de ascósporos é maior nas folhas que ocupam as posições de cinco a dez e quando ocorrem períodos chuvosos, com temperaturas de 21°C, atingindo o máximo de produção no início da estação seca.

Com relação ao fungo causador da Sigatoka-negra, *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, tem sido identificado uma maior sensibilidade às temperaturas mais baixas. De acordo com Cordeiro et al. (2011) temperaturas que variam entre 20 °C a 35 °C propiciam a germinação dos esporos, todavia entre 26 °C - 27 °C foi considerada a faixa de temperatura ideal para o processo de germinação e desenvolvimento da doença.

A infecção ocasionada por ambas as espécies de *Mycosphaerella* spp. em estudo, tem seu início após a deposição dos esporos nas superfícies das folhas da bananeira, conforme pode ser observado na (Figura 1) (STOVER, 1980). Há depender da temperatura, a germinação ocorre entre 2 á 6 horas. Em seguida, hifas crescerão sobre a superfície foliar por 2 a 6 horas até encontrar um estômato. No estômato será formado um apressório, seguindo-se a penetração (CORDEIRO et al., 2005).

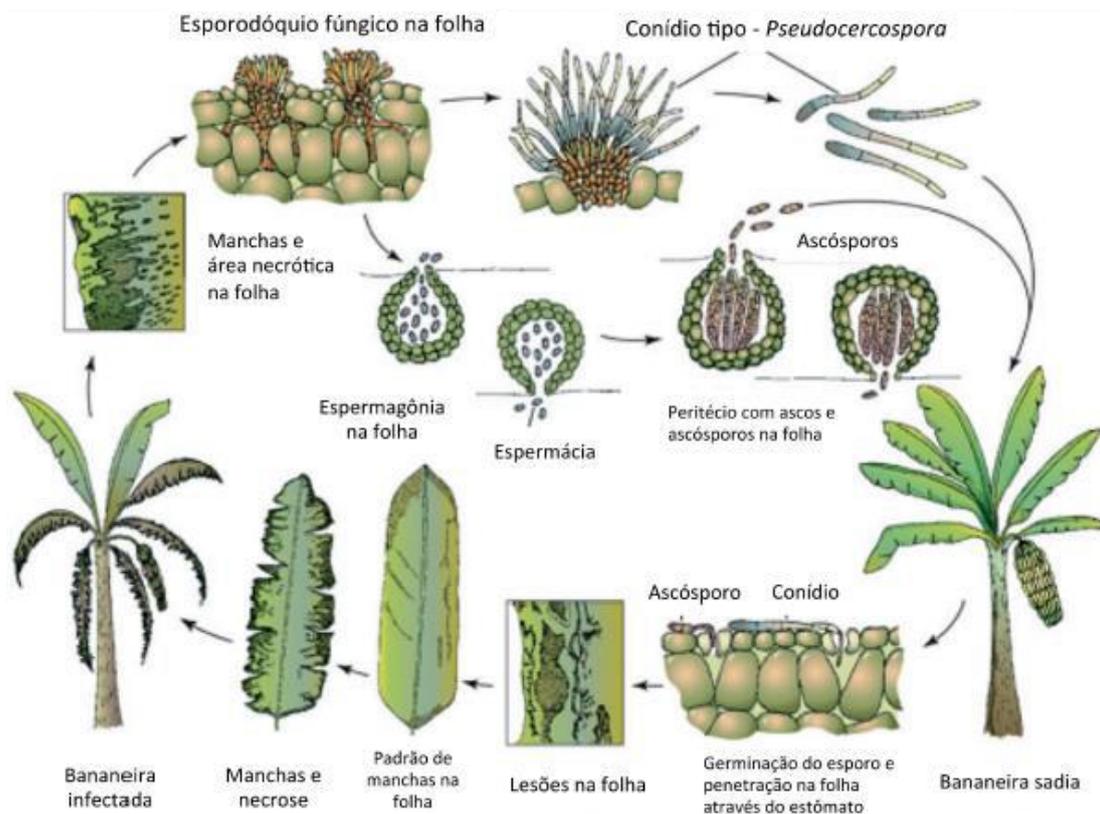


Figura 1: Ciclo de vida de *Mycosphaerella* spp. em bananeira (adaptado de AGRIOS, 2005).

Os ascósporos, esporos sexuados surgem tardiamente em relação aos conídios e são ejetados a partir dos peritécios, em climas úmidos ou, até mesmo, em climas secos com prevalência de orvalhos intensos (SIMMONDS, 1966). Com relação ao patógeno *Mycosphaerella fijiensis*, a fase anamórfica está presente na superfície abaxial da folha em estrias e manchas em estádios iniciais, onde se observam conidióforos saindo do estômato infectado, isoladamente ou em pequeno número (CORDEIRO et al., 2011).

Sintomatologia

As infecções ocasionadas pelos fungos *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis* ocorrem inicialmente nas folhas jovens do hospedeiro. A folha designada como vela, tem a sua estrutura arranjada em lóbulos foliares de forma perfeita e compactada, o lóbulo foliar esquerdo é enrolado sobre si e o direito, envolve o primeiro, a vela permanece ereta por cerca de um a dois dias, em seguida a vela começa a desenrolar aos poucos até apresentar a configuração de folha aberta (GUERRA; MENDONÇA, 2009).

Guerra e Mendonça (2009) mencionam que na configuração de vela e até atingir o desenrolamento completo, a folha fica exposta aos fatores ecológicos, deste modo acredita-se que a configuração espacial da folha vela tem favorecido a infecção do hospedeiro pelo patógeno na medida em que esta fica disposta de modo a facilitar o contato dos esporos quando estão sendo disseminados.

Os sintomas iniciais da Sigatoka-amarela são reconhecidos no hospedeiro através do surgimento de uma leve descoloração em forma de ponto entre as nervuras secundárias das folhas vela ou zero até a quarta folha. Com o decorrer do processo de infecção, as descolorações em forma de ponto expandem, progredindo para estrias de coloração amarela. Em decorrência do avanço da infecção as estrias aumentam, desenvolvendo manchas necróticas com formatos elípticos e alongados. Em estágios mais avançados desenvolvem-se lesões com centro deprimido, de coloração cinza, circundadas por halos amarelados (CORDEIRO; KIMATI, 1997).

Os sintomas da Sigatoka-negra iniciam-se com manchas diminutas e cloróticas na superfície abaxial da terceira ou quarta folha aberta. As manchas evoluem para estrias finas e marrons entre as nervuras secundárias das folhas. A coloração das estrias se intensifica adquirindo coloração marrom escuro, tornando-se visíveis na superfície adaxial das folhas. As lesões aumentam em tamanho, tornando-se fusiformes ou elípticas, apresentando o aspecto estriado típico das folhas infectadas, por fim, as manchas coalescem induzindo a morte prematura do limbo foliar (GASPAROTTO et al., 2006; CORDEIRO et al., 2016).

Os fatores climáticos que estão associados à epidemiologia da Sigatoka-negra são basicamente as mesmas condições necessárias para a Sigatoka-amarela, deste modo, Cordeiro et al. (2016), mencionam a condição de orvalho, temperatura e chuva, sendo imprescindíveis para que ocorra a infecção, e consequentemente o estabelecimento da doença.

Para a classificação das lesões características das sigatokas e avaliação do progresso da doença no hospedeiro, tem sido utilizado à escala diagramática de Stover modificada por Gauhl (1994). A escala propõe a atribuição de notas de acordo com o progresso da doença que vai do estágio zero, onde a planta não apresenta sintomas até o estágio VI, no estágio VI a planta apresenta entre 51% a 100% do limbo com sintomas, caracterizando-se pela fase final da mancha.

Em relação às distinções microscópicas entre as duas espécies, *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis*, podem ser diferenciadas inicialmente, examinando-se a estrutura do conidióforo. O fungo *Mycosphaerella fijiensis* produz conidióforos em pequenos grupos, os quais emergem diretamente dos estômatos (CORDEIRO et al., 2005). Enquanto que o microrganismo *Mycosphaerella musicola* produz conidióforos em feixes sobre estromas (esporodóquios). Outra distinção entre os patógenos é a presença de cicatriz ligeiramente espessada na base dos conídios em *Mycosphaerella fijiensis*, sendo uma característica ausente no fungo *Mycosphaerella musicola*.

A maior parte dos esporos assexuais (conídios) e estruturas que produzem seus esporos sexuais (espermácias em espermogônios) são produzidas na superfície abaxial da folha, enquanto que o fungo *Mycosphaerella musicola* produz conídios predominantemente na superfície adaxial da folha.

A identificação de ambos os patógenos, pode ser realizada examinando-se as estruturas da forma assexuada, tendo em vista que, as distinções nas estruturas sexuadas de *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis* são de difícil detecção. Todavia, para a caracterização precisa do patógeno, têm sido utilizadas técnicas moleculares, tais como, o uso de marcadores moleculares e por meio da técnica de PCR (CORDEIRO et al., 2011).

Metabólitos secundários produzidos por fitopatógenos

Determinados fungos fitopatogênicos possuem mecanismos específicos para a produção de substâncias tóxicas, entretanto tais fitopatógenos apresentam grandes diferenças taxonômicas e no mecanismo de interação entre o patógeno e o hospedeiro. Toxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos, geralmente de baixa massa molecular, móveis, ativas em concentrações fisiológicas ($< 10^{-6} - 10^{-8}$ M), não apresentam características enzimáticas, hormonais ou de ácidos nucleicos, sendo capazes de causar doenças ou até mesmo a morte de plantas (GOODMAN et al., 1986; SCHMELZ et al., 2003; TRUCKSESS, 2004).

Nedelnik; Repková (1998) mencionam que as toxinas podem ser agrupadas de acordo com suas propriedades químicas, além de serem agrupadas de acordo com o tipo de organismo produtor, a exemplo de fungos ou bactérias.

Ainda podem ser agrupadas com base no processo ou atividade biológica onde sua ação irá atuar. São exemplos de mecanismos de ação, à inibição enzimática e a degradação de parede celular. Tais metabólitos ainda são classificados quanto à especificidade ou não ao hospedeiro.

Segundo Knogge (1996), as interações entre plantas e microrganismos produtores de toxinas se baseiam na produção da toxina versus detoxificação, no reconhecimento versus não reconhecimento e na supressão do reconhecimento versus respostas de defesa. Ainda de acordo com o autor “as toxinas não seletivas ao hospedeiro agem primariamente inibindo os processos de defesa das plantas, como a detoxificação ou a atividade de enzimas localizadas na membrana”.

Tais metabólitos são tóxicos a uma variedade de espécies de plantas, independente das mesmas serem ou não hospedeiras do fungo toxigênico, são vistas como fatores de virulência, pois contribuem para a severidade da doença sem serem essenciais para sua ocorrência (KNOGGE, 1996). A cercosporina é um exemplo de toxina que atua de forma não-seletiva.

A cercosporina foi isolada em 1956, utilizando-se culturas de *C. kikuchii* (KUYAMA; TAMURA, 1956). Propriedades fotodinâmicas e tóxicas da cercosporina foram descritas inicialmente na década de 70, mais tarde, foi confirmada a importância da incidência luminosa para ativar a produção da toxina, assim como, desencadear os efeitos tóxicos (BATCHVAROVA et al., 1992; DAUB, 1982). Neste período também foi detectado correlação positiva entre a intensidade luminosa e toxidez em células vegetais de hospedeiros afetados por microrganismos *Cercospora* (DAUB, 1982).

Cercosporina

A cercosporina é uma toxina não seletiva a qual atua de forma prejudicial a inúmeros organismos. Pertence ao grupo químico perilenoquinona, contém moléculas fotossensibilizadoras capazes de absorver luz e gerar espécies reativas de oxigênio, causando danos à membrana celular (DAUB; CHUNG, 2009).

A produção de tal metabólito *in vitro* ocorre por meio de hifas em meio de cultura, resultando em acúmulo da toxina nas proximidades das hifas e na

superfície do meio. A toxina cercosporina apresenta coloração avermelhada, todavia em condições alcalinas como na presença de KOH, a mesma apresenta coloração esverdeada variando de verde claro a verde intenso. Ao realizar testes de absorvância da toxina Jenns et al. (1989) observaram que a mesma apresenta maior absorção a um comprimento de onda de 480 nm.

Daub e Chung (2009) mencionam que o fator mais importante para a ativação da toxina e para sua biossíntese é a presença de luz, por menor que seja a exposição à intensidade luminosa ocorre à ativação da toxina, enquanto na ausência de luz a produção de cercosporina é interrompida. Acredita-se que a luz visível dos comprimentos de onda absorvidos pela molécula cercosporina (aproximadamente 400-600 nm) são responsáveis tanto para induzir a produção quanto por causar toxicidade.

In vitro a cercosporina é produzida pelo patógeno apenas em meios de cultura que favoreçam o crescimento vegetativo, e é inibido em meios nutritivos que induzam o processo de esporulação, tal como na forma de suco V8. Diversos parâmetros fisiológicos, incluindo temperatura, condições nutritivas, pH e fonte de carbono, afetam a produção do metabólito. A síntese de metabólitos também varia entre espécies e entre populações de isolados de uma única espécie. A produção de toxinas também pode variar de acordo com a temperatura e regime de luz variada, temperaturas elevadas (30° C, 86° F) também inibem a produção de cercosporina (DAUB; CHUNG, 2007).

Diversidade genética de *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis*

Considerando a importância econômica e social da bananicultura e a amplitude dos danos causados pelos fungos *Mycosphaerella musicola* e principalmente *Mycosphaerella fijiensis* em bananais no Brasil, identificar, caracterizar isolados desses microrganismos, assim como compreender a estrutura genética e distribuição do patógeno se faz necessário. Desta forma, as informações geradas em pesquisas desta amplitude favorecem a obtenção de dados que fomentam a busca por alternativas que visam o controle das sigatokas.

Para a realização da identificação e classificação de patógenos relacionados, a compreensão da variabilidade genética e o estudo dos processos evolutivos em populações de microrganismos, técnicas da biologia molecular tem

sido constantemente empregadas. Queiroz et al., (2013) mencionam a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) como uma ferramenta eficiente e rápida, constituindo assim um método eficaz para a amplificação de diferentes genes, podendo revelar polimorfismo ao nível de sequências de DNA suficientes para estabelecer diferenças inter e intraespecíficas.

Desta maneira, *primers* específicos tem sido utilizados como ferramentas para a diagnose de fungos por meio da técnica de PCR, sendo considerada uma técnica bastante sensível (BORÉM; CAIXETA, 2009). Dentre as técnicas moleculares em constante uso, a análise da região ITS vem sendo utilizada para a identificação molecular de fungos por conta do alto grau de variabilidade interespecífica, da presença de sítios conservados para primers e por apresentar múltiplas cópias naturais no genoma (BLAALID et al., 2013). Em fungos, ocorre variação da região ITS, com algumas exceções, cerca de 450 a 750 pares de base de comprimento (CROUS et al., 2011; BLAALID et al., 2013).

O gene β -tubulina também vem sendo usado em estudos de filogenia por apresentar alta conservação da sequência de nucleotídeos. Arzanlou et al. (2008) e Crous et al. (2009), realizaram análises filogenéticas da região ITS (Internal transcribed spacer) do DNA ribossômico e do gene β -tubulina, entre espécies de *Mycosphaerella* spp. e seus anamorfos de variadas plantas hospedeiras.

Os fungos *Mycosphaerella musicola*, *fijiensis* e *emusae* foram identificados e diferenciados por Crous et al. (2001) e Hayden et al. (2003) com base no polimorfismo da região ITS do rDNA genômico. Crous et al. (2011) usaram a região ITS do rDNA genômico para analisar filogeneticamente o complexo *Mycosphaerella*, tendo em vista a inserção de espécies novas ao gênero.

Sobre o estudo da diversidade genética de populações de *Mycosphaerella musicola*, existem variados trabalhos, que investigam a variabilidade genética entre isolados de diferentes regiões brasileiras, dentre eles podemos mencionar, Moreira et al. (2003), onde avaliou a variabilidade genética entre isolados de *Mycosphaerella musicola* oriundos de diferentes estados brasileiros, utilizando a técnica de RAPD. Os resultados deste estudo evidenciaram alta diversidade genética não havendo correlação com as origens geográficas.

Montarroyos (2005) analisou a diversidade genética de *Mycosphaerella musicola* proveniente do estado de Pernambuco, neste estudo também não foi estabelecido correlação entre a alta diversidade e as origens geográficas dos

isolados. Rocha (2008) avaliou a variabilidade genética entre 11 isolados de *Mycosphaerella musicola* oriundos de variadas regiões brasileiras, sendo um destes isolados proveniente do norte de Minas Gerais, onde foi constatada alta variabilidade genética.

Conhecer a variabilidade genética de microrganismos subsidia o entendimento das dinâmicas de populações e a estrutura genética, além de possibilitar inferências sobre a evolução das espécies. A diversidade genética interespecífica e intraespecífica nas populações estão sob influência de fatores biológicos e ecológicos, podendo ser influenciados pelas condições a qual o indivíduo for exposto (HAMRICK, 1982; SUNNUCKS, 2000).

