



AMANDA LETÍCIA DA SILVEIRA

**ETIOLOGIA E CONTROLE DA ANTRACNOSE EM FRUTOS
DE BANANA NO BRASIL**

**LAVRAS - MG
2018**

AMANDA LETÍCIA DA SILVEIRA

**ETIOLOGIA E CONTROLE DA ANTRACNOSE EM FRUTOS DE BANANA NO
BRASIL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutora.

Prof. Dr. Eduardo Alves
Orientador

Dra. Sarah da Silva Costa Guimarães
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Silveira, Amanda Letícia da.

Etiologia e controle da antracnose em frutos de banana no
Brasil / Amanda Letícia da Silveira. - 2018.

77 p. : il.

Orientador(a): Eduardo Alves.

Coorientador(a): Sarah da Silva Costa Guimarães.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. *Colletotrichum* spp. 2. Marcadores ISSR. 3. *Musa* spp. I.
Alves, Eduardo. II. Guimarães, Sarah da Silva Costa. III. Título.

AMANDA LETÍCIA DA SILVEIRA

**ETIOLOGIA E CONTROLE DA ANTRACNOSE EM FRUTOS DE BANANA NO
BRASIL
ETHIOLOGY AND CONTROL OF ANTHRACNOSE IN BANANA FRUITS IN
BRAZIL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 29 de maio de 2018.

| | |
|---|--------------|
| Dr. Ricardo Magela de Souza | UFLA |
| Dra. Leila Aparecida Salles Pio | UFLA |
| Dra. Fabiano José Perina | EMBRAPA |
| Dra. Suellen Bárbara Ferreira Galvino Costa | PROPLAC/UFLA |

Prof. Dr. Eduardo Alves
Orientador

Dra. Sarah da Silva Costa Guimarães
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2018**

*A minha mãe por ser meu porto seguro.
Aos meus irmãos pelo carinho e incentivo.
Ao meu marido Márcio pela força, paciência e amor.
A minha filha Cecília por ser o motivo do meu sorriso.
Com todo carinho
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar força e iluminar o meu caminho, me fazendo sempre seguir adiante.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade e aprendizado.

Ao professor Eduardo Alves pela orientação, apoio e ensinamentos.

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

À Dra. Sarah Costa pelos ensinamentos e contribuições durante a realização deste trabalho.

Ao meu orientador da graduação e amigo Daniel Amaral, por ter me feito despertar o amor pela fitopatologia e pelo apoio e torcida sempre.

Aos laboratórios de Bacteriologia, Virologia, Fisiologia do Parasitismo e Micologia pelo suporte e disponibilização de estrutura e materiais para a realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de Microscopia Eletrônica, Aline, Elisa, Silvino, Fabiano, Tamara, Aline Vieira, por todo auxílio, paciência, colaboração e convivência.

Aos amigos que Lavras me proporcionou, Mara, Bruna, Cristian, Marina e Gilmar que estiveram comigo em todos os momentos, fazendo com que os dias fossem mais divertidos e agradáveis. Sem vocês essa conquista teria sido muito mais árdua. Vocês farão parte da minha vida sempre e nossos momentos ficarão sempre na minha memória.

Ao meu marido Márcio pelo incentivo, apoio, amor e muita paciência durante esta trajetória. Sei que foram momentos difíceis, mas confesso que sem a sua ajuda não seria possível a realização deste sonho. Agradeço também a sua família em especial a Dona Maria e Adriana pelo apoio, carinho e torcida.

A minha filha Cecília, por me proporcionar sentir o amor mais puro e bonito que existe. Por me revigorar com cada olhar e sorriso, me dando força para persistir.

A minha mãe por ser meu alicerce, exemplo e porto seguro. A sua persistência me fez chegar até aqui e querer ir mais longe sempre.

Aos meus irmãos Aline e Luciano pelo apoio e carinho.

Aos meus amigos Ayza, Antonio, Franciele e Juliana pela amizade, incentivo e torcida.

Aos meus afilhados João Pedro e Enrico, por me encherem de alegria e amor.

À minha família, vó Emília, tios e primos, por sempre torcerem e se orgulharem de mim.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos durante as disciplinas, contribuindo para minha formação profissional e pessoal.

Aos colegas da pós-graduação pela convivência e companheirismo.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.”

(Martin Luther King)

RESUMO

A antracnose, causada por *Colletotrichum* spp. é um patógeno de grande importância na cultura da banana uma vez que afeta o fruto tanto no campo quanto no período pós-colheita, depreciando seu valor comercial. Esse patógeno está amplamente distribuído nas regiões onde a bananeira é cultivada. *Colletotrichum* spp. apresenta diferentes níveis de virulência entre isolados, o que sugere a existência de variabilidade genética. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética de isolados de *Colletotrichum* spp. associados a frutos de banana apresentando sintomas de antracnose e determinar a sensibilidade micelial *in vitro* dos isolados, submetidos a concentrações de fungicidas químicos e biológico. Foram utilizadas 65 isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos de banana das cultivares Prata e Nanica, provenientes de diferentes estados brasileiros. Os isolados foram submetidos à caracterização morfológica, patogênica e molecular, além disso, foi realizado teste de sensibilidade *in vitro* a fungicidas. Caracteres culturais não foram informativos para distinção de espécies de *Colletotrichum*. Todos os isolados testados foram patogênicos. Na caracterização molecular foram utilizados 12 primers ISSR e análise filogenética utilizando o gene GAPDH, o que permitiu diferenciar os isolados em cinco espécies, das quais três delas ainda não haviam sido associadas à antracnose em banana. No teste de sensibilidade *in vitro*, dentre os fungicidas, o microbiológico, foi o que apresentou maior eficiência no controle dos isolados testados, além disso, não foi observado resistência a nenhum dos fungicidas testados. Os resultados obtidos com este estudo contribuem para o conhecimento sobre a etiologia da antracnose em banana, sendo de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias de controle contribuindo para minimizar os danos provocados pelo patógeno.

Palavras-chave: *Colletotrichum* spp. Marcadores ISSR. *Bacillus subtilis*.

ABSTRACT

Colletotrichum spp. is a pathogenic fungus of great importance in banana cultivation since it is the causal agent of anthracnose and affects the fruit both in the field and in the post-harvest period, depreciating its commercial value. This disease is widely distributed in the regions where the banana is cultivated. However, there are different levels of virulence, suggesting the existence of genetic variability among *Colletotrichum* spp. Thus, the present study aimed to identify *Colletotrichum* species associated with anthracnose of banana fruits, to verify the genetic diversity of *Colletotrichum* spp. and to determine the *in vitro* mycelial sensitivity of the isolates, submitted to concentrations of 2 chemical fungicides and a microbiological one. A total of 65 isolates of *Colletotrichum* spp. were obtained from banana fruits of the varieties Prata and Nanica, from different Brazilian states. The isolates were submitted to morphological, pathogenic and molecular characterization, in addition, an *in vitro* sensitivity test was performed on fungicides. Morphological and cultural characters were not informative for distinguishing *Colletotrichum* species. All isolates tested were pathogenic. In the molecular characterization were used 12 primers ISSR and phylogenetic analysis using the gene GAPDH, which allowed to differentiating the isolates in five species, of which three had not yet been associated to the banana anthracnose. In the *in vitro* susceptibility test, among the fungicides, the microbiological was the one that showed the highest efficiency in the control of the tested isolates, in addition, no resistance to any of the tested fungicides was observed. The results obtained with this study contribute to the knowledge about the etiology of anthracnose in banana, being of extreme importance for the development of control strategies contributing to minimize the damage caused by the pathogen.

Keywords: *Colletotrichum* spp. ISSR Markers. *Bacillus subtilis*.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 12 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 14 |
| 2.1 Cultura da banana | 14 |
| 2.2 Antracnose | 14 |
| 2.3 Etiologia, Sintomatologia e Epidemiologia | 15 |
| 2.4 Controle da doença | 16 |
| 2.5 Caracterização molecular de espécies de <i>Colletotrichum</i> spp. | 17 |
| REFERÊNCIAS | 20 |

CAPÍTULO 2

| | |
|--|----|
| ESPÉCIES DE <i>Colletotrichum</i> spp. ASSOCIADAS A FRUTOS DE BANANA COM SINTOMAS DE ANTRACNOSE | 25 |
| 1 INTRODUÇÃO | 28 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| 2.1 Obtenção dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. | 31 |
| 2.2 Caracterização Molecular | 33 |
| 2.2.1 Extração de DNA | 33 |
| 2.2.2 PCR-ISSR..... | 33 |
| 2.2.3 Análise filogenética..... | 35 |
| 2.3 Caracterização cultural | 37 |
| 2.4 Teste de patogenicidade | 39 |
| 3 RESULTADOS | 40 |
| 3.1 Análise dos marcadores ISSR | 40 |
| 3.2 Análise filogenética | 42 |
| 3.3 Caracterização cultural | 44 |
| 3.4 Teste de Patogenicidade..... | 46 |
| 4 DISCUSSÃO | 50 |
| 5 CONCLUSÃO | 53 |
| REFERÊNCIAS | 54 |

CAPÍTULO 3

| | |
|--|----|
| AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE <i>in vitro</i> DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. À FUNGICIDAS | 58 |
| 1 INTRODUÇÃO | 61 |

| | |
|-------------------------------|----|
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 63 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 65 |
| 4 CONCLUSÃO..... | 74 |
| REFERÊNCIAS..... | 75 |

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o quinto maior produtor de banana do mundo, com área cultivada de mais de 500 mil hectares e produção de aproximadamente sete milhões de toneladas de frutos no ano de 2016 (IBGE, 2017). A produção de banana está distribuída pelas 27 unidades da Federação, sendo os estados de São Paulo, Bahia e Minas Gerais maiores produtores. Problemas fitossanitários afetam a produtividade da cultura e a exportação de seus frutos. Várias doenças podem afetar a cultura, sendo a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum musae* (Berk & Curt.) von Arx. uma das principais. A infecção pode acontecer no campo, com os frutos ainda verdes, entretanto, o desenvolvimento de sintomas ocorre na fase de maturação (CORDEIRO; MATOS, 2005).

Não existem estimativas de perdas causadas pela antracnose no cultivo da banana. Porém, manchas nos frutos e uma redução do tempo de prateleira resultam em perdas para o produtor, comerciante e também para o consumidor (CORDEIRO; MATOS; MEISSNER FILHO, 2004).

A identificação das espécies de *Colletotrichum* baseada exclusivamente em aspectos morfológicos e em hospedeiros não tem se mostrado confiável (THAUNG, 2008; PHOTITA et al., 2005), já que várias espécies de *Colletotrichum* podem ter um único hospedeiro (MENEZES, 2006) e fatores ambientais podem influenciar na morfologia do fungo (PHOTITA et al., 2005). Além disso, espécies pertencentes ao complexo de espécies *C. gloeosporioides* (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012), não podem ser separadas por morfologia, sendo então necessárias análises filogenéticas para sua correta identificação.

Portanto, o uso conjunto de técnicas moleculares e análises morfológicas, aumenta a confiabilidade na identificação da espécie (THAUNG, 2008). A identificação correta do patógeno é importante para programas de melhoramento visando à resistência de plantas e na escolha do melhor manejo (MENEZES, 2006). Dentre as técnicas moleculares, o uso da técnica de *Inter-Simple Sequence Repeat – Polymerase Chain Reaction* (ISSR–PCR) tem se destacado em isolados de *Colletotrichum* para caracterização e análise da variabilidade genotípica (MEDEIROS et al., 2010; SANTOS et al., 2015).

Recentemente novas espécies foram descritas causando antracnose em banana. Em trabalho realizado por Intan-Sakinah, Suzianti e Latiffah (2013), em bananas na Malásia foi

encontrada a espécie *C. gloeosporioides* até então não relatada causando antracnose em bananeiras. Zhou et al. (2017), encontraram a espécie *C. scovillei* causando a doença em bananas na China, sendo esta espécie pertencente ao complexo *C. acutatum* (DAM et al., 2012). Isto mostra a necessidade de mais estudos para a identificação dos agentes causais da doença, pois podem existir outras espécies além das descritas causando antracnose em bananas no Brasil.

A realização do manejo da antracnose é um problema, devido tanto à ampla gama de hospedeiros susceptíveis (LIMA et al., 2013), quanto à diversidade da virulência entre diferentes espécies de *Colletotrichum* (TALHINHAS et al., 2015). Compreender a diversidade de patógenos, a interação patógeno-hospedeiro e outras informações associadas com estas espécies recém-reconhecidas, certamente contribuirão nas decisões sobre as medidas adequadas para o controle da doença (CAI et al., 2011; TALHINHAS et al., 2015). O controle da antracnose é feito pela aplicação de fungicidas. Porém, em patógenos de grande potencial evolutivo este controle pode ser dificultado pelo surgimento de resistência a produtos químicos (McDONALD; LINDE, 2002).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética de isolados de *Colletotrichum* spp. associados a frutos de banana apresentando sintomas de antracnose e determinar a sensibilidade micelial *in vitro* dos isolados, submetidos a concentrações de fungicidas químicos e biológico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultura da banana

A banana (*Musa* spp.) tem como centro de origem o continente asiático, é uma magnoliopsida (antiga monocotiledônea), pertencente à família Musacea, gênero *Musa*, sendo este um vegetal completo, por apresentar caule (rizoma), raiz, folhas, flores, frutos e sementes. É uma planta perene, uma vez que novos perfilhos nascem da base da planta-mãe (BORGES; SOUZA; ALVES, 2000).

A banana é a segunda fruta mais produzida no Brasil, com 6.778.043 ton. colhidas em 2017, perdendo apenas para a laranja, com 14.653.571 t colhidas nesse mesmo ano (IBGE, 2017). No Brasil, as bananas mais difundidas são: ‘Prata’, ‘Pacovan’, ‘Prata-Anã’, ‘Maçã’, ‘Mysore’, ‘Terra’, ‘D’Angola’ do grupo genômico AAB, ‘Nanica’, ‘Nanicão’ e ‘Grande Naine’ pertencente ao grupo AAA (SILVA; SANTOS-SEREJO; CORDEIRO, 2004).

Cerca de 40% da produção brasileira de bananas é comprometida devido a danos mecânicos que ocorrem desde a colheita até a embalagem dos frutos e também por doenças fúngicas na pós-colheita. Práticas realizadas de forma inadequada durante a colheita, o transporte e a embalagem provocam ferimentos que servem de porta de entrada para patógenos. Devido às exigências do mercado consumidor é necessário o uso de técnicas que mantenham a qualidade e impeçam a contaminação dos frutos e o desenvolvimento de doenças (VENTURA; HINZ, 2002).

O surgimento de podridões e a diminuição do tempo de vida pós-colheita de bananas, são favorecidas por mudanças físicas e bioquímicas nos frutos, desencadeadas pelo aumento rápido e acentuado na atividade respiratória e na produção endógena de etileno, após a colheita no estágio fisiológico desenvolvido. Esse comportamento caracteriza a banana como fruto climatérico (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

2.2 Antracnose

A antracnose também conhecida como podridão negra ou podridão das frutas maduras, está distribuída por todas as regiões produtoras de banana e é considerada a doença mais grave na pós-colheita (WARDLAW, 1972; CORDEIRO; MATOS, 2000). A doença se inicia no campo com o depósito de conídios do fungo *Colletotrichum* spp. sobre os frutos, com posterior germinação e penetração pela casca. Os sintomas aparecerão na fruta já madura,

levando a perdas significativas da produção (CORDEIRO; MATOS, 2000; VENTURA; HINZ, 2002; CORDEIRO; MATOS; MEISSNER FILHO, 2004).

A doença é um problema em pré e pós-colheita, uma vez que parte da infecção ocorre em frutos verdes no campo, permanecendo latente até o início da maturação. Em pós-colheita a infecção quiescente vai se manifestar durante o transporte e maturação dos frutos.

A antracnose geralmente ocorre na casca (pericarpo), sendo que raramente atinge a polpa dos frutos, exceto em condições de altas temperaturas ou quando os frutos estão em avançado estágio de maturação (CORDEIRO; MATOS, 2000; CORDEIRO; MATOS, 2003; PLOETZ; THOMAS; SLABAUGH, 2003; CORDEIRO; MATOS; KIMATI, 2005).

O agente causal desta doença é o fungo *C. musae*, porém existe grande semelhança morfológica deste agente etiológico com a espécie *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz & SAcc., sendo esse responsável pela maioria das antracnoses em diversas frutas pós colheita (PLOETZ; THOMAS; SLABAUGH, 2003). O teleomorfo de *C. musae* ainda é motivo de questionamento na literatura, entretanto Petch (1917) o descreveu como *Glomerella musarum* Petch.

2.3 Etiologia, Sintomatologia e Epidemiologia

A espécie *C. musae* é classificada taxonomicamente se baseando no teleomorfo que faz parte do filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, subclasse Sordariomycetidae, ordem Incertae sedis e família Glomerellaceae (INDEX FUNGORUM, 2018). A espécie se caracteriza por apresentar colônias com micélio aéreo e abundante, de coloração branca que com o passar do tempo se tornam acinzentadas e com a presença de massa de conídios de coloração alaranjada. Os conídios são hialinos, retos, cilíndricos, obtusos no ápice, unicelulares, com comprimento de 10 a 18 µm e 3 a 6,5 µm de largura (ARX, 1957; SUTTON, 1980; PLOETZ; THOMAS; SLABAUGH, 2003; COUTO; MENEZES, 2004). De acordo com Sutton (1980), a presença de apressórios médios e de coloração castanho-escura são muito comuns, apresentando forma irregular.

