



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS

GESSICA JACIRA TRINDADE DE SOUZA

**ESPÉCIES DE *COLLETOTRICHUM* ASSOCIADAS À
CULTURA DA BANANEIRA NO ESTADO DE ALAGOAS**

Rio Largo – AL

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS

GESSICA JACIRA TRINDADE DE SOUZA

**ESPÉCIES DE *COLLETOTRICHUM* ASSOCIADAS À
CULTURA DA BANANEIRA NO ESTADO DE ALAGOAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Proteção de Plantas.

Orientador: Prof. Dra. Iraildes Pereira Assunção

Coorientador: Mariote Dos Santos Brito Netto

Rio Largo – AL

2023

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Campus de Engenharias e Ciências Agrárias
Bibliotecário Responsável: Erisson Rodrigues de Santana - CRB4 - 1512

S729e Souza, Gessica Jacira Trindade de.

Espécies de *colletotrichum* associadas à cultura da bananeira no estado de Alagoas. /
Gessica Jacira Trindade de Souza. – 2023.

64f.: il.

Orientadora: Iraídes Pereira Assunção.

Co-orientador(a): Mariote dos Santos Brito Netto.

Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Programa de Pós -Graduação
em Proteção de Plantas, Campus de Engenharias e Ciências Agrárias,
Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo, 2023.

Inclui bibliografia

1. Pós-colheita. 2. Antracnose da bananeira. 3. Difenconazol.
I. Título.

CDU: 634.773: 981.35



Folha de Aprovação

GESSICA JACIRA TRINDADE DE SOUZA

ESPÉCIES DE *COLLETOTRICHUM* ASSOCIADAS À CULTURA DA BANANEIRA NO ESTADO DE ALAGOAS

Dissertação submetida à banca examinadora do Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas com Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, e aprovada em 28 de Fevereiro de 2023.

Banca examinadora:



Documento assinado digitalmente
MARIOTE DOS SANTOS BRITO NETTO
Data: 07/03/2023 07:39:19-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Coorientador – Prof. Dr. Mariote dos Santos Brito Netto
(Universidade Federal de Alagoas – Campus CECA)

Mayra Machado de Medeiros Brito

Examinadora Externa - Prof^a. Dr^a. Mayra Machado de Medeiros
(Universidade Federal de Alagoas – Campus CECA)

Gildemberg Amorim Leal Junior

Examinador Interno - Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Junior

*Ao meu filho **Arthur Calebe**, que me ensinou o real sentido do amor e que me motiva todos os dias.*

*Ao meu esposo **Nestor Neto** por partilhar a vida comigo e ser meu maior apoiador... Te amo!*

*A grande mulher que me deu a vida me ensinou a ser tudo que sou. A você minha amada mãe **Lene***

*Ao meu amado pai **José Fernando**, que sempre me incentivou a estudar, e lutar por meus objetivos. Minha eterna gratidão e amor...*

*Aos meus amados irmãos **Fernando Filho e Fernando Gabriel**, aos quais considero como filhos...*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao autor da minha vida, amado e melhor amigo Jesus por me manter firme até ao fim desta jornada acadêmica.

A Universidade Federal de Alagoas (UFAL), a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPQ) pela concessão da bolsa de estudo;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas pelos ensinamentos transmitidos durante o mestrado, em especial a Prof. Dra. Iraildes Pereira Assunção pela orientação;

Ao Prof. Dr. Mariote Dos Santos Brito Netto, por todos os ensinamentos e dedicação como coorientador em quem encontrei um grande amigo, responsável pelo meu amadurecimento científico durante o desenvolvimento do projeto;

Aos Profs. Gildeberg Amorim, Sarah Cavalcanti, Mayra Ferro e Roberto Ramos, pela amizade, convivência e por sempre estarem dispostos em ajudar;

A Lauristela pelo paciente ensino em técnicas laboratoriais e pelas lindas e calmas canções;

Aos estagiários que auxiliaram este projeto, colaborando na manutenção da coleção de isolados e nos experimentos, destacando João Victor Carvalho e Germano Junior;

Aos discentes do programa e todos que fazem parte do laboratório de Fitopatologia e análise molecular pela ótima convivência, em especial ao Tomaz, Kevison e Mayara pelos laços de amizades estabelecidos;

As melhores amigas de turma Iara e Jessica Mariana que partilharam de todos os desafios vivenciados, oferecendo apoio e motivação durante todo o período do curso;

A amiga Isabel Santos por todo o apoio na vida acadêmica e pessoal, que me recebeu de braços abertos em seu lar, integrando-me como parte da sua família e inicialmente me guiando quando tudo me era novo e desconhecido;

A Micaely Calixto por todo apoio emocional, feriados distraídos com muitas risadas e o mais alto grau de amizade que se pode estabelecer entre duas forasteiras;

A Alane Lima pela amizade fraternal e acolhedora;

A Amiga Denise Silva pelos conselhos, apoio e incentivos, a qual me integrou de forma delicada e gentil a sua família, e me proporcionou um local que chamo de “lar” mesmo tão longe dos meus;

A todos os membros da Igreja Adventista Pouso da Garça- Distrito Benedito Bentes, por me acolherem com tão grande amor, em especial ao Clube de Aventureiros Sementinhas de Jesus e a amiga Marcela Brito.

A toda a minha família em especial aos meus amados pais, Fernando e Lene pelo apoio e incondicional amor, por se esforçarem todos os dias de suas vidas para que os meus sonhos sejam realizados, espero um dia poder retribuir, reproduzir e levar a diante tudo oque recebi de vocês, sou grata pelos ensinios e, sobretudo por terem resguardado o meu maior tesouro durante o período em que estive desenvolvendo este projeto;*

Ao meu amado esposo e maior incentivador Nestor Neto, por todo afeto e paciência em vivenciar esse desafio ao meu lado, mesmo com a distância continuou sendo meu alicerce emocional e fonte de segurança.

*Ao meu filho *Arthur Calebe que mesmo criança soube demonstra todo carinho e compreensão, sua existência da o devido sentido a todo o esforço realizado.*

*“Sendo fortalecidos com todo o poder, de acordo com a força da sua glória,
para que tenham toda a perseverança e paciência com alegria.”*

COLOSSENSES 1:11

RESUMO

A bananicultura brasileira movimentou R\$ 9,9 milhões de reais no ano de 2021, é estabelecida, como uma atividade de grande importância social e econômica para o país. A região nordeste representa 40% das áreas produtoras de banana e o Estado de Alagoas é parte atuante nesta produção. No entanto, o rendimento médio da produção de bananas em Alagoas encontra-se duas toneladas abaixo da faixa nacional, dados resultantes de limitações geradas por doenças na pós-colheita das frutas, como a antracnose que é causada por fitopatógenos do gênero *Colletotrichum*, cuja infecção caracteriza-se por pequenas lesões que coalescem e formam grandes áreas necróticas na epiderme da fruta, diminuindo o tempo de vida útil comercial destas ao estimular o amadurecimento precoce das frutas, gerando perdas de até 40% da produção. Portanto, tendo em vista a relevância de investigações a respeito das espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose em frutos de bananeira, este estudo teve por objetivo a detecção, prevalência e inibição do crescimento de isolados de *Colletotrichum* ao difenoconazol no Estado de Alagoas, baseada nas características fisiológicas, morfoculturais, patogênicas e moleculares através de testes específicos em isolados obtidos em 18 municípios alagoanos. Os resultados aqui obtidos indicam que a antracnose da banana no estado de Alagoas está associada à espécie *Colletotrichum musae*, com ocorrência pontual da espécie *Colletotrichum siamense*, sendo o fungicida difenoconazol inibir até 88% do crescimento micelial de *C.musae*.

Palavras-chave: Pós-colheita; Antracnose da bananeira; Difenoconazol.

ABSTRACT

Brazilian banana farming moved R\$ 9.9 million reais in the year 2021, it is established, as an activity of great social and economic importance for the country. The northeast region represents 40% of the banana producing areas and the State of Alagoas is an active part of this production. However, the average yield of banana production in Alagoas is two tons below the national range, data resulting from limitations generated by diseases in the post-harvest of fruits, such as anthracnose, which is caused by phytopathogens of the genus *Colletotrichum*, whose infection it is characterized by small lesions that coalesce and form large necrotic areas in the fruit's epidermis, reducing their commercial shelf life by stimulating the early ripening of the fruit, generating losses of up to 40% of production. Therefore, in view of the relevance of investigations regarding the *Colletotrichum* species associated with anthracnose in banana fruits, this study aimed to detect, prevail and inhibit the growth of *Colletotrichum* isolates to difenoconazole in the State of Alagoas, based on the characteristics physiological, morphocultural, pathogenic and molecular through specific primers in isolates obtained in 18 municipalities in Alagoas. The results obtained here indicate that banana anthracnose in the state of Alagoas is associated with the *Colletotrichum musae* species, with occasional occurrence of the *Colletotrichum siamense* species, with the fungicide difenoconazole inhibiting up to 88% of the mycelial growth of *C. musae*.

Keywords: Postharvest; Banana anthracnose; Difenoconazole.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Percentual regional brasileiro de produção de frutos de bananeira.

Figura 2: Fórmula química estrutural do princípio ativo difenoconazol.

Figura 3: Localização municipal geográfica da origem de frutos de bananas utilizados no estudo.

Figura 4: Frutos recém-lavados (A), fruto em processo de maturação após três dias de recepção (B) e fruto com sintoma e sinal (C).

Figura 5: Pontos de inoculação para frutos feridos (CF) e não feridos (SF), utilizados nos testes de Patogenicidade e Virulencia de isolados de *Colletotrichum musae*.

Figura 6: Teste de patogenicidade com fermento e inoculação de *C.musae* aos três dias de inoculação em Mangifera indica cultivar 'Tommy Atkins'.

Figura 7: Árvore filogenética de Máxima verossimilhança do complexo *Colletotrichum gloeosporioides*, para região APMAT e posição filogenética dos isolados BMS8 e BTA12.

Figura 8: Lesão individual marrom escura, coalescida com a presença de acérvulos de coloração salmon, característicos dos sintomas e sinais de antracnose em frutos de bananeira ocasionadas por *C.musae* ao quarto dia após a inoculação para o teste de virulência.

Figura 9: Frutos inoculados com *Colletotrichum musae*; sem fermento (A) com fermento (B).

Figura 10: Frutos de manga inoculados com *Colletotrichum musae*; sintomas iniciais após 3 dias de inoculação comparados ao controle(A), controle inoculado com ADE (B), lesões características de antracnose ao quinto dia pós inoculação (C) patogenicidade de BMS8 (D) e BM6 (E).

Figura 11: Variação quanto à formação de micélio aéreo, de BM1 (A), BJG4 (B) e BPC3 (C), pertencentes ao grupo morfo cultural 2.

Figura 12: Características morfológicas dos 5 grupos de colônias de *C.musae*, seus conídios e apressórios em Alagoas. Reverso (A) e frente da placa de petri (B), conídios (C) e apressórios (D).

Figura 13: Múltiplos tubos germinativos e apressórios em isolados de *C.musae*.

Figura 14: Isolados de Joaquim Gosmes (1,2,3) e Limoeiro de Anadia (4), em meio BDA e em meio BDA tratado com Difenconazol.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Percentual de inibição do crescimento micelial (PIC) em *C.musae* por difenoconazol

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Primers específicos para amplificação de *C.musae* e primers de amplificação do gene APMAT utilizados no estudo.

Tabela 2: Escala para classificar isolados de *C.musae* em grupos morfoculturais.

Tabela 3: Quantitativo de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos em 18 município alagoanos neste estudo.

Tabela 4: Dimensões morfológicas de conídios e apressórios de *C.musae* de bananas de quinze municípios do Estado de Alagoas.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B.O.D - Incubadora com temperatura controlada e fotoperíodo

BB - Isolados de banana prata do município de Branquinha-Al

BTF- Isolados de banana da terra do município Flexeiras-Al

BI- Isolados de banana prata do município de Ibataguara- Al

BJG- Isolados de banana prata do município de Joaquim Gomes-Al

BLA- Isolados de banana maçã do município de Limoeiro de Anadia-Al

BM- Isolados de banana prata do município de Maceió-Al

BMG- Isolados de banana prata do município de Maragogi-Al

BMI- Isolados de banana prata do município de Murici-Al

BMS- Isolados de banana prata do município de Messias-Al

BMU- Isolados de banana maçã do município de União do Palmares-Al

BUP- Isolados de banana prata do município de União dos Palmares-Al

BP- Isolados de banana prata do município de Palmeira dos Índios-Al

BPC- Isolados de banana prata do município de Porto Calvo-Al

BPI-Isolados de banana prata do município de Piranhas-Al

BQ- Isolados de banana prata do município de Quebrangulo-Al

BRL- Isolados de banana prata do município de Rio Largo-Al

BSM- Isolados de banana prata do município de Santana do Mundaú-Al

BTA-Isolados de banana prata do município de Taquarana-Al

BTD-Isolados de banana prata do município de Tanque D'Arca-Al

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 A cultura da bananeira.....	19
2.2 Doenças fúngicas da bananeira	21
2.3 Antracnose da bananeira.....	22
2.4 Gênero <i>Colletotrichum</i>	23
2.4.1 <i>Colletotrichum musae</i>	24
2.4.2 Análises moleculares na identificação de <i>C.musae</i>	25
2.5 Métodos de controle da antracnose da bananeira	26
2.5.1 Difenconazol	27
2.6 Resistência de fungos a fungicidas.....	29
REFERÊNCIAS	30
3 DETECÇÃO, MORFOLOGIA E SENSIBILIDADE IN VITRO A DIFENOCONAZOL DE <i>COLLETOTRICHUM MUSAE</i> NO ESTADO DE ALAGOAS.....	35
RESUMO	35
ABSTRACT	36
4 INTRODUÇÃO.....	37
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
5.1 Locais de coleta e desenvolvimento do estudo.....	38
5.2 Obtenção dos isolados	39
5.3 Caracterização molecular	40
5.3.1 Extração de DNA total	40
5.3.2 Amplificação e sequenciamento do DNA	41
5.3.3 Análises filogenéticas	42
5.4 Testes de patogenicidade e virulência	42
5.4.1 Patogenicidade cruzada	43
5.5 Caracterização morfocultural de <i>Colletotrichum musae</i> em Alagoas	44

5.6	Avaliação da sensibilidade de <i>c. musae</i> ao difenoconazol	46
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6.1	Detecção de fitopatógenos associados à antracnose da banana em alagoas.....	46
6.2	Patogenicidade e virulência	50
6.2.1	Patogenicidade cruzada	52
6.3	Caracterizações morfológicas de <i>Colletotrichum musae</i>	54
6.4	Sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>c. musae</i> ao difenoconazol.....	58
8	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO GERAL

Bananeiras (*Musa spp.*) produzem a fruta *in natura* mais consumida no mundo. São plantas herbáceas pertencentes à família Musaceae, com origem no sudeste da Ásia e no Pacífico Ocidental. Atualmente seu cultivo é amplamente difundido em mais de 130 países e, no ranking em escala global, os maiores produtores de bananas são: Índia, Brasil, Filipinas, México e Equador (DIAS, 2011; SILVEIRA, 2018; FAO, 2021).