Variações genéticas entre indivíduos podem ser resultantes de diversos processos e forças evolutivas, tais como, mutações, fluxo gênico ou migração, reprodução sexual, seleção natural, deriva genética entre outros. Tais adventos evolutivos acabam por acumular efeitos nas populações, as quais, por sua vez, influenciam na especiação e na hierarquia taxonômica.

De acordo com Sunnucks (2000) estudos que visam investigar a variabilidade genética de populações examinam as relações existentes entre os processos evolutivos e padrões demográficos com variantes genéticas moleculares permitindo assim, inferir sobre a biologia do organismo. Para Perea et al. (2005) quantificar a diversidade genética de microrganismos patogênicos favorece o planejamento e adoção de medidas que visam o desenvolvimento de cultivares resistente à doenças, subsidiando assim programas de melhoramento genético de plantas.

REFERÊNCIAS

- 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.
- BORGES, A. L.; OLIVEIRA, A. M. G.; RITZINGER, C. H. S. P.; ALMEIDA, C. O.; COELHO, E. F.; SANTOS-SEREJO, J. A. DOS; SOUZA, L. S.; LIMA, M. B.; FANCELLI, E.; FOLEGATTI, M. I. S.; MEISSNER FILHO, P. E.; SILVA, S. O. e; MEDINA, V. M; CORDEIRO, Z. J. M. **A cultura da banana**. 3. ed. rev. ampl. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, (Coleção plantar, 56; Série Vermelha. Fruteiras), 110 p., 2006.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2 ed. Vicososa, MG, UFV, 532p. 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, n.2, p. 218-224, 2013.
- CORDEIRO, Z. J. M. **A cultura da banana**. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 3. ed. rev. e amp. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 110 p. (Coleção Plantar, 56).
- CORDEIRO, Z. J. M.; ROCHA, H. S.; ARAÚJO, A. G. **Metodologias para manuseio de *Mycosphaerella musicola* em laboratório**. Embrapa Mandioca e Fruticultura. Cruz das Almas, 2011. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/54426/1/Doc-198-final.pdf>.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira (*Musa* spp.). In: KIMATI ; GALLI (eds.) **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo. Ed. Agronômica Ceres. v. 2. p.99-117, 2005.

CORDEIRO, Z.J.M; MATOS, A. P. Doenças.fúngicas e bacterianas. In: CORDEIRO, Z. M. (org.). **Banana fitossanidade**. Embrapa Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, BA). Brasília: Embrapa Comunicação para transferência de tecnologia, 2000, p. 36- 65. 11.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; SILVA, S. O. **Recomendações técnicas sobre a Sigatoka-negra da bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 107, 2011.

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

CROUS, P. W; TANAKA, K.; SUMMERELL, B. A; GROENEWALD, J. Z. Additions to *Mycosphaerella* complex. **IMA Fungus**, v. 2, n.1, p. 49–64, 2011.

DUAB, M. E. Cercosporin, a photosensitiing toxin from *Cercospora* species. **Phytopathology**, v.72, n. 4, 370-374, 1982.

DAUB, M. E.; CHUNG, K. R. Cercosporin: A photoactivated toxin in plant disease. St. Paul: **APS Press**, 2007. p.1-12. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/online/feature/Cercosporin>>. Acesso em: 15 Fev. 2016.

DAUB, M. E.; CHUNG, K. R. Photoactivated perylenequinono toxins in plant pathogenesis. 2009. In: The Mycota V, **Plant Relationships**, 2nd Edition. H.Deising, Ed. Springer- Verlag, Berlin Heidelberg. P. 201-219. Disponível em: <<https://cals.ncsu.edu/plantbiology/Faculty/mdaub/Mycotachapter.pdf>>.

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 28 mar. 2018

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/> >. Acesso em: 13 de junho, 2017.

FOURÉ, E. **Leaf spot disease of Banana and Plantain caused by *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella fijiensis***. In: Conference of the International Musa Testing Program Held at Fhia, 1994, Honduras. Proceedings. Montpellier: INIBAP, 1994. p.37-46.

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

GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v.37, n.3, p. 229-233, 2004.

GUERRA, A. G.; MENDONÇA, V. **Manual de Fruticultura tropical**. Editora Clube dos autores, 375p, 2009.

HAMRICK, J. L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, Ohio, v.69, n. 10, p. 1685-1693, 1982.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMI, A. F.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 3.ed. São Paulo: **Agronômica Ceres**, 1997. v. 2, 725p.

KOSHIKUMO, E. S. M. Identificação molecular e morfológica, métodos de esporulação, indução e detecção de cercosporina das espécies de cercospora do milho. 109 p. (2011). **Tese (Doutorado em Fitopatologia)** - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

KOSHIKUMO, E. S. M.; ALVES, E.; VON PINHO, R. G. Induction and detection of toxin in *Cercospora zeina* and *Cercospora sorghi* f. sp. Maydis. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 1, p. 31-35, 2014.

KUYAMA, S.; TAMURA, T. Cercosporin. A pigmento f *Cercospora Kikuchii*. I. Cultivation of fungus, isolation and purification of pigment. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, p. 5725- 5726, 1956.

KNOGGE, W. Molecular basis of specificity in host-fungus interactions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 102, n. 9, p. 807-816, 1996.

MELO, R. C. C.; CORDEIRO, Z. J. M.; LEDO, C. A.S. **Controle da Sigatoka Amarela da bananeira mediante consórcio de variedades resistentes e suscetíveis**. XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura, Bento Goncalves- RS, Ano, 2012.

MEREDITH, D. S. Banana leaf spot disease (Sigatoka) caused by *Mycosphaerella musicola*. **Phytopathology Paper**, n. 11, 147 p. 1970.

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, n.3, p. 213-218, 1990.

MOREIRA, R. F. C.; CORDEIRO, Z. J. M.; VILARINHOS, A. D. Caracterização genética de isolados de *Mycosphaerella musicola* por marcadores RAPD. **Summa Phytopathologica**, v.29, n.3, p.275-277, 2003.

NEDÉLNICK, J.; REPKOVÁ, J. Plant selection in vitro for resistance to some pathogens using secondary toxic metabolites. **Journal of Genetic Plant Breeding**, v. 34, p. 69-76, 1998.

OLIVEIRA, J. R. O; NIETSCHKE, S.; COSTA, M. R; MIZOBUTSI, E. H.; OLIVEIRA, D. A. Diversidade Genética de Isolados de *Mycosphaerella musicola* Obtidos de Bananais do Norte de Minas Gerais, Brasil por Meio de Marcadores RAPD. **Ciência Rural**, v, 43, n.1, p. 45-48, 2013.

PAOLI, P. Biobancos microbiológicos a partir de coleta de amostras para a epidemiologia, diagnóstico e pesquisa. **Microbiol Rev.** v. 29, p. 897-910, 2005.

PLOETZ, R. C.; EVANS, E. A. The Future of Global Banana Production. **Horticultural Reviews**, v. 43, p. 311-343, 2015.

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. D. S.; URBEN, A. F. Ocorrência da Sigatoka negra no Brasil. **Fitopatologia brasileira**, v. 23, p. 295, 1998.

PERRIER, X.; LANGHE, E.; DONOHUE, M.; LENTFER, C.; VRYDAGHS, L.; BAKRY, F.; CARREEL, F.; HIPPOLYTE, I.; HORRY, J.P.; JENNY, C.; LEBOT, V.; RISTERUCCI, A.M.; TOMEKPE, K.; DOUTRELEPONT, H.; BALL, T.; MANWARING, J.; MARET, P.; DENHAM, T. Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 28, p. 11311-11318, 2011.

PEREA, I.; RODRÍGUEZ, A. E.; MÁRQUEZ, E.; ARANGO, R. Genetic diversity of Colombian isolates of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet based on microsatellite markers. **InfoMusa**, v.14, n.2. p.18-21, 2005.

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, n. 1, p. 443-452, 2013.

ROCHA, H. S. Epidemiologia da Sigatoka-amarela, quantificação de fenóis em variedades de bananeiras e análise filogenética de isolados de *Mycosphaerella musicola* utilizando microssatélites. **Tese de Doutorado**. Lavras: UFLA, 125p, 2008.

SCHMELZ, E. A.; ENGELBERTH, J.; ALBORN, H. T.; O'DONNELL, P.; SAMMONS, M.; TOSHIMA, H.; TUMLINSON, J. H. Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins and volatile organic compounds in plants. **PNAS**, v. 100, n. 18, p. 10551-10557, 2003.

SOLA, C. M. **Manutenção de microrganismos**: Conservação e viabilidade. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, n.14, p. 1398, 2012.

SILVA, S.O. et al. Cultivares In: O Agronegócio da Bananeira. Volume 1. 1ª Edição. Editado por Ferreira, C.F. ; Silva, S. de O. ; Amorim, E.P. ; Santos-Serejo, J.A dos. Embrapa Mandioca e Fruticultura. 832 p., 2016.

SIMMONDS, N. W. **The Evolution of the Bananas**. London: Longmans, 170p. 1962.

SIMMONDS, N.W. Bananas. 2nd ed. Longmans, Green & Co. Ltd. 1966. 512 p.

SIMMONDS, N.W. Diseases. In: SIMMONDS, N.W. Bananas. 2nd Ed. London: Longmans, 1966. p. 366-408.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in ecology & evolution**, v. 15, n. 5, p. 199-203, 2000.

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

TRUCKSESS, M. W. Mycotoxins. **JAOAC International**, v. 87, p. 275-284, 2004.

YOU, B. J.; LEE M. H.; CHUNG, K. R. Production of cercosporin toxin by the phytopathogenic *Cercospora* fungi is affected by diverse environmental signals. **Canadian journal of microbiology**, v. 54, n. 4, p. 259–269, 2008.

CAPÍTULO 2

Caracterização molecular e agressividade de isolados de *Mycosphaerella* spp. da bananeira (*Musa* spp.)*

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

Caracterização molecular e da agressividade de isolados de *Mycosphaerella* spp. da bananeira (*Musa* spp.)

RESUMO

O sequenciamento do rDNA, é uma técnica constantemente aplicada para a identificação de fungos, seu uso tem contribuído para distinguir diferenças entre isolados de uma mesma espécie ou gênero e expandir o conhecimento acerca da diversidade. Sendo assim, a diagnose de fitopatógenos tem sido realizada por meio da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Os objetivos deste trabalho foram caracterizar isolados de *Mycosphaerella* spp. obtidos de bananeira a nível de espécie, por meio do sequenciamento do rDNA da região (ITS1-ITS4) e do gene β -tubulina e avaliar a patogenicidade e agressividade desses isolados em mudas de bananeira. A correlação entre a agressividade e produção de cercosporina também foi testada. Para a caracterização genética foram utilizados trinta e um isolados de *Mycosphaerella* spp. coletados em três estados brasileiros em diferentes localidades. O DNA genômico dos isolados foi extraído para amplificação parcial do rDNA (ITS) e do gene β -tubulina. As sequências obtidas foram alinhadas com sequências depositadas no GenBank e com o auxílio do BLASTn. As sequências com alta similaridade foram utilizadas no conjunto de dados para reconstrução filogenética. Para a avaliação da agressividade e correlação com produção de cercosporina, 18 isolados de *Mycosphaerella musicola* e 1 isolado de *Mycosphaerella fijiensis* foram inoculados em mudas das variedades Prata Anã e Grande Naine. A avaliação da severidade ocorreu, em intervalos de 4 dias, por meio de escala de notas para obtenção das AACPDs em um período de 50 dias. Vinte e quatro isolados agruparam com sequências de *Mycosphaerella musicola* e dois isolados coletados no município de São Felipe - BA agruparam com sequências de *Mycosphaerella fijiensis*. As análises da AACPD revelaram diferenças na agressividade dos isolados, o período de incubação, variou entre 25 a 29 dias. Quanto à produção de metabólito fitotóxico versus agressividade dos isolados, houve correlação positiva em 50% dos isolados.

Palavras-chave: Diagnose de microrganismo; metabólitos secundários; epidemiologia.

ABSTRACT

The sequencing of rDNA is a technique constantly applied to the identification of fungi, its use has contributed to distinguish differences between isolates of the same species or genus and to expand the knowledge about diversity. Thus, the diagnosis of phytopathogens has been performed using the PCR (Polymerase Chain Reaction) technique. The objectives of this work were to characterize isolates of *Mycosphaerella* spp. (ITS1-ITS4) and the β -tubulin gene and to evaluate the pathogenicity and aggressiveness of these isolates in banana tree seedlings. The correlation between aggressiveness and cercosporine production was also tested. For the genetic characterization, thirty one isolates of *Mycosphaerella* spp. collected in three Brazilian states in different localities. The genomic DNA of the isolates was extracted for partial amplification of the rDNA (ITS) and the β -tubulin gene. The sequences obtained were aligned with sequences deposited on GenBank and with the aid of BLASTn. Sequences with high similarity were used in the dataset for phylogenetic reconstruction. For the evaluation of the aggressiveness and correlation with cercosporine production, 18 isolates of *Mycosphaerella musicola* and 1 isolate of *Mycosphaerella fijiensis* were inoculated on seedlings of Prata Anã and Grande Naine. The severity assessment was performed at 4-day intervals using a score scale to obtain AACPDs over a period of 50 days. Twenty - four isolates grouped with *Mycosphaerella musicola* sequences and two isolates collected in the municipality of São Felipe - BA grouped with *Mycosphaerella fijiensis* sequences. The AACPD analyzes revealed differences in the aggressiveness of the isolates, the incubation period ranged from 25 to 29 days. Regarding the production of phytotoxic metabolites versus aggressiveness of the isolates, there was a positive correlation in 50% of the isolates.

Keywords: Diagnosis of microorganism, secondary metabolites, epidemiology.

INTRODUÇÃO

A cercosporiose da bananeira causada pelos patógenos *Mycosphaerella musicola* Leach e *Mycosphaerella fijiensis* Morelet estão entre as principais doenças que acomete a bananicultura no Brasil e no mundo. Tais moléstias têm gerado impactos econômicos e sociais em regiões produtoras. No Brasil a Sigatoka-amarela foi constatada inicialmente nos estados da Região Norte, em 1944 no Amazonas (ARZANLOU et al., 2008; CROUS et al., 2009; QUEIROZ et al., 2013). Atualmente o fungo *Mycosphaerella musicola* Leach, encontra-se disseminado em todas as regiões de cultivo da bananicultura no Brasil e no mundo, gerando prejuízos na produção de frutos (CORDEIRO; MATOS; KIMATI, 2005, CORDEIRO et al., 2011 apud FOURÈ, 1994).

Já a Sigatoka-negra foi identificada no Brasil na década de 90, inicialmente no estado do Amazonas, posteriormente disseminou-se para outras regiões produtoras do país. Estima-se que os prejuízos decorrentes das lesões provocadas pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, podem impactar cerca de 100% da produção na ocorrência de epidemias severas (CORDEIRO et al., 2016).

A identificação de patógenos, em hospedeiros acometidos inicialmente pode ser realizada com base nos sintomas da doença e em características morfológicas. Todavia, os patógenos causadores de Cercosporiose em *Musa* spp. causam sintomas similares, podendo coexistir em uma mesma folha de bananeira, o que dificulta a constatação da doença.

Desta maneira, para identificação e diagnose com precisão, ferramentas moleculares para a análise de diferentes regiões do genoma tem sido utilizada favorecendo assim, a compreensão sobre relações filogenéticas e diversidade genética de populações de fungos. Tais mecanismos moleculares apresentam vantagens como rapidez, versatilidade e eficiência (ARZANLOU et al., 2007, GOMES et al., 2013).

Dentre as ferramentas moleculares em uso, destaca-se a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). A mesma é utilizada para a caracterização e diagnose de microrganismos, além de estudos das relações filogenéticas em diversos organismos. A técnica baseia-se, no uso de primers específicos para amplificar diferentes genes. Os primers específicos são pares de oligonucleotídios

sintéticos de fita simples, utilizados para iniciar a síntese de um segmento de DNA-alvo, constituindo assim, um importante instrumento para a identificação e diferenciação de fungos (CROUS et al., 2006; BORÉM; CAIXETA, 2009).

Análises da região ITS (Internal transcribed spacer) do DNA ribossômico e do gene β -tubulina, têm sido frequentemente empregados em estudos de relações filogenéticas entre espécies de *Mycosphaerella* spp. e seus anamorfos de diferentes plantas hospedeiras (ARZANLOU et al., 2008; CROUS et al., 2009; QUEIROZ et al., 2013).

Cordeiro et al. (2004), mencionam as sigatokas como um dos principais problemas fitossanitários da bananicultura. Tais microrganismos provocam no hospedeiro afetado, a redução da área foliar sadia e fotossintetizante, como consequência ocorre à morte prematura das folhas. Com isso, o crescimento e a produtividade das plantas são afetados.