A doença se manifesta inicialmente com pequenas manchas de cor amarronzada, com o progresso da doença as lesões vão se escurecendo e se tornando deprimidas. Quando em presença de alta umidade ocorre a formação de frutificações de coloração alaranjada a creme, com massas de conídios de cor salmão, que caracterizam os acérvulos de *Colletotrichum* (JEFFRIES et al., 1990; BAILEY et al., 1992; PLOETZ; THOMAS; SLABAUGH, 2003). Com o amadurecimento dos frutos e o progresso da doença, as lesões vão aumentando de

tamanho, se juntando e formando áreas necróticas maiores, que vão tomando grandes extensões do fruto deixando-os com má aparência (CORDEIRO; MATOS, 2000; PESSOA; OLIVEIRA, 2006). Frutos infectados com o fungo amadurecem de forma mais rápida, o que dificulta a comercialização devido ao apodrecimento (CORDEIRO; MATOS; MEISSNER FILHO, 2004).

A dispersão dos conídios pode ocorrer a curtas distâncias por respingos de chuva na mesma planta ou em plantas próximas e a longas distâncias pelo vento ou por insetos (PLOETZ; THOMAS; SLABAUGH, 2003). Em trabalho *in vitro* realizado por Goos e Tschirsch (1962), a temperatura ótima descrita para o crescimento, esporulação e germinação conidial foi em torno de 27 a 30° C e menor taxa de germinação na presença de luz, os conídios germinam sob umidade relativa elevada, superior a 98% em um período entre 6 e 12 horas.

Em trabalho realizado por Pessoa et al. (2007), bananas previamente inoculadas com *C. musae* foram testadas em diferentes temperaturas e períodos de molhamento, observado que quando associadas às temperaturas de 25 e 30° C com o período de molhamento de 36 horas, ocorreram formação de lesões maiores na superfície das frutas, porém quando a temperatura foi em torno de 15 °C, observou-se um menor desenvolvimento da doença.

2.4 Controle da doença

O manejo da doença deve ser iniciado no campo com a realização de práticas culturais, como a eliminação de restos culturais da área de cultivo, a fim de eliminar as possíveis fontes de inóculo (PLOETZ; THOMAS; SLABAUGH, 2003). Na fase de colheita e pós-colheita deve-se evitar ferimentos nos frutos, que servem de porta de entrada dos fungos. Deve-se ter o cuidado com o equilíbrio do fitohormônio etileno, que é responsável pelo amadurecimento dos frutos e é produzido tanto pelo hospedeiro quanto pelo patógeno (PLOETZ; THOMAS; SLABAUGH, 2003).

Procedimentos de lavagem e desinfestação para a prevenção e controle de doenças pós-colheita devem ser realizados, e podem ser feitos com o uso de detergente líquido neutro e sulfato de alumínio em câmara de nebulização ou tanque de imersão (LICHTEMBERG, 1999).

O controle químico também pode ser utilizado, e pode ser feito por imersão dos frutos em soluções com fungicidas ou pela atomização de produtos químicos no campo (CORDEIRO; MATOS, 2000; VENTURA; HINZ, 2002; CORDEIRO; MATOS, 2003;

CORDEIRO; MATOS; KIMATI, 2005). No Brasil apenas três produtos químicos são registrados para o controle de antracnose em banana, sendo que existem apenas dois ingredientes registrados: imazalil e tiabendazol (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2011).

2.5 Caracterização molecular de espécies de *Colletotrichum* spp.

O gênero *Colletotrichum* era tradicionalmente identificado por caracteres morfológicos e culturais, como medidas de conídios e apressórios, culturais como cor de colônia, taxa de crescimento micelial e patogenicidade em hospedeiros (TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA et al., 2006). Entretanto, a similaridade fenotípica que ocorre entre as diferentes espécies de *Colletotrichum* pode ocasionar dificuldades na identificação (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012) e por isso, outros métodos estão sendo aplicados para possibilitar uma correta identificação e diferenciação das espécies (MENEZES, 2006).

A caracterização fundamentada exclusivamente em critérios morfológicos, culturais, fisiológicos, bioquímicos e de patogenicidade embora útil, é limitada por vários fatores como o baixo número de caracteres passíveis de serem analisados e as variações intrínsecas ao patógeno (FUNGARO, 2000; PERES et al., 2003). Somado a isso, a existência de formas intermediárias do fungo, como *formae speciales*, e a falta de padronização de algumas condições culturais empregadas nos diferentes estudos, como a utilização de vários meios de cultura, fotoperíodos e temperaturas (influência dos fatores ambientais na estabilidade de caracteres), contribuem muito para que ocorram dificuldades na identificação de espécies de *Colletotrichum* (SUTTON, 1992; FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; LOPEZ, 2001; PERES et al., 2003; ANDRADE et al., 2007; PIMENTA, 2009).

Em decorrência da dificuldade no processo de identificação de espécies, várias técnicas moleculares têm sido utilizadas com o objetivo de fornecer uma melhor diferenciação das espécies (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; PHOTITA et al., 2005; RAMPERSAD; HOSSEIN; CARRINGTON, 2014; SILVA; ANDRADE, 2011). Os métodos moleculares mais utilizados para a identificação de espécies podem ser divididos em dois grupos principais, sendo que o primeiro consiste no uso da reação da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e o segundo no uso de sequenciamento e análise filogenética.

As reações de PCR são muito utilizadas para a caracterização da diversidade genética entre populações e espécies muito próximas de *Colletotrichum* (NGUYEN et al., 2010). Dentre as técnicas que utilizam PCR, a utilização de marcadores ISSR (*Inter-simple sequence*

repeats), vem se destacando por apresentar bons resultados de diversidade do gênero *Colletotrichum*. Os marcadores ISSR são regiões no genoma, situadas entre sequências microssatélites. A técnica consiste em amplificar essas regiões, via PCR, utilizando apenas um iniciador que resultará na amplificação de inúmeros fragmentos de DNA. Cada fragmento obtido a partir da mesma reação de PCR é considerado um loco, portanto, ISSR são marcadores dominantes multilocos úteis em estudos de variabilidade genética (NG; TAN, 2015).

Os marcadores de DNA ISSR possuem como vantagens a simplicidade, rapidez e reprodutibilidade, além de revelar alto polimorfismo (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002; TIWARI et al., 2015). Em função da sua abundância e dispersão no genoma, tem sido muito utilizado para estudar relações entre duas populações muito relacionadas (HUANG; SUN, 2000; DESHPANDE et al., 2001), ou indivíduos aparentados, devido ao elevado grau de polimorfismo (BORBA et al., 2005).

Já as análises de sequenciamento e filogenia têm sido muito utilizadas com diversos genes e regiões conservadas do DNA. A região *Internal Transcribed Spacer* é indicada como *barcode* (código de barras) universal para a identificação de fungos e por isso é utilizada com frequência por vários pesquisadores (SCHOCH et al., 2012), porém alguns pesquisadores notaram que para algumas espécies de *Colletotrichum* essa região não tem sido eficiente, como por exemplo em trabalhos realizados por Weir, Johnston e Damm (2012) e Cai et al. (2009) que concluíram que, dentro do complexo de espécies de *C. gloeosporioides*, os marcadores genéticos gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), calmodulina (CAL) e actina (ACT) podem ser usados como códigos de barras de DNA, mas as sequências de ITS não facilitaram a discriminação intraespecífica. Rampersad, Hossein e Carrington (2014) em trabalho com marcadores moleculares utilizados na reconstrução filogenética para espécies de *Colletotrichum*, confirmaram que a região ITS não foi capaz de separar os indivíduos testados como as regiões GAPDH e ACT sendo assim, a região ITS não foi eficiente para discriminação das espécies do gênero *Colletotrichum* testadas.

O uso de filogenia na identificação de espécies permite uma maior confiabilidade, no entanto o sequenciamento ainda apresenta um elevado custo. Para a caracterização e análise da variabilidade genética outras técnicas moleculares, que visam à diferenciação de espécies podem ser utilizadas, destacando se dentre elas o uso de marcadores microssatélites ISSR que podem ser uma alternativa inicial ao sequenciamento quando se trabalha com um grande número de isolados. Os marcadores ISSR além de serem considerados de baixo custo apresentam alta eficiência em análises de diversidade genética principalmente com

Colletotrichum spp. (RAMPERSAD, 2013; SHARMA; KATOCH, 2014; MAHMODI et al., 2014).

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, E. M. et al. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 21-31, 2007.
- ARX, J. A. von. Revision der zu *Gloeosporium* gestellten pilze. Verhandelingen der Koninklijke Nederlandsche Akademie van Wetenschappen. Afdeling Natuurkunde. **Tweede Sectie**, Amsterdam, v. 51, n. 3, p. 1-153, 1957.
- BAILEY, J. A. et al. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: Centre for Agriculture and Biosciences International, 1992. p. 88-120.
- BORBA, R. DA S. et al. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma Westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 565-569, 2005.
- BORGES, A. L.; SOUZA, L. da S.; ALVES, E. J. Exigências edafoclimáticas. In: CORDEIRO, Z. J. M. **Banana: Produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. (Frutas do Brasil, 1).
- CAI, L. et al. The evolution of species concepts and species recognition criteria in plant pathogenic fungi. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 50, p. 121-133, 2011.
- CAI, L.; HYDE et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 183- 204, 2009.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. Doenças da banana. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, p. 12-16, 2005.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas: volume 2**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 99-117.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; MEISSNER FILHO, P.E. Doenças e métodos de controle. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. (Ed). **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 146-182.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. Doenças da bananeira. In: FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P. (Ed.). **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2003. p. 323-390.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. Doenças fúngicas e bacterianas. In: CORDEIRO, Z. J. M. **Banana Fitossanidade**. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologias, 2000. p. 36-65.

COUTO, E. F.; MENEZES, M. Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 406-412, 2004.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C; CROUS, P. W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Stud Mycol.** v.73, p.37–113, 2012.

DESHPANDE, K. U. et al. Genetic diversity across natural populations of montane plant species from the western Ghats, India revealed by inter-simple sequence repeats. **Molecular Ecology.** v.10, p. 2397-2408, 2001.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, San Paul, v. 82, p. 596-605, 1998.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia- Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 3, n. 14, p. 12-16, 2000.

GOOS, R. D.; TSCHIRSCH, M. Effect of environmental factors on spore germination, spore survival, and growth of *Gloeosporium musarum*. **Mycologia**, New York, v. 54, n. 4, p. 353-367, 1962.

HUANG, J.; SUN, S. M. Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in Ipomoea series Batatas (Convolvulaceae) as revealed by intersimple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. **Theorycal Applied Genetica**, v. 100, p. 105-1060, 2000.

IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística** (2016). Prod. agric., Rio de Janeiro, v. 37, p.1-91, 2017.

INDEX FUNGORUM. *Colletotrichum musae* (Berk. & M.A. Curtis) Arx. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=295348>. Acesso em: 15 abr. 2018.

INTAN SAKINAH, M. A.; SUZIANI, I. V.; LATIFFAH, Z. First report of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose of banana (*Musa* spp.) in Malaysia. **Plant Disease**, San Paul, v. 97, n. 7, p. 991-991, 2013.

JEFFRIES, P.; DODD, J. C.; JEGER, M. J.; PLUMBLEY, R. A. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathology**, Oxford, v. 39, n. 3, p. 343-366, 1990.

LICHTEMBERG, L. A. Colheita e pós-colheita da banana. **Informe Agropecuário**, v. 20, n. 196, p. 73-90, Belo Horizonte, 1999.

LIMA, N. B. et al. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 61, p.75-88, 2013.

LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 9, p. 291-337, 2001.

MAHMUDI, F. et al. Genetic Diversity and Differentiation of *Colletotrichum* spp. Isolates Associated with Leguminosae Using Multigene Loci, RAPD and ISSR. **The Plant Pathology Journal**, Seoul, v. 30, n.1, p. 10-24, 2014.

McDONALD, B.A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 349-379, 2002.

MEDEIROS, L. V. *pelB* gene in isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from several hosts. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.9, p. 661-673, 2010.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 3, p.170-179, 2006.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. **Consulta de Praga/Doença**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins, 2011. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 16 abr. 2018.

NGUYEN, P. T. H et al. Identification of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of coffee in Vietnam. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 127, p. 7387, 2010.

NG, W. L.; TAN, S. G. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: are we doing it right? **ASM Science Journal**, Kuala Lumpur, v. 9, n. 1, p. 30-39, 2015.

PERES, A. P. et al. Variabilidade morfofocultural e genética de fungos associados à podridão peduncular do mamão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1053-1062, 2003.

PESSOA, W. R. L. S.; OLIVEIRA, S. M. A. Doenças da banana. In: OLIVEIRA, S. M. A. et al. (Ed.). **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. p. 539-553.

PESSOA, W. R. L. S.; OLIVEIRA, S. M. A.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. H.; SANTOS, A. M. G. Efeito da temperatura e período de molhamento sobre o desenvolvimento de lesões de *Colletotrichum musae* em banana. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 147-151, 2007.

PETCH, T. Additions to Ceylon fungi. **Annals of the Royal Botanic Gardens of Peradeniya, Peradeniya**, v. 6, n. 3, p. 195-256 [p. 223], 1917.

PHOTITA, W. et al. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. **Fungal Diversity**, v. 18, p. 117-133, 2005.

PIMENTA, A.A. **Caracterização morfométrica, patogênica e genética de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em manga (*Mangifera indica* L.)**. 2009. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

PLOETZ, R. C.; THOMAS, J. E.; SLABAUGH, W. R. Diseases of banana and plantain. In: PLOETZ, R. C. (Ed.). **Diseases of tropical fruit crops**. Florida: University of Florida (UFAS), 2003. p. 96-98.

RAMPERSAD, S. N. Genetic structure of *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* isolates infecting papaya inferred by multilocus ISSR markers. **Phytopathology**, Berlin, v.103, p.182-189, 2013.

RAMPERSAD, S. N.; HOSEIN, F. N.; CARRINGTON, C. V.F. Sequence exploration reveals information bias among molecular markers used in phylogenetic reconstruction for *Colletotrichum* species. **Springer Plus**, v. 3, n. 614, p. 1-15, 2014.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, n. 1, p. 9-17, 2002.

SANTOS, P. C. M. et al. Diversidade Genotípica e Patogênica de *Colletotrichum musae* no Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2015, v. 37, n. 2, p. 355-366.

SCHOCH, C.L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA**, v.109, p. 6241–6246, 2012.

SHARMA, P. N.; KATOCH, A. Population structure of *Colletotrichum gloeosporioides* associated with capsicum anthracnose in North Western Himalayas and evaluation for disease resistance. **Journal of Mycology and Plant Pathology**, v. 44 n. 4 pp. 412-416, 2014.

SILVA, H. S. A.; ANDRADE, E. S. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças da mandioca no Brasil. In: GHINI, R.; HAMADA, E.; BETTIOL, W. (Ed). **Impactos das mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil**. Embrapa Meio Ambiente, 2011. p. 356.

SILVA, S. O.; SANTOS-SEREJO, J. A.; CORDEIRO, Z. J. M. Variedades. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. (Ed.). **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMP, 2004. p. 45-47.

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980. p. 523-537.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: Centre for Agriculture and Biosciences International, 1992. p. 1-26.

TALHINHAS, P. et al. Virulence diversity of anthracnose pathogens (*Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* species complexes) on eight olive cultivars commonly grown in Portugal. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 142, p. 73-83, 2015.

THAUNG, M. M. Coelomycete systematic with special reference to *Colletotrichum*. **Mycoscience**, Tokyo, v. 49, n. 6, p. 345-350, 2008.

TIWARI, J.K. et al. Molecular characterization of potato somatic hybrids by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Potato Journal**, Shimla, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2015.

TOZZE JUNIOR, H. J.; MELLO, M. B. A.; MASSOLA JUNIOR, N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* spp. causadores de antracnose e, solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 71-79, 2006.

VENTURA, J. A.; HINZ, R. H. Controle das doenças da bananeira. In: ZAMBOLIM, L. et al. (Ed). **Controle de doenças de plantas fruteiras**. Viçosa: UFV, 2002. v.1, p. 838-938,.

WARDLAW, C .W. **Diseases of the banana and of the Manila hemp plant**. MacMillan and company. 1972.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 115–180, 2012.

ZHOU, Y.; HUANG, J. S.; YANG, L. Y.; WANG, G. F. First Report of Banana Anthracnose Caused by *Colletotrichum scovillei* in China. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 101, n. 2, p. 381, 2017.

CAPÍTULO 2

ESPÉCIES DE *Colletotrichum* spp. ASSOCIADAS A FRUTOS DE BANANA COM SINTOMAS DE ANTRACNOSE

RESUMO

O Brasil é um importante produtor e consumidor de bananas, porém problemas enfrentados principalmente na fase pós-colheita tem interferido na comercialização dos frutos. Dentre os problemas que ocorrem após a colheita destacam-se as doenças, como a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum* spp., que é responsável por interferir no amadurecimento dos frutos tornando-os indesejáveis para o comércio. Assim, Os objetivos com este trabalho foram: avaliar a diversidade de espécies de *Colletotrichum*, que ocorre em frutos de banana com sintomas de antracnose, por meio de ISSR, análise filogenética do gene GAPDH, caracteres culturais e testar a patogenicidade dos isolados em frutos de banana. Foram obtidos 65 isolados de *Colletotrichum* spp. de frutos de bananas de vários estados brasileiros e submetidos à caracterização morfológica, patogênica e molecular. Caracteres culturais não foram suficientes para a distinção de espécies de *Colletotrichum* e complexos. Todos os isolados testados foram patogênicos causando os sintomas característicos nos frutos inoculados e também apresentaram níveis diferentes de virulência. Na caracterização molecular foram utilizados 12 primers ISSR e análise filogenética utilizando o gene GAPDH, o que permitiu diferenciar os isolados em cinco espécies, das quais três delas ainda não haviam sido associadas à antracnose em banana. A maioria dos isolados estudados neste trabalho foi identificada como *C. musae* e pertence ao complexo de espécie *C. gloeosporioides*. Os resultados obtidos com este estudo contribuem para o conhecimento sobre a etiologia da antracnose em banana, sendo de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias de controle permitindo minimizar os danos provocados pelo patógeno.