Como quarto maior produtor mundial de bananas, o Brasil movimenta em média cerca de R\$ 9,9 bilhões de reais ao ano envolvidos nesta atividade. A região brasileira com maior extensão de áreas cultivadas com bananais é o Nordeste, abrangendo 40% da produção nacional da fruta. Dentre os estados produtores que compõe esta região, Alagoas possui área de cultivo equivalente a 9.016 ha, produzindo cerca de 110 t/Cachos ao ano. No entanto, o rendimento médio em produtividade no estado ainda encontra-se 2 t/ha abaixo da faixa nacional de produção (IBGE, 2021).

Em Alagoas, a bananicultura é desenvolvida, principalmente nas regiões dos Tabuleiros Costeiros, no Agreste e no Vale do Mundaú. O atual cenário econômico do Estado estimula o aumento de áreas destinadas ao cultivo de banana, no entanto este crescimento acelerado é acompanhado pelo desenvolvimento de doenças relacionadas à cultura (COELHO, 2019).

Dentre as doenças que acometem a cultura da bananeira, está a antracnose que pode comprometer até 40% da produção, e para a cultura tem como principal agente causal os fungos do gênero *Colletotrichum*. Estes patógenos são responsáveis por infectar bananas verdes ainda em campo e acelerar o amadurecimento do pericarpo das frutas, através de lesões coalescidas que evoluem a grandes áreas necróticas e deprimidas. Em condições favoráveis de alta umidade, os frutos cobrem-se de acérvulos (frutificações) de coloração rosa a salmão, e adquirem uma coloração acinzentada. Estes, portanto, constituem sintomas e sinais que inviabilizam a comercialização destas frutas (CORDEIRO, et. al, 2016).

Investigações a respeito da espécie *Colletotrichum* patogênicos a cultura da banana possui grande relevância para a sociedade alagoana, pois além de causar grandes prejuízos em campo e na pós-colheita, este fitopatógeno é fator limitante para a qualidade da fruta ao prejudicar sua comercialização (SILVEIRA, et. al., 2020).

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi investigar e caracterizar a antracnose da bananeira no estado de Alagoas, por meio do estudo das características

fisiológicas, morfo-culturais, patogênicas e moleculares de espécies de *Colletotrichum* associadas à doença, investigando, também, a influência do fungicida difenoconazol sobre o controle *in vitro* destes fitopatógenos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da bananeira

A bananeira tem origem no sudeste da Ásia e no Pacífico Ocidental, as variedades de frutas de banana que conhecemos hoje são resultantes da domesticação e combinação de mutações das espécies *Musa acuminata* e a *Musa balbisiana*. Por isso, as bananas são identificadas como *Musa* spp. (BORGES, et. al, 2006)). Pertencentes à família Musaceae são consideradas vegetais completos, sendo os frutos o principal órgão de interesse econômico, por deter aspectos nutricionais e organolépticos altamente apreciados pelo mercado consumidor de frutas (SILVEIRA, 2018).

A bananeira é uma planta herbácea de tronco curto e subterrâneo do tipo rizoma, que atua como órgão de reserva. Do centro da copa composta a partir da união das bainhas foliares que constituem um pseudocaule emergem as inflorescências, compostas por brácteas ovaladas de coloração normalmente roxo-avermelhada, em cujas axilas nascem as flores. Cada grupo de flores reunidas forma uma penca (mão) com um número variável de frutos (dedos), originados por partenocarpia. Os frutos inicialmente são verdes e, a partir da maturação de forma gradual, tornam-se amarelos. Posteriormente, começam a escurecer e nesse estágio diz-se que a planta morreu. Entretanto, durante o desenvolvimento há formação de rebentos (filhos), que surgem na base da planta, possibilitando a constante renovação e a vida permanente dos bananais (DIAS, 2011).

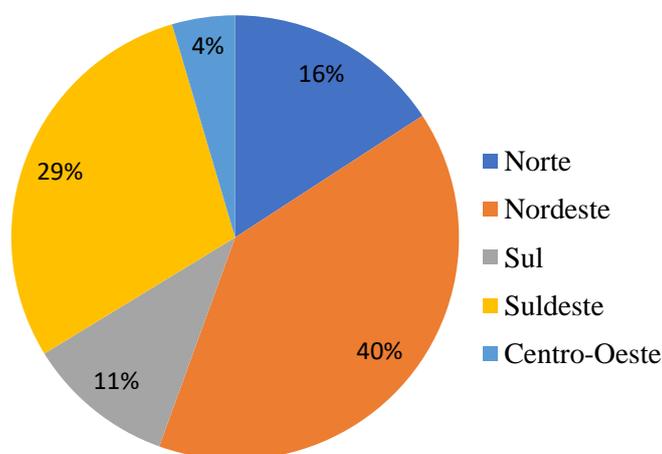
Nestas frutas ocorre um alto teor de minerais, como o potássio, fósforo e açúcares (carboidratos, além de conter pouco sódio), nos quais se pode encontrar aproximadamente 25% da recomendação diária de vitamina C, além de concentrações consideráveis de vitaminas A e B (tamina, riboflavina e niacina; LIMA, et. al. 2000).

No ranking mundial em produção de frutos, a banana ocupa a segunda posição (10 kg/hab./ano), sendo considerada a fruta *in natura* mais consumida do mundo. As projeções da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) são de que a produção mundial de bananas deve crescer 1,5% ao ano, atingindo 135 milhões de toneladas no ano de 2028. Atualmente, os principais países produtores são a Índia, com 30,8 milhões de toneladas, China com 11,2 milhões, Indonésia com 7,2 milhões e Brasil com 6,7 milhões de toneladas (FAO, 2021).

O Brasil como quarto maior produtor mundial da fruta, com área de cultivo de aproximadamente 453,2 hectares dispostos em todas as regiões do país, apresenta um rendimento de 15,02 t/ha de cachos em produtividade. A bananicultura brasileira movimentou no ano de 2021, cerca de R\$ 9,9 milhões de reais (IBGE, 2021).

O maior produtor Brasileiro de bananas é o estado da Bahia (65 t/cacho por ha), seguido por São Paulo (48 t/cacho por ha), Minas Gerais (47 t/cacho por ha), Pernambuco (43 t/cacho por ha) e Pará (39 t/cacho por ha). No entanto, a maior área de cultivo de banana no território brasileiro é representada pela união dos estados da região Nordeste, que abrangem 40% da produção nacional de bananas (Figura 1). Dentre estes estados nordestinos produtores de banana, Alagoascolhe cerca de 9 t/cacho por hectare ao ano, e possui uma área de cultivo equivalente a 9.016 ha destinada a colheita, produzindo cerca de 112,4 t/cachos ao ano. Apresenta um rendimento médio de 12,4 kg/ha, com 2 t/ha abaixo da faixa nacional em produtividade (IBGE, 2021).

Figura 1: Percentual regional brasileiro de produção de frutos de bananeira.



Fonte: IBGE, Censo agropecuário, 2021.

No ano de 2021, a bananicultura alagoana movimentou aproximadamente 220 mil reais, sendo seu maior produtor o município de Colônia Leopoldina (COELHO, 2019; LIMA et, al. 2013). Em Alagoas, a bananicultura é desenvolvida, principalmente, nas regiões dos Tabuleiros Costeiros, no Agreste e no Vale do Mundaú. Assim como nas demais regiões brasileiras as variedades de banana difundidas no estado são: ‘Prata’, ‘Pacovan’, ‘Prata-Anã’, ‘Maçã’, ‘Mysore’, ‘Terra’, ‘D’Angola’ do grupo genômico AAB, e ‘Nanica’, ‘Nanicão’ e ‘Grande Naine’ pertencente ao grupo AAA (IBGE, 2021).

A Secretaria de Agricultura do estado de alagoas (SEAGRI-AL) a mais de dez anos coordena o rol de parceiros institucionais na iniciativa de estruturação de uma “Rota da Fruticultura” que busca o fortalecimento da cadeia produtiva de frutas no estado. No entanto, este plano de desenvolvimento da fruticultura na região possui gargalos, principalmente na região do semiárido, onde a comercialização de bananas é prejudicada por podridões da coroa, e de frutos que diminuem o tempo de vida na pós-colheita das frutas (DONATO et al., 2009). Estas podridões são favorecidas por mudanças físicas e bioquímicas dos frutos, danos mecânicos que ocorrem desde a colheita até a embalagem e tem por causa principal a ocorrência de doenças fúngicas recorrentes no período de pré e pós-colheita (COELHO,2019; SILVEIRA,2018).

Estas doenças são responsáveis por 40% de perdas durante os fluxos de comercialização da banana, não comprometem a qualidade da polpa, mas diminuem a vida útil de prateleira das frutas, pois ocasionam manchas e podridões as cascas (pericarpo), ocasionando a rejeição pelo consumidor, fato que promove a baixa de preço e consecutivamente gera o aumento de perdas (AGUIAR, 2019).

2.2 Doenças fúngicas da bananeira

No cultivo de banana podem ocorrer algumas doenças fúngicas consideradas limitantes, como a sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*), sigatoka amarela (*Mycosphaerella musicola*) e mal-do-panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*). Contudo, outras doenças incidentes na cultura afetam diretamente os frutos, sendo classificadas como doenças de pré e pós-colheita (AGUIAR, 2019).

As doenças de pré-colheita de maior interesse econômico são: a lesão-de-johnston, (*Pyricularia* sp.); a mancha-losango (*Cercospora hayi* L. e *Fusarium* spp.) além de possíveis outros agentes; a pinta-de-deightoniella (*Deightoniella torulosa*) e a ponta-de-charuto (*Verticillium theobromae* e *Trachysphaera fructigena*) (SOUZA, 2019).

Dentre as doenças de pós-colheita tem-se a podridão-da-coroa ou podridão-da-almofada, causada pelos fungos *Fusarium roseum* e *Colletotrichum musae*, associada em alguns casos com bactérias oportunistas do gênero *Bacillus* como a espécie *Bacillus velezensis* (JUMPATHONG, et. al, 2022). O fitopatógeno *C. musae* também está associado à antracnose, reconhecida como a mais grave doença de pós-colheita da bananeira (PEREIRA; GASPAROTTO; BENCHIMOL, 2012).

2.3 Antracnose da bananeira

A antracnose da banana ocorre em todos os países produtores de banana do mundo, com registros de incidência na África do Sul, Austrália, Barbados, Brunei, Cuba, Estados Unidos, Haiti, Ilhas Virgens, Índia, Malawi, Papua-Nova Guiné, Porto Rico e Venezuela. No Brasil, acredita-se que, em função das características cosmopolitas de seus agentes causais, a doença possa estar presente em todas as áreas produtoras de banana do país (MAPA, 2022).

Tem como principal agente causal o fungo filamentosso *Colletotrichum musae*, o qual integra o Complexo *Colletotrichum gloeosporioides*. Outras espécies como *Colletotrichum dianesei*, *C. fragarie* e *C. tropicale* são relatadas como agente causal desta doença e também foram relatadas em *Mangifera indica* e *Coffea* spp, cultivos que são realizados em áreas próximas ou em consórcio com bananais no Brasil (VIEIRA, 2016; TALHINHAS e BARONCELLI, 2021; ZARRAQ, 2022).

Sua relevância científica investigativa se dá em função de sua efetiva capacidade em depreciar o valor comercial de frutos de banana. Todas as cultivares de banana de sobremesa são suscetíveis, porém há diferenças quanto ao grau de suscetibilidade estabelecido de acordo com grupo genômico ao qual a cultivar de bananeira pertence (SANTOS, 2011). As cultivares comerciais de banana são híbridos de duas espécies selvagens, a *Musa acuminata* (genoma A) e a *Musa balbisiana* (genoma B), a nomenclatura do genoma estabelece os Grupos Varietais AAA, AA e AAB. Estes agrupam cultivares de características semelhantes, sendo o grupo AAB com as cultivares Maçã, Mysore, Thap Maeo, Prata, Prata Anã, Pacovan e Branca, o mais suscetível à antracnose (PBMH & PIF, 2006).

Além dos frutos, *C. musae* ataca brácteas, flores, pecíolos e folhas do gênero *Musae* spp. sendo este um descrito pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) um patógeno específico (MAPA, 2022). A progressão da infecção estabelecida por este patógeno ocorre principalmente no decorrer do processo de logística das frutas, e afeta geralmente a casca (pericarpo), raramente atingindo a polpa dos frutos, exceto em condições de altas temperaturas ou quando os frutos estão em avançado estágio de maturação (SANTOS, 2011).

Apesar de a manifestação de sintomas ocorrerem durante o período de pós-colheita, a infecção acontece em campo em frutos imaturos, onde conídios dispersos no

ar são depositados sobre o tecido, germinam, formam os opressórios e, consecutivamente, penetram a epiderme permanecendo como infecção quiescente até o início da maturação, período no qual encontra condições favoráveis ao seu desenvolvimento (PINHO, 2010).

Em campo desta doença ocorre principalmente pela dispersão de esporos assexuais não móveis (conídios) dos patógenos, que ocorre a curtas distâncias através de respingos de chuva entre partes de uma mesma planta ou em plantas próximas e a longas distâncias pelo vento ou por meio de transporte realizado por insetos. Sabe-se que a temperatura ótima descrita para o crescimento, esporulação e germinação conidial destas espécies está na faixa entre 27 a 30° C, e a faixa não favorável encontra-se abaixo de 15° C. Sua germinação é favorecida pela ausência de luz em um período entre 6 e 12 horas e umidade relativa superior a 98% (SILVEIRA, 2018; ZAKARIA, 2021; MAPA, 2022).