Acredita-se que dentre as razões advindas do sucesso no estabelecimento de populações desses patógenos estejam relacionadas à produção da toxina cercosporina, a qual apresenta toxidez em inúmeras espécies vegetais. A produção de metabólitos fitotóxicos por membros do gênero *Cercospora* tem ocasionado consideráveis impactos sociais e econômicos em variadas culturas hospedeiras, incluindo a cultura da bananeira. Esse mecanismo é considerado um dos fatores associados à severidade da doença e às variações entre a produção da toxina cercosporina por diferentes isolados. Acredita-se que tudo isso possa refletir na agressividade dos mesmos (DAUB et al., 2005).

Além da produção de cercosporina, os microrganismos *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis*, garantem sucesso na dispersão para outras áreas, devido à maneira como ocorre à disseminação da doença, sendo o vento um dos principais agentes responsáveis pela liberação dos esporos, dispersão a pequenas e longas distâncias. Além disso, as águas das chuvas também favorecem a disseminação do patógeno. Outro fator favorável ao estabelecimento de populações desses patógenos esta relacionada à alta variabilidade genética (MOREIRA et al., 2003; CARLIER et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2013; PEIXOUTO et al. 2015).

Diante do exposto, o estudo das relações entre a severidade da doença, produção de cercosporina e a agressividade dos fungos *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis*, torna-se um campo de pesquisa promissor, haja vista

que essa interação entre a produção de cercosporina, patógeno e hospedeiro pode ser crucial para a colonização e infecção da planta afetada.

Deste modo, os objetivos deste estudo foram caracterizar isolados de *Mycosphaerella* spp. obtidos de bananeira a nível de espécie por meio do sequenciamento do rDNA da região (ITS1-ITS4) e do gene β -tubulina e avaliar a patogenicidade e agressividade desses isolados em mudas de bananeira.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos isolados

Os isolados de *Mycosphaerella* spp. foram adquiridos por meio de coletas em regiões produtoras de banana no Brasil nos estados da Bahia (BA), Minas Gerais (MG) e Rio Grande do Norte (RN). Folhas de bananeiras apresentando sintomas característicos de Sigatoka-amarela e Sigatoka-negra provenientes de seis genótipos de *Musa* spp. foram coletadas, em seguida, realizada uma desinfestação superficial em água corrente, seguido de água destilada. Áreas com maior proporção de lesões foram selecionadas, recortadas e colocadas em placas de Petri com papel filtro em câmara úmida, foram mantidas a 25 ± 2 °C por 48h.

Posteriormente, os fragmentos vegetais incubados foram observados sob microscópio estereoscópio para averiguar o surgimento de esporodóquio (Sigatoka-amarela) e conidióforos (Sigatoka-negra) (Figura 1). Os conídios foram coletados por meio de agulha de ponta fina e transferidos assepticamente para placas de Petri contendo meio BDA. As placas foram mantidas em BOD a 25 ± 2 °C por 5 dias para obtenção de culturas puras. A fim de preservar os isolados obtidos, todos foram preservados por meio do método Castellani e tiras de papel filtro.

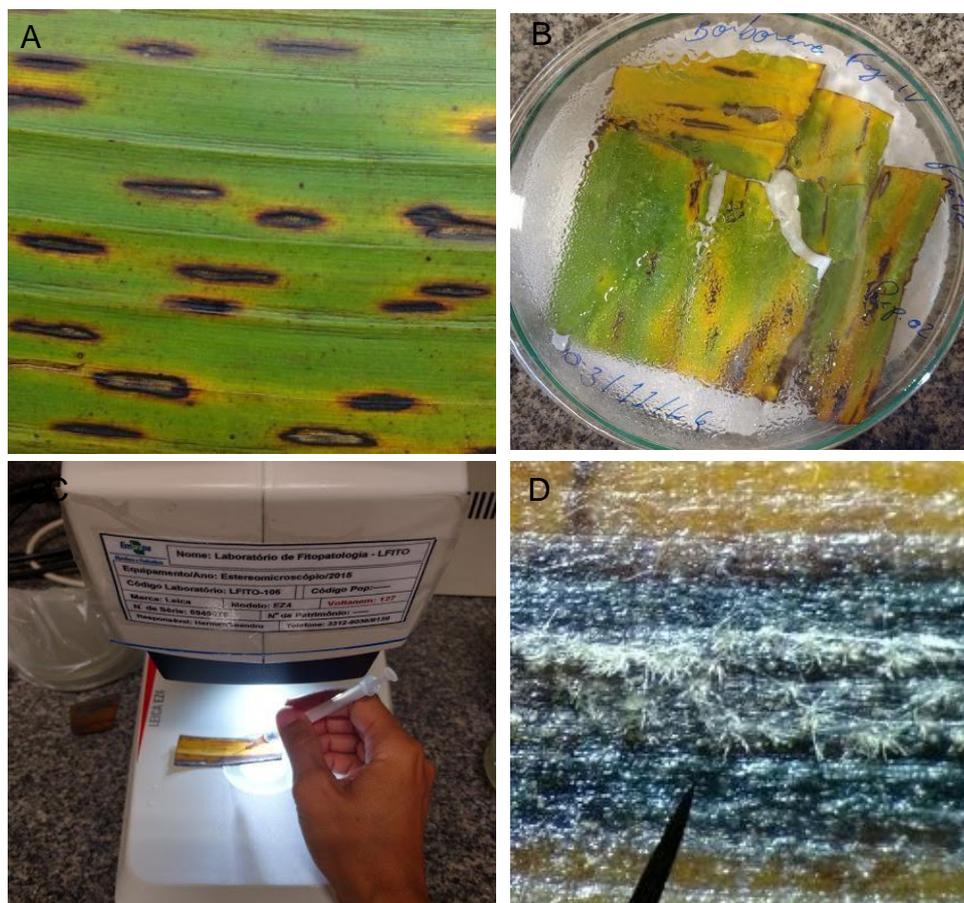


Figura 1. Isolamento do patógeno. A. Manchas características da Sigatoka-amarela. B. Preparo de câmara úmida após assepsia do fragmento vegetal. C. Captura de esporodóquios na região central das lesões. D. Esporodóquios na região central da lesão.

Extração do DNA

A extração do DNA dos isolados de *Mycosphaerella* spp. foram feitas utilizando o método CTAB (DOYLE e DOYLE, 1990) adaptado. Colônias fúngicas cultivadas em meio BDA por 30 dias a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas foram retiradas do meio de cultura e acomodadas em papel de filtro por 72h para secagem em câmara de exaustão. Após esse período foram maceradas em microtubos de 1,5 mL com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino.

Uma fração do macerado obtido, foi transferido para microtubos de 1,5 mL, cada amostra foi acrescida de 1,5 mL de tampão de extração (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, EDTA 2%, Na Sulfite 1%, PVP 1% - Polivinilpirrolidona 1mg) sendo mantidos em banho Maria por 1 h á 65 °C sob agitação mecânica a cada 10 min. Posteriormente os tubos foram centrifugados a 10000 RPM por 5 min em temperatura ambiente. Foi coletado 1 mL do sobrenadante em novo tudo de 2 mL.

Em seguida foi adicionado 800 µL de clorofórmio álcool isoamílico (24:1) sendo agitado no vortex. Após, os tubos foram novamente centrifugados a 10000 RPM por 10 min em temperatura ambiente, 800 mL do sobrenadante foi coletada e transferido para novos tubos de 1,5 mL.

Adicionou-se 600 µL de álcool isopropílico gelado, homogeneizou-se suavemente e incubou-se a -20 °C por 30 min. Posteriormente os tubos foram centrifugados a 10000 RPM por 10 min, foi descartado o sobrenadante. Foi acrescentado 500 µL de etanol 70%, agitado para remoção do pellet, novamente centrifugados a 10000 RPM por 2 min.

O sobrenadante foi descartado, deixou-se secar o pellet por 30 a 40 min, em seguida foi acrescentado 50 µL de solução de tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM), + 1 µL de Rnase / amostra). As amostras foram colocadas em banho Maria por 30 min a 37 °C, em seguida foram conservadas a -20 °C.

O DNA dos isolados foram purificados, em seguida, submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio (1 µg/mL), onde foram quantificados visualmente comparando-se com o marcador padrão de 1kb (Ladder®). As amostras foram submetidas a um campo elétrico a 110 V por 60 minutos, posteriormente o gel foi visualizado no transiluminador para a determinação da quantidade do DNA.

Amplificação e sequenciamento da região ITS e gene β -tubulina

O DNA genômico foi utilizado para a amplificação da região ribossômica envolvendo a região ITS1 e ITS4 (WHITE et al.,1990) e o gene β -tubulina, utilizando os iniciadores β -tub 2b e β -tub T1 (GLASS; DONALDSON, 1995). Foram realizados o sequenciamento de trinta e um isolados para a região ITS e para o gene β -tubulina (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de *Mycosphaerella* spp. utilizados no sequenciamento. Cruz das Almas-BA, Embrapa/UFRB, 2018.

Amostra	Cultivar	Microrregião	Município
001 BA	Prata anã	Velho Chico/BA	Bom Jesus da Lapa
018 BA	Prata comum	Baixo Sul/BA	Presidente Tancredo Neves
033 BA	Prata anã	Sertão Produtivo/BA	Sebastião Laranjeiras
034 BA	Grande Naine	Velho Chico/BA	Bom Jesus da Lapa
040 MG	Prata anã	Lavras/MG	Lavras
044 RN	Caipira	Chapada do Apodi/RN	Apodi
056 BA	Maçã/Leite	Litoral Sul/BA	Itajuípe
066 BA	Prata	Baixo Sul/BA	Gandu
075 RN	Pacovan	Mossoró/RN	Baraúna
0166 MG	Prata	Jaíba/MG	Jaíba
0167 MG	Prata	Velho Chico/BA	Bom Jesus da Lapa
0168 MG	Grand Naine	Jaíba - MG	Jaíba
0169 MG	Prata	Velho Chico/BA	Bom Jesus da Lapa
0170 MG	Prata	Jaíba - MG	Jaíba
0171 MG	Prata	Jaíba - MG	Jaíba
0172 MG	Prata	Jaíba - MG	Jaíba
0173 MG	Prata	Jaíba - MG	Jaíba
0174 MG	Prata	Jaíba - MG	Jaíba
0175 MG	Prata	Jaíba - MG	Jaíba
0176 MG	Grand Naine	Jaíba - MG	Jaíba
0178 BA	Ouro	São Felipe/BA	São Felipe
0179 MG	Grand Naine	Jaíba - MG	Jaíba
0180 BA	Ouro	São Felipe/BA	São Felipe
0181 BA	Ouro	São Felipe/BA	São Felipe
0182 MG	Prata	Jaíba - MG	Jaíba
0183 MG	Prata	Jaíba - MG	Jaíba
0184 BA	Ouro	São Felipe/BA	São Felipe
0185 MG	Prata	Jaíba - MG	Jaíba
0186 MG	Prata	Jaíba - MG	Jaíba
0187 MG	Prata	Jaíba - MG	Jaíba
0188 BA	Ouro	São Felipe/BA	São Felipe

*Valores numéricos representam o código de registro das amostras no laboratório de fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

As reações de amplificação do rDNA foram realizadas em um volume final de 50 μ L, contendo: 2,0 μ L de DNA genômico a 10 ng/ μ L; Tris-HCl a 1M (pH

8,0); 2 µL de Tampão para *Taq* DNA Polimerase; 2 µl de dNTPs (2,5 mM); 0,5 µl de MgCl₂ (50mM); 2,5 µl de cada primer (10 µM) e 0,2 µl de enzima *Taq* DNA Polimerase recombinante Invitrogen® (5u/µl). A amplificação foi executada em termociclador Veriti™ 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). As reações foram submetidas a um ciclo de desnaturação inicial do DNA (94 °C, 5 min), 35 ciclos de desnaturação (94 °C por 30 s), anelamento (52 °C por 45 s), polimerização (72 °C 2 min) e extensão final (72 °C por 7 min).

Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídio (1,0%) e observados sob luz ultravioleta. Os fragmentos de DNA tiveram suas bandas purificadas utilizando-se o Kit de purificação (Ludwing Biotec®) por coluna, seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida foram encaminhados para sequenciamento pela empresa MacroGen Inc. (Seul, Coréia do Sul), em duas direções (direta e reversa).

Tratamento dos dados moleculares

As sequências diretas e reversas de cada isolado foram alinhadas com auxílio do programa SeqManII para obtenção das sequências complementares. As sequências completas de nucleotídeos da região (ITS1 e ITS4) e do gene β tubulina dos 31 isolados de *Mycosphaerella* spp. foram usadas para buscas de sequências similares por meio do programa BLASTn do NCBI (National Center for Biotechnology Information), onde foram comparados os percentuais de similaridade com as sequências disponíveis no banco de dados, visando a confirmação da espécie de cada isolado.

O alinhamento das sequências foi feito no programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994) e as árvores filogenéticas foram processadas com o programa MEGA v. 6.0 (TAMURA et al., 2007). As árvores filogenéticas foram construídas utilizando-se o método de distância de Neighbor-Joining (NJ). As sequências foram agrupadas com base no modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros e o suporte dos clados foi testado por meio de 10000 replicações bootstrap.

Teste de patogenicidade, avaliação da agressividade dos isolados e busca por correlação com produção cercosporina - Condições de cultivo para inoculação

Isolados do patógeno *Mycosphaerella* spp. pertencentes a coleção de fungos do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, oriundos de coletas, foram utilizados no teste de patogenicidade e na avaliação da severidade da doença (Tabela 2). O microrganismo foi cultivado no meio de cultivo V8 (9 g de Agar, 1 g de CaCO₃ (carbonato de cálcio), 100 ml de suco V8 e 400 ml de água destilada), acrescido de 500µl de antibiótico amoxicilina.

Tabela 2. Isolados de *Mycosphaerella* spp. utilizados no teste de severidade da Sigatoka. Cruz das Almas-BA, Embrapa/UFRB, 2018.

Amostra	Cultivar	Microrregião	Município
001 BA	Prata anã	Velho Chico/BA	Bom Jesus da Lapa
018 BA	Prata comum	Baixo Sul/BA	Presidente Tancredo Neves
033 BA	Prata anã	Sertão Produtivo/BA	Sebastião Laranjeiras
034 BA	Grandee Naine	Velho Chico/BA	Bom Jesus da Lapa
066 BA	Prata	Baixo Sul/BA	Gandu
075 RN	Pacovan	Mossoró/RN	Baraúna
0168 MG	Grande Naine	Jaíba – MG	Jaíba
0169 MG	Prata	Velho Chico/BA	Bom Jesus da Lapa
0170 MG	Prata	Jaíba – MG	Jaíba
0172 MG	Prata	Jaíba – MG	Jaíba
0173 MG	Prata	Jaíba – MG	Jaíba
0181 BA	Ouro	São Felipe/BA	São Felipe
0182 MG	Prata	Jaíba – MG	Jaíba
0183 MG	Prata	Jaíba – MG	Jaíba
0184 BA	Ouro	São Felipe/BA	São Felipe
0186 MG	Prata	Jaíba – MG	Jaíba
0187 MG	Prata	Jaíba – MG	Jaíba
0188 BA	Ouro	São Felipe/BA	São Felipe

*Valores numéricos representam o código de registro das amostras no laboratório de fitopatologia Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Os isolados foram repicados, macerados e transferidos uma alíquota de 1 ml por placa para o meio de cultivo, usando-se uma alça de Drigalski foi espalhado por toda a placa de Petri (Figura 2). Posteriormente foram incubados em estufa tipo BOD com temperatura ajustada para 25 °C ± 2 por 11 dias. Após o

período de cultivo mencionado, procedeu-se com o preparo de suspensões de esporos para a inoculação em plantas teste (CORDEIRO et al., 2011).



Figura 2. Procedimentos de multiplicação do fungo *Mycosphaerella* spp. (A – B). Obtenção de macerado a partir de colônias do fungo. (C) Transferência de alíquota do macerado para cultivo em meio V8. (D) Espalhamento do fungo por toda a placa contendo o meio de cultivo fazendo uso da alça de Drigalski.

Preparo de suspensão de esporos e inoculação em plantas teste

Visando a inoculação do patógeno nas variedades teste, foram cultivadas 10 repetições de cada isolado, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri. Após 11 dias de cultivo sobre as condições anteriormente mencionadas, adicionou-se 15 mL de água destilada por placa sobre as colônias, procedendo-se com a liberação dos conídios por meio de raspagem com escova de cerdas rígidas. Após 15 minutos da obtenção das suspensões, estas foram filtradas utilizando-se uma peneira fina.

Posteriormente as suspensões foram quantificadas em câmara de Neubauer e as concentrações de esporos foram ajustadas a 1.10^4 conídios/mL. As folhas de número 1 e 2 de cada planta, foram inoculadas na superfície abaxial do limbo, até o ponto de escorrimento, conforme a metodologia descrita por (CORDEIRO et al., 2011). Após a inoculação, as folhas foram revestidas com sacos plásticos transparentes umedecidos, visando o favorecimento de condições propícias para a germinação, colonização e infecção do tecido vegetal pelo microrganismo (Figura 3).