Palavras-chave: GAPDH. *Musa* spp. *Colletotrichum musae*.

ABSTRACT

Brazil is an important producer and consumer of bananas, but problems faced mainly in the post-harvest phase have interfered in the commercialization of the fruits. Among the problems that occur after the harvest, diseases such as anthracnose caused by the fungus *Colletotrichum* spp., which are responsible for interfering in the ripening of the fruits, make them undesirable for trade. The objectives of this work were: to evaluate the diversity of *Colletotrichum* species, which occurs in banana fruits with symptoms of anthracnose, through ISSR, phylogenetic analysis of the GAPDH gene, cultural characteristics and to test the pathogenicity of the isolates in fruits of banana. There were obtained 65 isolates of *Colletotrichum* spp. of banana fruits from several Brazilian states and submitted to morphological, pathogenic and molecular characterization. Cultural characters were not sufficient for distinguishing species of *Colletotrichum* and complexes. All the isolates tested were pathogenic causing the characteristic symptoms in the inoculated fruits and also presented different levels of virulence. In the molecular characterization were used 12 primers ISSR and phylogenetic analysis using the gene GAPDH, which allowed to differentiate the isolates in five species, of which three had not yet been associated to the banana anthracnose. Most of the isolates studied in this work were identified as *C. musae* and belong to the *C. gloeosporioides* species complex. The results obtained with this study contribute to the knowledge about the etiology of anthracnose in banana, being of extreme importance for the development of control strategies allowing to minimize the damages caused by the pathogen.

Keywords: GAPDH. *Musa* spp. *Colletotrichum musae*.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de banana do mundo, produzindo aproximadamente sete milhões de toneladas de frutos no ano de 2016 (IBGE, 2017), sendo considerado um importante produtor e consumidor de bananas. Porém a bananicultura nacional enfrenta sérios problemas nas etapas de produção e pós-colheita, que limitam a sua inserção no mercado internacional, devido, basicamente, ao elevado consumo interno e às elevadas perdas na pós-colheita e na comercialização (MAIA et al., 2008).

Dentre as perdas na pós-colheita, destacam-se os fatores físicos (danos mecânicos), fisiológicos (distúrbios fisiológicos e fatores abióticos) e microbiológicos (doenças bióticas), que aliados ao baixo nível tecnológico adotado nos pomares, a baixa qualidade da fruta produzida e a precária estrutura comercial (MAIA et al., 2008; SILVA et al., 2003; RANGEL; PENTEADO; TONET, 2002; CARDOSO, 2005). Uma das causas de perdas na pós-colheita de frutas é a qualidade fitossanitária, que envolve a ação de insetos e fitopatógenos (SILVA; CORDEIRO, 2000). Dentre os fitopatógenos que atacam a cultura, o fungo *Colletotrichum musae* possui destaque, pois prejudica de forma considerável tanto a comercialização quanto o consumo *in natura* dessa fruta (SILVA; CORDEIRO, 2000; CORDEIRO; MATOS; KIMATI, 2005; CORDEIRO; MATOS, 2005; PESSOA et al., 2007).

Esta doença sempre representou o mais grave problema em todas as regiões produtoras do mundo (VENTURA; HINZ, 2002; CORDEIRO; MATOS, 2005). Os frutos infectados pelo fungo têm amadurecimento acelerado e, mesmo que a polpa não seja atingida, torna-se de aspecto indesejável para o consumo, inviabilizando a exportação (DEL PONTE, 2018). Os sintomas observados são lesões escuras e deprimidas, que com o progresso da doença e em condições ambientais favoráveis, como alta umidade, cobrem-se de frutificação rósea. Essas estruturas são os acérvulos, responsáveis pela produção e disseminação dos conídios (COUTO; MENEZES, 2004). Já foram relatadas na literatura quatro diferentes espécies causando estes sintomas em frutos de banana que são *C. musae*, *C. fructicola* e *C. gloesporioides* pertencentes ao complexo *C. gloesporioides* e *C. scovillei* membro do complexo *C. acutatum*.

A ocorrência de mais de uma espécie de *Colletotrichum* parasitando um mesmo hospedeiro pode dificultar o controle da antracnose devido ao comportamento diferenciado das espécies quanto à sensibilidade aos fungicidas. Isto já foi verificado para *C. acutatum*, *C. boninense*, *C. capsici*, *C. coccodes* e *C. gloesporioides* que causam a antracnose do pimentão

no Brasil, isolados de tais espécies apresentam sensibilidade diferenciada aos fungicidas azoxistrobina, carbendazim, tiabendazol e tebuconazol (TOZZE JÚNIOR et al., 2011).

A identificação de espécies de *Colletotrichum* foi anteriormente baseada na morfologia e na associação com seu hospedeiro (HYDE et al., 2009), entretanto ocorria instabilidade dos caracteres morfológicos dificultando a discriminação das espécies. A abordagem polifásica para estudos com *Colletotrichum*, utilizando filogenia multi-gene juntamente com dados morfológicos, tem sido recomendada para identificação precisa de espécies e gênero (CAI et al. 2009; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

A diferenciação entre espécies de *Colletotrichum*, baseadas no hospedeiro de origem ou em sua gama de hospedeiros, pode não ser um critério confiável para fungos deste gênero, que podem infectar inúmeras espécies de plantas hospedeiras. Deste modo, diversos estudos buscam, por meio de ferramentas de pesquisa, caracterizar e identificar isolados de *Colletotrichum*, visando compreender a etiologia da antracnose, em diferentes hospedeiros (AFANADOR-KAFURI et al., 2003; TOZZE JÚNIOR, 2007).

As técnicas moleculares, baseadas em análise de DNA, vêm sendo cada vez mais utilizadas, possibilitando o desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e específicos na identificação de espécies (TEIXEIRA; VIEIRA; MACHADO, 2004). Diferentes técnicas moleculares têm sido utilizadas para estudar a diversidade e auxiliar na identificação de espécies do gênero *Colletotrichum* (TALHINAS et al., 2005; VILA NOVA et al., 2011). Entre essas técnicas a utilização de marcadores moleculares ISSR (*Inter-simple sequence repeats*) tem sido muito utilizada para a caracterização de espécies. Entre os vários marcadores de DNA disponíveis, a metodologia de ISSR é considerada de baixo custo, simples, rápida, reprodutível e que revela alto polimorfismo (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002; TIWARI et al., 2015).

Outra técnica muito eficiente na distinção de espécies é a filogenia baseada no sequenciamento de regiões do DNA genômico que consegue diferenciar espécies morfológicamente semelhantes, bem como aquelas pertencentes a gêneros complexos, assim como *Colletotrichum*. A análise dos fragmentos de DNA onde são encontradas regiões conservadas do genoma proporcionam estudos para a análise filogenética das espécies, permitindo estimar as relações de ancestralidade entre organismos, criar novos grupos taxonômicos, reconstruir árvores filogenéticas com representantes de diferentes áreas geográficas, assim como a separação dos isolados em espécies distintas e diferenciação dos isolados dentro de cada espécie (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; SCHNEIDER, 2007).

A identificação correta de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose em frutos de banana é de grande importância para compreensão do ciclo de vida do patógeno. Também permite estudos epidemiológicos e o desenvolvimento de medidas adequadas de manejo da doença, além de tornar a produção da fruta no Brasil mais competitiva atendendo as exigências sanitárias de exportação.

Os objetivos com este trabalho foram: avaliar a diversidade de espécies de *Colletotrichum*, que ocorre em frutos de banana com sintomas de antracnose, por meio de ISSR, análise filogenética do gene GAPDH, caracteres culturais e testar a patogenicidade dos isolados em frutos de banana.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Os frutos com sintomas típicos de antracnose foram coletados de variedades comerciais de banana Prata e Nanica provenientes dos estados: Bahia, Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Norte (TABELA 1). Para a realização do isolamento, os frutos foram lavados e fragmentos da casca de aproximadamente 5 mm² com sintomas da doença foram obtidos. Estes fragmentos foram desinfestados superficialmente e transferidos para placas de Petri com meio BDA (batata-dextrose-ágar). As placas com os fragmentos foram incubadas em BOD à temperatura 25° C ± 1° C e fotoperíodo de 12 horas. Após sete dias foram selecionadas as colônias típicas de *Colletotrichum* spp., seguido de repicagem. Posteriormente, a partir de culturas puras, obtiveram-se culturas monospóricas. Foram obtidos 65 isolados de *Colletotrichum* spp. e os mesmos foram armazenados em tubos de ensaio com BDA, recobertos com óleo mineral estéril e armazenados a temperatura ambiente.

Tabela 1- Isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos de banana, avaliados segundo cultivares e origem geográfica.(Continua).

| Isolado | Cultivar | Origem Geográfica |
|---------|----------|--------------------|
| 1 | Nanica | Ilhéus – BA |
| 2 | Nanica | Ilhéus – BA |
| 3 | Prata | Pires do Rio – GO |
| 4 | Nanica | Arcos – MG |
| 5 | Nanica | Arcos – MG |
| 6 | Prata | Pouso Alegre – MG |
| 7 | Prata | Pouso Alegre – MG |
| 8 | Prata | Pouso Alegre – MG |
| 9 | Prata | Caldas – MG |
| 10 | Prata | Caldas – MG |
| 11 | Prata | Pará de Minas – MG |
| 12 | Nanica | Passos – MG |
| 13 | Nanica | Passos – MG |
| 14 | Prata | Passos – MG |
| 15 | Prata | Formiga – MG |

| | | |
|----|--------|--------------------|
| 16 | Prata | Formiga – MG |
| 17 | Prata | Formiga – MG |
| 18 | Prata | Tupaciguara – MG |
| 19 | Prata | Januária – MG |
| 20 | Prata | Januária – MG |
| 21 | Nanica | Januária – MG |
| 22 | Prata | Lavras – MG |
| 23 | Prata | Lavras – MG |
| 24 | Prata | Lavras – MG |
| 25 | Prata | Lagoa Formosa – MG |
| 26 | Prata | Lagoa Formosa – MG |
| 27 | Prata | Lagoa Formosa – MG |
| 28 | Prata | Lagoa Formosa – MG |
| 29 | Nanica | Lagoa Formosa – MG |
| 30 | Prata | Piumhi – MG |
| 31 | Prata | Piumhi – MG |
| 32 | Prata | Guapé – MG |
| 33 | Prata | Guapé – MG |
| 34 | Prata | Guapé – MG |
| 35 | Prata | Uberaba – MG |
| 36 | Prata | Uberaba – MG |
| 37 | Prata | Uberaba – MG |
| 38 | Prata | Pirapora – MG |
| 39 | Prata | Pirapora – MG |
| 40 | Prata | Pirapora – MG |
| 41 | Prata | Piracema – MG |
| 42 | Prata | Piracema – MG |
| 43 | Nanica | Janaúba – MG |
| 44 | Nanica | Janaúba – MG |
| 45 | Prata | Janaúba – MG |
| 46 | Prata | Estiva – MG |
| 47 | Prata | Estiva – MG |
| 48 | Prata | Silvianópolis – MG |
| 49 | Prata | Silvianópolis – MG |

| | | |
|----|--------|-------------------------|
| 50 | Prata | São João do Meriti – RJ |
| 51 | Prata | São João do Meriti – RJ |
| 52 | Nanica | Ipanguaçu – RN |
| 53 | Nanica | Ipanguaçu – RN |
| 54 | Nanica | Ipanguaçu – RN |
| 55 | Nanica | Corupá – SC |
| 56 | Nanica | Corupá – SC |
| 57 | Nanica | Jundiaí – SP |
| 58 | Prata | Aparecida – SP |
| 59 | Nanica | Jaboticabal – SP |
| 60 | Nanica | Jaboticabal – SP |
| 61 | Nanica | Jaboticabal – SP |
| 62 | Prata | Registro – SP |
| 63 | Prata | Registro – SP |
| 64 | Prata | Registro – SP |
| 65 | Prata | Ubatuba – SP |

Fonte: do autor (2018).

2.2 Caracterização Molecular

2.2.1 Extração de DNA

A extração de DNA dos isolados foi baseada no protocolo de Kuramae-Izioka (1997) e posteriormente para a avaliação da concentração e da qualidade do DNA foi utilizado espectrofotômetro NanoDrop e também eletroforese em gel de agarose.

2.2.2 PCR-ISSR

As reações de PCR foram realizadas para os 65 isolados com cada *primer* utilizando as seguintes quantidades de reagentes: 5 µL de GoTaq® Colorless Master Mix, primer 5 pmol, 60 ng de DNA e água pura estéril q.s.p. 20 µL. Doze primers ISSR (TABELA 2) foram escolhidos baseados em trabalhos realizados com espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, ou que apresentaram alto polimorfismo (GUPTA et al., 1994; RATANACHERDCHAI et al., 2010; RAMPERSAD, 2013).

Tabela 2 - Relação de primers utilizados para o desenvolvimento das reações de PCR-ISSR, de isolados de *Colletotricum* de frutos de banana e suas respectivas sequências e temperaturas de anelamento.

| Primers | Sequência (5'– 3') | Temperatura de Anelamento |
|---------|--------------------|---------------------------|
| PC1 | GTGGTGGTGGTGGTG | 57,2 °C |
| PC3 | GTGTGTGTGTGTGTGTC | 50,4 °C |
| P7 | ACAACAACAACAACA | 43,6 °C |
| P8 | AACAACAACAACAAC | 42,1 °C |
| P10 | AAGAAGAAGAAGAAGAAG | 47,0 °C |
| P12 | GACAGACAGACAGACA | 48,8 °C |
| P15 | AGAGAGAGAGAGAGAGTG | 46,8 °C |
| P20 | CTGAGAGAGAGAGAGAGA | 48,1 °C |
| P22 | GAGCAACAACAACAACAA | 55,4 °C |
| AF80820 | AGAGAGAGAGAGAGAGT | 42,5 °C |
| AF80821 | AGAGAGAGAGAGAGAGC | 46,8 °C |
| AF80824 | GAGAGAGAGAGAGAGAYG | 50,0 °C |

Fonte: do autor (2018)

Para a amplificação com os primers ISSR, as reações foram realizadas em um termociclador Therm 1000 Axigen Maxigene, sendo utilizado um ciclo a 95 °C por 3 minutos, 35 ciclos de 3 etapas, sendo a desnaturação a 94 °C por 40 segundos, anelamento com temperatura variável de acordo com o primer utilizado por 40 segundos e a extensão por 72° C por um minuto; para finalizar um ciclo a 72 °C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram revelado por eletroforese em tampão TBE 1 X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3), utilizando gel de agarose 1,0%, contendo 2 µL de GelRed ® (Invitrogen), visualizadas sob luz UV em equipamento de fotodocumentação MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems). Como padrão de tamanho molecular foi utilizado o Marcador Molecular 1 kb DNA(*BioLabs*®).

As imagens dos géis contendo o produto das reações PCR-ISSR foram analisadas, a partir das quais foi obtida uma matriz binária, com o número 1 significando presença de banda, e o número 0 significando ausência. Essa matriz binária foi convertida em uma matriz de distância com auxílio do software XLSTAT (Addinsoft®, versão 2014), empregando-se o coeficiente de Jaccard, utilizado para a construção de um dendrograma para análise das

relações genéticas existentes entre os isolados. O dendrograma foi construído pelo método de distância e algoritmo UPGMA (“Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average”) e a correlação cofenética (r) também foi estimada. Essas análises foram realizadas no programa PAST v. 3.08 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

2.2.3 Análise filogenética

Baseado nos agrupamentos gerados pela análise de ISSR foram selecionados para o sequenciamento do gene gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e posterior análise filogenética 22 isolados (TABELA 3) que apresentaram maior diversidade genética. O fragmento de GAPDH foi amplificado utilizando-se os *primers* GDF (*forward*; 5'-CCGTCAACGACCCCTTCATTGA-3') e GDR (*reverse*; 5'-GGGTGGAGTCGTACTIONTGAGCTGT-3') (TEMPLETON et al., 1992). As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o kit Promega GoTaq® Colorless Master Mix (Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com GelRed (Biotium®), com posterior visualização realizada em fotodocumentador MiniBis Pro (Uniscience). Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o kit Wizard® SV Gel kit and PCR Clean-up System (Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA) para, posterior sequenciamento na empresa Macrogen, USA.

Tabela 3 - Isolados de *Colletotrichum* spp. avaliados na análise filogenética segundo variedades de banana e origem.

| Isolado | Cultivar | Origem |
|---------|----------|--------------------|
| 1 | Nanica | Ilhéus – BA |
| 3 | Prata | Pires do Rio – GO |
| 4 | Nanica | Arcos – MG |
| 8 | Prata | Pouso Alegre – MG |
| 11 | Prata | Pará de Minas – MG |
| 13 | Nanica | Passos – MG |
| 17 | Prata | Formiga – MG |
| 20 | Prata | Januária – MG |
| 23 | Prata | Lavras – MG |
| 27 | Prata | Lagoa Formosa – MG |
| 30 | Prata | Piumhi – MG |

| | | |
|----|--------|-------------------------|
| 35 | Prata | Uberaba – MG |
| 38 | Prata | Pirapora – MG |
| 44 | Nanica | Janaúba – MG |
| 48 | Prata | Silvianópolis – MG |
| 51 | Prata | São João do Meriti – RJ |
| 52 | Nanica | Ipanguaçu – RN |
| 55 | Nanica | Corupá – SC |
| 59 | Nanica | Jaboticabal – SP |
| 60 | Nanica | Jaboticabal – SP |
| 61 | Nanica | Jaboticabal – SP |
| 65 | Prata | Ubatuba – SP |

Fonte: do autor (2018).

Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente por meio do programa SeqAssem (HEPPERLE, 2004) e as sequências consenso foram comparadas com a base de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information – NCBI, por meio do programa BLAST (<http://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>). Sequências adicionais de membros do complexo de espécies *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum boninense* foram obtidas a partir do GenBank (TABELA 4). Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos foram gerados utilizando-se CLUSTAL W implementado no MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). A análise filogenética foi realizada pelo método de máxima parcimônia (MP) com teste de bootstrap de 1000 repetições, por meio do programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). A sequência de *Colletotrichum acutatum* (CBS 112996) foi utilizada como *outgroup*. As sequências geradas serão depositadas no Genbank e o alinhamento será depositado no TreeBase.

Tabela 4 - Isolados de *Colletotrichum* inseridos na análise filogenética com informação do táxon, hospedeiro, localização geográfica e número de acesso do GenBank para as sequências do gene GAPDH.

| Espécie | Código Isolado | Hospedeiro | Localização Geográfica | Nº de acesso Genbank |
|---------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| <i>C. acutatum</i> | CBS 112996* | <i>Carica papaya</i> | Australia | JQ948677 |
| <i>C. aracearum</i> | LC1033* | <i>Monstera deliciosa</i> | China | KX893585 |
| <i>C. boninense</i> | ICMP 17904* | <i>Crinum asiaticum</i> | Japan | JX009905 |
| <i>C. boninense</i> | CBS 123755* | <i>Crinum asiaticum</i> | Japan | JQ005240 |

| | | | | |
|---------------------------|---------------|-----------------------------|-------------|----------|
| <i>C. brasiliense</i> | ICMP 18607* | <i>Passiflora edulis</i> | Brazil | JQ005322 |
| <i>C. brassicicola</i> | CBS 101059* | <i>Brassica oleracea</i> | New Zealand | JQ005259 |
| <i>C. cliviae</i> | CBS125375* | <i>Clivia miniata</i> | China | JX546611 |
| <i>C. dianesei</i> | CMM4083* | <i>Mangifera indica</i> | Brazil-SFV | KC517194 |
| <i>C. endomangiferae</i> | CMM3814* | <i>Mangifera indica</i> | Brazil | KC702955 |
| <i>C. endophytica</i> | MFLUCC10-0676 | <i>Unknown wild fruit</i> | Thailand | KF24218 |
| <i>C. fructicola</i> | ICMP 18581* | <i>Coffea arabica</i> | Thailand | JX010033 |
| <i>C. gloeosporioides</i> | ICMP 17821* | <i>Citrus sinensis</i> | Italy | JX010056 |
| <i>C. hippeastri</i> | CBS 25376* | <i>Hippeastrum vittatum</i> | China | JQ005318 |
| <i>C. horii</i> | ICMP 10492* | <i>Diospyros kaki</i> | Japan | GQ329681 |
| <i>C. karstii</i> | CBS 132134* | <i>Vanda sp.</i> | China | HM585391 |
| <i>C. musae</i> | ICMP 19119* | <i>Musa sp.</i> | USA | JX010050 |
| <i>C. musae</i> | ICMP 17923 | <i>Musa sp.</i> | Indonésia | JX009929 |
| <i>C. theobromicola</i> | ICMP 18649* | <i>Theobroma cacao</i> | Panama | JX010006 |
| <i>C. parsonsiae</i> | ICMP 18590* | <i>Parsonsia capsularis</i> | New Zealand | JQ005320 |
| <i>C. petchii</i> | CBS 378.94* | <i>Dracaena marginata</i> | Italy | JQ005310 |
| <i>C. phyllanthi</i> | CBS 175.67* | <i>Phyllanthus acidus</i> | India | JQ005308 |
| <i>C. siamense</i> | ICMP 18578* | <i>Coffea arabica</i> | Thailand | JX009924 |

* = Espécime tipo ou ex-tipo. As sequências foram baixadas do GenBank, ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants, Landcare Research, Auckland, New Zealand; CBS: Centraalbureau voor Schimmel cultures, Utrecht, The Netherlands; CMM-Culture Collection of Phythopathogenic Fung “Prof. Maria Menezes”, Recife, Brazil; MFLUCC: Mae Fah Luang University Culture Collection, Thailand.Fonte: do autor (2018).

2.3 Caracterização cultural

Para a análise cultural, discos de colônias de 5 mm² de diâmetro foram extraídos das margens de culturas monospóricas de sete dias, cultivadas em meio BDA, e transferidos para novas placas contendo o mesmo meio de cultivo. A seguir, tais culturas foram incubadas a 25°C ± 1°C e fotoperíodo de 12 horas.

A mensuração do diâmetro das colônias foi realizada diariamente, em sentidos ortogonais entre si, até que a colônia de algum isolado tenha atingido o bordo da placa. A partir dos dados obtidos, foi determinado o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) medido conforme Nechet e Abreu (2002), empregando-se a fórmula usada por Oliveira (1991).

$$IVCM = \frac{\sum(D-Da)}{N}$$

N

Em que:

IVCM: Índice de velocidade de crescimento micelial (cm dia^{-1});

D: Diâmetro médio da colônia (cm);

Da: Diâmetro médio da colônia do dia anterior (cm);

N: Número de dias após a repicagem.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições por isolado. Cada unidade amostral foi constituída por uma placa de Petri. Realizou-se o teste de comparação de médias Scott-Knott utilizando-se o software Sisvar, versão 5.6 (FERREIRA, 2017).

Após as colônias alcançarem uniformemente as bordas das placas e atingir estabilização da sua coloração, procederam-se avaliações das mesmas, frente e reverso, sendo também avaliada a possível presença de setores, e com os dados obtidos foi desenvolvida uma escala qualitativa de notas (TABELA 5).

Tabela 5 - Escala de notas referentes à coloração de colônias, em meio de cultura batata-dextrose-ágar, de isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de frutos de banana.

| Escala | Coloração das Colônias | |
|--------|--|--|
| | Frente da placa de Petri | Reverso da placa de Petri |
| 1 | Branca | Branca |
| 2 | Branca acinzentada com pontuações escuras | Branca acinzentada com pontuações escuras |
| 3 | Branca acinzentada com pontuações salmão e escuras | Branca acinzentada com pontuações salmão e escuras |
| 4 | Branca a salmão, com pontuações escuras | Branca a salmão, com pontuações escuras |
| 5 | Branca com pontuações escuras | Branca com pontuações escuras |
| 6 | Salmão com pontuações salmão | Salmão com pontuações salmão |
| 7 | Salmão com pontuações salmão e escuras | Salmão com pontuações salmão e escuras |
| 8 | Branca com pontuações salmão e escuras | Branca com pontuações salmão e escuras |
| 9 | Branca a salmão com pontuações salmão e escuras | Branca a salmão com pontuações salmão e escuras |
| 10 | Branca a salmão com pontuações salmão | Branca a salmão com pontuações salmão e escuras |
| 11 | Branca a salmão com pontuações salmão | Branca a salmão com pontuações salmão |
| 12 | Branca a salmão | Branca a salmão |
| 13 | Cinza | Cinza escuro |

Fonte: do autor (2018).

2.4 Teste de patogenicidade

Para o teste de patogenicidade, frutos sadios de banana cv. Nanica foram previamente lavados em água corrente, desinfestados com hipoclorito de sódio a 2% por três minutos, esta cultivar foi escolhida por ser considerada mais suscetível a doença. Foram utilizados 65 isolados cultivados em BDA por sete dias.

Para a inoculação foram realizados furos nos frutos com multiagulhas de dois mm de profundidade, aonde foi adicionado 20 µL de suspensão de conídios na concentração ajustada para 2×10^6 conídios/mL para todos os tratamentos, com exceção do tratamento controle em que foi adicionado 20 µL de água destilada esterilizada sobre os furos realizados nos frutos. Após inoculação os frutos foram envolvidos com sacos plásticos e colocados em temperatura e umidade relativa média de 25 ± 2 °C e $90 \pm 5\%$, respectivamente, por 48 horas, e após este período os sacos plásticos foram removidos e os frutos permaneceram sobre a bancada até o desenvolvimento das lesões.

As avaliações de severidade foram realizadas a partir do terceiro dia de inoculação, medindo-se diariamente o diâmetro de crescimento das lesões na casca dos frutos utilizando um paquímetro até atingirem a marcação de uma área de 15 cm^2 realizada previamente. Com os dados diários de severidade foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), utilizando a regra do ponto médio ou método de integração trapezoidal (CAMPBELL; MADDEN, 1990).

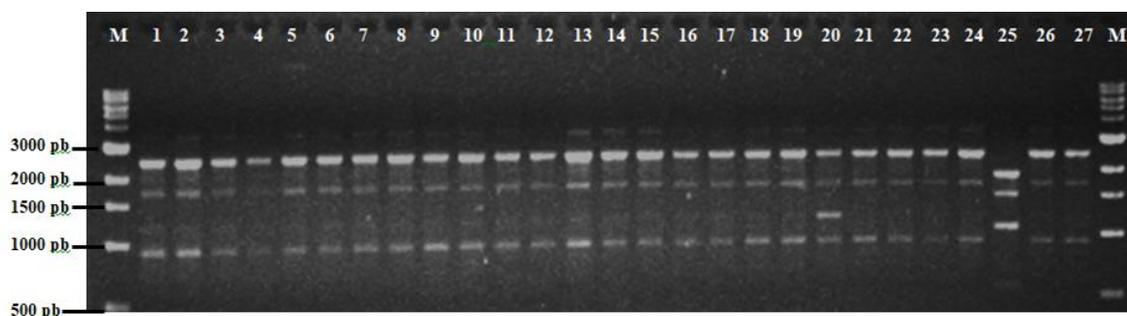
O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com duas repetições para cada tratamento e a parcela experimental foi representada por um fruto. Realizou-se o teste de comparação de médias Scott-Knott utilizando-se o software Sisvar, versão 5.6 (FERREIRA, 2017).

3 RESULTADOS

3.1 Análise dos marcadores ISSR

Observou-se polimorfismo entre os isolados por meio da análise molecular utilizando *primers* ISSR. A partir da matriz de distância foi verificada a presença de um total de 124 bandas polimórficas, assim como permitiu à obtenção de um dendrograma. Com os *primers* ISSR utilizados foram gerados diferentes fragmentos, com tamanho de bandas variando de 500 a 3000 pares de base (pb) aproximadamente (FIGURA 1).

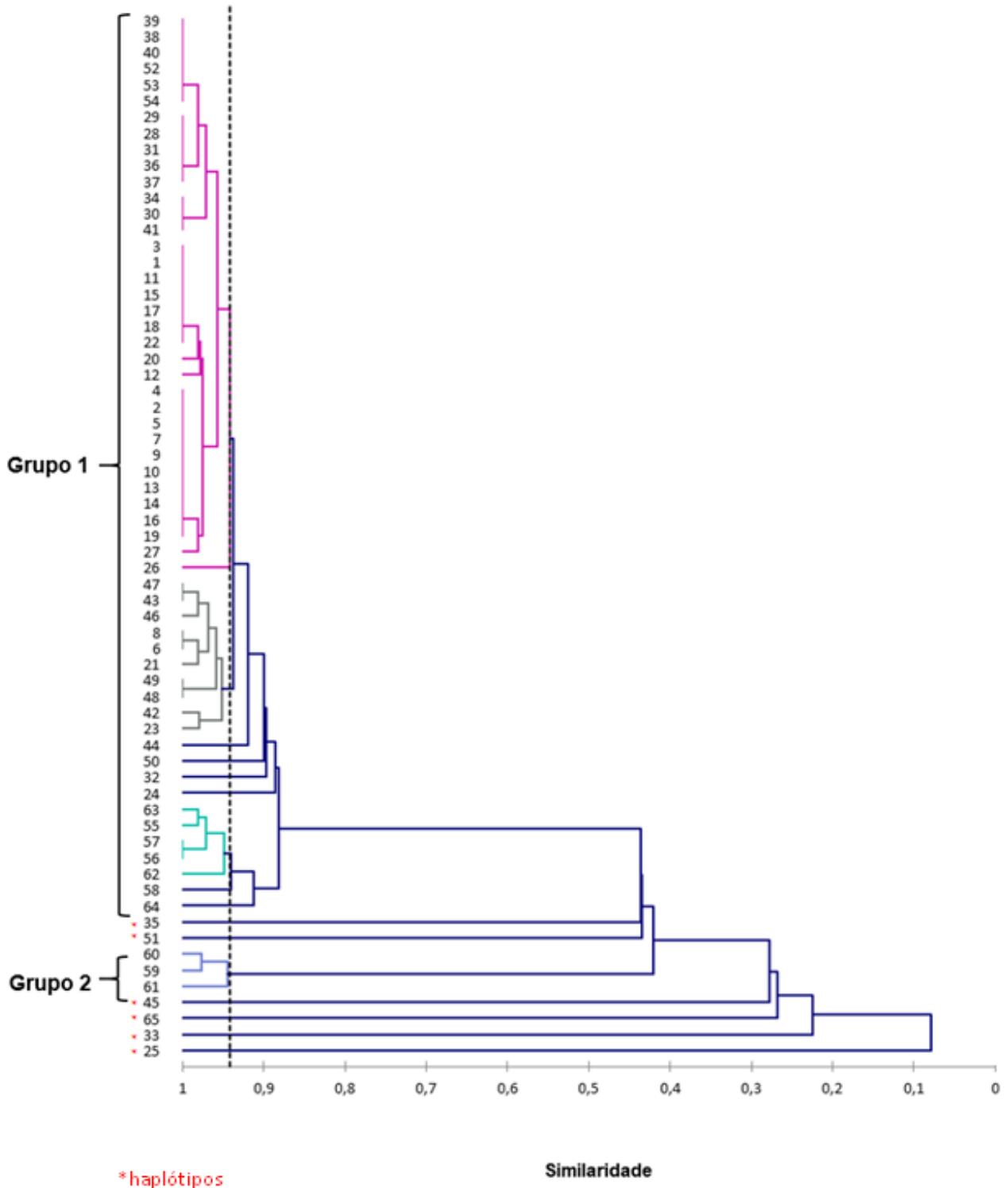
Figura 1 - PCR com o primer ISSR (P10) referente aos isolados 1 a 27 em gel de agarose.



Legenda: M: Marcador de peso molecular 1kb, isolados de 1 a 27.

A análise do padrão de bandas geradas por cada um dos 12 *primers* em conjunto, possibilitou a obtenção de uma matriz binária e, subsequentemente, de uma matriz de distância, utilizada nas análises posteriores. A partir da matriz de similaridade obteve-se o dendrograma (FIGURA 2), pelo método UPGMA. O alto valor obtido da correlação cofenética (r) 0,997 mostra uma alta associação entre as similaridades obtidas pelo coeficiente de Jaccard e o dendrograma. Valores de similaridade variaram de 100% a 5,3%. Sendo que a similaridade genética média observada neste estudo foi de 0,9411.

Figura 2 - Dendrograma representativo da similaridade genética.

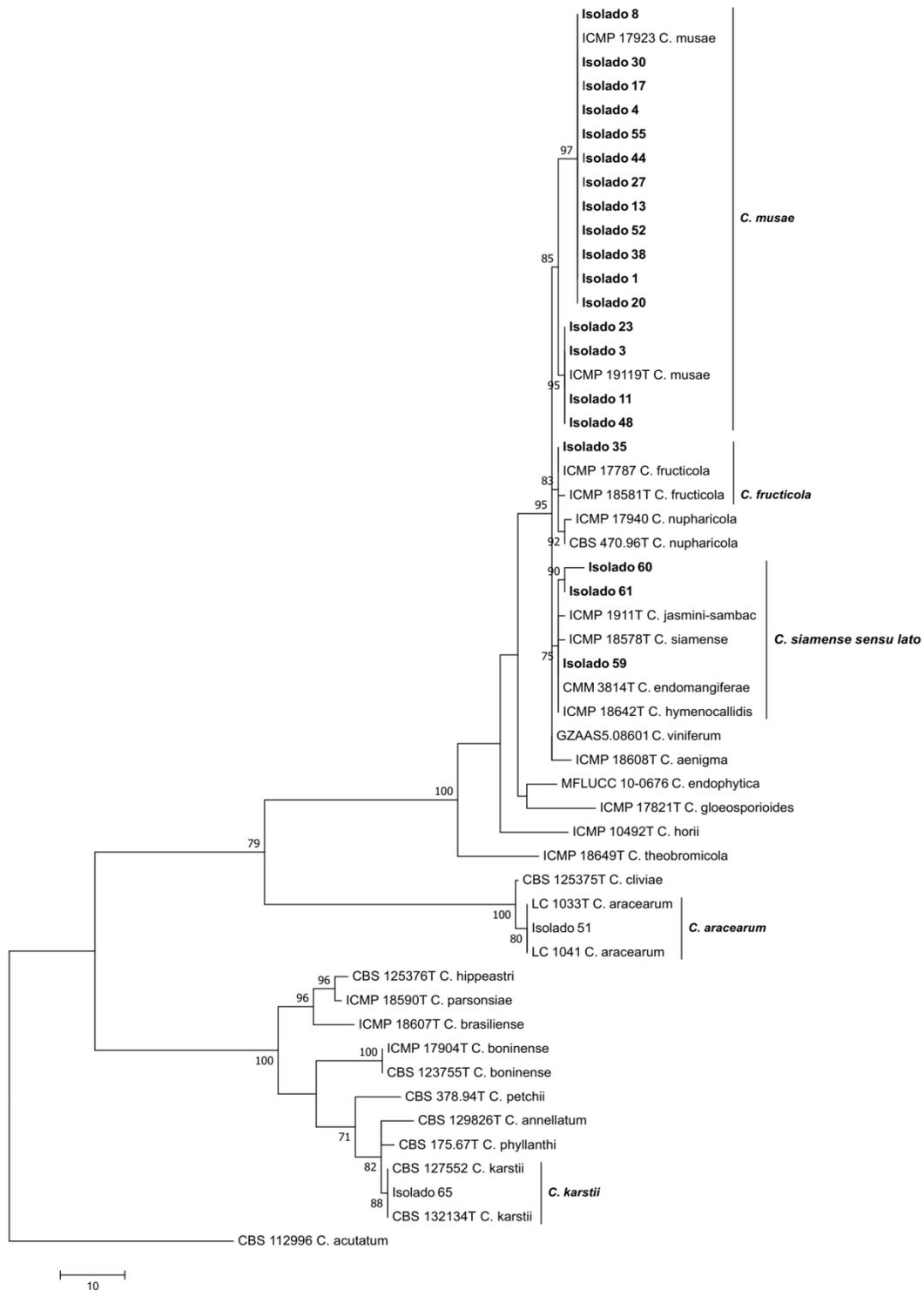


Legenda: Dendrograma representativo da similaridade genética entre os 65 isolados de *Colletotrichum* associados a antracnose do fruto de banana, obtido pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), utilizando o complemento aritmético do índice de Jaccard como medida de similaridade, com base em marcadores ISSR. Fonte: do autor (2018).