Fungos do gênero *Colletotrichum* sobrevivem no hospedeiro e, também, em restos culturais, por este fato a antracnose é policíclica, ou seja, podem ocorrer repetidos ciclos de infecções durante o cultivo. No entanto, há um déficit quanto aos estudos epidemiológicos que determinariam as concentrações de inóculo capazes de estabelecer maior severidade (PINHO, 2010; SANTOS, 2011).

Os sintomas caracterizam-se pela formação de pequenas lesões que coalescem formando grandes áreas necróticas escuras, com o eixo maior paralelo ao eixo longitudinal e delimitado por uma margem mais clara. Sob condições de alta umidade, estas lesões podem apresentar uma cobertura de frutificação de coloração que varia entre rosa e salmão, onde os acérvulos adquirem uma coloração acinzentada. Geralmente, as lesões são superficiais, mas podem, em casos severos, com o amadurecimento do fruto, atingir a polpa (CORDEIRO et al., 2016; BARBOSA, 2021).

2.4 Gênero *Colletotrichum*

Único membro da família Glomerellaceae, os fungos pertencentes ao gênero *Colletotrichum* (teleomorfo *Glomerella*) são importantes fitopatógenos de plantas cultivadas, que vem passando por recentes mudanças taxonômicas. Podem ser classificados como endófitos, saprófitos ou entomopatógenos. Possuem esporos assexuais (conídios) hialinos, curvos ou fusiformes, produzidos por um acérvulo setoso. As células a partir das quais se desenvolvem os conídios (células

conidiogênicas) também podem ser formadas em ramificações laterais do micélio (JAYAWARDENA, et al 2021).

Os acérvulos (corpos frutescentes) alojam-se na epiderme do hospedeiro onde podem variar muito de forma (crosta, lentilha ou pústula) e tamanho (1 mm a 40mm) em uma mesma espécie. Sua produção é controlada por fatores ambientais, portanto a presença ou ausência destas não é utilizada como um caráter de valor taxonômico para separação de taxa (MENEZES, 2002; PEREIRA, 2016).

Inicialmente von Arx (1957) classificou 11 taxas agrupados neste gênero, de acordo com aspectos relacionados à morfologia dos indivíduos. No entanto, estudos posteriores demonstraram que fatores ambientais exercem influências sobre características morfológicas em fungos e, portanto, as classificações até o presente momento continham erros. A primeira visão abrangente deste gênero com 66 nomes de uso comum e 19 nomes duvidosos, somente foi apresentada a comunidade científica no ano de 2009, destacando a necessidade de revisar as classificações usando métodos moleculares (JAYAWARDENA et al, 2021).

Portanto, nos últimos dez anos o número de espécies pertencentes a este gênero sofre alterações à medida que investigações sobre distribuição geográfica, características morfológicas do estado sexual e cultural, da patogenicidade e filogenia aprofundam-se. Atualmente as 280 espécies descritas estão agrupadas em 16 complexos, dentre os quais se encontra o “Complexo *Colletotrichum gloeosporioides*” (LIU, et. al, 2022). Este complexo abrange 54 espécies que foram associados a 283 espécies de plantas pertencentes a 212 gêneros (TALHINHAS e BARONCELLI, 2021).

Grande parte destas espécies é considerada polífaga e algumas demonstram forte especialização em relação ao hospedeiro, como ocorre com a espécie *C. musae* na cultura da bananeira. Porém, tal especialização não permite a classificação de espécies, uma vez que estudos moleculares associados aos métodos baseados em critérios fenotípicos demonstram que novas espécies de *Colletotrichum* também são descritas como patogênicas em banana como *C. tropicale*, *C. dianesei*, *C. fragariae* e *C. chrysophilum* (VIEIRA, 2016; ZAKARIA, 2021).

2.4.1 *Colletotrichum musae*

C. musae é descrita na literatura como causadora da antracnose da bananeira no mundo todo. No entanto, além da antracnose, também pode causar as podridões da

ponta do caule, da coroa e da ponta da flor em bananeiras. Sendo sua atuação prevalentemente descrita para espécies e diferentes órgãos vegetais em indivíduos do gênero *Musa* spp. VIEIRA et al. (2018) sugeriram que esta espécie pode ser específica do hospedeiro para a planta. No entanto, um estudo detalhado em escala global é necessário para confirmar esta hipótese.

Taxonomicamente classificada com base em sua fase teleomórfica e descrita na literatura por Petch (1917) como *Glomerella musarum*, esta espécie foi inserida no filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, subclasse Sordariomycetidae, ordem Incertae sedis e família Glomerellaceae (INDEX FUNGORUM, 2021).

As colônias possuem micélio aéreo abundante de tonalidade branca e se tornam, posteriormente, acinzentadas. Também apresentam expressiva massa de conídios, geralmente hialinos, retos, cilíndricos, obtusos nos ápices, unicelulares que em média tem cerca de 10,70 - 12,88 µm de comprimento x 11,70 µm de largura. Os apressórios são bastante comuns, médios e de coloração castanho-escuro com forma irregular, por vezes com lóbulos grandes ou profundos que medem cerca de 9-13 µm de comprimento x 9-11,50 µm de largura (PEREIRA, 2016).

Apesar da gama de conhecimentos acumulados a respeito deste patógeno, sua identificação é prejudicada em decorrência de uma grande similaridade fenotípica presente entre *Colletotrichum* spp (espécies crípticas). Sua caracterização fundamentada exclusivamente em critérios morfológicos, culturais, fisiológicos, bioquímicos e de patogenicidade embora útil, torna-se limitada e, por isso, métodos em análises moleculares estão sendo aplicados para possibilitar uma correta identificação e diferenciação concisa (TALHINHAS e BARONCELLI, 2021).

2.4.2 Análises moleculares na identificação de *C.musae*

Os principais métodos moleculares utilizados para identificação da espécie *C. musae* consistem no uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) e de Sequenciamento do genoma, sendo a base para as análises filogenéticas. 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).

A identificação molecular de isolados de *C. musae* através de PCR é facilitada, pois conta com um conjunto de primers destinados a serem específicos para a espécie. O primer Musae_tub_33F (5-GGTACCCCGACATTATG-3) foi projetado para que a

extremidade 3' abranja uma inserção única do locus TUB2 de *C.musae* e é usado em combinação com o Musae_tub_387 (5-CAATGTGGCCAGATAGGGGG- 3). As condições de termociclagem consistem em uma desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos e 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 63°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, seguindo de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. (VIEIRA, 2016)

Com o auxílio de análises moleculares da região ITS e genes GAPDH, TUB2, ACT e APMAT, além das espécies *C. tropicale*, *C. dianesei*, *C. fragariae* e *C. chrysophilum* relatadas em 2016, no Brasil, em associação à antracnose na cultura da banana, Huang et al,(2021) relataram na China duas espécies associadas a doença sendo estas *C.karstii* e *C. siamense*.

2.5 Métodos de controle da antracnose da bananeira

O controle da antracnose se dá por meio de medidas curativas, biológica, cultural e química, além de medidas preventivas através da realização de práticas culturais em campo e no decorrer do beneficiamento e transporte dos frutos. O controle dos níveis do fito hormônio etileno, responsável pelo amadurecimento dos frutos, produzido tanto pelo hospedeiro quanto pelo patógeno também é visto como uma forma de manejar preventivamente a antracnose (VIEIRA, et. al, 2018 ; TALHINHAS e BARONCELLI, 2021).

Após a colheita recomenda-se a lavagem e desinfestação dos frutos, feitas com o uso de detergente líquido neutro e sulfato de alumínio em câmara de nebulização ou tanque de imersão. O controle químico também pode ser utilizado, feito por imersão dos frutos em soluções com fungicidas ou pela atomização de produtos químicos no campo (KIMATI, 2005).

No Brasil, existem cinco produtos químicos para o controle de antracnose para todas a cultivares de bananeiras, sendo apenas três ingredientes ativos registrados: imazalil, tiabendazol e Azoxistrobina (AGROFIT, 2021).

As espécies de *Colletotrichum* demonstram respostas diferentes aos fungicidas, portanto, sua utilização deve ser realizada somente após identificação correta da espécie causadora da antracnose. Assim, no intuito de conhecer melhor o comportamento de isolados de *Colletotrichum* spp. à diferentes grupos químicos, inúmeros trabalhos são realizados em todo o mundo, pois o manejo da antracnose é um processo complexo

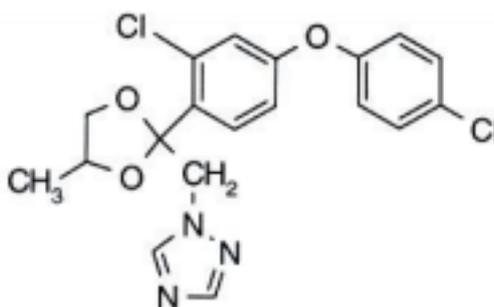
resultante da gama de hospedeiros susceptíveis, e da diversidade de virulência entre diferentes espécies (LIMA et al., 2013).

Compreender a diversidade de patógenos, a interação patógeno-hospedeiro e outras informações associadas com esta espécie, contribui para a tomada de decisões sobre as medidas mais adequadas de controle (TALHINHAS et al., 2015; SILVEIRA,2020).

2.5.1 Difenoconazol (c19h17cl2n3o3)

O difenoconazol ((cis,trans-3-cloro-4-[4-metil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-metil)-1,3-dioxolan-2-il] fenil-4-clorofenil éter) (Figura 2) é um fungicida orgânico pertencente ao grupo químico dos triazóis, formado pela adição de radicais a uma molécula 1,2,4-triazol (SANCHES, 2018). Possui ação sistêmica, de rápida absorção e translocação pelo tecido vegetal que ocorre de forma acropetal. É classificado como extremamente tóxico e amplamente utilizado em diferentes de países por atuar no controle de uma ampla gama de doenças fúngicas que acometem culturas agrícolas (DONG et al., 2013; QUANGLIANG et al., 2014).

Figura 2: Fórmula química estrutural do princípio ativo difenoconazol.



Fonte: ANVISA, 2022

O princípio ativo foi sintetizado para inibir a biossíntese de ergosterol, um importante componente na formação da membrana celular. Com ação protetiva tóxica, seu mecanismo de ação interfere diretamente no crescimento micelial, na formação de tubo germinativo e do apressório, comprometendo o crescimento fúngico, entretanto, esta proteção é parcial, já que o patógeno pode penetrar em tecidos tratados. Já a ação curativa se dá pela inibição do desenvolvimento do haustório e micelial no interior do tecido do hospedeiro (WANG et al., 2008; SALGADO, 2021).

Este processo ocorre através da inibição da desmetilação (DMI) direcionada ao esterol 14 α -desmetilase, enzima que regula a biossíntese do ergosterol, ou seja, ao entrar em contato com este fungicida as células do fungo acumulam esteróis, pois o fungicida ocupa os sítios ativos destinados á ligação da enzima 14 α -desmetilase ao citocromo P-450, catalisador da reação de oxidação de 14 α -metil até 14 α -hidroximetil (DONG et al., 2013; PRICE et al., 2015; HE et al., 2019).

O aumento de compostos intermediários de 14 α -metil até 14 α -hidroximetil promovem uma desorganização da estrutura celular, induzindo a formação de membranas alternativas, a partir da elevação das doses deste fungicida, observa-se dano direto sobre a membrana do fungo assim como alterações morfológicas. Estas alterações se caracterizam por inchamento das células, vacuolização excessiva, septação incompleta, aparecimento de vesículas entre a membrana e a parede celular e a formação de inclusões membranosas (FORCELINI, 1994; TOMLIN, 2002).

Formulado como concentrado emulsionável com aspecto líquido castanho claro a escuro com odor aromático, e nome comercial Score® é indicado para o controle de fungos fitopatogênicos nas seguintes famílias botânicas: Alstroemeriaceae (*Alternaria solani*; *Sphareoteca pannosa*), Amaranthaceae (*Cercospora beticola*), Amaryllidaceae (*A. porri*), Anacardiaceae (*C. gloeosporioides*; *L. theobromae*; *Oidium mangiferae*), Apiaceae (*A. dauci*), Arecaceae (*Bipolaris incurvata*; *L. theobromae*), Asteraceae (*A. helianthi*; *Erysiphe cichoracearum*; *Puccinia horiana*; *Septoria lactucae*; *S. pannosa*), Begoniaceae (*S. pannosa*), Brassicaceae (*A. brassicae*) Cacicaceae (*Asperisporium caricae*), Caryophyllaceae (*A. solani*), Cucurbitaceae (*Didymela bryoniae*; *S. fuginea*), Ericaceae (*Phoma exigua*), Fabaceae (*C. arachidicola*; *C. dematium*; *C. kikuchii*; *E. polygoni*; *Microsphaera difusa*; *Phaeoisariopsis griseola*; *Phomopsis sojae*; *Pseudocercospora personata* *S. glycines*; *Sphaceloma arachidis*; *Uromyces appendiculatus*), Gentiaminiaceae (*Cercospora* sp.; *C. gloeosporioides*; *P. horiana*), Geraniaceae (*P. pelargonii-zonalis*), Lauraceae (*C. gloeosporioides*; *S. perseae*), Malvaceae (*Ramularia areola*), Musaceae (*Mycosphaerella musicola*; *M. fijensis*), Passifloraceae (*C. gloeosporioides*), Plantaginaceae (*Cercospora* sp.), Poaceae (*Bipolaris oryzae*; *C. zae-maydis*; *Exserohilium turcicum*; *Phaeosphaeria maydis*), Rosaceae (*Diplocarpon rosae*; *Entomosporium mespili*; *Monilinia fructicola*; *M. fragariae*; *Podosphaera leucotricha*; *S. pannosa*; *Venturia inaequalis*), Rubiaceae (*C. coffeicola*), Rutaceae (*C. gloeosporioides*; *Elsinoe australis*), Salicaceae (*Melampsora*

medusae), Solanaceae (*A. solani*; *C. capsici*; *P. exigua* var. *exigua*; *S. lycopersici*)
Violaceae (*C. gloeosporioides* *S. pannosa*) (SYMGENA, 2022).