Figura 3. Inoculação do fungo *Mycosphaerella musicola* e *fijiensis*. (A.B.C) Preparo de suspensão de esporos (1.10^4 conídios/mL). (A) Acréscimo de alíquota de água para liberação de esporos. (B) Raspagem das colônias com escova. (C) Filtração da suspensão em peneira de poro fino. (D) Inoculação do fungo nas folhas 1 e 2 na superfície abaxial do limbo. (E) Identificação das folhas inoculadas. (F) Folhas inoculadas em câmara úmida revestidas com sacos plásticos transparentes.

Teste de Patogenicidade e avaliação da agressividade

Com base nos resultados da caracterização molecular e nos resultados de produção de cercosporina, 17 isolados de *Mycosphaerella musicola* (Iso 01, Iso 168, Iso169, Iso170, Iso172, Iso173, Iso18, Iso 181, Iso182, Iso183, Iso 184, Iso186, Iso187, Iso33, Iso 34, Iso66, Iso75) e 01 isolado padrão de *Mycosphaerella fijiensis* (Iso 188) foram selecionados para o teste de agressividade nas cultivares Prata Anã (Subgrupo Prata, AAB) e Grande Naine (Subgrupo Cavendish, AAA).

As mudas cultivadas *in vitro* foram obtidas na biofábrica Campo situada na Unidade da Embrapa – CNPMF, as mudas foram aclimatadas por 15 dias em casa de vegetação e transplantadas em sacos de polietileno contendo solo acrescido de potássio, fibra de coco e esterco, sendo transferidos para o telado.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial. O teste foi composto por dezenove tratamentos, correspondente a 17 isolados de *Mycosphaerella musicola*, 01 isolado de *Mycosphaerella fijiensis* e um tratamento testemunha sem inoculação. Para isso, foram utilizadas um total de duzentas e vinte e oito plantas, sendo cento e quatorze de cada cultivar (Prata Anã e Grande Naine).

Avaliação do progresso da doença

Para avaliar o progresso da doença, as folhas 1 e 2 foram marcadas com fitas plásticas, onde foi feita a avaliação da severidade da doença em cada planta. As avaliações foram efetuadas a cada quatro dias a partir do período compreendido entre a inoculação e a manifestação dos primeiros sintomas (período de incubação). O período de incubação, variou entre 25 a 29 dias. A metodologia para avaliação da severidade pautou-se na escala de notas posposta por Stover (1971) e modificada por Gauhl (1994) descrita conforme (Figura 4) abaixo:

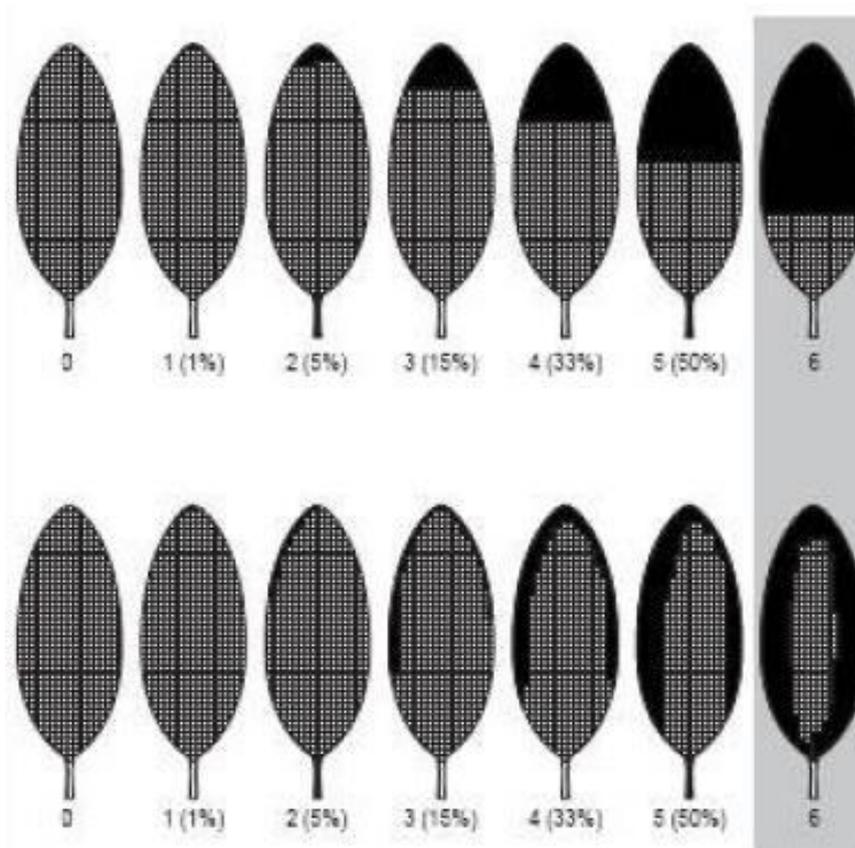


Figura 4: Escala de severidade para avaliação da intensidade do mal-de-sigatoka em folha de bananeira proposta por Stover (1971) modificada por Gauhl (1994).

Descrição da escala de notas posposta por Stover (1971) e modificada por Gauhl (1994) (Figura 4):

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.

Após a coleta dos dados, foi determinado o índice de doença (ID) de cada genótipo por meio da seguinte fórmula:

Índice de infecção: % (IF): $[\sum n*b/(N-1)*T]*100$

Onde: n = número de folhas em cada nível de escala de Stover (1971), modificada por Gauhl (1994); b = grau da escala;

N = número de graus empregados na escala (7); T = número total de folhas avaliadas.

Ao final das avaliações foram calculados os valores do índice de doença em relação ao tempo para cada genótipo, posteriormente foi calculada a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para cada genótipo.

Para análise dos dados (AACPD) foi utilizada a análise de componentes principais (PCA), técnica usada para gerar índices e agrupamento de indivíduos. Estes são agrupados de acordo com seu comportamento dentro da população, conforme suas características. Considerando o tipo de análise utilizada, (PCA), esta é caracterizada por não reconhecer padrões. Desse modo, é possível averiguar similaridades ou discrepâncias de um dado conjunto de amostras, assim como a influência das variáveis estudadas na sua diferenciação (OSUMA, 2004).

Para definição do número de grupos, nesse estudo foi usado índice Pseudo-t2 do pacote Nbclust do programa R. Assim, o número ótimo de grupos indicado nesse índice, foi usado para a separação de dois grupos na análise de agrupamentos pelo método K-means, utilizando o pacote factoextra. Para tanto, formaram-se dois grupos, um com os isolados mais agressivos e outro com menos agressivos. Dentro da distribuição dos isolados, realizada pela análise de componentes principais, foi avaliado os isolados quanto à agressividade em cada variável.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação e caracterização molecular

Das 33 amostras de DNA genômico obtidas, todas tiveram fragmentos amplificados por meio da técnica de PCR passíveis de serem sequenciados. Entre as 33 amplificações realizadas, 26 fragmentos geraram sequências em

condições de uso para a realização da análise filogenética. Assim, a busca por similaridade no banco de dados GenBank, através da ferramenta BLAST, revelou que as sequências obtidas correspondiam de fato às regiões de ITS e β -tubulina desejadas.

Relações filogenéticas com base na região ITS e gene β -tubulina

Para a construção das árvores filogenéticas com base na região ITS, as sequências geradas no estudo foram alinhadas com outras 37 obtidas no banco de dados do CNBI (GenBank) pertencentes ao gênero *Cercospora* e a família Mycosphaerellaceae. Para tanto, foram utilizadas duas sequências do gênero *Passalora loranthei* para fazer o enraizamento da árvore, como grupo externo, totalizando 64 sequências neste alinhamento. Já a construção da árvore filogenética com base no gene β -tubulina, foram alinhadas com outras 6 sequências obtidas no banco de dados do CNBI (GenBank) pertencentes ao gênero *Cercospora*.

Para tanto, o melhor modelo para a análise nesse estudo foi o método de distância de Neighbor-Joining (NJ), aplicado com base no modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros. Neste, a robustez dos ramos das árvores foi estimada por bootstrap, empregada 10000 replicações para cada análise. Para a confirmação dos resultados obtidos por meio do método Neighbor-Joining, foram construídas árvores filogenéticas, utilizando-se o método de máxima verossimilhança. A partir disso, foram observadas pequenas alterações na alocação das espécies, contudo, a conformação da árvore não sofreu alterações significativas.

Assim, a maioria dos isolados agruparam-se com as sequências depositadas no Genbank para a espécie *Mycosphaerella musicola* (*M. musicola* DQ01956) (Figura 5), comprovando que as características morfológicas observadas nos isolados correspondem às características da espécie. Dessa forma, dentre os isolados estudados foram identificados e caracterizados molecularmente dois isolados correspondentes ao fungo *Mycosphaerella fijjensis* (AF181705) (Figura 6).

Diante da referida prática de estudo, os resultados mostraram a espécie *Mycosphaerella musicola* em um clado de união com espécies (*M. musicola*

DQ01956), com alto valor de suporte (bootstrap 97%). Assim sendo, analisando a árvore gerada para o gene β -tubulina, o mesmo grupo de isolados foi agrupado formando um clado com alto valor de suporte (bootstrap 99%). Da mesma forma, na análise filogenética da região ITS, em β -tubulina houve formação de um clado distinto sendo alocados dois isolados correspondentes ao patógeno *Mycosphaerella fijiensis* com alto valor de suporte (bootstrap 99%). Logo, baseando-se na sequência de nucleotídeos de β -tubulina e de ITS, é possível observar nas árvores, o alto grau de similaridade entre os isolados identificados como *Mycosphaerella musicola*, tendo em vista a formação de uma politomia.

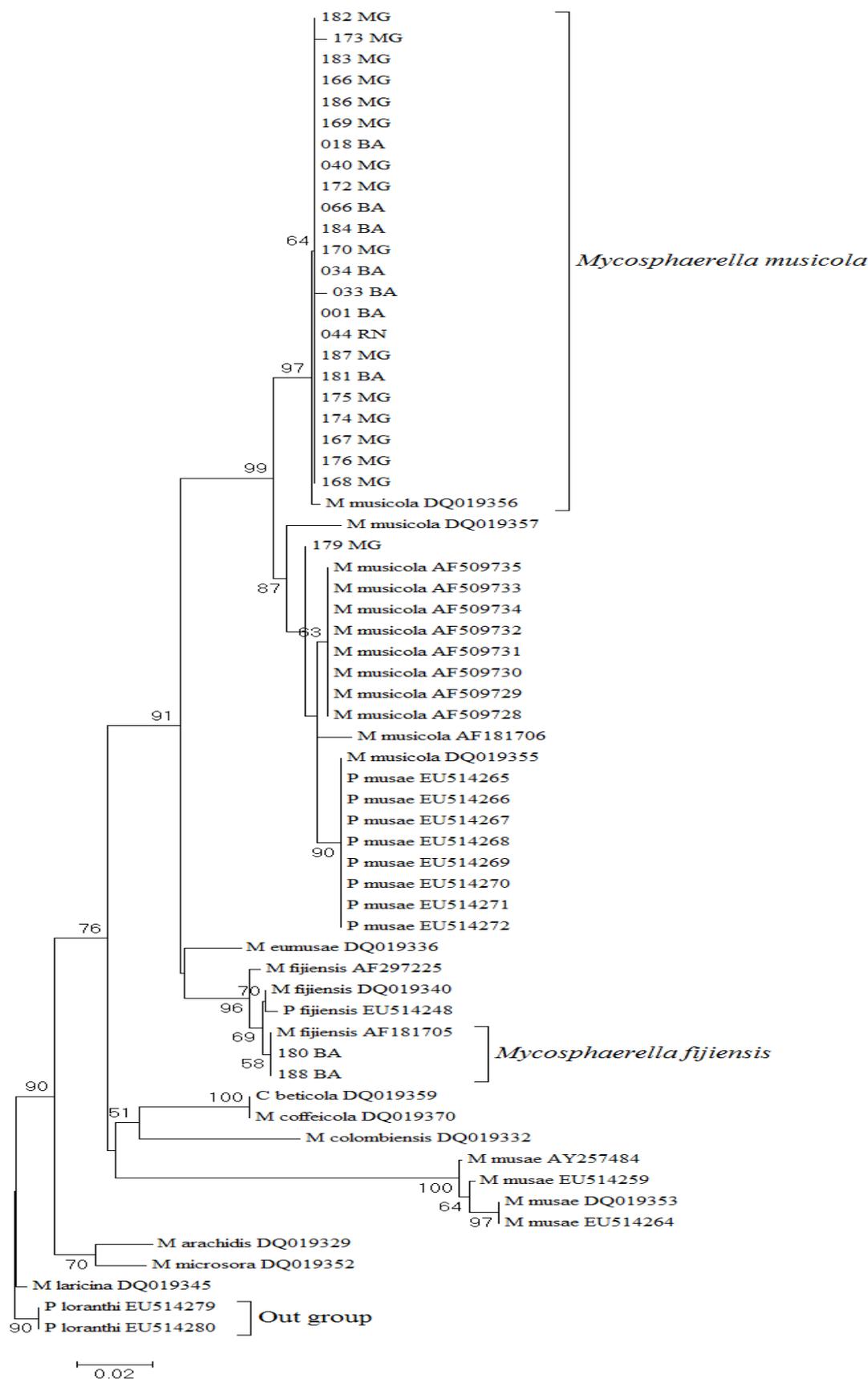


Figura 5. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento da sequência de DNA do espaçador transcrito interno (ITS) de *Mycosphaerella* spp. ocorrendo em bananeiras. O filograma baseia-se no método Neighbor-Joining (NJ), com base no modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros. Os valores de suporte Bootstrap de 10000 repetições são mostrados como porcentagem nos nós.

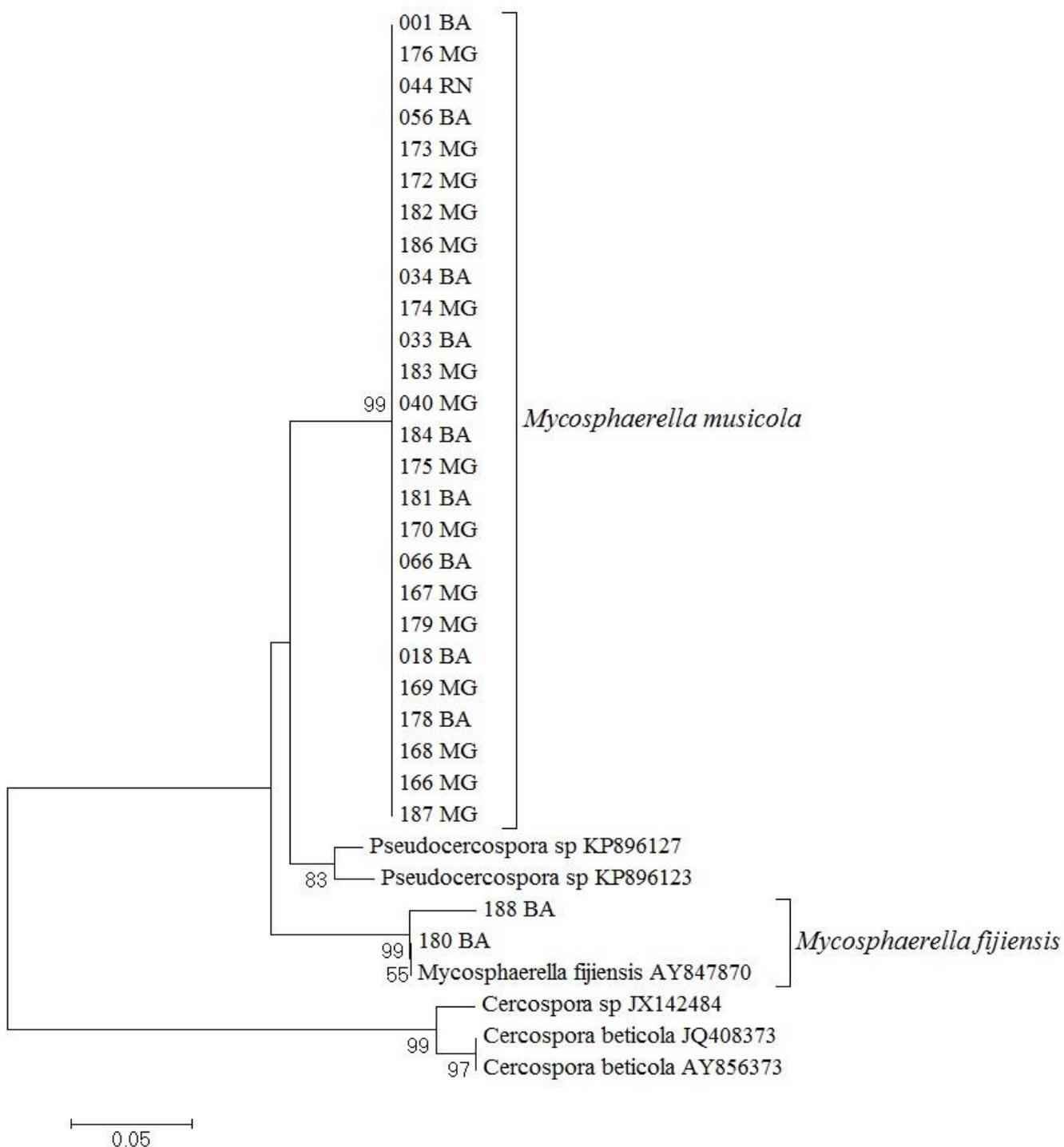


Figura 6. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento da sequência parcial do gene codificador da β -tubulina de *Mycosphaerella* spp. O comprimento dos ramos horizontais é proporcional à distância genética entre as espécies. A árvore foi obtida usando o método NJ (Kimura 2 Parâmetros). Números próximos aos ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de bootstrap (10000).