No dendrograma obtido, pôde-se observar a formação de dois grupos e seis diferentes haplótipos. O grupo um foi formado por 56 isolados, seguido pelo grupo dois com três isolados.

3.2 Análise filogenética

O alinhamento com sequências parciais do gene GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) apresentou 260 caracteres, sendo 80 conservados, 180 variáveis e destes 141 informativos. A análise filogenética pelo método de MP revelou que os 22 isolados agruparam em dois diferentes complexos, “gloeosporioides” e “boninense” e a ocorrência de pelo menos quatro espécies filogenéticas de *Colletotrichum* associadas à antracnose do fruto de banana. Os resultados mostram a distribuição destes isolados em maior número no complexo de espécie *C. gloeosporioides*. Destes, a maioria agrupou com isolados representantes de *C. musae*. Um isolado (isolado 35) agrupou com o tipo de *C. fructicola*, tendo como espécie irmã *C. nupharicola*. Três isolados (59, 60 e 61) agruparam no clado de *C. siamense* sensu lato e não foram resolvidos a partir deste gene na análise filogenética. Um isolado (isolado 65) agrupou com representantes de *C. karstii* pertencente ao complexo de espécie *C. boninense* e um isolado (isolado 51) agrupou com representantes de *C. aracearum*, espécie irmã de *C. cliviae* (FIGURA 3). Todos os isolados foram agrupados em clados apoiados com altos valores de *bootstrap* (mínimo de 75%).

Figura 3 - Árvore filogenética de MP para espécies de *Colletotrichum*.

Legenda: Árvore filogenética de MP para espécies de *Colletotrichum*, baseada em sequências de GAPDH. *C. acutatum* utilizado como outgroup. Os valores de *bootstrap*, 1.000 repetições, são indicados em porcentagem acima e abaixo dos internódios. Abreviações: CBS - Centraalbureau voor Schimmel cultures, Utrecht, The Netherlands; ICMP-International Collection of Microorganisms from Plants, Landcare Research, Auckland, New Zealand; CMM-Culture Collection of Phytopathogenic Fung “Prof. Maria Menezes”, Recife, Brazil; MFLUCC- Mae Fah Luang University Culture Collection, Thailand. Fonte: do autor (2018).

3.3 Caracterização cultural

Na Tabela 6 encontram-se os dados relativos ao índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) em meio BDA, coloração de colônia e patogenicidade dos isolados.

Houve diferença estatística ($P < 0,05$) para o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos isolados durante os cinco dias de avaliação. Todos os isolados apresentaram crescimento médio superior a $0,70 \text{ cm dia}^{-1}$. O maior IVCM ($2,84 \text{ cm dia}^{-1}$) foi observado para o isolado 24, enquanto o menor valor de crescimento ($0,70 \text{ cm dia}^{-1}$) foi verificado no isolado 56. Foi observada grande variação no crescimento micelial dos isolados de *Colletotrichum* spp. Supõe-se que o IVCM pode estar relacionado com o desenvolvimento da doença em campo, em que o maior IVCM implica uma maior virulência do patógeno. Entretanto, para confirmar essa correlação, avaliações da severidade da doença e velocidade de desenvolvimento de lesões nos frutos são necessárias.

Foi possível separar os 65 isolados em 13 grupos quanto à coloração da colônia, foram avaliadas tanto a frente quanto o reverso das placas e com as informações obtidas foi criada uma escala de notas conforme a coloração. Ocorreu variação entre as colônias, sendo que nas placas avaliadas a coloração da frente e do reverso na maioria das vezes foi igual. Cerca de 22% das colônias apresentaram a coloração branca/acinzentadas, com topografia aérea rala e abundante presença de massas de conídios de cor laranja, correspondendo ao grupo de número dois da tabela de coloração. As colônias desenvolveram micélios em setores regulares, que acompanharam o crescimento radial normal da colônia. Seis colônias apresentaram setores miceliais, porém não foi observada relação entre a origem ou a variedade de banana da qual os isolados foram obtidos. Foi observada a formação de apenas um setor por colônia.

Tabela 6 - Classificação de isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de frutos de banana quanto a espécie, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), coloração das colônias (CC), ausência ou presença de setores (S) e a patogenicidade (P) de isolado.

| Isolado | Espécie | IVCM | CC | S | P |
|---------|-----------------|--------|----|---|---|
| 1 | <i>C. musae</i> | 2,51 e | 9 | - | + |
| 2 | <i>C. musae</i> | 2,66 e | 7 | - | + |
| 3 | <i>C. musae</i> | 2,02 d | 3 | - | + |
| 4 | <i>C. musae</i> | 2,67 e | 6 | - | + |
| 5 | <i>C. musae</i> | 2,23 d | 2 | - | + |

| | | | | | |
|----|----------------------------|--------|----|---|---|
| 6 | <i>C. musae</i> | 2,63 e | 2 | - | + |
| 7 | <i>C. musae</i> | 1,83 c | 4 | - | + |
| 8 | <i>C. musae</i> | 2,69 e | 2 | + | + |
| 9 | <i>C. musae</i> | 2,63 e | 9 | - | + |
| 10 | <i>C. musae</i> | 1,19 b | 11 | - | + |
| 11 | <i>C. musae</i> | 2,61 e | 2 | - | + |
| 12 | <i>C. musae</i> | 2,70 e | 8 | - | + |
| 13 | <i>C. musae</i> | 2,14 d | 2 | - | + |
| 14 | <i>C. musae</i> | 1,93 c | 10 | - | + |
| 15 | <i>C. musae</i> | 1,80 c | 3 | - | + |
| 16 | <i>C. musae</i> | 2,54 e | 2 | - | + |
| 17 | <i>C. musae</i> | 2,32 d | 12 | - | + |
| 18 | <i>C. musae</i> | 2,44 e | 3 | - | + |
| 19 | <i>C. musae</i> | 2,03 d | 3 | - | + |
| 20 | <i>C. musae</i> | 2,02 d | 3 | - | + |
| 21 | <i>C. musae</i> | 2,51 e | 3 | - | + |
| 22 | <i>C. musae</i> | 1,20 b | 3 | - | + |
| 23 | <i>C. musae</i> | 2,13 d | 5 | - | + |
| 24 | <i>C. musae</i> | 2,84 e | 7 | + | + |
| 25 | <i>Colletotrichum spp.</i> | 2,31 d | 13 | - | + |
| 26 | <i>C. musae</i> | 2,25 d | 12 | - | + |
| 27 | <i>C. musae</i> | 2,77 e | 3 | - | + |
| 28 | <i>C. musae</i> | 2,48 e | 9 | - | + |
| 29 | <i>C. musae</i> | 0,90 a | 6 | - | + |
| 30 | <i>C. musae</i> | 1,88 c | 2 | - | + |
| 31 | <i>C. musae</i> | 1,89 c | 8 | - | + |
| 32 | <i>C. musae</i> | 1,96 d | 1 | - | + |
| 33 | <i>Colletotrichum spp.</i> | 1,11 b | 13 | - | + |
| 34 | <i>C. musae</i> | 1,54 c | 6 | - | + |
| 35 | <i>C. fructicola</i> | 1,72 c | 9 | - | + |
| 36 | <i>C. musae</i> | 2,15 d | 2 | + | + |
| 37 | <i>C. musae</i> | 2,70 e | 9 | - | + |
| 38 | <i>C. musae</i> | 2,81 e | 8 | - | + |
| 39 | <i>C. musae</i> | 2,68 e | 3 | - | + |

| | | | | | |
|----|-------------------------------|--------|----|---|---|
| 40 | <i>C. musae</i> | 1,13 b | 8 | - | + |
| 41 | <i>C. musae</i> | 1,35 b | 5 | - | + |
| 42 | <i>C. musae</i> | 2,82 e | 5 | - | + |
| 43 | <i>C. musae</i> | 2,47 e | 2 | - | + |
| 44 | <i>C. musae</i> | 0,95 a | 9 | - | + |
| 45 | <i>Colletotrichum spp.</i> | 1,04 b | 9 | - | + |
| 46 | <i>C. musae</i> | 1,65 c | 4 | - | + |
| 47 | <i>C. musae</i> | 1,88 c | 3 | - | + |
| 48 | <i>C. musae</i> | 2,66 e | 5 | - | + |
| 49 | <i>C. musae</i> | 2,81 e | 1 | - | + |
| 50 | <i>C. musae</i> | 2,23 d | 11 | - | + |
| 51 | <i>C. aracearum</i> | 2,40 e | 11 | - | + |
| 52 | <i>C. musae</i> | 1,09 b | 2 | - | + |
| 53 | <i>C. musae</i> | 1,62 c | 4 | - | + |
| 54 | <i>C. musae</i> | 1,35 b | 11 | + | + |
| 55 | <i>C. musae</i> | 1,64 c | 12 | - | + |
| 56 | <i>C. musae</i> | 0,70 a | 2 | + | + |
| 57 | <i>C. musae</i> | 2,56 e | 3 | + | + |
| 58 | <i>C. musae</i> | 2,82 e | 7 | - | + |
| 59 | <i>C. siamense sensu lato</i> | 2,04 d | 1 | - | + |
| 60 | <i>C. siamense sensu lato</i> | 2,08 d | 2 | - | + |
| 61 | <i>C. siamense sensu lato</i> | 2,23 d | 2 | - | + |
| 62 | <i>C. musae</i> | 1,23 b | 2 | - | + |
| 63 | <i>C. musae</i> | 1,22 b | 10 | - | + |
| 64 | <i>C. musae</i> | 1,68 c | 9 | - | + |
| 65 | <i>C. karstii</i> | 1,82 c | 13 | - | + |

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Fonte: do autor (2018).

3.4 Teste de Patogenicidade

Todos os 65 isolados inoculados foram patogênicos em frutos de banana. As bananas inoculadas apresentaram sintomas típicos de antracnose após sete dias de incubação. Esses sintomas apresentaram-se inicialmente como pequenas lesões de coloração marrom-escura, que com o passar do tempo tornaram-se lesões necróticas deprimidas (FIGURA 4).

Posteriormente, sobre as lesões eram notadas a presença de acérvulos que são pequenas pontuações com massas de conídios de cor salmão.

O parâmetro epidemiológico AACPD apresentou diferenças significativas para o teste F, ($P < 0,05$) o que indica a existência de variabilidade da virulência entre os isolados, ou seja quanto menor a AACPD menos virulento foi o isolado, permitindo subdividi-los em seis grupos de virulência (TABELA 7). Os isolados considerados mais virulentos pertencem ao grupo seis, sendo eles: 39, 6, 21, 64, 24, 38, 9, 53, 51, 45 e 22. Os isolados de *C. musae* apresentaram diferentes níveis de virulência com a AACPD variando de 1,24 (isolado 26) a 56,85 (isolado 22). Os isolados de *C. siamense sensu lato* também apresentaram diferentes níveis de virulência com AACPD de 2,47 (isolado 60), 26,69 (isolado 61) e 28,35 (isolado 59). O isolado 51 de *C. aracearum* apresentou AACPD 52,82, o isolado 35 de *C. fructicola* apresentou 34,94 e o isolado 65 de *C. karstii* apresentou 28,30.

Figura 4 - Fotografia de sintomas típicos de antracnose em banana 'Nanica' inoculada com *Colletotrichum* spp. e o controle inoculado apenas com água destilada.



Fonte do autor (2018).

Não houve relação entre o nível de virulência e a procedência dos isolados, uma vez que isolados procedentes de diferentes locais foram igualmente virulentos.

Tabela 7 - Agrupamento de isolados de *Colletotrichum* spp. de acordo com a Virulência em frutos de banana cv. Nanica e Prata comparada pelos valores de AACPD.

| Isolado | AACPD | Grupo de Virulência |
|----------------|--------------|----------------------------|
| 26 | 1,24 a | 1 |
| 5 | 1,34 a | 1 |
| 36 | 1,39 a | 1 |
| 25 | 1,41 a | 1 |
| 41 | 1,45 a | 1 |
| 19 | 1,45 a | 1 |
| 56 | 1,54 a | 1 |
| 8 | 2,11 a | 1 |
| 60 | 2,47 a | 1 |
| 46 | 11,04 a | 1 |
| 15 | 15,67 b | 2 |
| 11 | 20,73 b | 2 |
| 33 | 22,58 b | 2 |
| 34 | 22,84 b | 2 |
| 43 | 23,09 b | 2 |
| 30 | 25,97 c | 3 |
| 61 | 26,69 c | 3 |
| 17 | 26,71 c | 3 |
| 65 | 28,30 c | 3 |
| 59 | 28,35 c | 3 |
| 52 | 29,59 c | 3 |
| 62 | 30,52 c | 3 |
| 20 | 30,65 c | 3 |
| 63 | 31,18 c | 3 |
| 32 | 31,37 c | 3 |
| 16 | 32,68 d | 4 |
| 49 | 33,72 d | 4 |
| 10 | 33,88 d | 4 |
| 29 | 34,15 d | 4 |
| 44 | 34,61 d | 4 |
| 7 | 34,76 d | 4 |
| 40 | 34,87 d | 4 |

| | | |
|-----------|---------|---|
| 35 | 34,94 d | 4 |
| 31 | 35,93 d | 4 |
| 3 | 36,40 d | 4 |
| 27 | 36,49 d | 4 |
| 47 | 38,06 d | 4 |
| 1 | 38,30 d | 4 |
| 42 | 38,47 d | 4 |
| 4 | 38,77 d | 4 |
| 54 | 39,15 d | 4 |
| 58 | 40,59 e | 5 |
| 2 | 40,73 e | 5 |
| 13 | 40,82 e | 5 |
| 14 | 40,87 e | 5 |
| 28 | 41,13 e | 5 |
| 23 | 42,76 e | 5 |
| 37 | 43,06 e | 5 |
| 12 | 43,27 e | 5 |
| 18 | 44,01 e | 5 |
| 55 | 44,78 e | 5 |
| 50 | 45,46 e | 5 |
| 57 | 45,59 e | 5 |
| 48 | 46,17 e | 5 |
| 39 | 47,41 f | 6 |
| 6 | 47,62 f | 6 |
| 21 | 48,47 f | 6 |
| 64 | 48,78 f | 6 |
| 24 | 49,06 f | 6 |
| 38 | 49,07 f | 6 |
| 9 | 49,74 f | 6 |
| 53 | 50,82 f | 6 |
| 51 | 52,82 f | 6 |
| 45 | 56,06 f | 6 |
| 22 | 56,85 f | 6 |

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Fonte: do autor (2018).

4 DISCUSSÃO

Nas análises utilizando os marcadores ISSR, o grupo 1 corresponde a espécie *C. musae*. Com base neste resultado pode-se observar alta variabilidade genética dentro desta espécie. Quanto maior a diversidade genética de uma população, maior o potencial evolutivo e, portanto, maior a probabilidade de se adaptar às mudanças nas condições ambientais (MCDONALD; LINDE, 2002). Ou seja, quanto maior a diversidade, maior a chance de haver um indivíduo adaptado a determinada condição restritiva que cubra a população. Conseqüentemente, tal informação é relevante porque pode auxiliar na implementação de medidas mais eficientes de controle da doença.

Este estudo foi baseado em uma ampla coleção de isolados obtidos de frutos de banana com sintomas de antracnose e revelou que o agente etiológico desta doença é representado por cinco diferentes espécies já descritas de *Colletotrichum*: *C. musae*, *C. fructicola*, *C. siamense sensu lato*, *C. aracearum* e *C. karstii*. Além de mais três haplótipos de *Colletotrichum* spp. determinados pelo polimorfismo de ISSR. Os agrupamentos evidenciados por ISSR corresponderam às espécies identificadas com base em sequências do gene GAPDH na análise filogenética.