E apesar da recomendação deste princípio ativo para o controle de *Colletotrichum musae* não ser descrita pelo MAPA, estudos *in vitro* apontam que as espécies *C. abscissum*, *C. gloeosporioides* e *C. karstii* são altamente sensíveis ao fungicida difenoconazol, indicando uniformidade na sensibilidade dos isolados com mais de 50% de inibição do crescimento (SALGADO, 2021).

2.6 Resistência de fungos a fungicidas

As resistências a fungicidas tratam-se de uma alteração estável e herdável na sensibilidade de um patógeno a uma determinada dose de fungicida. A baixa eficiência no controle químico é resultante do surgimento de isolados do patógeno resistentes que ocorrem devido à mutação ou outro mecanismo de variabilidade do patógeno, como alterações bioquímicas. Para evitar o desenvolvimento da resistência é necessário o planejamento prévio dos métodos de aplicação para cada princípio ativo, realização de rotação e coerência na utilização da dose recomendada (FRAC, 2015).

Para compreender o desenvolvimento de resistência aos triazóis, é necessário considerar diferenças no espectro de ação entre os fungicidas deste grupo. Há relatos de resistência provenientes destes em várias espécies de fungos, estando algumas relacionadas aos inibidores de desmetilação (DMI) como e o caso do difenoconazol. No entanto, a literatura relata 100% de inibição de crescimento micelial *in vitro* de 52 isolados de *C. gloeosporioides* associados a *Morus nigra* L (amora preta) (GAVIRIA-HERNÁNDEZ, et, al.2013).

O monitoramento de possíveis resistências pode ser realizado por meio de um bioensaio, pois são facilmente adaptáveis e podem ser aplicados a maior parte dos sistemas (SILVEIRA et. al, 2020). Os efeitos sobre a germinação dos esporos são um rápido indicativo para avaliar a sensibilidade ao fungicida, mas podem ser equivocados quando o fungicida não tem efeito sobre a germinação, mas atua em um estágio posterior do desenvolvimento do fungo. Os componentes do meio de cultura assim como outras variáveis são controlados e afetam minimamente a análise (SILVEIRA,et al, 2020).

Estas investigações são importantes para a tomada de decisão no manejo integrado de doenças e seus resultados surtem efeito positivo para a produção de frutas

no Brasil. Por este motivo estudos relacionados a espécies causadoras de antracnose na cultura da bananeira são desenvolvidos a cada ano pela comunidade científica dos países que lideram o ranking de produção deste fruto (ZAKARIA, 2021)

REFERÊNCIAS

- 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 jun. 2021.
- AGUIAR, V. do N., **Influência Da Temperatura e do Período de Molhamento na Expressão Da Podridão da Coroa Causada por *Fusarium*, em Bananas na Pós-Colheita**. Monografia. Universidade Federal do Ceara. Fortaleza -2019
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Agrotóxicos**. Monografias autorizadas. D-36 - Difenconazol. 2022.
- BARBOSA, G. G.; COSTA, F A.; COSTA, A. C. da.; ULHOA, C. J. Avaliação do potencial de isolados de *Trichoderma* spp. nativos do estado de Mato Grosso do Sul contra o fungo *Colletotrichum musae*. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.3, p. 29484-29502 mar 2021.
- BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipelis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 441–3, 1997.
- BORGES, A. L. et al., A cultura da banana / **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**. – 3. ed. rev. e amp. – Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 110 p.: il. – (Coleção Plantar, 56). ISBN 85-7383-378-5
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further Researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, p. 181-84. 1967.
- CASQUETE MENDOZA, J. A. **Eficacia de fungicidas para la pudrición de corona del fruto (*Colletotrichum musae*) de Banano (*Musa AAA*)**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso. BABAHOYO: UTB. 2022.
- CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S. *Colletotrichum current* status and future directions. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.73, p.181-213. 2012.
- CENSO AGROPECUÁRIO 2021: Brasil, **Grandes Regiões e Unidades da Federação**. IBGE, 2021.. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613#resultado>. Acesso em Janeiro de 2023.
- COELHO, S. Parceiros se articulam para fortalecer fruticultura em Alagoas; **EMBRAPA: Notícias**. (2019). Disponível em: [https://www.embrapa.br/busca-de-](https://www.embrapa.br/busca-de)

noticias/-/noticia/42596135/parceiros-se-articulam-para-fortalecer-fruticultura-em-alagoas Acesso em: 12 de jun de 2021.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira. In: Amorim, L. et al., **Manual de Fitopatologia**. Ouro Fino: CERES. p. 109-124. 2016.

COUTO, E.F.; MENEZES, M. Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. **Fitopatologia Brasileira** 29:406-412. 2004

DIAS, J. do S. A. ; BARRETO, M. C. (Ed.). Aspectos agronômicos, fitopatológicos e socioeconômicos da sigatoka-negra na cultura da bananeira no Estado do Amapá. Macapá: Embrapa Amapá, 2011. 95 p. ISBN 978-85-61366-14-8

DONATO, S. L. R.; ARANTES, A. M.; SILVA, S. O.; CORDEIRO, Z. J. M. Comportamento fitotécnico da bananeira 'Prata-Anã' e de seus híbridos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 12, p. 1608-1615, 2009.

DONG, F. et al. Chiral triazole fungicide difenoconazole: Absolute stereochemistry, stereoselective bioactivity, aquatic toxicity, and environmental behavior in vegetables and soil. **Environmental Science & Technology**, v.47, p.3386-3394, 2013.

EDINGTON, L.V.; KHEN, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology, Saint Paul**, v.61, p.42-44, 1971.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Countries by commodity**. Rankings Banana.(2021). Disponível em< [https:// www .fao. org/ faostat/en/ #rankin gs/countr ies_by_commodity](https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity)> Acesso em 23 de janeiro de 2023.

FRAC - **Fungicide resistance action committee**. 2015. Disponível em: <http://www.frac.info/home>. Acesso em: 10 de Jul de 2021.

FORCELINI, C.A. Fungicidas inibidores da síntese de esteróis - triazoles. **RAPP** .1994.

GAVIRIA-HERNÁNDEZ, V.; PATIÑO-HOYOS, L. F.; SALDARRIAGA-CARDONA, A. Evaluación in vitro de fungicidas comerciales para el control de *Colletotrichum* spp., en mora de castilla. **Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v. 14, n. 1, p. 67-75, 2013.

HE, M. et al. Constraining evolution of *Alternaria alternata* resistance to a demethylation inhibitor (DMI) fungicide difenoconazol. **Frontiers in Microbiology**, v.10, p.1-12, 2019.

HUANG, R. et al. Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of banana. **Plant Pathology**, v. 70, n. 8, p. 1827-1837, 2021.

JUMPATHONG, W. et al. Biosurfactant-producing *Bacillus velezensis* PW192 as an anti-fungal biocontrol agent against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum musae*. **Microorganisms**, v. 10, n. 5, p. 1017, 2022.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA (FAO). **FAO no Brasil: Fortes perspectivas de crescimento para produção**. Relatório 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/1193684/>. Acesso em: 06 de Jun 2021.

INDEX FUNGORUM. *Colletotrichum musae* (Berk. & M.A. Curtis) Arx. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=295348>. Acesso em: 19 de jun. 2021.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo agropecuário 2019**. Cidades; Lavoura Permanente, 2021.

JAYAWARDENA, R. S. et al. *Colletotrichum*: lifestyles, biology, morpho-species, species complexes and accepted species. **Mycosphere** 12(1): 519–669 (2021) www.mycosphere.org 2021. Doi 10.5943/mycosphere/12/1/7

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: **Ceres**, 2 v. 663 p. 2005.

LEITE, I.C.H.L. et al. Analysis of *Colletotrichum musae* populations from Brazil reveals the presence of isolates with high competitive ability and reduced sensitivity to postharvest fungicides. **Plant Pathology**, v.69, n.8 p. 1529-1539, 2020.

LIMA, N. B.; BATISTA, M. V. A.; MORAIS JR, M. A.; BARBOSA, M. A. G.; MICHEREFF, S. J.; HYDE, K. D. CÂMARA, M. P. S. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61: p.75–88, 2013.

LIU, F. et al. Updating species diversity of *Colletotrichum*, with a phylogenomic overview. **Studies in Mycology**, v. 101, n. 1, p. 1-56, 2022.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT**. Patógenos de banana; busca por nome científico. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agrofit>. Acesso em 09 de setembro de 2022.

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.

OLIVEIRA, J.A. Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.). **Ciência e Prática**, v.16, n.1, p.42-47, 1992.

PEREIRA, F. D. Caracterização Morfocultural e Molecular de Isolados de *Colletotrichum* Spp. Provenientes de Diferentes Frutas Tropicais. Tese (doutorado) - **Universidade Estadual Paulista**, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, - UNESP Campus de Jaboticabal. P. 23-25, 2016.

PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L.; BENCHIMOL, R. L. Doenças da bananeira. In: GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. R. (ed.). A cultura da bananeira na região Norte do Brasil. 2. ed. Brasília: Embrapa Amazônia Ocidental. **E-book**. p. 547-636. 2012

PBMH & PIF - PROGRAMA BRASILEIRO PARA A MODERNIZAÇÃO DA HORTICULTURA & PRODUÇÃO INTEGRADA DE FRUTAS. **Normas de Classificação de Banana**. São Paulo: CEAGESP, 2006. (Documentos, 29).

PRICE, C.L. et al. Azole fungicides - Understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. **Pest Management Science**, v.71, n.8, p.1054-1058, 2015.

PINHO, D. B.; MIZOBUTSI, E. H.; SILVA, S. de E. O.; REIS, S. T. dos.; MIZOBUTSI, G. P.; XAVIER, A. A.; RIBEIRO, R. C. F.; MAIA, V. M. Avaliação de Genótipos de Bananeira à *Colletotrichum Musae* em Pós-Colheita. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 32, n. 3, p. 786-790. Setembro, 2010

QUANGLIANG, L. et al. Crystal structure of trans-3-chloro-4-[4-methyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-2-yl]phenyl-4-chlorophenyl ether, C₁₉H₁₇Cl₂N₃O₃. Zeitschrift für Kristallographie - **New Crystal Structures**, v.229, n.3, p.233-234, 2014.

SALGADO, G. H. dos S. S. Sensibilidade in vitro de *Colletotrichum* spp. associados a *Citrus sinensis* a fungicidas triazóis (DMI) e suas combinações às estrobilurinas. Dissertação. **Universidade Estadual Paulista** 2021.

SANCHES, A. L. M. Avaliação do efeito ambiental do inseticida Kraft 36EC®(abamectina) e do fungicida Score 250EC®(difenoconazol) por meio de análises ecotoxicológicas em diferentes estágios de vida do *Danio rerio*. Tese (Doutorado). **Universidade de São Paulo**. 2018.

SANTOS, P. C. das M. S. Caracterização de Isolados de *Colletotrichum musae* no Estado de Pernambuco. Dissertação. **Universidade Federal Rural de Pernambuco**. p 20-23, Recife- PB. 2011.

SILVEIRA, L. da.; SOARES, M. G. de O.; GUIMARÃES, S. da S. C.; PEREIRA, F. D.; POZZEBON, B. C.; ALVES, D. Avaliação da sensibilidade in vitro de isolados de *Colletotrichum* spp. há fungicidas Amanda. *Nativa*, Sinop, v. 8, n. 1, p. 01-07, jan./fev. 2020. **Pesquisas Agrárias e Ambientais**. DOI: <http://dx.doi.org/10.31413/nativa.v8i1.7443>.

SILVEIRA, A. L. da. Etiologia e controle da antracnose em frutos de banana no Brasil. **Universidade Federal de Lavras**. Tese. p. 14-17, 2018.

SOUZA, É. I. A. de. Perdas Pós-Colheita em Bananas Produzidas em Rio Preto da Eva. Dissertação. **Universidade Federal do Amazonas**. Amazonas Manaus, p. 19-21, 2019

SUTTON, B.C. The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. **CMI**, Kew, p.696, 1980

SU, Y.Y. et al. Epitypification of *Colletotrichum musae*, the causative agent of banana anthracnose. **Mycoscience**, v.52, p.376-382. 2011. DOI:<https://doi.org/10.1007/S10267-011-0120-9>

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.

TALHINHAS, P.; BARONCELLI, R. *Colletotrichum* species and complexes: Geographic distribution, host range and conservation status. **Fungal Diversity**, v. 110, n. 1, p. 109-198, 2021.

TOMLIN C.D.S. The pesticide manual: a world compendium. 12 ed. Surrey, **United Kingdom: British Crop Protection Council**, CD-ROM. 2002.

VIEIRA, W.A.S. et al. The impact of phenotypic and molecular data on the inference of *Colletotrichum* diversity associated with *Musa*. **Mycologia**, v.109, n.6, p.912-934, 2018.

VIEIRA, W.A.S. et al. Thiophanate-Methyl resistance and fitness components of *Colletotrichum musae* isolates from banana in Brazil. **Plant Disease**, v.101, n.9, p.1659-1665, 2017. DOI:<https://doi.org/10.1094/PDIS-11-16-1594-RE>

VIEIRA, W. A. dos S. Espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da banana no Brasil e sensibilidade de *C. musae* ao tiofanato-metílico. Tese (doutorado). **Universidade Federal Rural de Pernambuco**. 2016.

VON ARX, J.A. Revision der zu *Gloeosporium* gestellten Pilze. Amsterdam: N. V. **Noord Hollandsche Uitgevers Maatschappij**, 157p. 1957.

WANG, Z. et al. Determination and dynamics of difenoconazole residues in Chinese cabbage 2030 and soil. **Chinese Chemical Letters**, v.19, p.969-972, 2008.

WEIR, B.S.; JOHNSTON, P.R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v.73, p.115-180, 2012. DOI: <https://doi.org/10.3114/sim0011>

ZAKARIA, Latiffah. Diversity of *colletotrichum* species associated with anthracnose disease in tropical fruit crops—A review. **Agriculture**, v. 11, n. 4, p. 297, 2021.