Teste de Patogenicidade, avaliação da agressividade dos isolados e estabelecimento de correlação entre a produção cercosporina

Fajola (1978) e Almeida et al. (2005) mencionam existir uma correlação entre o nível de produção da toxina cercosporina in vitro e os níveis de produção in vivo, impactando assim, na severidade da doença causada pelos isolados estudados. Desta maneira este estudo buscou avaliar a existência de interação entre a agressividade de isolados com base na produção de cercosporina, para isso foram inoculados 18 isolados caracterizados como *Mycosphaerella musicola* e 01 isolado caracterizado como *Mycosphaerella fijiensis* (Iso 188) (Figura 7).

Logo, diversos autores já mencionaram que as células de vários organismos não produtores de metabólitos fitotóxicos, tais como plantas, fungos e bactérias são sensíveis à toxina cercosporina. Além disso, já existem inúmeros relatos sobre a importância da toxina na patogênese. Assim sendo, considera-se que a produção da toxina esteja relacionada com a intensidade dos sintomas causados em hospedeiros parasitados por espécies de gênero *Cercospora* spp. Com isso, o metabólito também tem sido relatado como fator que confere agressividade ao microrganismo produtor (BATCHVAROVA et al., 1992; DAUB; EHRENSHAFT, 2000; DAUB et al., 2005; DAUB; CHUNG, 2007).



Figura 7. Sigatoka-amarela, sintomas da doença (A,B,C): A - Sintomas iniciais, B - Lesões necróticas elípticas, deprimidas com centro cinza e halo amarelado, C - Seca das folhas devido as lesões necróticas. Sigatoka-negra, sintomas da doença (D,E,F): D e E - Lesões iniciais em forma de listras marrom café na fase abaxial da folha, em (E) Lesões ao longo da nervura principal; F – Progressão das lesões por toda a superfície foliar, do limbo foliar para a nervura principal.

A avaliação da agressividade dos isolados foi verificada por meio da análise de componentes principais utilizando-se dados da (AACPD). Dessa forma, dois grupos foram formados, um contendo os isolados mais agressivos e outro contendo os isolados identificados como menos agressivos (Figura 8).

Os isolados que obtiveram melhor representatividade quanto à agressividade tanto na cultivar Prata Anã, quanto na cultivar Grande Naine estão alocados no grupo circundado pela elipse verde. Este grupo foi formado pelos isolados (Iso188, Iso 172, Iso 173, Iso 170 em Prata e Iso 181, Iso 183, Iso 182, Iso 169 em Grande Naine) considerados mais agressivos. Já os isolados

alocados no grupo circundado pela elipse azul, possuem uma menor representatividade em relação à agressividade, estando estes isolados localizados mais próximos da origem.

Com isso, pode-se inferir ainda sobre a (Figura 8), o evidente agrupamento dos isolados, e suas relações com os eixos, componente 1 e componente 2, os isolados que melhor representam a agressividade são os que estão mais distantes da origem ponto (0.0), em relação ao eixo do x, representados pela elipse maior. Os isolados que obtiveram menor agressividade estão contidos na elipse menor, ou seja, estão mais próximos da origem em relação ao eixo y.

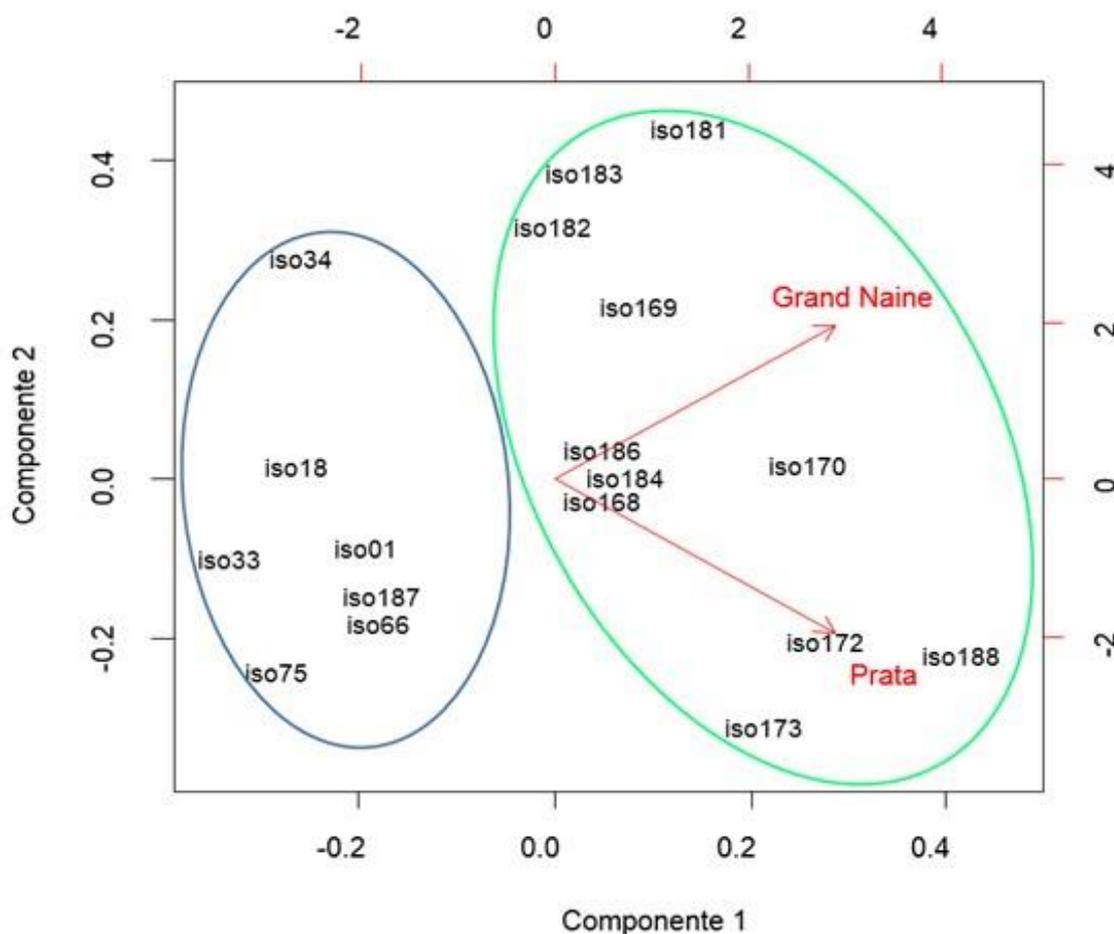


Figura 8. Distribuição dos isolados *Mycosphaerella* spp. inoculados em cultivares de bananeira Prata Anã e Grande Naine, ordenados com base na AACPD (Área abaixo da curva de progresso da doença). As AACPD foram agrupadas pelo método k-means, elipses indicam grupos formados de acordo com agrupamento k-means.

Fajola (1978) e Jenns et al. (1989), mencionaram a existência de variação entre a produção de cercosporina *in vitro* entre espécies e entre isolados de uma mesma espécie, neste trabalho também foi observado prevalência de variação quanto a produção do metabólito por diferentes isolados. Levando-se em conta o estudo dos autores citados acima, houve correlação positiva entre a produção de cercosporina na espécie em que foi observada a produção *in vitro*, valor quantificado e a agressividade dos patógenos nas respectivas plantas hospedeiras.

Almeida et al. (2005) observaram que na espécie *C. kikuchii*, houve correlação de 83% entre a concentração da toxina detectada *in vitro* e a severidade da doença em plantas de soja inoculadas com isolados do patógeno. Callahan et al. (1999) menciona que isolados de *C. kikuchii*, com produção de cercosporina em diferentes proporções infectam plantas de soja. Todavia, aqueles isolados com percentuais mais elevados, são considerados mais severos.

Nesse sentido, no presente trabalho foi observada correlação entre agressividade e cercosporina em 50% dos isolados. Resultados equivalentes de interação positiva cercosporina e severidade já foram relatados para outras espécies de *Cercospora* (ALMEIDA et al., 2005; CHOQUER et al., 2005).

Observando-se ainda a (Figura 8), pode-se concluir que o isolado (Iso188) é o que apresenta maior agressividade, em relação aos demais. Assim, os isolados (Iso 186, Iso 184 e Iso 168) estão agrupados em posições similares na figura, sugerindo que tais isolados não diferiram ou diferiram pouco entre si, quanto à agressividade, relacionando-se com a toxina, e obtiveram níveis de absorção similares.

Feito isso por meio da análise não paramétrica, utilizando-se o teste Kruskal-Wallis, foram identificados sete grupos distintos, onde os isolados mais agressivos correspondem aos isolados representados na (Figura 8), sendo representados na tabela pelos três primeiros grupos (a, ab, abc) conforme pode ser observado na (Tabela 3) abaixo:

Tabela 3. Área abaixo da curva de progresso da doença obtida por meio do Índice de doença (Mckinney, 1923).

Isolado	AACPD*
Iso 188	1612.18 ^a
Iso 172	1469.67 ^{ab}
Iso 170	1451.05 ^{abc}
Iso 173	1373.28 ^{abcd}
Iso 181	1345.14 ^{abcd}
Iso 169	1293.86 ^{abcd}
Iso 184	1280.94 ^{abcd}
Iso 168	1261.92 ^{abcd}
Iso 186	1254.54 ^{abcd}
Iso 183	1201.81 ^{abcd}
Iso 182	1136.18 ^{abcd}
Iso 66	1087.01 ^{bcd}
Iso 187	1067.01 ^{cd}
Iso 01	1041.98 ^{cd}
Iso 18	977.86 ^d
Iso 34	962.53 ^d
Iso 33	876.38 ^d
Iso 75	875.23 ^d

*AACPD: Área abaixo da curva de progresso da doença estimada por meio do Índice de doença (Mckinney, 1923). Médias seguidas da mesma letra não diferiram estatisticamente por meio do teste Kruskal Wallis ao nível de 5% de significância.

Comparando-se as médias de absorvância da produção de cercosporina (Ver cap 3), com as análises da AACPD por meio do teste Kruskal-Wallis, percebe-se a existência de correlação entre a agressividade dos isolados e a produção da toxina cercosporina *in vitro*. Todavia, essa correspondência não foi observada para todos os isolados testados no estudo. Dentre os isolados com maiores valores de absorvância encontram-se os isolados (Iso172, Iso 181, Iso 173), os quais encontram-se entre os que apresentaram maior agressividade.

Sendo assim, o isolado que apresentou maior agressividade *in vivo* (Iso 188), diferindo-se dos demais tratamentos, não apresentou correspondência entre o valor de absorvância e a AACPD. Todavia, este isolado foi caracterizado molecularmente pertencente ao gênero *Mycosphaerella fijiensis*. Deste modo, apesar de ser quantificada a produção do metabólito, não houve neste estudo, outros isolados dessa espécie para que seja feita inferência quanto a

agressividade e produção de tóxina. Logo, já existem inúmeros relatos na literatura acerca da agressividade deste patógeno ser superior ao fungo *Mycosphaerella musicola*.

Diante disso, o fungo *Mycosphaerella fijiensis*, é considerado mais destrutivo que o patógeno *Mycosphaerella musicola*, apresenta maior velocidade e intensidade de ataque, além de infectar as folhas mais jovens, destruindo assim, maior área foliar fotossintetizante. Assim sendo, os níveis de agressividade superiores atribuídos ao microrganismo *Mycosphaerella fijiensis* estaria relacionado às características biológicas que o torna mais competitivo em relação ao patógeno *Mycosphaerella musicola*, como maior produção de ascósporos, maior quantidade de ciclos sexual anual e taxa elevada de colonização do tecido do hospedeiro (STOVER, 1980; SIMMONDS, 1986; JONES, 1990; MOULIOM PEFOURA et al., 1996).

Peixoto et al. (2015), estudando a variabilidade genética de isolados de *Mycosphaerella musicola* de diferentes regiões do Brasil, não observou diferenças significativas em relação a origem dos isolados. Contrariamente a isto, nossos resultados demonstraram haver existência de variação na agressividade dos isolados. Os isolados provenientes do estado de Minas Gerais, se sobressaíram quanto à agressividade em relação aos demais. Neste contexto, observou-se a formação de grupos de isolados em relação à agressividade pela análise da AACPD, dentre os grupos formados, os isolados de MG foram mais prevalentes.

CONCLUSÕES

Não foi identificada *Mycosphaerella fijiensis* entre os isolados de Minas Gerais.

Foi confirmada a ocorrência de *Mycosphaerella fijiensis* no estado da Bahia.

O isolado (Iso 188-BA) de *Mycosphaerella fijiensis* é o mais agressivo.

Os isolados de Minas Gerais apresetam maior agressividade.

Todos os isolados são patogênicos para as cultivares Pata Anã e Grande Naine.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. M. R.; PIUGA, F. F.; MARIN, S. R. R.; BINNECK, E.; SARTORI, F.; COSTAMILAN, L. M.; TEIXEIRA, M. R. O.; LOPES, M. Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of Brazilian isolates of *Cercospora kikuchii*. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n. 6, p.594-602, 2005.
- ARZANLOU, M.; ABELN, E. C.; KEMA, G. H.; WAALWIJK, C.; CARLIER, J., VRIES, I.; GUZMÁN, M.; CROUS, P. W. Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. **Phytopathology**, v. 97, n. 9, p. 1112-1118, 2007.
- 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.
- BATCHVAROVA, R. B.; REDDY, V. S.; BENNETT, J. Cellular resistance in rice to cercosporin, a toxin of *Cercospora*. **Phytopathology**, v, 82, n. 6, p. 642-646. 1992.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. Marcadores moleculares. 2 ed. Vicosa, MG,UFV, 532p. 2009.
- CARLIER, J.; RIVAS, G.; ZAPATER, M. F.; ABADIE, C.; AITKEN, E. Genetic differentiation in *Mycosphaerella* leaf spot pathogens. In: Workshop on *Mycosphaerella* Leaf Spot Diseases, San José, 2002 Costa Rica. *Mycosphaerella* Leaf Spot Diseases of Bananas: Present Status and Outlook. Montpellier: INIBAP. p.123-129, 2003.
- CHOQUER, M.; LAHEY, K. A.; CHEN, H. L.; CAO, L.; UENG, P. P.; DAUB, M. E.; CHUNG, K. R. The CTB1 gene encoding a fungal polyketide synthase is required for cercosporin biosynthesis and fungal virulence of *Cercospora nicotianae*. **Molecular Plant Microbe Interact**, Saint Paul, v. 18, n. 5, p. 468- 476, 2005.
- CORDEIRO, Z. J. M.; ROCHA, H. S.; ARAÚJO, A. G. Metodologias para manuseio de *Mycosphaerella musicola* em laboratório. Embrapa Mandioca e

Fruticultura: (**Documentos / Embrapa Mandioca e Fruticultura**, ISSN 1516–5728; 198) Cruz das Almas, 32.p 2011.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira. In: KIMATI, H; AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p.99-117, 2005.

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.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; HADDAD, F. Melhoramento genético. (Org). **O agronegócio da banana**. Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Mandioca e Fruticultura, p.559-563, 2016.

CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; GROENEWALD, M.; CALDWELL, P.; BRAUN, U.; HARRINGTON T. C. Species of *Cercospora* associated with grey leaf spot of maize. **Stud Mycol**, v. 55, p. 189–197, 2006.

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

DAUB, M. E; EHRENSHAFT, M. M. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: contributions to plant disease and fundamental biology. **Annual Review Phytopathology**, v. 38, n. 1, p. 461–90, 2000.

DAUB, M. E; HERRERO, S.; CHUNG, K. R. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, n.197-206, 2005.

DAUB, M. E.; CHUNG, K. R. Cercosporin: A photoactivated toxin in plant disease. St. Paul: **APS Press**, p.1-12, 2007.

DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

FAJOLA, A.O. Cercosporin, a phytotoxin from *Cercospora* spp. **Physiological Plant Pathology**, v. 13, n.2, p. 157-164, 1978.

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

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, Brazil. **Plant Disease**, v. 97, n.12, p. 1537-1543, 2013.

JENNS, A. E.; DAUB, M. E.; UPCHURCH, R. G. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. **Phytopathology**, v. 79, n.2, p. 213-219, 1989.

JONES, D.R. **Black Sigatoka** – a threat to Australia. In: FULLERTON, R.A.; STOVER, R.H. (eds.). Proceedings of an International Workshop Held at San Jose. Costa Rica, 1989, Março 28- Abril, 1, p. 38-46, 1990.