Das espécies identificadas neste estudo, *C. musae* (Berk. & M. A. Curtis) já havia sido relatada a nível mundial em associação com antracnose da banana e *C. fructicola* relatada na Tailândia (SU et al., 2011). Por outro lado este é o primeiro relato das espécies *C. siamense sensu lato*, *C. aracearum* e *C. karstii* associado a antracnose da banana. *C. siamense sensu lato* pertence ao complexo de espécies *C. gloesporioides* e já foi relatada em associação a antracnose da gravioleira na Colômbia e, recentemente relatada em frutos de manga no Brasil (ÁLVAREZ et al., 2014; LIMA et al., 2013). *Colletotrichum aracearum* foi descrita recentemente e estava em associação com *Monstera deliciosa* e *Philodendron selloum* na China (HOU et al., 2016).

Dentre as espécies do complexo *C. boninense*, *C. karstii* ocorre em muitas plantas hospedeiras e é geograficamente diversa. Esta espécie foi relatada em folhas de *Vanda* sp. (YANG et al., 2011), em folhas de *Citrus* (PENG et al., 2012), bem como em várias orquídeas do gênero *Phalaenopsis* nos Estados Unidos (JADRANE et al., 2012). Além disso, foi relatada recentemente em *Mangifera indica* na Austrália (DAMM et al., 2012) e no Brasil (LIMA et al., 2013) e em graviola na Colômbia (ÁLVAREZ et al., 2014).

Os caracteres culturais avaliados na caracterização dos isolados de *Colletotrichum* neste estudo não geraram informações suficientes para a identificação em nível de espécies e

de complexos. Isto retrata a ineficácia de tais caracteres sozinhos na identificação de espécies de *Colletotrichum*.

Os resultados obtidos neste trabalho coincidem com os observados por Couto e Menezes (2004), que observaram a formação de colônias de coloração branca, cinza, cinza escura e rosada em isolados de *C. musae* de seis regiões do Estado de Pernambuco, sendo a coloração frente e reverso idênticas. Da mesma forma, Santos et al. (2015) separaram 30 isolados originários de Pernambuco em três grupos de coloração, sendo branco, creme e salmão e indicaram a presença de micélio aéreo. Resultados semelhantes também foram descritos por Zakaria et al. (2009) e Abd-Elsalam et al. (2010), que observaram, inicialmente, colônias de coloração branca, tornando-se alaranjada com a idade. Essa grande variação na coloração de colônias de *Colletotrichum* encontradas na literatura pode ser explicada pela alta variabilidade genética do gênero e neste trabalho foi observada grande variação de coloração devido à quantidade de isolados obtidos e também devido a diferentes regiões de coleta.

Todos os isolados foram patogênicos induzindo sintomas típicos de antracnose em frutos de bananas. Este resultado demonstra que a capacidade de causar antracnose na banana evoluiu de forma convergente em momentos distintos, uma vez que diferentes espécies causam o mesmo sintoma no mesmo hospedeiro. Isolados de *C. musae* e *C. aracearum* foram mais virulentos, sendo que a maioria dos isolados do grupo de virulência 6 pertencem a essas duas espécies, seguindo *C. fructicola* com integrante do grupo de virulência 4, *C. karstii* e *C. siamense sensu lato* com isolados do grupo de virulência 3.

Os resultados são semelhantes ao observado por Santos et al. (2015) que em trabalho realizado com isolados de *Colletotrichum musae* provenientes de Pernambuco, inoculados em frutos de banana das cultivares Pacovan e Prata com fermento, verificaram que todos os isolados foram patogênicos e que também ocorreu variação na virulência dos isolados utilizados. Em trabalho realizado por Almeida e Coêlho (2007), com isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de maracujá, foi possível separá-los em dois grupos de agressividade e da mesma forma desse estudo, não foi possível correlacionar a virulência com a origem dos isolados. Neste estudo foi encontrado um maior número de grupos de virulência pelo fato de os isolados terem sido obtidos de regiões distantes, diferindo dos trabalhos citados acima que foram isolados de um mesmo Estado.

Os resultados gerados neste trabalho contribuem para o conhecimento sobre a etiologia da antracnose do fruto da banana, que é essencial no desenvolvimento de estratégias de controle contribuindo para minimizar os danos provocados pelo patógeno. Além de

subsidiar futuros projetos relacionados com melhoramento e proteção fitossanitária, contribuindo para o aumento da qualidade dos frutos e o aumento do tempo de prateleira.

5 CONCLUSÃO

Os iniciadores ISSR são eficientes em demonstrar variabilidade genética dos isolados de *Colletotrichum* e discriminar a presença de espécies diferentes.

A antracnose de bananeira é causada por pelo menos cinco espécies diferentes de *Colletotrichum* no Brasil *C. musae*, *C. fructicola*, *C. siamense sensu lato*, *C. aracearum* e *C. karstii*.

A maioria dos isolados estudados neste trabalho são identificados como *C. musae* e pertencem ao complexo de espécie *C. gloeoporioides*.

Os isolados apresentam diferentes níveis de virulência.

Caracteres culturais não foram informativos para distinção de espécies de *Colletotrichum* e complexos em frutos de banana.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELSALAM, K. A. et al. First morphogenetic identification of the fungal pathogen *Colletotrichum musae* (*Phyllachoraceae*) from imported bananas in Saudi Arabia. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.9, p. 2335-2342, 2010.
- AFANADOR-KAFURI, L. et al. Characterization of *Colletotrichum* isolates from Tamarillo, Passiflora, and Mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology**, Colômbia, v.9, n.5, p. 579-874, 2003.
- ALMEIDA, L. C.; COÊLHO, R. S. B. Caracterização da Agressividade de Isolados de *Colletotrichum* de Maracujá Amarelo com Marcadores Bioquímico, Fisiológico e Molecular. **Fitopatologia Brasileira**, Brasil, v. 32, n.4, p. 318-328, 2007.
- ÁLVAREZ, E.; GAÑÁN, L.; ROJAS-TRIVIÑO, A.; MEJÍA J. F.; LLANO, G. A.; GONZÁLEZ, A. Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species isolated from soursop in Colombia. **European Journal of Plant Pathology**, v. 139, p. 325-338, 2014.
- CAI, L. et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, n.1, p. 183-204, 2009.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to Plant Disease Epidemiology**. New York: John Wiley & Sons Inc. 1990.
- CARDOSO, R. M. C. B. **Avaliação quantitativa de perdas pós-colheita de banana comercializada na cidade de Santo Antônio de Jesus-BA**. 2005. 120 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, 2005.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. Doenças da banana. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 228, p. 12-16, 2005.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**: volume 2. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 99-117.
- COUTO, E. F.; MENEZES, M. Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 406-412, 2004.
- DAMM, U. et al. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, p. 1-36, 2012
- DEL PONTE, E. M. (Ed.) **Fitopatologia.net - herbário virtual**. Departamento de Fitossanidade. Agronomia, UFRGS. Disponível na Internet: <http://www.ufrgs.br/agronomia/fitossan/herbariovirtual>. Acesso em: 02 mar. 2018.
- FERREIRA, D.F. **Sisvar**. Versão 5.6. Lavras: UFLA/DEX, 2015. Disponível em: Acesso em: Set. de 2017.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, San Paul, v. 82, n. 6, p. 596-605, 1998.

GUPTA, M. et al. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, p. 998-1006, 1994.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Paleontological statistics software: Package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, United States, v. 9, n. 4, 2001.

HEPPERLE, D. SeqAssem[®]. **A sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences**. Win 32-Version. 2004. Disponível em: <http://www.sequentix.de>. Acesso em: 01 jan. 2018.

HOU, L. W. et al. *Colletotrichum aracearum* and *C. camelliae-japonicae*, two holomorphic new species from China and Japan. **Mycosphere**, China, v. 7, n. 8, p. 1111-1123, 2016.

HYDE, K. D. et al. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, n. 1, p. 147-183, 2009.

IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística** (2016). Prod. agric. Rio de Janeiro, v. 37, p.1-91, 2017.

JADRANE, I. et al. First report of flower anthracnose caused by *Colletotrichum karstii* in white *Phalaenopsis orchids* in the United States. **Plant Disease**, San Paul, v. 96, p. 1227, 2012.

KURAMAE-IZIOKA, E. E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Revista Unimar**, v. 19, n. 3, p. 683-689, 1997.

LIMA, N. B. et al. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 61, p.75-88, 2013.

MAIA, V. M. et al. Tipos e intensidade de danos mecânicos em bananas ‘prata-anã’ ao longo da cadeia de comercialização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p.365-370, 2008.

McDONALD, B.A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 349-379, 2002.

MEDEIROS, L. V. et al. *pelB* gene in isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from several hosts. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, p. 661-673, 2010.

NECHET, K. L.; ABREU, M. S. Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v.26 n. 6, p. 1135-1142, 2002.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 1991. 111 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, 1991.

PENG, L. et al. *Colletotrichum* species on Citrus leaves in Guizhou and Yunnan provinces, China. **Cryptogamie Mycologie**, v.33, p. 267–283, 2012.

PESSOA, W.R.L.S. et al. Efeito da temperatura e período de molhamento sobre o desenvolvimento de lesões de *Colletotrichum musae* em banana. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.2, p. 147-151, 2007.

RAMPERSAD, S. N. Genetic structure of *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* isolates infecting papaya inferred by multilocus ISSR markers. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 103, p. 182-189, 2013.

RANGEL, A.; PENTEADO, L. A. C.; TONET, R. M. **A cultura da banana**. 2. Ed. Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, 2002. 91 p. (CATI. Boletim Técnico, 234).

RATANACHERDCHAI, K; ISSR for comparison of cross- inoculation potential of *Colletotrichum capsici* causing chili anthracnose. **Microbiology Research**, v. 4, n. 1, p. 76–83, 2010.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, Kluwer Academic Publishers Printed in the Netherlands, v.128 p. 9-17, 2002.

SANTOS, P. C. M. et al. Diversidade Genotípica e Patogênica de *Colletotrichum musae* no Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 2, p. 355-366, 2015.

SCHNEIDER, H. **Métodos de análise filogenética: Um guia prático**. Ed. Holos, Belém, 200 p. 2007.

SILVA, C. S. et al. Avaliação econômica das perdas de banana no mercado varejista: um estudo de caso. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 229-234, 2003.

SILVA, J. R., CORDEIRO, Z. J. M.. Fitossanidade na exportação de banana. In: CORDEIRO, Z. J. M. (Ed.), **Banana: Fitossanidade**. volume: 8 Cruz das Almas-BA, Brasil: Embrapa Mandioca e fruticultura; Brasília –DF, Brasil, 2000. p. 9-14.

SU Y.Y. et al. Epitypification of *Colletotrichum musae*, the causative agent of banana anthracnose. **Mycoscience**, Tokyo, v. 52, p. 376-382, 2011.

TALHINHAS, P. et al. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 6, p. 2987-1998, 2005.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731 – 2739, 2011.

TEIXEIRA, H.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C. Marcadores RAPD na análise da diversidade genética de isolados de *Acremonium strictum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 651-655, 2004.

TEMPLETON, M. D. et al. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. **Gene**, v. 122, p. 225-230, 1992.

TIWARI, J. K. et al. Molecular characterization of potato somatic hybrids by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Potato Journal**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2015.

TOZZE JUNIOR, H. J. **Caracterização e identificação de espécies *Colletotrichum* associadas à antracnose do pimentão (*Capsicum annuum*) no Brasil**. 2007. 81 p. Dissertação de Mestrado. Piracicaba, São Paulo, 2007.

TOZZE JÚNIOR, H. J.; FIRMINO, A. C., MASSOLA JÚNIOR, N. S. **Sensibilidade in vitro de isolados de *Colletotrichum* spp. do pimentão a fungicidas sistêmicos**. In: XXXIV CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 34, 2011, Campinas. Summa Phytopatologica 36 p. (CD).

VENTURA, J. A.; HINZ, R. H. Controle das doenças da bananeira. In: ZAMBOLIM, L. et al. (Ed.). **Controle de doenças de plantas fruteiras**. Viçosa: UFV, 2002. v.1. p. 838-938.

VILA NOVA, M.nX. et al. Pathogenicity for onion and genetic diversity of isolates of the pathogenic fungud *Colletotrichum gloeosporioides* (*Phyllachoraceae*) from the State of Pernambuco, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, p. 311-320. 2011.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 115–180, 2012.

YANG, Y. L. et al. *Colletotrichum* species on *Orchidaceae* in southwest China. **Cryptogamie Mycologie**, v. 32, p. 229–253, 2011.

ZAKARIA, L. et al. Characterisation of *Colletotrichum* species associated with anthracnose of banana. **Tropical Life Sciences Research**, v. 20, p. 119-125, 2009.

CAPÍTULO 3
AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE *in vitro* DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. À
FUNGICIDAS

RESUMO

As doenças pós-colheita estão entre os principais fatores que reduzem a produção da cultura da banana. Dentre elas a antracnose se destaca. Causada pelo fungo *Colletotrichum* spp. essa doença interfere principalmente na qualidade dos frutos reduzindo seu tempo de prateleira. Como medida de controle a utilização de produtos químicos tem sido a mais utilizada e com isso já se tem observado a ineficiência de alguns princípios ativos. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilidade micelial *in vitro* de isolados de *Colletotrichum* spp., submetidos a diferentes doses de fungicidas. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso (DIC) com 5 isolados, 3 fungicidas, 4 doses (0,1; 1,0; 10; 100 mg L⁻¹) e 3 repetições. Discos de micélio de cada fungo foram adicionados no centro das placas com as doses de cada fungicida. O crescimento micelial foi medido após o micélio dos fungos das placas controle atingirem suas bordas. Foi estimada a concentração efetiva dos fungicidas capaz de inibir em 50 % do crescimento micelial (EC50) e classificados em quatro categorias de eficiência, de acordo com a escala de Edgington, Khew e Barron (1971). Quando houve diferença estatística as diferenças foram verificadas pelo teste Scott-Knott (entre fungicidas e isolados) ou regressão (entre as doses). Todos os fungicidas foram eficientes no controle *in vitro*, com destaque para o fungicida microbiológico. Para os isolados testados não foi observado resistência a nenhum dos fungicidas utilizados.

Palavras-chave: Pós-colheita. *Bacillus subtilis*. Controle químico. Antracnose.

ABSTRACT

Post-harvest diseases are among the main factors that reduce the production of banana crops. Among them the anthracnose stands out. Caused by the fungus *Colletotrichum* spp. this disease mainly interferes in the quality of the fruits reducing their shelf life. As a control measure the use of chemical products has been the most used and with this we have already observed the inefficiency of some active principles. Thus, this work had the objective of evaluating the in vitro mycelial sensitivity of *Colletotrichum* spp. Isolates submitted to different doses of fungicides. The experimental design was completely randomized (DIC) with 5 isolates, 3 fungicides, 4 doses (0.1, 1.0, 10, 100 mg L⁻¹) and 3 replicates. Mycelial disks of each fungus were added in the center of the plates with the doses of each fungicide. Mycelial growth was measured after the fungal mycelium of the control plates reached their edges. The effective concentration of fungicides capable of inhibiting 50% of mycelial growth (EC50) and classified in four efficiency categories according to the Edgington, Khew and Barron (1971) scale was estimated. When there was statistical difference the differences were verified by the Scott-Knott test (between fungicides and isolates) or regression (between doses). All fungicides were efficient in the in vitro control, with emphasis on the fungicide microbiological. For the isolates tested, no resistance to any of the fungicides used was observed.

Keywords: Post-harvest. *Bacillus subtilis*. Chemical control, Anthracnose.

1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de doenças na pós-colheita é um dos problemas que reduzem a qualidade e que limitam a exportação das frutas brasileiras, levando a perdas superiores a 50% (TAVARES, 2004; TAVARES; SOUZA, 2005; MEDINA; PEREIRA, 2004), além de diminuir o tempo de prateleira dos frutos (ANTHONY et al., 2004; SILVA et al., 2008; DEL PONTE, 2009; VENTURA; HINZ, 2002).

No caso da banana, várias podridões podem ocorrer nessa fase, porém o maior destaque é dado à antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum* spp., que se manifesta, principalmente na fruta madura (VENTURA; HINZ, 2002). A doença é caracterizada pela formação de lesões deprimidas, escuras, com o eixo maior paralelo ao eixo longitudinal e delimitada por uma margem mais clara. Sob condições de alta umidade, cobrem-se de frutificação rosada, ou acérvulos do agente patogênico. Geralmente, as lesões são superficiais, mas podem, em casos severos, com o amadurecimento da fruta, atingir a polpa (KIMATI et al., 2005).

A importância da antracnose está ligada à frequência com que aparece, principalmente, nas condições de comércio interno em que, poucos cuidados são tomados do ponto de vista de manuseio, ausência de controle químico em campo e de refrigeração. Para o controle do *C. musae*, devem-se considerar aspectos relacionados ao manejo adequado na pré-colheita, colheita e após a colheita (VENTURA; HINZ, 2002).

O controle desta doença pode ser por meio de medidas curativa, biológica, cultural e química, como também por meio de medidas preventivas, tais como a seleção de uma cultivar resistente, uso da redução da temperatura de armazenamento (CIMANGA et al., 2002; PUPO et al., 2003; SILVA et al., 2008). No entanto, a medida de controle mais utilizada são os fungicidas químicos como o imazalil e tiabendazol, os únicos liberados para uso na cultura da banana em pós-colheita (VENTUROSO et al., 2010; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2018).