ZARRAQ, AL-Faifi et al. *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum musae* Associated with Wilt Disease of *Coffea arabica* in Coffee Gardens in Saudi Arabia. **The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology= Journal Canadien des Maladies Infectieuses et de la Microbiologie Médicale**, v.20, 2022.

3 Detecção, morfologia e sensibilidade in vitro a difenoconazol de *Colletotrichum musae* no estado de alagoas

RESUMO

A banana é a fruta *in natura* mais consumida do mundo, e o Brasil é o quarto maior produtor mundial com 6,7 milhões de toneladas por ano. A região Nordeste representa 40% das áreas brasileiras cultivadas com bananeiras e o Estado de Alagoas é parte atuante nesta produção. No entanto, o rendimento médio da produção de bananas em Alagoas encontra-se duas toneladas abaixo da faixa nacional, e a ocorrência de doenças na pós-colheita como a antracnose da bananeira contribui para diminuição da produção. Esta doença tem como agentes causais os fitopatógenos do gênero *Colletotrichum* responsáveis por acelerar a maturação das frutas deixando-as com características pouco desejáveis ao consumo. Este estudo buscou investigar a distribuição, morfologia e resistência ao fungicida difenoconazol pela espécie *C.musae*, associadas á antracnose em banana no estado de Alagoas. Os isolados obtidos de frutas de bananeira oriundas de 18 municípios do estado foram identificados através de PCR e sequenciamento como pertencentes às espécies *Colletotrichum musae* e *Colletotrichum siamense*. Sendo constatada alta taxa (50%>85%) de inibição no crescimento in vitro de *C.musae* pelo fungicida difenoconazol.

Palavras-chave: Antracnose da bananeira; Biologia molecular; Inibição por fungicida.

3.1 Detection, morphology and in vitro sensitivity to difenoconazole from colletotrichum musae in the state of alagoas

ABSTRACT

Banana is the most consumed fresh fruit in the world, and Brazil is the fourth largest producer in the world with 6.7 million tons per year. The Northeast region represents 40% of the Brazilian areas cultivated with bananas and the State of Alagoas is an active part of this production. However, the average yield of banana production in Alagoas is two tons below the national range, and the occurrence of post-harvest diseases such as banana anthracnose contributes to a decrease in production. This disease has as causal agents the phytopathogens of the genus *Colletotrichum* responsible for accelerating the maturation of fruits, leaving them with characteristics that are not desirable for consumption. This study aimed to investigate the distribution, morphology and resistance to the fungicide difenoconazole by the species *C.musae*, associated with anthracnose in banana in the state of Alagoas. The isolates obtained from banana fruits from 18 municipalities in the state were identified through PCR and sequencing as belonging to the species *Colletotrichum musae* and *Colletotrichum siamense*. A high rate (50%>85%) of in vitro growth inhibition of *C.musae* was observed by the fungicide difenoconazole.

Keywords: Banana anthracnose; Molecular biology; Fungicide inhibition.

4 INTRODUÇÃO

A bananeira (*Musa* spp.) é uma planta herbácea, pertencente à família Musaceae, cuja maioria das espécies é oriunda do continente asiático. Seu fruto é o mais consumido do mundo, fato que contribui para a ampla distribuição mundial de cultivos de *Musa* spp. em mais de 130 países. No ranking de maiores produtores desta fruta, estão a Índia, Brasil, Filipinas, México e Equador (DIAS, 2011; SILVEIRA, 2018; FAO, 2021)

O Brasil apresenta um rendimento médio anual em produtividade de 15,02 t/Cacho por hectare, produção esta que movimenta em média cerca de R\$ 9,9 bilhões de reais ao ano. A região brasileira com maior extensão de áreas cultivadas com bananais é o Nordeste, abrangendo 40% da produção nacional da fruta. Dentre os estados produtores que compõe esta região, Alagoas possui área de cultivo equivalente a 9.016 ha destinados a colheita que produzem cerca de 110 t/Cachos ao ano, porém o rendimento médio em produtividade do estado ainda encontra-se 2 t/ha abaixo da faixa nacional de produção (IBGE, 2021).

Em Alagoas, a bananicultura é desenvolvida, principalmente, nas regiões dos Tabuleiros Costeiros, no Agreste e no Vale do Mundaú. O atual cenário econômico do Estado estimula o aumento de áreas destinadas ao cultivo de banana, no entanto este crescimento acelerado e acompanhado pelo desenvolvimento de doenças relacionadas à cultura (COELHO, 2019).

Entre estas doenças esta a antracnose que pode comprometer até 40% da produção, e tem como principal agente causal o fungo *Colletotrichum musae*, responsável por infectar bananas verdes ainda em campo, e comprometer durante o amadurecimento o pericarpo das frutas através de lesões coalescidas que evoluem a grandes áreas necróticas e deprimidas. Em condições favoráveis de alta umidade, os frutos cobrem-se de frutificações de coloração rosa a salmão, onde os acérvulos fúngicos adquirem uma coloração acinzentada. Estes constituem sintomas e sinais que inviabilizam a comercialização destas frutas (CORDEIRO, et. al, 2016).

Portanto, investigações a respeito da espécie *C. musae* possui grande relevância para a sociedade alagoana, pois além de causar grandes prejuízos em campo e na pós-colheita, este fitopatógeno é fator limitante para a qualidade da fruta ao prejudicar sua comercialização (SILVEIRA, et. al., 2020). Assim, a fim de contribuir para o melhor desempenho da bananicultura no Estado de Alagoas o objetivo do presente estudo foi

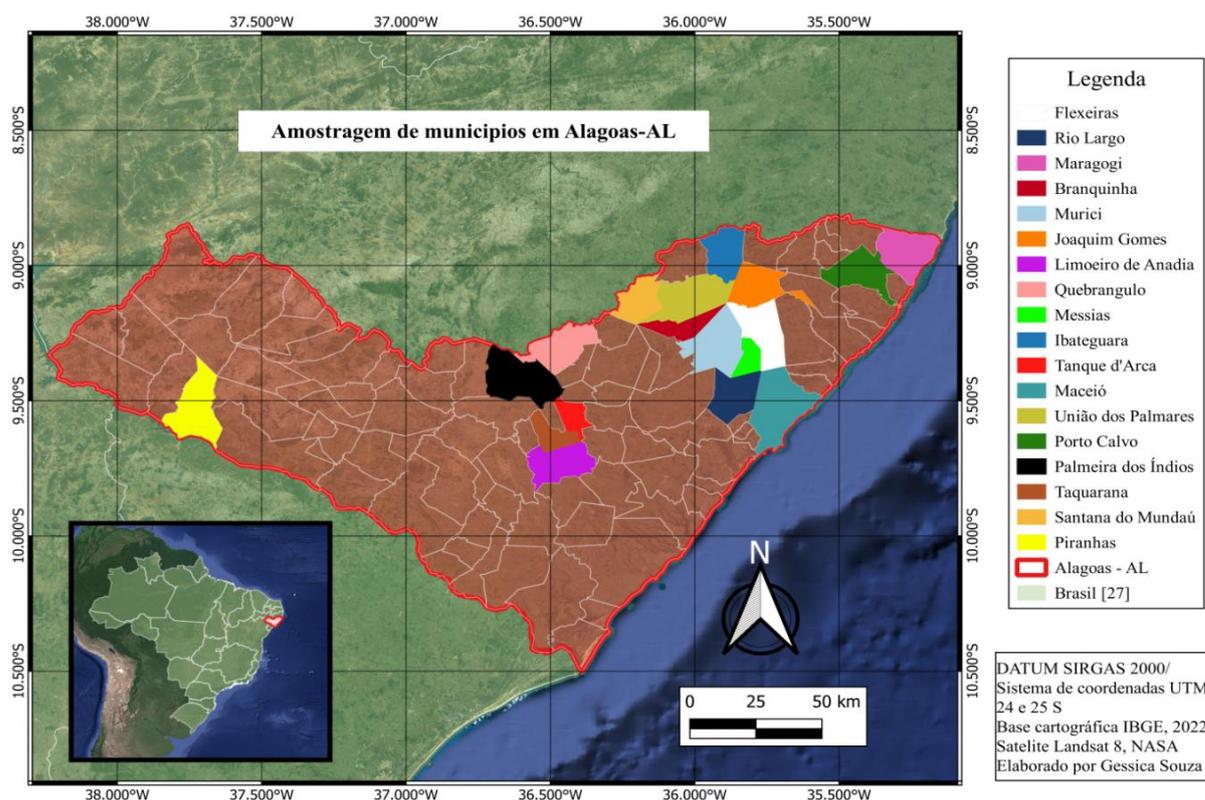
investigar a distribuição, morfologia e resistência ao fungicida difenoconazol de diferentes espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Locais de coleta e desenvolvimento do estudo

Amostras de frutos de banana das cultivares Prata, Branca e Terra, foram obtidas em 18 municípios pertencentes a seis regiões do estado de Alagoas-AL (norte, metropolitana, serrana dos quilombos, agreste, alto sertão e planalto da borborema; Figura 3) (SEADES, 2022).

Figura 3: Localização municipal geográfica da origem de frutos de bananas utilizados no estudo.



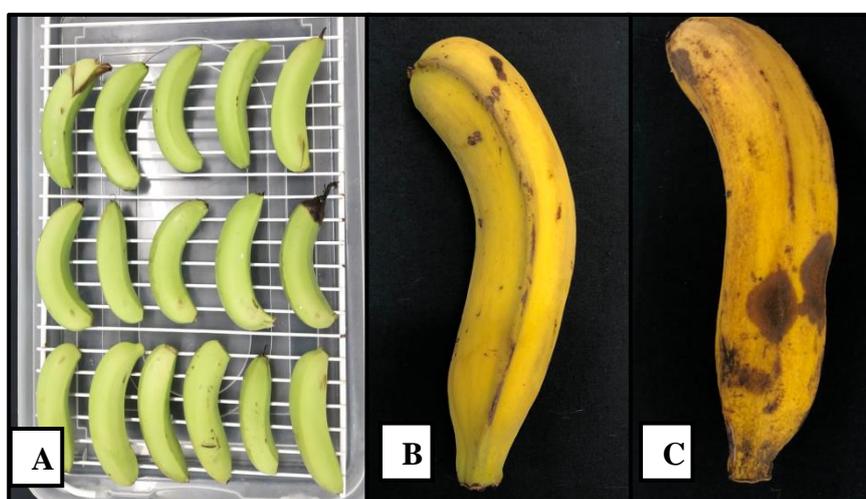
Fonte: Autora, 2022.

O estudo foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia Vegetal do Campus de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA-UFAL), localizado no município de Rio Largo - AL.

5.2 Obtenção dos isolados

As frutas recepcionadas foram destacadas da coroa e lavadas com sabão neutro em águas corrente e, posteriormente, secas em papel toalha e mantidas em bancada a temperatura ambiente (aproximadamente 28°C). O frutos coletados permaneceram em monitoramento por 4 dias, para a observação do surgimento de lesões necróticas e deprimidas, de coloração marrom-escura e/ou aparecimento de sinais caracterizados por mucilagem de coloração alaranjada, resultante da produção de conídios em acérvulos sob tecido hospedeiro (Figura 4).

Figura 4: Frutos recém-lavados (A), fruto em processo de maturação após três dias de recepção (B) e fruto com sintoma e sinal (C).



Fonte: Autora, 2022.

O isolamento ocorreu de forma direta e indireta de acordo com ALFENAS E MAFIA, (2016) em meio de cultura Ágar-Ágar. Os isolamentos foram mantidos em meio Ágar-Ágar (AA) na bancada em temperatura ambiente durante dois dias. Observado o crescimento do patógeno, foram retirados discos (5 mm) das bordas das colônias e, posteriormente, transferidos para novas placas de Petri contendo meio de cultura BDA, sendo mantidos em temperatura ambiente por sete dias

Após a observação de esporulação dos isolados, foi realizada a cultura monospórica, garantindo a pureza genética necessária à realização dos estudos de caracterização molecular, cultural e morfológica. Estas foram obtidas através da repicagem da ponta de hifa proveniente de colônias em meio de cultura AA após 48 h do isolamento, com duas repetições por isolado. A ponta de hifa foi transferida para novas placa de Petri contendo meio Batata Dextrose e Agar (BDA) e mantida por 7 dias

em temperatura ambiente ou até o surgimento das estruturas de reprodução do patógeno. (SUTTON, 1980).

5.3 Caracterização molecular

5.3.1 Extração de DNA total

A massa micelial utilizada para extração do DNA total (Doyle e Doyle, 1987) dos isolados de *Colletotrichum* spp foi obtida de culturas puras com 7 dias de crescimento. Resumidamente, o processo se deu da seguinte forma: com auxílio de uma alça estéril em chama, o micélio foi raspado e inserido em um micro tubo (vol. 2 ml) contendo 500µl de tampão de lise (1M de Tris-HCl pH 7,2, 0,5M de EDTA, SDS e água). Posteriormente, as amostras foram agitadas em vórtex por 5 minutos e levadas ao banho maria (65°C) por 30 minutos, com intervalos de agitação no vortex a cada 10 minutos (Doyle; Doyle, 1987).

Após resfriamento das amostras em temperatura ambiente, foi adicionado a estas 500µl de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico 24:1) e 200 µl de tampão de extração hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) 10% (CTAB 10%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, PVP 1%). As amostras foram agitadas em vortex até a mistura de reagentes + micélio apresentar aspecto leitoso. As amostras foram centrifugadas em 12.000 RPM, há uma temperatura de 4°C por 10 minutos.

O sobrenadante foi transferido para um novo micro tubo (vol. 1,5 ml), onde foi adicionado 500µL de Isopropanol. As amostras foram suavemente agitadas e levadas ao freezer por 2 horas a -20° C. Posteriormente foram centrifugadas em 12.000 RPM , há uma temperatura de 4 ° C por 10 minutos para a precipitação do DNA (formação do pellet).

O Isopropanol foi descartado e o DNA precipitado passou por duas lavagens com etanol absoluto e 70%, realizadas com auxílio de centrifugação de 12.000 RPM, há 4°C por apenas 5 minutos. As amostras foram secas em temperatura ambiente e, em seguida, ressuspensas com 40 µL de TE (Tris-EDTA; Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM) + RNase (10µg/mL).