McKINNEY, H. H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v.26, n.5, p.195-217, 1923.

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.

MOREIRA, R. F. C.; CORDEIRO, Z. J. M.; VILARINHOS, A. D. Caracterização genética de isolados de *Mycosphaerella musicola* por marcadores RAPD. **Summa Phytopathol**, v. 29, n. 3, p. 275-277, 2003.

OLIVEIRA, J. R. O.; NIETSCHKE, S.; COSTA, M. R.; MIZOBUTSI, E. H.; OLIVEIRA, D. A. Diversidade Genética de Isolados de *Mycosphaerella musicola* Obtidos de Bananas do Norte de Minas Gerais, Brasil por Meio de Marcadores RAPD. **Ciência Rural**, v. 43, n.1, p. 45-48, 2013.

OSUMA, R.G. Análise de Componentes Principais, Notas de Aula 9, Texas A; M University, Texas, 2004,

PEIXOUTO, Y. S.; BRAGANÇA, C. A. D.; ANDRADE, W. B.; FERREIR, C. F.; HADDAD. F.; OLIVEIRA. S. A.; DAROSCI, F. S. B.; MILLER, R. N.; AMORIM, E. P. Estimation of genetic structure of a *Mycosphaerella musicola* population using inter-simple sequence repeat markers. **Genetics and Molecular Research**, v.14, n. 3, p. 8046-57, 2015.

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, n.1, p. 443-452, 2013.

SIMMONDS, N. W. Bananas *Musa* cvs. In: SIMMONDS, N.W. (ed.) Criação de resistência duradoura. Roma, Itália: FAO, p. 17-24, 1986. (Produção e Proteção de Plantas da FAO, Documento 70)

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

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.

CAPÍTULO 3

**Caracterização de isolados de *Mycosphaerella* spp. quanto à
produção de cercosporina *in vitro****

* Artigo a ser ajustado para posterior submissão à revista PAB (Pesquisa Agropecuária Brasileira)

Caracterização de isolados de *Mycosphaerella* spp. quanto à produção de cercosporina *in vitro*

RESUMO

A cercosporina é uma micotoxina com atividade tóxica contra um amplo espectro de organismos, e que pode ter sua produção induzida em meios de cultura específicos, *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi caracterizar isolados de *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis* quanto à produção de cercosporina, sob diferentes condições de cultivo e regime luminoso. Em vista disto foram testados 08 meios de cultivo a fim de verificar o mais propício para induzir a produção da toxina. Os testes foram realizados sobre condições controladas em estufa incubadora tipo BOD a 25 ± 2 °C, sob duas condições luminosas, luz constante e fotoperíodo de 12h. Para a extração e quantificação da toxina cercosporina, discos miceliais foram imersos em solução de KOH por 16 horas em condição de ausência luminosa, após esse período as soluções resultantes foram filtradas e quantificadas por meio da absorbância. Os resultados evidenciaram influência entre a composição do meio de cultura e a produção da toxina *in vitro*, também foi estabelecida variações entre os isolados quanto à produção da toxina. Dentre os meios testados o cultivo em meio de cultura Ágar leite de coco dextrose (ALCD) foi o único que apresentou resultado positivo para indução e produção da toxina, quanto aos regimes luminosos testados, em ambas as condições luminosas foi induzida e quantificada a produção da toxina. Os resultados obtidos neste estudo, quanto à indução, produção e quantificação da toxina cercosporina *in vitro*, geraram informações científicas que subsidiam estudos sobre relações entre a variabilidade do patógeno e à produção da toxina.

Palavras-chave: Cercosporiose da bananeira, fungos, metabólitos secundários.

ABSTRACT

Characterization of *Mycosphaerella* spp. in vitro production of cercosporin

Cercosporin is a mycotoxin with toxic activity against a broad spectrum of organisms, and which may have its induced production in specific culture media, in vitro. The objective of this work was to characterize isolates of *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella fijiensis* for the production of cercosporin, under different growing conditions and light regime. In view of this, 8 culture media were tested in order to verify the most conducive to induce the production of the toxin. The tests were carried out under controlled conditions in incubator type BOD at 25 ± 2 °C, under two light conditions, constant light and photoperiod of 12 h. For the extraction and quantification of the cercosporin toxin, mycelial discs were immersed in KOH solution for 16 hours in the absence of light conditions, after which the resulting solutions were filtered and quantified by absorbance. The results evidenced influence between the composition of the culture medium and the production of the toxin in vitro, also it was established variations among the isolates regarding the production of the toxin. Among the media tested, the cultivation in culture medium Agar coconut milk dextrose (ALCD) was the only one that presented positive result for induction and toxin production, as for the light regimes tested, in both light conditions was induced and quantified the production of the toxin. The results obtained in this study, regarding the induction, production and quantification of the cercosporin toxin in vitro, generated scientific information that subsidizes studies on the relationship between the variability of the pathogen and the production of the toxin.

Key words: Cercosporiosis of banana, fungi, secondary metabolites.

INTRODUÇÃO

Diversos gêneros de fungos produzem substâncias tóxicas, tais substâncias podem ser associadas a mecanismos de interação patógeno-hospedeiro para o estabelecimento da doença. Dentre os patógenos produtores de toxinas encontram-se o grupo *Cercospora*, que possui mecanismos específicos para a produção de substâncias tóxicas. Entretanto, apresentam especificidades no mecanismo de interação entre o patógeno e o hospedeiro.

Duab et al. (2005) mencionam que fungos patogênicos de plantas usam variadas estratégias para colonizar e infectar plantas hospedeiras. Dentre tais mecanismos encontra-se a produção de metabólitos secundários, sendo a produção de toxinas uma estratégia bem desenvolvida nas espécies do gênero *Cercospora*.

Logo, as toxinas caracterizam-se por apresentarem baixa massa molecular, não apresentam características enzimáticas, hormonais ou de ácidos nucleicos (GOODMAN et al., 1986; SCHMELZ et al., 2003; TRUCKSESS, 2004). Toxinas produzidas por fungos patogênicos de plantas diferem em estrutura na função desempenhada na doença e modo de ação. Sendo assim, exercem funções diferenciadas podendo impactar na expressão de sintomas e no progresso da doença, tornando-se fundamentais ou não para o estabelecimento da doença.

Sendo assim, as toxinas podem ser agrupadas com base em propriedades químicas de acordo com o grupo de organismos produtores da mesma, como por exemplo, fungos ou bactérias e ainda baseada no processo ou atividade biológica onde irá exercer ação. Logo, tais metabólitos podem atuar nos processos de inibição enzimática e na degradação de parede celular. As toxinas podem ainda ser classificadas quanto à especificidade ou não ao hospedeiro (NEDELNIK; REPKOVÁ, 1998).

Dessa forma, espécies pertencentes ao gênero *Cercospora* produzem a cercosporina, toxina não seletiva atuante de forma prejudicial a inúmeros organismos. Pertencente ao grupo químico perilenoquinona, é caracterizada como fotossensibilizantes. Desse modo, sua ativação ocorre por meio da absorção de energia luminosa, ocasionando a produção de espécies reativas de oxigênio, que danificam as membranas celulares de plantas hospedeiras (DUAB et al., 2005).

Assim, os danos causados a membrana das células do hospedeiro pela toxina cercosporina, de acordo com Daub; Briggs (1989) podem ser considerados um fator importante no estabelecimento da infecção considerando que espécies *Cercospora* não penetram nas paredes celulares de plantas hospedeiras, porém se estabelecem nos espaços intercelulares de seus hospedeiros. Com isso, ao romper as membranas das células hospedeiras o patógeno é favorecido na obtenção de nutrientes necessários para o crescimento e a esporulação no hospedeiro (DAUB; BRIGGS, 1989, DAUB et al., 2005, DAUB; CHUNG, 2009).

Desse modo, a cercosporina pode reagir diretamente com moléculas celulares ou com oxigênio, levando a produção de radicais livres de lipídios e espécies de oxigênio ativo como o superóxido e peróxido de hidrogênio. Com isso, a maior parte das macromoléculas nas células da planta hospedeira são suscetíveis ao dano oxidativo causado por moléculas fotossensibilizadoras. Assim, os fotossensibilizadores danificam lipídios, proteínas e DNA. O dano causado é determinado pelo local onde a molécula fotossensibilizadora localiza-se nas células, mais especificamente nas membranas, citoplasma ou núcleo.

Logo, a toxina apresenta coloração avermelhada em condições alcalinas. Entretanto, na presença de KOH, a mesma apresenta coloração verde. Tal toxina apresenta maior absorção a um comprimento de onda de 480 nm (JENNS et al., 1989). Levando-se em conta Daub e Chung (2009), estes mencionam que o fator mais importante para a ativação da toxina e para sua biossíntese é a presença de luz.

Por menor que seja a exposição à intensidade luminosa ocorre à ativação da toxina, enquanto na ausência de luz a produção de cercosporina é interrompida. Diante disso, a luz visível dos comprimentos de onda absorvidos pela molécula de cercosporina (aproximadamente 400-600 nm) é responsável tanto para induzir a produção quanto por causar a toxicidade (DAUB; CHUNG, 2009).

In vitro a cercosporina é sintetizada apenas em meios de cultura que favoreçam o crescimento vegetativo, e é reprimida em condições nutricionais que induzem o processo de esporulação, tal como na forma de suco V8. Diversos parâmetros fisiológicos, incluindo temperatura, condições nutricionais, pH e fonte de carbono afetam a produção da cercosporina. Assim, a produção da toxina também varia entre espécies e isolados de uma mesma espécie, sob diferentes

ambientes de culturas. Dessa forma, a produção da toxina também varia em função da temperatura e regime luminoso. Temperaturas elevadas em torno de 30°C, também inibem a produção de cercosporina (DAUB; CHUNG, 2007).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi caracterizar isolados de *Mycosphaerella* spp. da bananeira quanto à produção da toxina cercosporina. Para isso os isolados de *Mycosphaerella* spp. foram submetidos a oito condições de cultivo distintas e duas condições luminosas (luz constante e fotoperíodo de 12h), visando assim, estabelecer condições para a produção e quantificação da toxina, e caracterizar os isolados quanto a produção do metabólito.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem dos isolados de *Mycosphaerella* spp.

Os isolados de *Mycosphaerella* spp. utilizados no desenvolvimento desta pesquisa foram adquiridos a partir do isolamento direto de estruturas do patógeno provenientes de folhas de bananeiras infectadas coletadas no município de São Felipe-Bahia, Bom Jesus da Lapa- Bahia e no município de Jaíba, Norte de Minas Gerais. As folhas coletadas foram transportadas em sacos de papel identificados, para a unidade da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada no município de Cruz das Almas - Bahia, sendo realizado o isolamento do patógeno no laboratório de Fitopatologia.

Para tanto, foram coletadas um total de 60 amostras dentre as localidades mencionadas, destas conseguiu-se isolar e obter culturas puras de 23 amostras (Tabela 1) as quais foram conservadas na micoteca do laboratório utilizando-se o método de conservação Castellani e tiras de papel filtro.

Parte dos isolados utilizados foram provenientes da coleção já existente no laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Estes encontram-se conservados por meio do método Castellani, estes fazem parte da coleção obtida por Peixoto (2013) onde foi avaliada a estrutura genética de isolados de *Mycosphaerella musicola* por meio da utilização de marcadores molecular.

Isolamento direto de estruturas do patógeno

O isolamento direto foi efetuado no laboratório de Fitopatologia na Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, Bahia. As folhas de bananeira coletadas apresentando manchas necróticas características aos sintomas de Sigatoka-amarela e Sigatoka-negra foram lavadas em água corrente, em seguida em água destilada.

Posteriormente, foram selecionadas, nas amostras já desinfestadas, as regiões que apresentavam maior proporção de lesões por área. Após a seleção e corte dos fragmentos do material vegetal, estes foram mantidos em câmaras úmidas, em placas de Petri ou Gerbox, contendo papel filtro umedecidos e incubados em estufa incubadora tipo BOD por 48 horas com temperatura ajustada para 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12h.

Em seguida foi observada a esporulação do patógeno utilizando-se microscópio estereoscópico binocular, onde as estruturas fúngicas foram identificadas e localizadas. Nas lesões características de Sigatoka-amarela, inicialmente localizou-se os esporodóquios, em seguida procedeu-se a coleta dos conídios. Para as lesões características da Sigatoka-negra, prosseguiu-se com a identificação e localização dos conidióforos e captura dos conídios (CORDEIRO et al., 2011).

Dispondo de uma agulha de ponta fina, os conídios foram capturados das lesões e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura batata dextrose ágar (BDA), onde foram incubadas em estufa incubadora tipo BOD por cinco dias a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$. Após o período mencionado, colônias compactas foram observadas crescendo na superfície do meio de cultivo (CORDEIRO et al., 2011).

Repicagem de isolados da Micoteca do laboratório de Fitopatologia

Foram selecionados aleatoriamente 30 isolados de *Mycosphaerella musicola* oriundos da micoteca do laboratório de Fitopatologia, posteriormente estes isolados foram repicados em câmara de fluxo laminar. Dentre os isolados selecionados, apenas nove (Tabela 1) apresentaram viabilidade para o uso na pesquisa. Quanto à repicagem, procedeu-se com a retirada de frações das colônias acondicionadas em tubos Ependorf fazendo uso de um bisturi. Em

seguida, foi realizada a maceração das frações de cada isolado usando-se um almofariz e pistilo.

Em seguida, utilizando uma pipeta graduada foram acrescentados ao macerado 2 ml de água destilada autoclavada. A suspensão de fragmentos de micélio produzida foi transferida para placas de Petri contendo meio de cultura BDA, sendo distribuído 1 ml de cada macerado por placa. Posteriormente as frações dispostas nas placas foram espalhadas utilizando-se a alça de Drigalski. Em seguida, as placas foram vedadas com filme plástico e transferidas para estufa tipo BOD, com temperatura ajustada para 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12h (CORDEIRO et al., 2011).

Tabela 1. Isolados de *Mycosphaerella* spp. obtidos por meio do isolamento direto e repicagem de isolados provenientes da micoteca do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Cruz das Almas-BA, Embrapa/UFRB, 2018.

Amostra	Cultivar	Microrregião	Município
001 BA	Prata anã	Velho Chico/BA	Bom Jesus da Lapa
018 BA	Prata comum	Baixo Sul/BA	Presidente Tancredo Neves
033 BA	Prata anã	Sertão Produtivo/BA	Sebastião Laranjeiras
034 BA	Grande Naine	Velho Chico/BA	Bom Jesus da Lapa
040 MG	Prata anã	Lavras/MG	Lavras
044 RN	Caipira	Chapada do Apodi/RN	Apodi
056 BA	Maçã/Leite	Litoral Sul/BA	Itajuípe
066 BA	Prata	Baixo Sul/BA	Gandu
075 RN	Pacovan	Mossoró/RN	Baraúna
0166 MG	Prata	Jaíba/MG	Jaíba
0167 MG	Prata	Velho Chico/BA	Bom Jesus da Lapa
0168 MG	Grand Naine	Jaíba – MG	Jaíba
0169 MG	Prata	Velho Chico/BA	Bom Jesus da Lapa
0170 MG	Prata	Jaíba – MG	Jaíba
0171 MG	Prata	Jaíba – MG	Jaíba
0172 MG	Prata	Jaíba – MG	Jaíba
0173 MG	Prata	Jaíba – MG	Jaíba
0174 MG	Prata	Jaíba – MG	Jaíba
0175 MG	Prata	Jaíba – MG	Jaíba
0176 MG	Grand Naine	Jaíba – MG	Jaíba
0177 MG	Prata	Jaíba – MG	Jaíba
0178 BA	Ouro	São Felipe/BA	São Felipe
0179 MG	Grand Naine	Jaíba – MG	Jaíba

0180 BA	Ouro	São Felipe/BA	São Felipe
0181 BA	Ouro	São Felipe/BA	São Felipe
0182 MG	Prata	Jaíba – MG	Jaíba
0183 MG	Prata	Jaíba – MG	Jaíba
0184 BA	Ouro	São Felipe/BA	São Felipe
0185 MG	Prata	Jaíba – MG	Jaíba
0186 MG	Prata	Jaíba – MG	Jaíba
0187 MG	Prata	Jaíba – MG	Jaíba
0188 BA	Ouro	São Felipe/BA	São Felipe

*Valores numéricos representam o código de registro das amostras no laboratório de fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Indução da produção de Cercosporina – Seleção de meio de cultivo

Para induzir a produção da toxina cercosporina, inicialmente os isolados foram macerados usando-se o almofariz e pistilo. Em seguida, utilizando uma pipeta graduada, foi acrescido ao macerado 2 ml de água destilada autoclavada. A suspensão de fragmentos de micélio produzida foi transferida para placas de Petri contendo meio de cultura BDA, sendo distribuído 1 ml de cada macerado por placa. Posteriormente as frações dispostas nas placas foram espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalski. Depois, as placas foram vedadas e transferidas para estufas tipo BOD, com temperatura ajustada para 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12h (CORDEIRO, 2011).