A utilização incorreta da dose recomendada é um dos fatores que podem acarretar o surgimento de problemas futuros, como: variação na sensibilidade ao produto, surgimento de isolados do patógeno resistentes e, conseqüentemente, baixa eficiência no controle químico (GHINI; KIMATI, 2000; FRAC, 2015). Fungos fitopatogênicos, antes sensíveis a um determinado fungicida, podem apresentar isolados com menor sensibilidade ao produto ou até mesmo tornarem-se resistentes, se a aplicação for realizada de forma não recomendada. Isso pode ocorrer devido à mutação ou outro mecanismo de variabilidade do patógeno

(PARREIRA; NEVES; ZAMBOLIM, 2009). A resistência a fungicida é uma alteração estável e herdável de um patógeno a uma determinada dose de fungicida, resultando numa redução da sensibilidade ao produto (PEREIRA, 2009; REIS; REIS; CARMONA, 2010).

Sabe-se que espécies de *Colletotrichum* demonstram respostas diferentes aos fungicidas (LIYANAGE et al., 1992; JAYASINGHE; FERNANDO 1998, BROWN; SREENIVASAPRASAD; TIMMER, 1996). A avaliação da eficiência de fungicidas deve ser realizada após identificação correta da espécie causadora de antracnose foliar que se tem interesse. No intuito de conhecer melhor o comportamento de isolados de *Colletotrichum* spp. a diferentes grupos químicos, inúmeros trabalhos são realizados em todo o mundo. Tavares e Souza (2005) testando a sensibilidade de isolado de *C. gloeosporioides* a diferentes fungicidas, observaram que o isolado demonstrou maior sensibilidade ao fungicida imazalil e apresentou resistência ao fungicida do grupo dos benzimidazóis o tiabendazol.

Resultados satisfatórios têm sido obtidos no controle de doenças pós-colheita (VALDEBENTO-SANHUEZA, 2001). A relação entre a diversidade de microrganismos e as suas relações antagônicas, surgem como importantes ferramentas para o controle biológico aplicado. Destaca-se como um bom agente de controle biológico o *Bacillus* spp. por formar endósporos e apresentar uma multiplicidade de mecanismos antagônicos. Também a produção de antibióticos é característica de algumas leveduras efetivas no controle *in vitro* e *in vivo* de doenças (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Um dos pontos fundamentais para evitar o surgimento de patógenos resistentes a um determinado produto químico é a tomada de decisão de maneira correta de como será realizado o controle químico (PARREIRA et al., 2009). Fazer rotação de princípios ativos ou evitar o uso de fungicidas com tendência à resistência dos isolados é a principal estratégia a ser utilizada. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilidade micelial *in vitro* de isolados de *Colletotrichum* spp., submetidos a diferentes doses de fungicidas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do teste *in vitro* foram utilizados quatro isolados de *C. musae* (22, 37, 55 e 64) e um isolado de *C. aracearum* (isolado 51), com alta eficiência no teste de patogenicidade, e três fungicidas (TABELA 1).

Tabela 1- Fungicidas utilizados no teste de sensibilidade *in vitro* de isolados de *C. musae* e *C. aracearum*, obtidos de frutos de banana.

| Ingrediente Ativo | Nome Comercial | Grupo Químico | *CIA |
|---|-----------------------|--------------------------|-------------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> linhagem QST 713 | Serenade | Fungicida microbiológico | 13,68 g L ⁻¹ |
| Imazalil | Magnate | Imidazol | 500 g L ⁻¹ |
| Tiabendazol | Tecto | Benzimidazol | 485 g L ⁻¹ |

*Concentração de ingrediente ativo. Fonte: do autor (2018).

Para a determinação da EC₅₀ (concentração efetiva inibitória de 50 % do crescimento micelial) os fungicidas foram diluídos em série a partir de uma solução estoque até a concentração desejada.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso (DIC) com cinco isolados, dois fungicidas químicos e um microbiológico, quatro doses de fungicida (0,1; 1,0; 10; 100 mg L⁻¹) e a testemunha sem fungicida e três repetições. Cada fungicida foi adicionado ao meio BDA a 45°C e distribuído em placas de Petri de nove cm de diâmetro. Em seguida, discos de micélio (seis mm de diâmetro) de cultura pura de sete dias dos isolados foram colocados no centro das placas, que posteriormente foram incubadas em BOD 25°C ± 1°C e fotoperíodo de 12 h. As avaliações constaram da medição do crescimento micelial com a utilização de um paquímetro, por meio da média dos diâmetros perpendiculares entre si (diâmetro médio de colônia). Neste caso a testemunha foi desconsiderada. As avaliações foram realizadas quatro dias após a inoculação, quando as colônias das placas controle, atingiram a borda das placas. Foi estimada a concentração efetiva do fungicida capaz de inibir em 50 % do crescimento micelial (EC₅₀). O EC₅₀ foi calculado com base na porcentagem de inibição de crescimento de cada isolado nas diferentes concentrações dos fungicidas quando comparados ao crescimento nas placas sem fungicidas (testemunha). Posteriormente foi realizada uma regressão linear simples entre a porcentagem de inibição e o log de cada dose para linearização dos valores.

Após o cálculo da EC50, os fungicidas foram classificados em quatro categorias de eficiência, de acordo com a escala de Edgington, Khew e Barron (1971), citada por Tavares (2005), em que: EC50 < 1 mg L⁻¹ alta eficiência (AE); EC50 1 - 10 mg L⁻¹ moderada eficiência (ME); EC50 10 - 50 mg L⁻¹ baixa eficiência (BE) e EC50 > 50 mg L⁻¹ insensibilidade (I).

As análises estatísticas foram processadas com o auxílio do programa SISVAR versão 5.6. (FERREIRA, 2017). Quando houve diferença estatística as foi realizado o agrupamento pelo teste Scott-Knott (entre fungicidas e isolados) ou regressão (entre as doses).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados de *C. musae* e *C. aracearum* utilizados no teste de sensibilidade foram selecionados por apresentarem alta eficiência no teste de patogenicidade. Os fungicidas tiabendazol e imazalil apresentaram EC 50 igual a 1,02 e 2,8 mg L⁻¹ respectivamente, enquanto o fungicida microbiológico *Bacillus subtilis* (Bs) apresentou EC 50 igual a 0 mg L⁻¹. Esse valor 0 mg L⁻¹ encontrado para o Bs ocorreu porque o fungo não cresceu na presença de qualquer uma das doses testadas do fungicida e na testemunha o crescimento do fungo foi vigoroso. Como o cálculo da EC 50 foi realizado comparando com a testemunha, o valor foi inexpressivo. De acordo com a classificação pela escala de Edgington, Khew e Barron (1971) o produto a base de Bs foi considerado de alta eficiência (EC50 < 1 mg L⁻¹) e os demais fungicidas de moderada eficiência (EC50 ≤ 10 mg L⁻¹).

Resultado diferente foi encontrado por Tavares e Souza (2005) onde em trabalho realizado com isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de frutos de mamão observaram que o fungicida tiabendazol, demonstrou baixa eficiência no controle do *C. gloeosporioides*, sendo a EC 50 igual a 33,30. Porém para o fungicida Imazalil (inibidor da síntese de esteróis) o resultado observado pelos autores coincide com os encontrados nesse estudo, que mostra que os isolados testados são sensíveis a esse fungicida. Resultados semelhantes foram registrados com *Colletotrichum gloeosporioides* em Citrus (GOES, 1995) e *Colletotrichum acutatum* em morango (KOSOSKI et al., 2001).

A tolerância de espécies do fungo aos fungicidas pertencentes ao grupo dos benzimidazóis foi observada por Lapeyre de Bellayre e Dubois (1997) e Khan; Akhed; Magan (2001), em isolados de *Colletotrichum musae* oriundos de fruto de banana. Isso provavelmente deve-se ao uso contínuo deste fungicida pelos produtores para o controle do patógeno. Porém, nesse estudo os isolados testados não apresentaram resistência a esse princípio ativo, sendo que sua EC 50 foi considerada moderada, sendo que este fato pode ter ocorrido devido os frutos obtidos neste estudo não terem sido colhidos de áreas onde a pulverização com produtos químicos seja intensa, pois sabe-se que a pressão de seleção ocorre devido ao uso contínuo de mesmo princípio ativo.

Já para o fungicida a base do agente biológico Bs, Stracieri et al. (2015) estudando *Colletotrichum* spp. em isolados de manga consideraram este fungicida como de baixa eficiência diferindo do resultado encontrado nesse trabalho para isolados de *Colletotrichum* de banana, em que o fungicida biológico foi classificado como altamente eficiente *in vitro*.

Os resultados da análise da variância dos dados de crescimento micelial de *Colletotrichum* spp, indicam que existe diferença significativa entre os tratamentos, entre cada fator estudado e a interação dupla e tripla (TABELA 2).

Tabela 2 - Resumo da análise de variância dos dados de crescimento micelial em função dos fungicidas, doses, isolados e suas interações.

| FV | GL | QM |
|----------------------------|-----------|------------|
| Fungicida | 2 | 13567.98** |
| Dose | 3 | 19501.26** |
| Isolado | 4 | 1067.40** |
| Fungicida x Dose | 6 | 3814.04** |
| Fungicida x Isolado | 8 | 118.48** |
| Dose x Isolado | 12 | 407.81** |
| Fungicida x Dose x Isolado | 24 | 122.72** |
| Erro | 164 | 10,33 |
| Média (mm) | 22,51 | |
| CV (%) | 14,28 | |

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. Fonte: do autor (2018).

Todos os isolados testados tiveram o crescimento micelial reduzido na presença dos fungicidas, independente do princípio ativo utilizado. A resposta de sensibilidade variou de acordo com o fungicida testado.

Foram realizados desdobramentos dos valores médios do crescimento micelial (mm) em função dos fungicidas para as combinações entre os isolados dentro de cada dose aplicada (Tabelas 3 a 6).

Na tabela 3 são mostrados os valores médios do diâmetro das colônias para a dose 0,1 mg L⁻¹ e isolados. Quando fixada a dose 0,1 mg L⁻¹, há destaque do fungicida Bs, que proporcionou os menores valores de crescimento micelial independente do isolado, sendo superior no controle quando comparado com os demais. O Bs é um fungicida microbiológico que possui múltiplos modos de ação. Os lipopeptídeos produzidos pelo *Bacillus subtilis* QST713 presentes na formulação atuam na membrana celular das estruturas reprodutivas do fungo, provocando sua deformação e produzindo rupturas. É usado em pulverização preventiva no controle de doenças (STRACIERI, 2015).

Tabela 3 - Diâmetro médio das colônias (mm) de *C. musae* e *C. aracearum* em função dos fungicidas na dosagem de 0,1 mg L⁻¹ para cada isolado.

| Fungicidas | Isolados | | | | |
|--------------------------|----------|---------|---------|--------|---------|
| | 22 | 51 | 64 | 37 | 55 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 12,57 a | 13,66 a | 10,93 a | 9,09 a | 7,12 a |
| Tiabendazol | 42,63 b | 73,30 b | 32,75b | 58,11b | 34,75 b |
| Imidazol | 60,11 c | 82,70c | 57,62c | 62,64c | 36,86 b |

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem a um mesmo grupo pelo teste Scott-Knott a 5%. Fonte: do autor (2018).

Mahadatanapuk et al. (2007) testando a ação de três espécies dos bacilos (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis*) sobre a germinação de *Colletotrichum musae*, nas concentrações de 1x10⁸, 2x10⁸, 3x10⁸ e 4x10⁸ (ufc mL⁻¹) comprovaram que, para as concentrações a partir de 2x10⁸ ufc mL⁻¹, todas as espécies apresentaram um absoluto efeito inibitório (100 %) sobre a germinação de conídios em comparação ao controle (2 %). Provavelmente os demais fungicidas testados necessitam de doses maiores para serem eficientes.

Na Tabela 4 estão os valores médios do diâmetro das colônias quando aplicado a dose de 1 mg L⁻¹. Nota-se que os produtos tiabendazol e Bs foram superiores em todos os isolados testados, exceto para o 22 (neste caso apenas o tiabendazol se destacou).

Tabela 4 - Diâmetro médio das colônias (mm) de *C. musae* e *C. aracearum* em função dos fungicidas na dosagem 1,0 mg L⁻¹ para cada isolado.

| Fungicidas | Isolados | | | | |
|--------------------------|----------|---------|---------|---------|---------|
| | 22 | 51 | 64 | 37 | 55 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 11,16 b | 11,69 a | 6,78 a | 8,78 a | 5,00 a |
| Tiabendazol | 5,00 a | 10,98 a | 7,72 a | 5,00 a | 5,00 a |
| Imidazol | 45,51 c | 63,99 b | 52,03 b | 40,53 b | 44,89 b |

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem a um mesmo grupo pelo teste Scott-Knott a 5%. Fonte: do autor (2018).

Houve uma maior eficiência do Bs quando aplicou-se menor dose, confirmado com dados da Tabela 5, em que aplicando dose de 10 mg L⁻¹ as maiores médias foram para o tiabendazol e imidazol.

Tabela 5 - Diâmetro médio das colônias (mm) de *C. musae* e *C. aracearum* em função dos fungicidas na dosagem de 10,0 mg L⁻¹ para cada isolado.

| Fungicidas | Isolados | | | | |
|--------------------------|----------|---------|--------|---------|--------|
| | 22 | 51 | 64 | 37 | 55 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 5,28 a | 11,53 b | 5,00 a | 7,85 a | 5,00 a |
| Tiabendazol | 5,00 a | 7,33 a | 5,00 a | 5,00 a | 5,00 a |
| Imidazol | 5,00 a | 5,00 a | 5,00 a | 11,80 b | 5,00 a |

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem a um mesmo grupo pelo teste Scott-Knott a 5%. Fonte: do autor (2018).

Na dose de 100 mg L⁻¹ observa-se que todos os fungicidas foram eficientes no controle do crescimento micelial independente do isolado, exceto para o isolado 51 (TABELA 6).

Tabela 6 - Diâmetro médio das colônias (em mm) de *C. musae* e *C. aracearum* em função dos fungicidas na dosagem de 100 mg L⁻¹ para cada isolado.

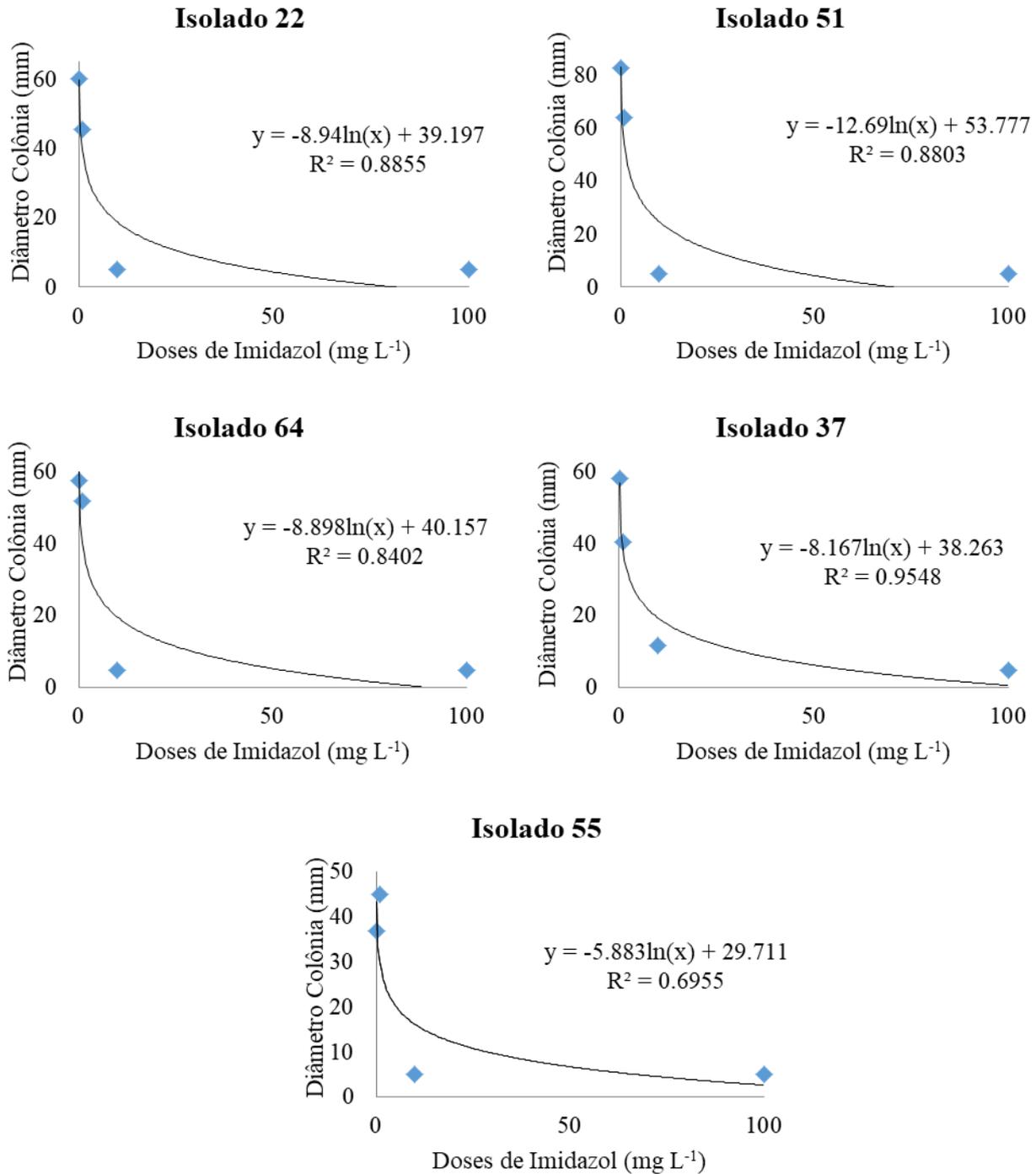
| Fungicidas | Isolados | | | | |
|--------------------------|----------|---------|--------|--------|--------|
| | 22 | 51 | 64 | 37 | 55 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 5,01 a | 5,00 a | 5,00 a | 6,60 a | 5,00 a |
| Tiabendazol | 5,00 a | 8,10 a | 5,00 a | 5,00 a | 5,00 a |
| Imidazol | 5,00 a | 12,16 b | 5,00 a | 5,00 a | 5,00 a |

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem a um mesmo grupo pelo teste Scott-Knott a 5%. Fonte: do autor (2018).