A qualidade do DNA foi estimada visualmente em gel de agarose 1 %, corados com brometo de etídio e observados em luz UV. O material obtido foi armazenado a uma temperatura de -20°C.

5.3.2 Amplificação e sequenciamento do DNA

Para os isolados obtidos neste estudo foram realizadas análises via PCR.. As reações foram realizadas em um volume final de 30 μ L, contendo XX μ L de tampão 10X PCR, XX μ L da mistura de dNTPs a 10 mM, XX μ L de cada oligonucleotídeo a 10 μ M, 1 μ L do DNA molde diluído (1:50), e uma unidade de *Taq* DNA Polymerase, completando-se o volume com H₂O ultrapura.

Para todos os isolados foram testados os primers espécie-específicos para *C. musae*: Musae_tub_33F/ Musae_tub_387 (VIEIRA, et al., 2018) (Tabela1). As condições de termociclagem foram: um ciclo a 95°C por 3 minutos (desnaturação inicial); 30 ciclos a 95°C por 30 segundos (desnaturação), 53°C por 30 segundos (anelamento), e 72°C por 30 segundos (extensão); e um ciclo final a 72°C por 10 minutos, realizada em termociclador *Applied Biosystems* (2720 Thermal Cycler).

Os isolados coletados que não amplificaram com os primers específicos para *C.musae* foram submetidos a amplificação, via PCR, do gene ApMAT com os primers CgDLF6 / CgMAT1_F2 (Tabela 1) sob as seguintes condições de termociclagem: desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C; 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C e 1 minuto a 72°C; extensão final de 7 minutos a 72°C (ROJAS, et al. 2010).

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio e observados sobre luz UV. Os isolados que necessitaram de análises mais precisas como sequenciamento, foram enviados para a empresa Macrogen Inc. (Seoul, Coréia do Sul).

Tabela 1: Primers específicos para amplificação de *C.musae* e Primes de amplificação do gene APMAT utilizados no estudo.

	Primer	Sequências (5'-3')	Referencias
Sequência específica (<i>C.musae</i>)	Musae_tub_33F	GGTACCCCGACATTATG	Dos Santos Vieira, 2018
	Musae_tub_387	CAATGTGGCCAGATAGGGGG	
ApMAT	CgDLF6	AGTGGAGGGCGGGACGTT	Rojas, et al. 2010
	CgMAT1_F2	TGATGTATCCCGACTACCG	

5.3.3 Análises filogenéticas

Os componentes genômicos foram montados utilizando o programa Staden Package versão 2.0 (www.staden.sourceforge.net/). As sequências obtidas foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLASTn (ALTSCHUL, et al., 1990) e o banco de dados de nucleotídeos não redundante GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) para determinar as espécies de *Colletotrichum* spp. com as quais elas compartilham maior identidade de sequência.

Para determinação do relacionamento filogenético entre os isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos nesta pesquisa e demais espécies do gênero foram realizados alinhamentos múltiplos das sequências nucleotídicas utilizando o algoritmo MUSCLE implementado no pacote MEGA6 e ajustado manualmente. A árvore foi construída por estimativa de máxima verossimilhança, utilizando o MEGA6.

5.4 Testes de patogenicidade e virulência

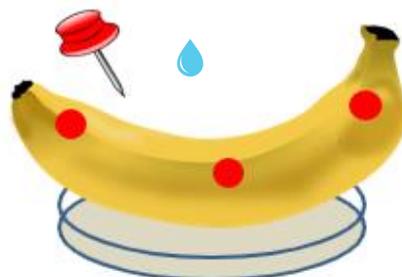
Setenta e cinco isolados representativos de *C. musae* oriundos de 15 municípios do estado de Alagoas, foram submetidos aos testes de patogenicidade e virulência. A inoculação foi realizada em frutos das cultivares 'Pacovan'. Os frutos foram lavados em água corrente, desinfetados superficialmente em hipoclorito de sódio a 1% por 3 min e, em seguida, lavados em água destilada estéril (ADE). Após a secagem em temperatura ambiente, os frutos foram colocados em bandejas plásticas sobre toalhas de papel umedecidas com ADE. Os frutos foram colocadas sobre placas de Petri esterilizada para evitar o contato direto com a água.

As bandejas foram acondicionadas em sacos plásticos e incubadas a 25 °C. Após 48 horas a câmara úmida foi retirada e os frutos mantidos a mesma temperatura. Os isolados foram testados em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições para cada um dos cinco isolados representativos para 15 municípios dos municípios de Flexeiras, Maragogi, Branquinha, Murici, Joaquim Gomes, Limoeiro de Anadia, Quebrangulo, Messias, Ibateguara, Tanque D'Arca, Maceió, União do Palmares, Porto Calvo, Palmeira dos Índios, Taquarana e Piranhas.

O teste foi realizado em frutos com e sem ferimentos. O ferimento dos frutos ocorreu em 3 pontos, perfurando a sua superfície com um alfinete a uma profundidade de 3 mm (Figura 5). O inóculo constituiu-se de uma gota de 20µL de suspensão de

conídios (1×10^6 conídios/ml), depositadas sobre o ferimento na superfície de cada fruto. O controle negativo consistiu de frutos inoculados com ADE.

Figura 5: Pontos de inoculação para frutos feridos (CF) e não feridos (SF), utilizados nos testes de Patogenicidade e Virulencia de isolados de *Colletotrichum musae*.



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

A patogenicidade foi avaliada quatro dias após a inoculação, observando a presença ou ausência de sintomas. Enquanto a virulência foi avaliada pela medição do diâmetro da lesão (cm) em duas direções perpendiculares e calculado a média do diâmetro da lesão. As diferenças na virulência entre isolados de *C. musae* foram determinadas pelas médias do diâmetro da lesão estabelecida pelo isolado e foram comparadas pelo teste Turkey em nível de 5% de probabilidade com o Software Statistix versão 9.0.

5.4.1 Patogenicidade cruzada

Vinte e cinco isolados, representativos de cada um dos quinze municípios foram submetidos a um teste de patogenicidade cruzada utilizando *Mangifera indica* cultivar 'Tommy Atkins' (manga tommy) (Figura 6).

Figura 6: Teste de patogenicidade com fermento e inoculação de *C.musae* aos três dias de inoculação em *Mangifera indica* cultivar 'Tommy Atkins'.



Fonte: Dados da pesquisa (2023).

As condições de higienização dos frutos e ambientação do teste estiveram de acordo com o tópico “testes de patogenicidade e virulência”. O teste foi realizado em frutos com estágio inicial de maturação, os ferimentos foram realizados em seis pontos, perfurando a superfície dos frutos com um alfinete estéril a uma profundidade de 3 mm. O inóculo constituiu-se de uma gota de 20µL de suspensão de conídios (1×10^6 conídios/ml; ALFENAS e MAFIA, 2016).

O controle negativo consistiu de frutos inoculados com ADE. A patogenicidade foi determinada cinco dias após a inoculação, observando a presença ou ausência de sintomas.

5.5 Caracterização morfocultural de *Colletotrichum musae* em Alagoas

Setenta e cinco isolados de *C. musae* identificados com base nas análises filogenéticas foram utilizados para caracterização morfocultural da população. Para caracterização cultural, discos de BDA (5mm) contendo o micélio de cada isolado foram retirados da borda de colônias cultivadas por sete dias em ambiente controlado de estufa BOD há uma temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas. A partir do sétimo dia de isolamento em BDA sintético foi observado o desenvolvimento das culturas fúngicas, sendo caracterizada a partir de uma escala qualitativa (tabela 2) à coloração das colônias, presença e/ou ausência de setores (ALFENAS; MAFIA, 2016; SANTOS, et. Al, 2015).

Tabela 2: Escala para classificar isolados de *C.musae* em grupos morfoculturais.

ESCALA	COLORAÇÃO DAS COLONIAS	
	Frente da placa de Petri	Reverso da placa de Petri
1	Branca	Branca/Castanho
2	Branca/Salmão	Braca/Salmão
3	Branca/Salmão	Branco/Castanho
4	Cinza	Cinza/Salmão
5	Cinza	Cinza/Verde

Fonte: Adaptado de SANTOS, et. al, 2015

Para observações do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), um disco de meio BDA contendo o micélio foi retirado da borda de colônias cultivadas por sete dias. Estes foram transferidos individualmente para o centro de novas placas de Petri contendo 20 ml de meio BDA sintético. O diâmetro das colônias (mm) foi

avaliado diariamente com observação do reverso das placas, através da mensuração, em dois sentidos perpendiculares, com o auxílio de um paquímetro digital. A partir dos dados obtidos foi determinado o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM),

$$IVCM = \sum(D - Da) N^{(1)}$$

Onde: IVCM: Índice de velocidade de crescimento micelial (mm dia⁻¹);

D: Diâmetro médio da colônia (mm);

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

N: Número de dias após a repicagem.

de acordo com Pereira (2016), utilizando a fórmula (1) a seguir:

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições de cada isolado, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri. As diferenças entre as velocidades de crescimento foram determinadas pelo teste Turkey em nível de 5% de probabilidade com o Software Statistix versão 9.0.

No estudo de caracterização de conídios e apressórios foram utilizados quinze isolados, sendo cada um de um município específico. Foram avaliados o tamanho e forma de cinquenta conídios e cinquenta apressórios escolhidos aleatoriamente dentre as estruturas do patógeno após dez dias de crescimento em meio BDA. Para a visualização dos esporos foram utilizadas lâminas de vidro, onde foi depositada uma gota (40 µL) de ADE juntamente com os conídios e observadas em microscópico óptico.

A formação de apressórios foi realizada utilizando uma gota de suspensão de esporos depositada sobre uma lâmina de vidro estéril acondicionada em placa de Petri forrada com papel filtro estéril umedecido com ADE, para manter o ambiente úmido e permitir a germinação dos conídios. Após 48 horas, as imagens dos apressórios e conídios foram capturados. Para a mensuração de comprimento e largura, considerou-se como comprimento, a distância entre o septo existente entre o apressórios e o tubo germinativo e a extremidade mais distante do mesmo. A largura foi mensurada em sentido perpendicular ao considerado para o comprimento (COSTA, 2014).

As medidas de comprimento e largura dos conídios e apressórios foram obtidas através de imagens capturadas por câmera digital (Olympus IX2-SLP) acoplada ao microscópio óptico com aumento de 400x, projetada em monitor de computador, através do software Cellsenses Standard (SAMSUNG SDC-415®). As análises foram

realizadas em Microsoft Excel, onde foram calculadas as médias de comprimento e largura, bem como a relação comprimento e largura (C/L) de conídios e apressórios.

5.6 Avaliação da sensibilidade de *C. musae* ao difenoconazol

O teste de sensibilidade *in vitro* de *C. musae* à difenoconazol (Score, 250 g/L - 25% m/v; Syngenta, São Paulo, SP, Brasil), foi realizado da seguinte forma: o fungicida foi dissolvido em DMSO para facilitar a diluição em meio BDA fundente (45°C) e obter-se a concentração de 1 µg de i.a. ml⁻¹. A concentração final do DMSO, incluindo a testemunha, no meio de cultura foi de 1% (v/v).

Discos contendo micélio (5 mm diâmetro) de cada isolado foram removidos da margem das colônias com 7 dias de crescimento em meio BDA e depositados em meio BDA sintético suplementado com fungicida. Para as testemunhas foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultura BDA sintético suplementado com DMSO onde foram depositados discos do patógeno.

As avaliações foram realizadas através de medições diárias do diâmetro das colônias obtidos através da média de duas medidas perpendiculares, com o auxílio de régua graduada, obtendo-se a média do crescimento diário para cada repetição de cada tratamento, após 7 dias de incubação foi a 25°C no escuro. Com o resultado das medições foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC; BASTOS, 1997), de acordo com a fórmula (2), descrita a seguir:

$$PIC = \frac{(Crescimento da testemunha - Crescimento do tratamento) \times 100}{Crescimento da testemunha (2)}$$

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com 4 repetições de 5 isolados de cada um dos 15 municípios, 1 concentração de fungicida + DMSO. As avaliações foram realizadas através do crescimento micelial em dois sentidos, perpendicularmente, durante 7 dias. As placas foram incubadas em estufa BOD a 25° C no escuro.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Detecção de fitopatógenos associados à antracnose da banana em alagoas

Um total de 225 isolados foi obtido no presente estudo (Tabela 3), sendo 222 identificados como indivíduos da espécie *C.musae* através de PCR com os primers específicos desenvolvidos por VIEIRA, et al., (2017). O fato de estes isolados pertencerem em sua maioria à espécie *C.musae* corrobora com a afirmativa descrita anteriormente de que esta ainda é a espécie mais prevalente responsável pela antracnose de frutos de bananeiras registradas no Brasil (SANTOS, et. al, 2015; VIEIRA, et al, 2017; ZAKARIA, 2021).

Tabela 3: Quantitativo de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos em 18 município alagoanos neste estudo.

Município-AL	Código	Quantidade	Hospedeiro
			(Variedade)
Joaquim Gomes	BJG	16	Prata/Pacovan
Quebrangulo	BQ	8	Prata/Pacovan
Piranhas	BPI	23	Pacovan
Messias	BMS	12	Prata/Pacovan
Murici	BMI	13	Prata
Ibateguara	BI	17	Prata
Taquarana	BTA	12	Pacovan
Branquinha	BB	12	Prata/Pacovan
Palmeira dos Índios	BP	7	Pacovan
Limoeiro de Anadia	BLA	15	Prata/Pacovan
Porto Calvo	BPC	25	Prata
União do Palmares	BPU	19	Prata/Maçã
Maceió	BM	4	Prata
Tanque D'Arca	BTD	17	Pacovan
Santana do Mundaú	BSM	1	Pacovan
Maragogi	BMG	13	Pacovan
Rio Largo	BRL	1	Prata
Flexeira	BTF	10	Terra
Total	18	225	4

Fonte: Dados da Pesquisa (2023).