Após 11 dias de cultivo, foram feitos discos de 8 mm de diâmetro nas placas contendo as colônias fúngicas. Os discos fúngicos foram transferidos para placas de Petri contendo os oito meios de cultura testados (Tabela 2), em triplicata, foram dispostos três discos por placa. Em seguida, as placas foram vedadas e transferidas para estufas tipo BOD, com temperatura ajustada para 25 ± 2 °C e luz constante.

Para averiguar a produção da toxina pelo patógeno *Mycospherella* spp., tendo em vista caracterizar os isolados quanto a produção do metabólito, foram testados vinte e três isolados, em oito meios de cultivos distintos e dois regimes luminosos, para cada condição luminosa três repetições por isolado.

Após 10 dias de incubação, a produção da toxina foi determinada pelo acúmulo de pigmentação de coloração vermelha sobre a superfície do meio de

cultura, as colônias foram fotodocumentadas. Após a identificação do meio de cultivo o qual favoreceu a produção do metabólito (Ágar leite de coco dextrose - ALCD), foi realizado um novo ensaio visando quantificar a toxina produzida.

Tabela 2. Componentes dos meios de cultura utilizados para induzir a produção de Cercosporina. Cruz das Almas - BA, Embrapa/UFRB, 2018.

Meio de cultura	Siglas	Componentes do meio	pH
Água-ágar	AA	9 g de ágar + 500 ml água destilada autoclavada	5,51
Suco V8 ágar	V8	9g de ágar + 100 ml de suco V8 + 1g CaCo3 + 400 ml água estéril	6,39
BDA	BDA	20g de BDA + 500 ml água destilada autoclavada	5,5
Água de coco (Natural)	AC	100 ml de água de coco + 9g ágar + 400 ml água destilada autoclavada	5,7
Água de coco (Natural) + Cloreto de Magnésio, Cloreto de Manganês + Cloreto de Cálcio	ACC	100 ml de água de coco + MgCl ₂ 20,3 g; CaCl ₂ 10,2 g; MnCl ₂ 1,0 g + 400 ml água destilada autoclavada	6.9
Leite de coco (Sococo) + Dextrose	ALCD	9g ágar + 9g Dextrose + 100ml de leite de coco (Sococo) + 400 ml água destilada autoclavada	5,3
Leite de coco (Sococo) + Extrato de Levedura	LCEL	9g ágar + 3g Extrato de levedura + 100ml de leite de coco (Sococo) + 400 ml água destilada autoclavada	5,95
Extrato da folha de bananeira + Ágar	EBA	100 ml de extrato de folha + 9g ágar+ 400 ml água destilada autoclavada	-

*Todos os meios de cultura preparados foram autoclavados a 120°C por 20 minutos.

Extração e quantificação da Cercosporina

Para quantificar a produção da toxina, após a identificação do meio nutritivo que propiciou a indução desta toxina, foi conduzido um ensaio em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial composto por 31 isolados, duas condições luminosas, um meio de cultivo e seis repetições, totalizando 372 placas. Destas 186 foram incubadas sob fotoperíodo

de 12h e a mesma quantidade de placas foram incubadas sob intensidade luminosa constante.

Inicialmente foi realizado todo o processo já descrito de maceração e indução da esporulação do patógeno em meio BDA. Após 11 dias de cultivo, foram feitos discos de 8 mm de diâmetro nas placas contendo as colônias fúngicas. Os discos fúngicos foram transferidos para placas de Petri contendo o meio de cultura (Leite de coco + Dextrose (ALCD)). Em seguida, as placas foram vedadas e transferidas para estufas tipo BOD, com temperatura ajustada para 25 ± 2 °C.

Após 10 dias de incubação, procedeu-se a realização da extração e quantificação da toxina, de acordo com a metodologia descrita por Chung (2003) com algumas modificações. Para a extração foram feitos três discos miceliais, com 6 mm de diâmetro de cada placa de Petri, estes foram colocados em 8 ml de KOH (5 mol.L^{-1}) por 16 horas a temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 2$ na ausência de luz. Após o período mencionado as amostras foram filtradas utilizando-se gaze estéril visando à retirada dos discos de micélio para posterior leitura de absorvância.

Foram realizadas três leituras de absorção da toxina por isolado. As leituras da absorvância foram feitas no espectrofotômetro Thermo Scientific™ Genesys 10S UV-Vis nos comprimentos de onda de 480 nm, 595 nm e 640 nm. O experimento foi realizado por três vezes.

Análise Estatística

O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC) com 62 tratamentos, constando de 3 repetições para cada placa de Petri, onde foram feitas 3 leituras de absorvância da toxina nos três comprimentos de onda testados (480 nm, 595 nm e 640 nm). As médias foram comparadas pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Assim, os dados resultantes da análise por meio de espectrofotometria, valores de absorvância de cada isolado, foram submetidos à análise de variância, onde as variáveis estudadas foram às interações entre, Isolado x Período luminoso, Isolado x Comprimento de onda e Período luminoso x Comprimento de onda. Para análise dos dados foi utilizado o programa R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Indução da produção de Cercosporina – Seleção de meio de cultivo

A produção de pigmentação pelos isolados de *Mycosphaerella* spp. testados teve início a partir do terceiro dia após a transferência dos discos de micélio para o meio de cultura (ALCD). Há relatos que a produção de cercosporina inicia-se dois dias após a transferência da colônia fúngica para o meio de cultura ou tecidos lesionados de plantas infectadas (JENNS et al., 1989; ROBESON et al., 1993). Após 10 dias de incubação, a produção da toxina foi determinada pelo acúmulo de pigmentação de coloração vermelha sobre a superfície do meio de cultura.

Logo, entre os oito meios de cultura testados foi possível induzir a produção da toxina cercosporina apenas no meio de cultura composto por Ágar leite de coco dextrose (ALCD). Dentre os demais meios não houve produção de pigmentação. No meio (ALCD) foi observada a presença de pigmentação vermelha ao redor das colônias fúngicas com tonalidades variando entre vermelho claro a vermelho escuro. A pigmentação vermelha concentrou-se nas bordas e embaixo das colônias havendo expansão da pigmentação no meio formando um halo bem definido (Figura 1).

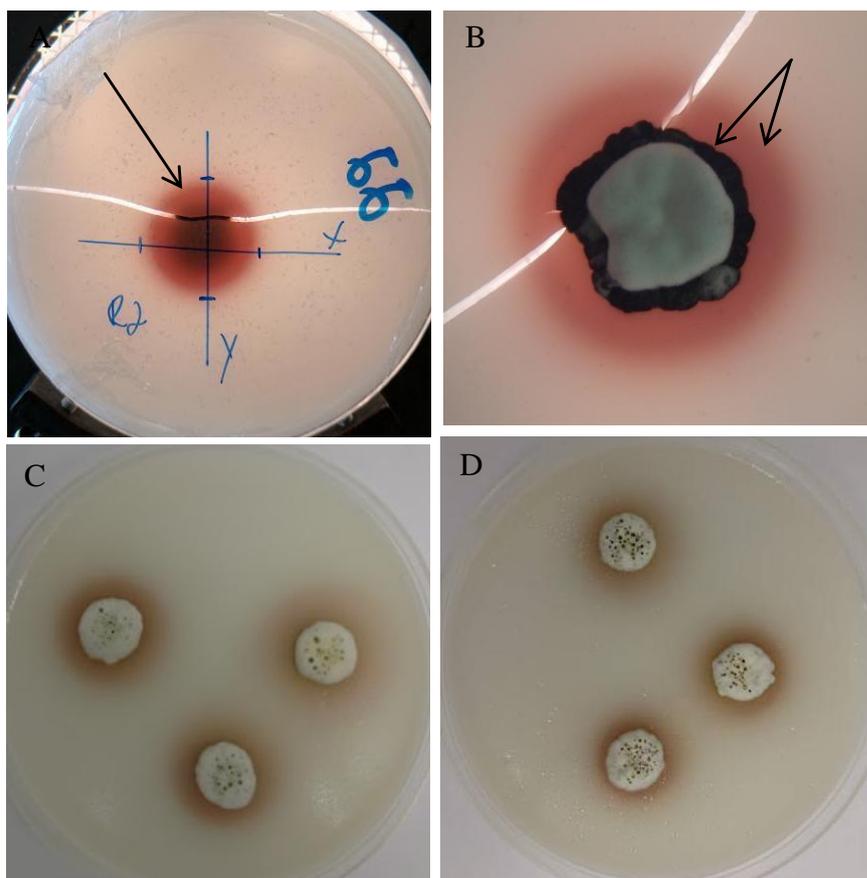


Figura 1. Colônias de *Mycosphaerella* spp. aos 15 dias de produção da toxina. (A) Seta indicando halo vermelho característico da produção de cercosporina no meio de cultivo (ALCD), isolado 66 sobre luz constante. (B) Seta indicando o crescimento micelial versus tamanho do halo. (C) Produção de cercosporina, isolado 34 sob fotoperíodo de 24h. (D) Produção de cercosporina, isolado 34 sobre fotoperíodo de 12h.

Fajola (1978) desenvolveu um estudo onde foi induzida a produção de cercosporina, por vinte isolados do gênero *Cercospora*, em seis meios de cultivo diferentes (Ágar água, Ágar suco V8, Ágar suco de cenoura, Ágar batata sacarose, Ágar batata, Ágar batata dextrose), foi obtido melhor resultado para a produção da toxina no meio BDA. Resultados inferiores foram encontrados para o meio Ágar-água.

Com isso, o autor relatou a produção da toxina, por dez dos isolados testados. Todavia, foram observadas variações no grau de produção entre os diferentes isolados. Dentre as espécies de *Cercospora* investigadas, foi quantificado a maior produção de cercosporina em *Cercospora ricinella*. Já em

Cercospora nicotianae a produção foi pouca, enquanto outros oito isolados não produziram a toxina.

Após 15 dias da indução da produção da toxina, por meio de medição utilizando-se régua, foi observado que o diâmetro médio das colônias cultivadas no meio (ALCD) variou de 1,0 á 1,5 cm enquanto o diâmetro do halo formado na superfície do meio pela produção de cercosporina variou 1,2 á 2,5 cm. Após quarenta dias de incubação, foi observado que a produção do metabólito continuava intensa em uma parcela dos isolados (03 isolados). Esta produção justifica-se pela variação entre as condições ideais para indução e produção da toxina entre isolados de uma mesma espécie.

Assim, de acordo com Daub e Chung (2009) a toxina cercosporina é preferivelmente sintetizada em meios de cultivo que favoreçam o crescimento vegetativo, a exemplo do meio BDA, sendo reprimida quando o patógeno é cultivado em meio favorável à esporulação, a exemplo do meio de cultivo V8. Isso ocorre devido ao fato das condições nutricionais necessárias para cada processo serem antagônicas.

Todavia, neste estudo os resultados diferiram dos obtidos por Fajola, (1978) e Daub; Chung, (2009) tanto o meio de cultivo BDA quanto o meio de cultivo V8 não estimularam a produção da toxina pelo patógeno. Ambos favoreceram o crescimento micelial, sendo o meio BDA responsável pelo maior deles em todos os isolados testados, enquanto o meio V8 promoveu a esporulação do patógeno.

Os meios à base de suco V8 e Água de coco não induziram a produção da toxina não corroborando Santos et al. (2015), que observaram a presença desta por *Cercospora capsicum* em pimenteiras. Koshikumo (2013) induziu a produção da toxina em *Cercospora zeina* e *Cercospora sorghif* sp. *maydis*, em meio a base de água de coco enriquecido por leveduras e ou sais como: MgCl, CaCl e MnCl.

Diante disso, a autora verificou que a adição de extrato de levedura e de sais favoreceu significativamente a produção de cercosporina, apesar de não haver diferença significativa entre as concentrações da toxina nos meios. Não houve indução da produção da toxina cercosporina nos meios compostos por água de coco natural ágar e água de coco natural acrescido de sais pelos isolados de *Mycosphaerella* spp. da bananeira no presente estudo.

Portanto, o meio a base de leite de coco acrescido de extrato de levedura não apresentou produção de coloração compatível com a pigmentação vermelha característica de cercosporina, corroborando You et al. (2008) que mencionam a possibilidade do extrato de levedura de estimular ou não a produção de toxinas, a depender do meio de cultura utilizado, sem alterar a expressão dos genes envolvidos na biossíntese, indicando a existência de outros mecanismos possivelmente envolvidos.

Neste meio, foi verificada uma mudança de coloração nas bordas das colônias, entretanto o pigmento apresentou-se com uma coloração marrom diferindo da característica observada por patógenos produtores de cercosporina, essa pigmentação observada pode estar associada à produção de outros metabólitos secundários produzidos pelo microrganismo.

Sendo assim, no meio a base de extrato da folha de bananeira não houve produção de pigmentação vermelha, podendo estar relacionado aos componentes do meio de cultura a exemplo de sais, fontes de nitrogênio, além dos nutrientes que favorecem a esporulação do patógeno *in vivo* obtida a partir do extrato.

Estes componentes podem estar associados ao favorecimento do processo de esporulação do fungo. Desta maneira, pode estar contribuindo para a indução da esporulação. Daub e Chung (2009) mencionam que meios de cultura que favorecem a esporulação não induzem a produção da toxina cercosporina. Resultado semelhante foi descrito por Santos et al. (2015) onde o meio de cultivo produzido à base de folhas de pimenteira não induziu a produção da toxina, entretanto favoreceu a esporulação.

A constituição do meio Ágar-água apresenta menor proporção de nutrientes, sendo composto apenas pelos constituintes da água destilada provida de concentrações menores ou ausência de cloretos, apresentam quantidades reduzidas de minerais, como P, Fe, K, Cl, I e Ca e íons, sendo constituídos também por celulose, anidrogactose e proteínas (KOSHIKUMO et al., 2014).

O meio de cultivo composto apenas por ágar-água neste estudo não favoreceu a indução da produção da toxina, corroborando com o trabalho de Santos (2015) em que também não foi possível observar a produção da toxina por *Cercospora Capsicum*. Entretanto ainda que em baixas proporções nutricionais neste meio Koshikumo et al., (2014) observaram a presença da toxina por *Cercospora sorghi* f. sp. *maydis*.

Com base nos resultados observados neste estudo e em comparação com a produção de cercosporina por diferentes patógenos causadores de cercosporiose, pode-se inferir que diferentes meios de cultivos podem favorecer a produção da toxina, haja vista as variadas fontes de nutrientes fornecidas, contudo neste estudo a indução e produção da toxina foi verificada apenas no meio (ALCD).

Análise quantitativa da produção de cercosporina por meio de espectrofotometria

A cercosporina apresenta solubilidade moderada em água e alta solubilidade em variados solventes orgânicos. Devido à solubilidade reduzida em água, são formados cristais vermelhos da toxina que se acumulam na superfície do meio de cultivo, sendo visíveis com facilidade por meio do pigmento produzido.

Desse modo, para a extração e posterior quantificação por meio da leitura de absorvância, os discos fúngicos foram adicionados ao solvente (KOH 5N). Ao serem imersos na solução (KOH 5N), todos os isolados apresentaram mudança de coloração adquirindo coloração esverdeada instantaneamente, característica esperada para isolados produtores de cercosporina.

Com relação aos dados resultantes da análise de variância (ANOVA) para a variável absorvância houve diferença significativa entre os valores médios da absorção da toxina. Conforme pode ser observado na (Tabela 3), foi obtido efeito significativo entre as interações, Isolado x Período luminoso, Isolado x Comprimento de onda e, Período luminoso x Comprimento de onda. Os resultados dessas interações foram significativos a 1% de probabilidade pelo teste F, ou seja, os tratamentos diferem entre si.

Tabela 3: Análise de variância (ANOVA): Variável absorvância da toxina cercosporina em relação aos tratamentos testados.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Isolado	31	1,43	0,05	14,71	0,0000
Período	1	0,01	0,01	3,29	0,0707
C_onda	2	1,34	0,67	214,28	0,0000
Isolado*Período	31	0,52	0,02	5,39	0,0000

Isolado*C_onda	62	0,40	0,01	2,04	0,0000
Período*C_onda	2	0,03	0,02	4,86	0,0083
Isolado*Período*C_onda	62	0,25	0,00	1,30	0,0747
Erro	384	1,20	0,00		
Total	575	5,182799			
CV (%)	48,23				

**e*, significativo pelo teste F a 1% e 5%, respectivamente.

Após o período de dezesseis horas de escuro a solução adquiriu coloração esverdeada variando de verde claro a translúcido, a variação na intensidade da coloração evidencia diferenças entre isolados quanto à produção da toxina. Feito as leituras de absorbâncias, todos os filtrados apresentaram picos de absorção nas três faixas analisadas (480nm, 595nm e 640nm). Todos os isolados foram caracterizados como produtores de cercosporina (Tabela 4).

Tabela 4. Médias da absorbância da toxina cercosporina para diferentes isolados de *Mycosphaerella* spp. submetidos a diferentes comprimentos de onda, Cruz das Almas-BA, Embrapa/UFRB, 2018.