Outros trabalhos mostraram resultados contrários aos verificados. Tavares e Souza (2005) para controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* do mamoeiro, observaram que o fungicida tiabendazol foi ineficiente no controle do patógeno e já imazalil foi altamente eficiente. Da mesma forma resultados semelhantes foram registrados com *Colletotrichum gloeosporioides* em Citrus (GOES, 1995) e *Colletotrichum acutatum* em morango (KOSOSKI et al., 2001), em que os isolados testados foram mais sensíveis ao imazalil.

Na Figura 1 estão os valores médios dos diâmetros das colônias em função das doses de imidazol para os diferentes isolados. Observa-se que quando se aplica o produto ocorre uma queda acentuada até aproximadamente 20 mg L⁻¹. Após este valor ocorre um decréscimo do diâmetro menos acentuado, evidenciando que o controle foi efetivo em menores doses.

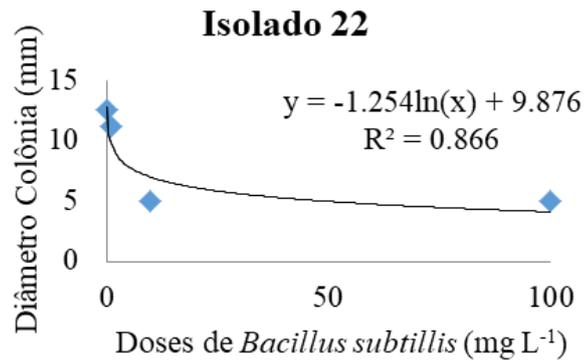
Figura 1 - Diâmetro médio das colônias (mm) de *C. musae* e *C. aracearum* em função das doses do fungicida imidazol.



Legenda: Diâmetro médio das colônias (mm) de *C. musae* e *C. aracearum* em função das doses do fungicida Imidazol aplicadas nos isolado 22, 51, 64, 37 e 55. Fonte: do autor (2018).

No desdobramento das doses de Bs dentro de cada isolado houve efeito significativo ($P < 0,05$) apenas para o isolado 22. Houve tendência similar ao verificado para imidazol, ou seja, queda da variável acentuada até 20 mg L^{-1} (FIGURA 2).

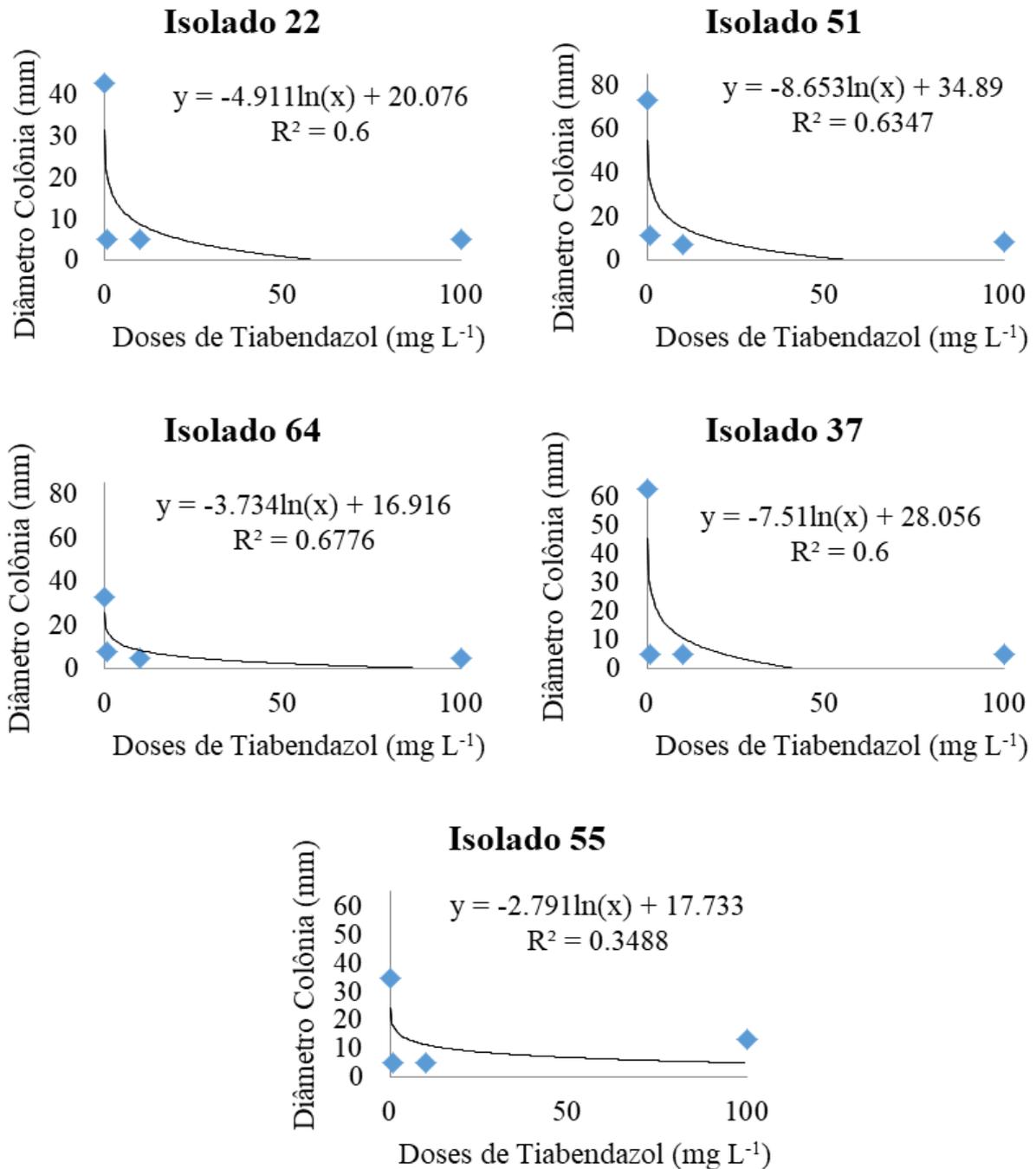
Figura 2 - Diâmetro médio das colônias (mm) de *C. musae* em função das doses do fungicida *Bacillus subtilis*.



Legenda: Diâmetro médio das colônias (mm) de *Colletotrichum musae* em função das doses do fungicida *Bacillus subtilis* aplicadas no isolado 22. Fonte: do autor (2018).

Para o fungicida tiabendazol houve queda no diâmetro das colônias em doses próximas de 5 a 10 mg L^{-1} , independente do isolado (FIGURA 3).

Figura 3 - Diâmetro médio das colônias (mm) de *C. musae* e *C. aracearum* em função das doses do fungicida Tiabendazol aplicadas nos isolado 22,51, 64, 37, 55.



Legenda: Diâmetro médio das colônias (mm) de *C. musae* e *C. aracearum* em função das doses do fungicida tiabendazol aplicadas nos isolado 22, 51, 64, 37 e 55. Fonte: do autor (2018).

Nas Tabelas 7, 8 e 9 estão os valores médios dos diâmetros das colônias em função dos isolados para as diferentes doses dentro dos fungicidas imidazol, Bs e tiabendazol, respectivamente.

Quando aplicado o fungicida imidazol na dose 0,1 mg L⁻¹ (TABELA 7), o isolado 55 foi o mais suscetível a esse fungicida seguido do 37, 64 e 22, e o isolado mais resistente foi o 51. Já para a dose 1,0 mg L⁻¹ o isolado mais suscetível foi o 37 (diâmetro médio 40,53 mm) e o mais resistente foi o 51 (diâmetro médio de 63,99 mm). Doses de 10 mg L⁻¹ foram suficientes para controlar todos os isolados exceto o isolado 37, que só foi controlado de forma eficiente quando se utilizou a dose de 100 mg L⁻¹.

Tabela 7 - Diâmetro médio das colônias (mm) de *C. musae* e *C. aracearum* em função dos isolados quando aplicado o fungicida imidazol em diferentes doses.

| Isolados | Doses (mg L ⁻¹) | | | |
|----------|-----------------------------|---------|---------|---------|
| | 0,1 | 1,0 | 10 | 100 |
| 22 | 60,11 b | 45,51 b | 5,00 a | 5,00 a |
| 51 | 82,70 c | 63,99 d | 5,00 a | 12,16 b |
| 64 | 57,82 b | 52,03 c | 5,00 a | 5,00 a |
| 37 | 58,11 b | 40,53 a | 11,80 b | 5,00 a |
| 55 | 36,86a | 44,89 b | 5,00 a | 5,00 a |

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem a um mesmo grupo pelo teste Scott-Knott a 5%. Fonte: do autor (2018).

Para o fungicida *Bacillus subtilis* aplicado na dose 0,1 mg L⁻¹ (TABELA 8) não houve diferença entre os isolados testados. O isolado 51 se destacou negativamente, pois nas doses 1 e 10 mg L⁻¹ ele apresentou maior diâmetro médio das colônias e só foi controlado na dose de 100 mg L⁻¹.

Tabela 8 - Diâmetro médio das colônias (mm) de *C. musae* e *C. aracearum* em função dos isolados quando aplicado o fungicida *Bacillus subtilis* em diferentes doses.

| Isolados | Doses (mg L ⁻¹) | | | |
|----------|-----------------------------|---------|---------|--------|
| | 0,1 | 1,0 | 10 | 100 |
| 22 | 12,57 a | 11,16 b | 5,28 a | 5,01 a |
| 51 | 13,66 a | 11,69 b | 11,53 b | 5,00 a |
| 64 | 10,93 a | 6,78 a | 5,00 a | 5,00 a |
| 37 | 9,09 a | 8,78 b | 7,85 a | 6,60 a |
| 55 | 7,12 a | 5,00 a | 5,00 a | 5,00 a |

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem a um mesmo grupo pelo teste Scott-Knott a 5%. Fonte: do autor (2018).

Já para o fungicida tiabendazol, quando se aplicou doses acima de 1mg L⁻¹ não ocorreu diferença do diâmetro médio das colônias em função dos isolados (TABELA 9). Os isolados 64 e 37 apresentaram menores médias para a dose 0,1 mg L⁻¹.

Tabela 9 - Diâmetro médio das colônias (mm) de *C. musae* e *C. aracearum* em função dos isolados quando aplicado o fungicida tiabendazol em diferentes doses.

| Isolados | Doses (mg L ⁻¹) | | | |
|----------|-----------------------------|---------|--------|--------|
| | 0,1 | 1,0 | 10 | 100 |
| 22 | 42,69 b | 5,00 a | 5,00 a | 5,00 a |
| 51 | 73,30 d | 10,93 a | 7,33 a | 8,10 a |
| 64 | 32,75 a | 7,77 a | 5,00 a | 5,00 a |
| 37 | 62,64 c | 5,00 a | 5,00 a | 5,00 a |
| 55 | 34,75 a | 5,00 a | 5,00 a | 5,00 a |

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem a um mesmo grupo pelo teste Scott-Knott a 5%. Fonte: do autor (2018).

No Brasil, Kupper e Gimenes-Fernandes (2002) estudaram a potencialidade antagonística de 64 isolados de *B. subtilis* a *C. acutatum* *in vitro* e em flores destacadas de lima ácida, ‘Tahiti’. Segundo os autores, todos os isolados produziram metabólitos capazes de inibir o crescimento micelial do fitopatógeno e muitos deles deram 100% de controle da doença em flores destacadas de lima ácida “Tahiti”.

4 CONCLUSÃO

Dentre os fungicidas testados o fungicida microbiológico foi considerado de alta eficiência e o imidazol e o tiabendazol foram considerados de eficiência moderada.

Todos os fungicidas testados foram eficientes para o controle *in vitro* de *C. musae* e *C. aracearum*.

Em doses menores o fungicida a base do agente biológico *Bacillus subtilis* foi mais eficiente que os outros fungicidas testados.

Não foi observado resistência a nenhum dos fungicidas utilizados.

REFERÊNCIAS

- ANTHONY, S. et al. Fungal pathogens associated with banana fruit in Sri Lanka, and their treatment with essential oils. **Mycopathologia**, v.157, p. 91-7, 2004.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 341 p, 2009.
- BROWN, A. E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, L.W. Molecular characterization of slow growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p. 523-527, 1996.
- CIMANGA, K. et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of some aromatic plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, p. 382-387, 2002.
- DEL PONTE, E.M. (Ed.) **Fitopatologia.net - herbário virtual**. Departamento de Fitossanidade. Agronomia, UFRGS. Disponível na Internet: <http://www.ufrgs.br/agronomia/fitossan/herbariovirtual>. Acesso em: 02 mar 2018.
- EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazoles compounds, **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, p. 42-44, 1971.
- FERREIRA, D.F. **Sisvar. Versão 5.6**. Lavras: UFLA/DEX, 2015. Disponível em: Acesso em: Set. de 2017.
- FRAC - Fungicide resistance action committee. 2015. Disponível em: <http://www.frac.info/home>. Acesso em: 10 de Jan. de 2018.
- GHINI, R. e KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. 1ª edição. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p.78, 2000.
- GOES, A. **Queda prematura de Citrus: caracterização do agente causal, *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ [Senso ARX, 1957, e controle da doença]**. 1995. 16 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Piracicaba, 1995.
- JAYASINGHE, C. K., FERNANDO, T. H. P. S. Growth at different temperatures and on fungicide amended media: Two characteristics to distinguish *Colletotrichum* species pathogenic to rubber. **Mycopathologia**, v. 143, p. 93-95, 1998.
- KHAN, S. H.; AKHED, J.; MAGAN, N. Control of the anthracnose pathogen of banana (*Colletotrichum musae*) using antioxidants alone and in combination with thiabendazole or imazalil. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 50, p. 601 - 608, 2001.
- KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, 663 p.

KOSOSKI, R. M. et al. Efeito de fungicidas em *Colletotrichum acutatum* em morango e controle da antracnose em morangueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 662-666, 2001.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N. Isolamento e seleção de *Bacillus* spp. para o controle de *Colletotrichum acutatum* em flores destacadas de lima ácida 'Tahiti'. **Summa Phytopathologica**, v. 28, p. 292-295, 2002.

LAPEYRE DE BELAIRE, L. de; DUBOIS, C. Distribution of thiabendazole- resistance *Colletotrichum musae* isolates from Guadalupe banana plantations. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 12, p. 1378-1383, 1997.

LIYANAGE, H. D.; MCMILLAN R. T.; KISTLER H. C. Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82 p.1371-1376, 1992.

MAHADTANAPUK, S. et al. Mutation of *Bacillus* licheniform is using low-energy ion beam bombardment. **Surface Coatings Technology**, v. 201, p. 8028-8033, 2007.

MEDINA, M. M.; PEREIRA, M. E. C. Pós-Colheita. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. **O cultivo da bananeira**. 2004. p. 209-231.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. **Consulta de Praga/Doença**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins, 2011. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 16 abr. 2018.

PARREIRA, D. F.; NEVES, W. S. e ZAMBOLIM, L. Resistência de fungos a fungicidas inibidores de quinona. **Revista Tropica: Ciências Agrárias e Biológicas**. Maranhão. v.3, n. 2, p. 24-34, 2009.

PEREIRA, A. V. S. **Sensibilidade a fungicidas e adaptabilidade de *Lasiodiplodia theobromae* patogênico ao mamão**. 2009. 57 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, UFRPE. 2009.

PUPPO, M. S. et al. Antifungal activity of monoterpenes against the plant pathogens *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium subglutinans* f.sp. ananas. **Applied and Environmental Microbiology**. 2003.

REIS, E. M.; REIS, A. C. e CARMONA, M. A. **Manual de fungicidas – Guia para o Controle Químico de Doenças de plantas**. 6 ed. Passo Fundo: Editora UPF, p. 226, 2010.

SILVA, M. B. et al. Tratamento térmico e prochloraz no controle da antracnose em pós-colheita de frutos de banana "Prata-Anã". **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 4, p. 364-5, 2008.

STRACIERI, J. **Caracterização morfo-cultural e molecular de *Colletotrichum* spp. associados a antracnose em manga, mamão e goiaba.** 2015. 109 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal)– Universidade Estadual Paulista – UNESP Jaboticabal, Jaboticabal, 2015.

TAVARES, G. M. **Controle químico e hidrotérmico da antracnose em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) na pós-colheita.** 2004. 55p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

TAVARES, G. M.; SOUZA, P. E. Efeito de fungicidas no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 52-59, 2005.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; CATTANIO, M.E. Controle biológico de *Penicillium expansum* em pós colheita de maçãs ‘Fuji’. **Fitopatologia Brasileira**, Jaboticabal, v.26, p.445. 2001.

VENTURA, J.A.; HINZ, R.H. Controle das doenças da bananeira. In: ZAMBOLIM, L. et al. (Ed.). **Controle de doenças de plantas fruteiras.** Viçosa: UFV, 2002. v.1. p.838-938.