Apenas os isolados BTA 11, BTA12 e BTA14 oriundos de bananas da variedade ‘Pacovan’, advindas do município de Taquarana localizado na região Agreste do estado de Alagoas não amplificaram quando submetidos à análise molecular com os primers específicos para *C.musae*. Porém obtiveram resultados positivos quando submetidos à amplificação do gene APMAT, indicando que estes pertencem ao complexo *C. gloeosporioides* (SHARMA, et. al., 2015; VIEIRA, et. al., 2017)

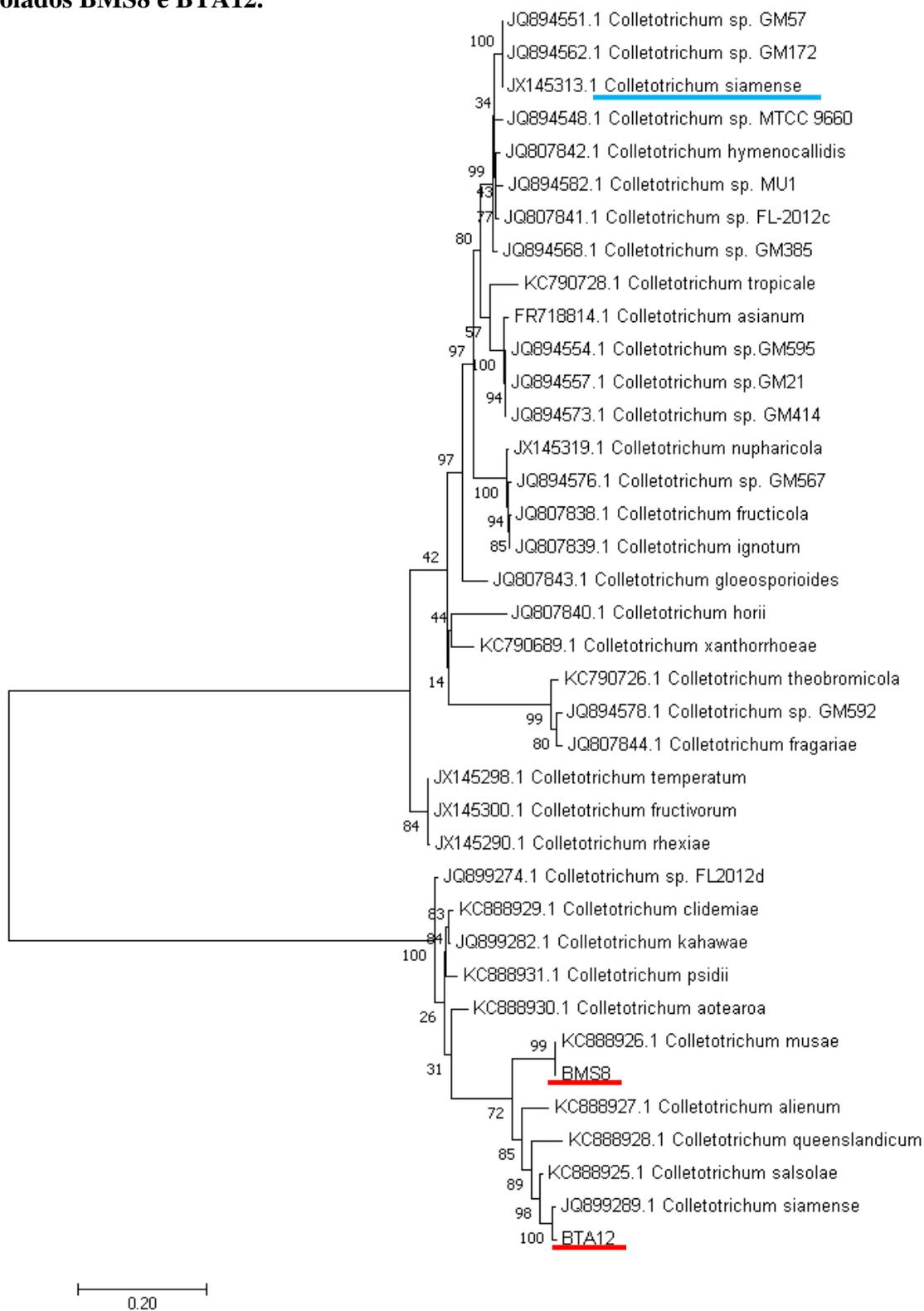
Os isolados BTA12 e BMS8 através de sequenciamento do gene APMAT apresentaram afinidade de acordo com o algoritmo BLASTn, e agruparam-se a um clado bem sustentado por meio da construção da árvore de máxima verossimilhança com as espécies *Colletotrichum siamense* (100%) e *Colletotrichum musae* (99%) respectivamente. A utilização do gene APMAT na identificação de espécies pertencentes ao complexo *Colletotrichum gloesporioides* de acordo com SHARMA, et al., (2015) e tida como suficiente. No entanto, é importante ressaltar que ocorre um erro de nomenclatura depositada no banco de dados GenBank quanto a nomenclatura de um indivíduo Singleton (que não pertence agrupasse a um complexo) descrito por DOYLE, et. al., (2013) onde percebe-se a repetição do nome da espécie *C. siamense* onde deveria constar *Colletotrchum sp.* (Figura 7).

Este é o primeiro relato da associação da espécie *C. siamense* à antracnose em frutos de bananeira no estado de Alagoas, no entanto VIERA, et al, (2017) já havia relatado esta espécie como patogênica em frutos de bananeiras coletadas no estado de Pernambuco, e PEREIRA (2016) à descreve em ação conjunta a *C.musae* em pomares de frutas tropicais no estado de São Paulo, infectando frutos de abacate e goiaba.

A espécie *C. musae* é reconhecida por sua relação patógeno-hospedeiro para diferentes órgãos vegetais em indivíduos do gênero *Musa* spp. no mundo todo, as quais além da antracnose em frutos, também pode causar as podridões da ponta do caule, da coroa e da ponta da flor destes hospedeiros por este motivo VIEIRA et. al. (2018) sugeriram que esta espécie pode ser específica do hospedeiro para a planta. No entanto, LI, et. al., (2019) relataram a espécie em associação a *Mangifera indica* em plantios comerciais na China, assim como ZARRAQ, et. al., (2022) a relata infectando *Coffea arabica* na Árabia Saudita.

O fato espécie *C. siamense* começar a ser encontrada infectando frutos de bananeira fazendo com estas expressem sintomas típicos da antracnose é decorrente de diversos mecanismos que estimulam a variabilidade genética em fungos mitospóricos, tais como a mutação, ambiente e outros fatores propícios em que podem estar sujeitos em condições naturais. Sendo importante ressaltar que antracnose é uma doença endêmica nas áreas de cultivo de varias frutíferas, onde ocorrem simultâneas infecções que estimulam a reprodução do patógeno, o que certamente amplia as chances na geração de variantes genéticos (FRAC, 2015; PEREIRA 2016, VIEIRA, et al 2017).

Figura 7: Árvore filogenética de Máxima verossimilhança do complexo *Colletotrichum gloeosporioides*, para região APMAT e posição filogenética dos isolados BMS8 e BTA12.



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

6.2 Patogenicidade e virulência

São patogênicos em banana os setenta e cinco isolados de *C.musae* testados, pois foram capazes de induzir ao hospedeiro sintomas específicos de antracnose nas quatro repetições testadas. Os sintomas surgiram em até três dias após a inoculação para os frutos inoculados com fermento e ao quarto dia em frutos inoculados sem fermento, os sinais surgiram em até cinco dias para ambas as condições e os frutos utilizados como tratamento controle não apresentaram sintomas no decorrer da condução do experimento.

Os sintomas observados inicialmente caracterizam-se pelo surgimento de pequenas lesões individuais afundadas de coloração preta ou marrom-escura que coalesceram formando lesões maiores. Os sinais do fitopatógeno foram pequenas pontuações (acérvulos) subepidérmicas, que exsudam uma massa de conídios, de coloração rosada ou salmão (Figura 8). Sendo estes aspectos os principais responsáveis pela redução significativa do valor de mercado da fruta (GARRITO e GAVA, 2014; ZAKARIA, 2021).

Figura 8: Lesão individual marrom escura, coalescida com a presença de acérvulos de coloração salmon, característicos dos sintomas e sinais de antracnose em frutos de bananeira ocasionadas por *C.musae* ao quarto dia após a inoculação para o teste de virulência.



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Esta massa mucilaginosa que envolve estruturas de propagação, os conídios, é descrita botanicamente por RODRIGUES et al. (2015) como esporopolenina, que é caracterizada por sua hidrossolubilidade, ou seja, pode ser desfeita na presença de respingos de chuva, permitindo a disseminação dos conídios que germinam, produzem o

apressório e penetram a cutícula de frutos em todos os estádios de desenvolvimento (GARRITO e GAVA, 2014).

Os dados quantitativos (diâmetro das lesões) representados pelo teste de virulência indicam que não houve correlação entre o grau de virulência dos isolados e sua origem relacionada à localização geográfica do município onde foi coletado. Porém, a ausência ou presença de ferimento no fruto foi fator determinante para o tamanho médio das lesões. As lesões em frutos com ferimento (CF) foram maiores do que em frutos sem ferimento (SF), quando avaliadas quatro dias pós-inoculação (Figura 9) O tamanho médio das lesões de frutos com ferimento foi de 18,67 mm e as SF de 12,43 mm, indicando que o ferimento favorece o estabelecimento do fitopatógeno em banana. SANTOS, et al, (2015) ao encontrarem resultados semelhantes descrevem que o ferimento é importante para a penetração de algumas espécies de *Colletotrichum*, pois favorece sua entrada e, conseqüentemente, o processo de infecção e colonização.

Figura9: Frutos inoculados com *Colletotrichum musae*; sem ferimento (A) com ferimento (B).



Fonte: Dados da Pesquisa (2023)

Além de maiores lesões os frutos feridos (CF) também maturaram primeiro. Este fato é resultante da ação conjunta de dois estímulos (ferimento + fitopatógeno) na ativação de enzimas presentes no tecido vegetal, denominadas de fosfolipase D (PLD), que são responsáveis por desempenhar reações fisiológicas em resposta à deterioração e senescência dos frutos (YI, et al, 2022). Estas ajustam expressões gênicas que ativam processos de transporte vesicular, degradação da membrana e sinalização intracelular para quando o tecido vegetal passa por estresses como congelamento, desidratação, alta salinidade, fermentos e interações planta-patógeno (LI, et al, 2017).

Estudos relacionados a ativação de processos metabólicos em resposta a infecção por *C.musae* em banana, principalmente a maturação, vem sendo desenvolvidos a mais de duas décadas, como por YI, et al, (2022). Os autores investigam diretamente a função dos genes MaPLD e sua resposta direta a *C.musae*, a fim de desenvolver novos mecanismos de resistência que regulem o fator maturação em bananas na pós-colheita infectadas por este patógeno. Pois isto possibilitaria um maior tempo de vida útil do fruto na pós-colheita, dentro da rede de comercialização como o tempo de logística e armazenamento.

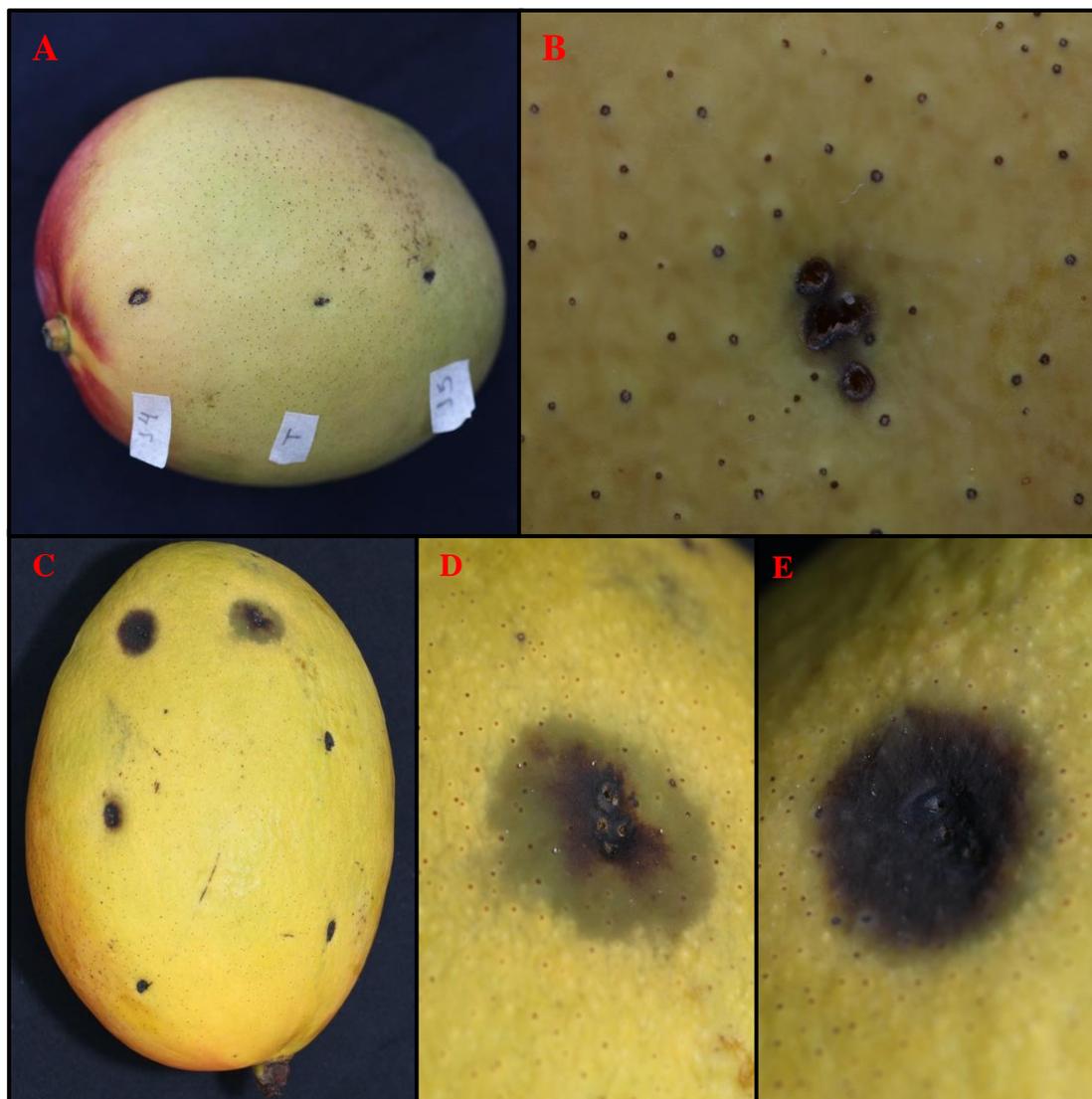
6.2.1 Patogenicidade cruzada

Dentre os vinte e cinco isolados submetidos ao teste de patogenicidade cruzada os isolados BMS8, BM5 e BM6 provenientes de frutos de bananeira foram patogênicos em manga, causando lesões necróticas após cinco dias de inoculação (Figura 10). No entanto, desenvolveram apenas sintomas e não foi observado sinais do fitopatógeno nos tecidos inoculados, isto pode ser resultado da baixa especialização estabelecida com o hospedeiro, como relatado em estudos desenvolvidos com espécies de *Colletotrichum* spp. em anonáceas por KAMEI et. al., (2014) que verificou nos isolados de pinha e graviola certa preferência por seu hospedeiro.