Isolados	Comprimento de Onda		
	480nm	595nm	640nm
Iso 01	0,132 dA	0,054 cB	0,043 cB
Iso 166	0,514 aA	0,181 aB	0,138 bB
Iso 167	0,145 dA	0,061 cB	0,044 cB
Iso 168	0,175 dA	0,082 cB	0,065 cB
Iso 169	0,116 dA	0,065 cB	0,056 cB
Iso 170	0,101 dA	0,042 cB	0,035 cB
Iso 171	0,187 cA	0,100 cB	0,087 bB
Iso 172	0,341 bA	0,146 bB	0,122 bB
Iso 173	0,224 cA	0,139 bB	0,120 bB
Iso 174	0,105 dA	0,045 cB	0,033 cB
Iso 175	0,177 dA	0,099 cB	0,088 bB
Iso 176	0,136 dA	0,062 cB	0,050 cB
Iso 178	0,124 dA	0,053 cB	0,043 cB
Iso 179	0,215 cA	0,106 bB	0,092 bB
Iso 18	0,241 cA	0,107 bB	0,089 bB
Iso 180	0,133 dA	0,073 cB	0,067 cB
Iso 181	0,276 cA	0,126 bB	0,104 bB
Iso 182	0,151 dA	0,074 cB	0,061 cB
Iso 183	0,142 dA	0,066 cB	0,057 cB
Iso 184	0,157 dA	0,060 cB	0,044 cB
Iso 185	0,244 cA	0,138 bB	0,116 bB
Iso 186	0,182 dA	0,063 cB	0,049 cB

Iso 187	0,123 dA	0,047 cB	0,037 cB
Iso 188	0,143 dA	0,081 cB	0,073 cB
Iso 33	0,196 cA	0,110 bB	0,093 bB
Iso 34	0,222 cA	0,113 bB	0,098 bB
Iso 40	0,264 cA	0,217 aA	0,198 aA
Iso 44	0,144 dA	0,066 cB	0,054 cB
Iso 56	0,115 dA	0,050cB	0,040 cB
Iso 66	0,177 dA	0,089 cB	0,081 cB
Iso 75	0,151 dA	0,088 cB	0,075 cB

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott á 5% de significância. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott á 5% de significância.

Comparando os isolados dentro de cada comprimento de onda, houve resultados de absorção superiores no comprimento de 480 nm, todavia o isolado (Iso 40), não diferiu estatisticamente em relação aos três comprimentos de onda. No comprimento de 480 nm, observa-se a formação de quatro grupos onde ocorreram variações quanto à produção da toxina. Em relação aos comprimentos de onda de 595 nm e 640 nm, os valores de absorbância foram equivalentes.

Fajola (1978) testou a produção da toxina. Oito isolados foram classificados como não produtores e ao fazer a extração em acetona, a solução apresentou uma coloração vermelha brilhante. O autor mencionou existir tendências na taxonomia do grupo *Cercospora*, as quais indicam que isolados não produtores da toxina, não sejam verdadeiros *Cercospora*, podendo pertencer a outros gêneros relacionados.

Para tanto, no trabalho em questão a parcela de isolados considerados qualitativamente como não produtores da toxina por não apresentarem produção de pigmento ao realizar a extração em KOH, apresentaram a mesma coloração verde translúcido similar aos isolados produtores da toxina. Desta maneira, com base nas leituras de absorbância e produção de pigmento todos os isolados foram caracterizados como produtores de cercosporina. Todavia, ainda fazem-se necessárias pesquisas que investiguem outros mecanismos relacionados à produção e expressão da toxina pelo fungo *Mycosphaerella* spp. e patógenos causadores de Cercosporiose.

A produção da toxina está relacionada a fatores ambientais como temperatura, meio de cultivo e a condição luminosa na qual o microrganismo seja

submetido. Fajola (1978), ao testar seis meios de cultura distintos, notou que a melhor temperatura para o crescimento micelial (30 °C) divergiu da temperatura ideal (22,5°C) para produção da toxina. Nesta pesquisa não foram testadas diferentes temperaturas para induzir a produção da toxina. A temperatura usada nos testes foi de 25°C ± 2, considerada ideal para o crescimento micelial de *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis*.

Visando ampliar variáveis a serem testadas para produção de metabolitos secundários por microrganismos, a utilização de diferentes condições de temperatura para a indução de toxina se torna uma alternativa viável tendo em vista que outros estudos, já mencionaram a ocorrência de variação na produção da toxina *in vitro* entre isolados de espécies diferentes e entre isolados de uma mesma espécie (FAJOLA, 1978; JENNS; DAUB; UPCHURCH, 1989).

Assim, os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram variações entre a produção da toxina por isolados da mesma espécie onde dos trinta e um isolados testados, foi observada a produção qualitativa de pigmentação em doze isolados, sendo eles, (Iso 01, 18, 33, 34, 40, 66, 75, 168, 170, 179, 186, 187) (Tabela 4). Entretanto, houve variação quanto à intensidade da coloração e tamanho do halo formado pela produção do metabólito ao redor das colônias.

Com relação às propriedades fotodinâmicas foram comparadas as médias das absorvâncias da toxina cercosporina por isolado dentro dos comprimentos de onda. Ao comparar as médias (Tabela 5) foi verificado que o isolado, (Iso 40) obteve valor de absorvância de (0,282), sendo estatisticamente superior aos demais isolados para o fotoperíodo de 12 horas (P12). Já para o P24, (luz constante), o isolado (Iso 166) obteve valor de absorvância (0,370), sendo estatisticamente superior aos demais isolados, neste período. Ambos os isolados mencionados, foram considerados maiores produtores de cercosporina para cada período testado.

Comparando-se os períodos, nota-se que a maioria dos isolados, não diferiram significativamente por meio do teste de Scott-Knott á 5% de significância, desta maneira, a produção da toxina pode ser induzida em ambos os períodos. Contudo, analisando os valores de absorção entre os isolados dentro do mesmo período, os valores de absorvância foram em grande parte superior na interação isolado versus P12, sendo deste modo, o período luminoso mais indicado.

Tabela 5. Médias das absorvâncias da toxina cercosporina por isolado dentro dos regimes luminosos, P12 (alternância luminosa 12h claro e escuro) e P24 (luz constante). Cruz das Almas-BA, Embrapa/UFRB, 2018.

Isolados	Período	
	P12	P24
Iso 01	0,056 dA	0,096 dA
Iso 166	0,185 bB	0,370 aA
Iso 167	0,073 dA	0,094 dA
Iso 168	0,135 bA	0,080 dB
Iso 169	0,096 cA	0,062 dA
Iso 170	0,037 dA	0,082 dA
Iso 171	0,160 bA	0,089 dB
Iso 172	0,167 bB	0,239 bA
Iso 173	0,209 bA	0,113 cB
Iso 174	0,056 dA	0,066 dA
Iso 175	0,134 bA	0,108 cA
Iso 176	0,081 dA	0,085 dA
Iso 177	0,068 dA	0,082 dA
Iso 178	0,074 dA	0,073 dA
Iso 179	0,150 bA	0,125 cA
Iso 18	0,173 bA	0,118 cB
Iso 180	0,053 dB	0,129 cA
Iso 181	0,207 bA	0,130 cB
Iso 182	0,109 cA	0,082 dA
Iso 183	0,059 dB	0,117 cA
Iso 184	0,086 cA	0,088 dA
Iso 185	0,200 bA	0,133 cB
Iso 186	0,080 dA	0,116 cA
Iso 187	0,051 dA	0,087 dA
Iso 188	0,087 cA	0,111 cA

Iso 33	0,178 bA	0,087 dB
Iso 34	0,178 bA	0,111 cB
Iso 40	0,282 aA	0,170 cB
Iso 44	0,110 cA	0,066 dB
Iso 56	0,070 dA	0,067 dA
Iso 66	0,122 cA	0,110 cA
Iso 75	0,119 cA	0,090 dA

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott á 5% de significância. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott á 5% de significância.

Comparando-se as médias da interação entre o período luminoso e o comprimento de onda (Tabela 6), os resultados demonstram que para quantificar a produção da toxina, o comprimento de onda de 480nm obteve destaque, sendo observados valores de absorção maior que nas demais faixas. Contudo, analisando as médias entre os períodos luminosos e a faixa de 480nm, os resultados para absorbância foram estatisticamente semelhantes.

Tabela 6. Comparação das médias das absorbâncias da toxina cercosporina nos períodos (P12), 12h de luz e (P24) 24h de luz, nos três comprimentos de onda testados 480nm, 595 nm e 640 nm. Cruz das Almas-BA, Embrapa/UFRB, 2018.

Período	Comprimento de Onda		
	480nm	595nm	640nm
P12	0,178 aA	0,099 aB	0,084 aB
P24	0,190 aA	0,080 bB	0,065 bB

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott á 5% de significância. Médias seguidas pelas mesmas letras nas linhas maiúsculas não diferem entre si pelo teste F.

Os resultados obtidos neste estudo corrobora Fajola (1978), onde foram testadas três condições luminosas: luz contínua, escuridão contínua e períodos alternados de luz e escuridão 12 h. Diante disso, constatou-se que a condição

mais favorável à produção de toxina foi sob alternância luminosa de 12 h de luz e escuridão, seguida por luz contínua, enquanto a condição de escuridão contínua não foi significativa.

Desta maneira, podemos inferir que independente da condição luminosa testadas *in vitro* neste estudo, foi possível induzir a produção da toxina. Contudo, o (P12), foi estatisticamente, mais favorável à produção do metabólito. Diante desses resultados, Duab (2005), menciona que patógenos que evoluíram usando a produção de metabólitos tóxicos como estratégia para estabelecer relações patógeno-hospedeiro, requer luz para o crescimento e a sobrevivência.

Sendo assim, diversos autores relatam que a intensidade luminosa correlaciona-se com a atividade e produção da toxina. Ainda há relatos que mencionam a existência de correlação entre a exposição à luz e o desenvolvimento de manchas necróticas típicas de cercosporioses, sendo uma das razões, pela qual, em geral, as cercosporioses sejam mais severas em plantas expostas ao sol (BATCHVAROVA et al., 1992; DAUB, 1982; 1982; LYNCH ; GEOGHEGAN, 1979).

CONCLUSÕES

O meio de cultivo Ágar leite de coco acrescido de dextrose (ALCD) é o que melhor induziu a produção de cercosporina por isolados de *Mycosphaerella* spp.

A produção de cercosporina é dependente de cada isolado de *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis*.

O melhor regime luminoso para produção de cercosporina é, P12. O comprimento de onda de 480 nm é o recomendado para quantificar a cercosporina.

REFERÊNCIAS

BATCHVAROVA, R. B.; REDDY, V. S.; BENNETT, J. Cellular resistance in rice to cercosporin, a toxin of *Cercospora*. **Phytopathology**, v.82, n. 6, p. 642-646, 1992.

CHOQUER, M.; DEKKERS, K. L.; CHEN, H. Q.; CAO, L.; UENG, P. P.; DAUB, M. E.; CHUNG, K.R. The CTB1 gene encoding a fungal polyketide synthase is required for cercosporin biosynthesis and fungal virulence of *Cercospora nicotianae*. **Molecular Plant Microbe Interact**, v. 18, n.5, p. 468-476, 2005.

CHUNG, K. R. Involvement of calcium/ Calmodulin Signaling in Cercosporin Toxin Biosynthesis by *Cercospora nicotianae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 2, p. 1187-1196, 2003.

CORDEIRO, Z. J. M.; ROCHA, H. S.; ARAÚJO, A. G. Metodologias para manuseio de *Mycosphaerella musicola* em laboratório. **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Documentos**, 2011.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. **Doenças da bananeira**. In: KIMATI, H; AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). Manual de fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p.99-117, 2005.

DUAB, M. E. Cercosporin, a photosensitizing toxin from *Cercospora* species. **Phytopathology**, v. 72, n. 4, p. 370-374, 1982.

DAUB, M. E.; BRIGGS, S. P. Changes in tobacco cell membrane composition and structure caused by cercosporin. **Plant Physiology**, v. 71, n. 4, p. 763-766. 1989.

DAUB, M. E.; EHRENSHAFT, M. M. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: contributions to plant disease and fundamental biology. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, n. 1, p. 461–90, 2000.

DAUB, M. E.; HERRERO, S.; CHUNG, K. R. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, p. 197-206, 2005.

DAUB, M. E; CHUNG, K. R. Cercosporin: A photoactivated toxin in plant disease. St. Paul: **APSnet**, v. 10, p. 2007-0207, 2007.

DAUB M. E.; CHUNG, K. R. Photoactivated Perylenequinone Toxins in Plant Pathogenesis. In: **Plant Relationships**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 201-219, 2009.

FAJOLA, A. O. Cercosporin, a phytotoxin from *Cercospora* spp. **Physiological Plant Pathology**, v. 13, n. 2, p. 157-164, 1978.

GOODMAN, R. N.; KIRÁLY, A.; WOOD, K. R. **The Biochemistry and physiology of plant disease**. University of Missouri Press, 1986. 433 p.

JENNS, A. E.; DAUB, M. E; UPCHURCH, R. G. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. **Phytopathology**, v. 79, 213-219, 1989.

KOSHIKUMO, E. S. M. Identificação molecular e morfológica, métodos de esporulação, indução e detecção de cercosporina das espécies de cercospora do milho. 109 p. **Tese (Doutorado em Fitopatologia)** - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

KOSHIKUMO, E. S. M.; ALVES, E; VON PINHO, R. G. Induction and detection of toxin in *Cercosporazeina* and *Cercosporasorghi* f. sp. *Maydis*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 1, 2014.

KNOGGE, W. Molecular basis of specificity in host-fungus interactions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 102, n. 9, p. 807-816, 1996.

NEDÉLNICK, J.; REPKOVÁ, J. Plant selection in vitro for resistance to some pathogens using secondary toxic metabolites. **Journal of Genetic Plant Breeding**, v. 34, p. 69-76, 1998.

PEIXOUTO, Y. S. Estrutura genética de isolados do fungo causador da Sigatoka-amarela em bananeira. **Dissertação (Mestrado)** Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, 2013 p.70.

ROBERSON, J. R.; JALAL, M. A. F.; SIMPSOM, R. B. **Methods for identifying cercosporin-degrading microorganisms**. U.S. Patent n. 5, 262, 306, 16 nov.1993.

ROCHA, F.S.; CATÃO, C. R. M; MUNIZ, M. F. S. Aspectos Diagnósticos entre *Mycosphaerella* spp. da Bananeira, Distribuição e Manejo no Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, n.14; p. 2012.

SANTOS, A. S. Caracterização morfológica de cercospora e eficiência da toxina cercosporina na seleção de genótipos de pimenteiras ornamentais. 2015 55f. **Tese** (Doutorado em Agronomia)-Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2015.

SCHMELZ, E. A.; ENGELBERTH, J.; ALBORN, H. T.; O'DONNELL, P.; SAMMONS, M.; TOSHIMA, H.; TUMLINSON, J. H. Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins and volatile organic compounds in plants. **PNAS**, v. 100, n. 18, p. 10551-10557, 2003.

SIMMONDS, N.W. **Bananas**. 2nd ed. Longmans, Green ; Co. Ltd. 1966. 512 p.

TRUCKSESS, M. W. Mycotoxins. **JAOAC International**, v. 87, p. 275-284, 2004.

YOU, B. J.; LEE, M. H.; CHUNG, K. R. Production of cercosporin toxin by the phytopathogenic *Cercospora* fungi is affected by diverse environmental signals. **Canadian journal of microbiology**, v. 54, n. 4, p. 259–269, 2008.

Considerações Finais

Os resultados encontrados no presente trabalho ampliam os conhecimentos sobre os fungos *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis*. A identificação e caracterização dos isolados por meio das relações filogenéticas, assim como a caracterização quanto à agressividade e produção de cercosporina geraram informações úteis para programas de melhoramento de bananeira, visando à produção de variedades resistentes ao patógeno.

Dessa forma, estudos adicionais utilizando um maior número de isolados, que representem as duas espécies *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis*, com vistas a investigar as interações patógeno-hospedeiro e agressividade dos isolados, correlacionando a produção de cercosporina, ainda são necessários. Haja vista que não foram encontrados outros trabalhos relacionando a produção de toxina por *Mycosphaerella* spp. da bananeira.

Por fim, pesquisas com vistas a compreender o mecanismo de ação e a biossíntese da toxina, podem ser um caminho para a melhor compreensão da atuação do metabólito produzido pelo fungo na patogenicidade. Podendo ser investigado genes envolvidos na ativação da toxina cercosporina relacionados à patogenicidade do microrganismo.

Dada a realização desse trabalho após selecionar conteúdo a pesquisar, organizar estudos e experimentos, chegou-se a conclusão a cerca da variabilidade de *mycosphaerella* spp. da bananeira com base na caracterização molecular, agressividade e produção de cercosporina, com buscas de informações apresentada nesta pesquisa. Deseja-se poder contribuir no conhecimento e domínio prático do material estudado.