Ainda que os sinais não tenham sido reproduzidos em sua totalidade, os resultados de patogenicidade observados indicam que os isolados de *C. musae* oriundos de frutos de bananeira não apresentam especificidade apenas em relação a gênero *Musa* spp, fato constatado também por Li et al, (2019) que isolou *C. musae* provenientes de pomares de manga no sul da China. Nota-se o estabelecimento de ambiguidade do que outrora era relatado em literatura de que *C. musae* possui especificidade para com hospedeiros do gênero *Musa* spp., como sugerido por VIEIRA et al. (2017) responsáveis pelo desenvolvimento dos primers específicos na identificação de *C. musae* utilizados neste estudo.

Informações a respeito da gama de hospedeiros para fitopatógenos são de suma importância para o manejo integrado de doenças e, principalmente, quando se trata da antracnose, que de acordo com ZAKARIA (2021) é uma doença recorrente em espécies fruteiras tropicais como *Carica papaya*, *Mangifera indica*, *Musa* spp, *Persea americana*, *Psidium guajava*, *Hylocereus* spp., entre outras, pois os indivíduos do gênero *Colletotrichum* geralmente são cosmopolitas e encontram um propício ambiente em área de produção consorciada (ALMEIDA, 2011).

Figura 10: Frutos de manga inoculados com *Colletotrichum musae*; sintomas iniciais após 3 dias de inoculação comparados ao controle(A), controle inoculado com ADE (B), lesões características de antracnose ao quinto dia pós inoculação (C) patogenicidade de BMS8 (D) e BM6 (E).



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

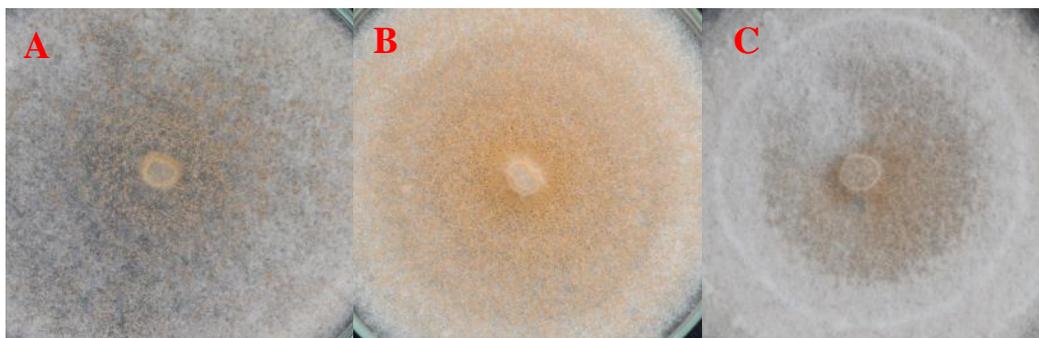
Porém, em função do amplo debate estabelecido sobre o grau de especificidade de *C.musae*, para BMS8, BM5 e BM6 foi realizado o reisolamento, extração de DNA e amplificação com primers específicos para a espécie que demonstraram um resultado novamente positivo. O isolado BMS8 foi encaminhado para o sequenciamento do gene

ApMAT a fim de identificar possíveis alterações genéticas, apresentados e discutidos no tópico anterior.

6.3 Caracterizações morfológicas de *Colletotrichum musae*

Os 75 isolados de *C.musae* avaliados foram classificados dentro dos cinco morfogrupos em escala (1 a 5) estabelecida previamente para esta análise (Tabela 2). As colorações do crescimento micelial dos isolados variaram entre: branca, salmão, e cinza, com reversos variando em branco, castanho, salmão, cinza e verde. Para 66,2% dos isolados observou-se a produção de massas de conídios de coloração laranja na superfície das colônias sendo classificados como pertencentes ao grupo 2 (Anexo1). Também houve variação quanto à formação de micélio aéreo (Figura 11), desde flocoso sem mucilagem aparentes, até micélio escasso, submerso e bem esporulado.

Figura 11: Variação quanto à formação de micélio aéreo, de BM1 (A), BJG4 (B) e BPC3 (C), pertencentes ao grupo morfocultural 2.



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Colônias de *C. musae* com características semelhantes ao grupo 2, são descritas por MENEZES (2006) e SANTOS (2015) no estado de Pernambuco, e por DA SILVEIRA et al, (2019) nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Norte coletados em áreas de produção comercial em larga escala de bananas. Recentemente, na Arábia Saudita, o grupo 2 também foi descrito por ZARRAQ, et al, (2022) em um isolado obtido em cultivos de café, que descreve a colônia em meio BDA apresentando micélio aéreo branco que tornou-se laranja claro. O morfogrupo 4 é relatado por SAKINAH, et al. (2014), na Malásia, que descrevem colônias de *C. musae* com coloração de branca a cinza.

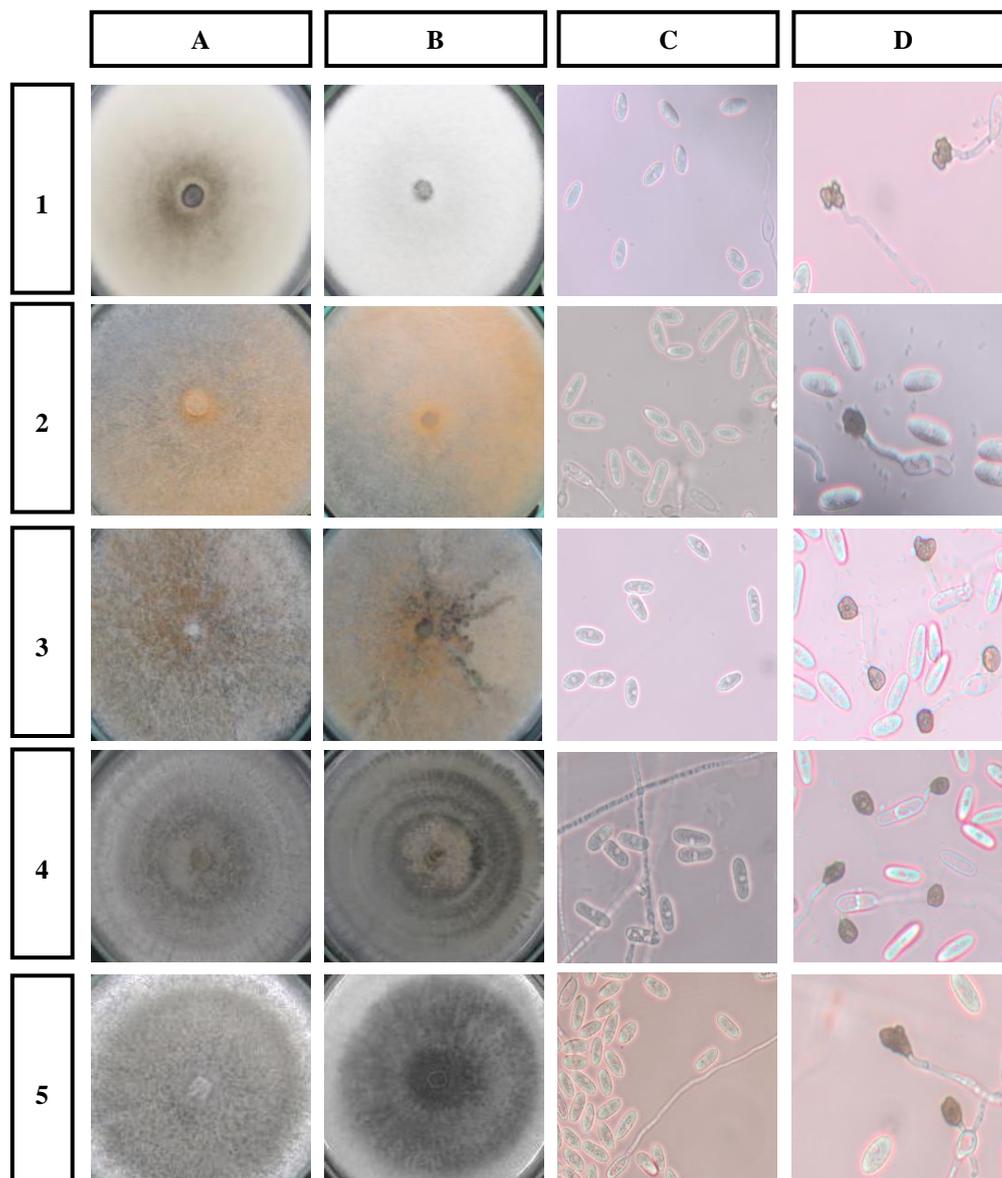
O índice de velocidade de crescimento micelial (IVMC) dos isolados de *C. musae* variou entre 17 mm/dia desenvolvidos pelo isolado BB3 a 8,17 mm/dia pelo isolado BQ7, estando ambos classificados como morfogrupo 2. Os dados de IVMC submetidos ao teste de Tukey a 5% de probabilidade apontam diferenças significativas de crescimento dos isolados, independentemente do grupo morfológico descrito no presente estudo (Anexo1). SAKINAH et al. (2014) observaram diferenças de crescimento em seus isolados de *C. musae* em um mesmo substrato, no entanto, sugerem que esse fato relaciona-se com a presença de raças fisiológicas.

O comprimento dos conídios dos 15 isolados avaliados variou entre 7,72 μm a 9,69 μm com média de 8,74 μm e a largura variou entre 3,21 μm e 3,94 μm com média de 3,61 μm (Tabela 4). As variações dimensionais para a espécie encontram-se dentro dos padrões descritos por Li et al. (2019) em isolados de *C. musae* obtidos em pomares de *Mangifera indica* (manga) na China. Em geral, apresentaram-se hialinos, retos, obtusos nas extremidades, predominantemente cilíndricos, curtos ou elipsoidais, unicelulares de parede fina e delgada e em seu interior apresentavam um glóbulo oleoso (Figura 12 C-1,2,3,4 e 5) que confere um elemento de reserva energética, conhecido como gútula (GARRITO e GAVA, 2014).

Múltiplos tubos curtos de anastomoses conidiais com até dois apressórios por conídio foram observados em todos os isolados, o que confere uma característica comumente observada em isolados pertencentes ao complexo *Colletotrichum gloeosporioides* (ARAUJO e STADNIK, 2013; COSTA, 2014; GONÇALVES, et al, 2016).

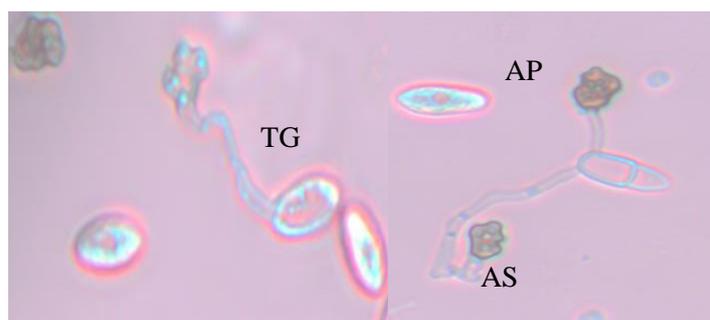
Os apressórios miceliais apresentaram coloração variável de marrom claro a marrom escuro (Figura 13), indicando melanização, sinal de alta capacidade em penetração no tecido hospedeiro. Estes são formados por meio da diferenciação morfológica do ápice de uma hifa micelial que passa a ter a capacidade de adesão, com função de penetração e sobrevivência do patógeno, suportando a ativação de defesas do tecido vegetal, lançadas contra o patógeno por meio de eventos bioquímicos localizados que ocorrem após o reconhecimento do contato do patógeno. Estes eventos de acordo com DIXON; LAMB (1990) dependem de uma combinação complexa de componentes de defesa constitutivos (barreiras físicas e químicas) e induzíveis (ativação da expressão de genes que codificam para proteínas relacionadas à defesa de plantas). No entanto, como visto neste estudo, a melanização também ocorre em membranas e meios artificiais (GONÇALVES, et al, 2016; VELHO e STADNIK, 2020).

Figura 12: Características morfológicas dos 5 grupos de colônias de *C.musae*, seus conídios e apressórios em Alagoas. Reverso (A) e frente da placa de petri (B), conídios (C) e apressórios (D).



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Basicamente para todos os isolados foram observadas três formas de apressórios (irregular, circular e ovalada). Também, quanto à disposição em relação ao conídio, pelo comprimento do tubo germinativo observaram-se apressórios sésseis e pedicelados (Figura 15 D- 1,2,3,4 e 5) (GONÇALVES E STADNIK, 2012). O comprimento dos apressórios para os isolados variou de 4,71 μm a 5,95 μm e a largura dos apressórios variou de 3,81 μm a 4,46 μm . As médias de dimensões foram de 5,22 para comprimento e 4,14 para a largura (Tabela 3).

Figura 13: Múltiplos tubos germinativos e apressórios em isolados de *C.musae*.

AS-Apressório séssil
 AP-Apressório pedicelado
 TG- Tubo germinativo

Fonte: Dados da Pesquisa (2023)

A avaliação do tamanho dos conídios e apressórios pela relação C/L demonstrou resultados esperados, sem diferença significativa, uma vez que os isolados são pertencentes à mesma espécie oriundas de hospedeiros do gênero *Musa* spp. O valor deste quociente indica que os isolados apresentam em média as mesmas dimensões morfológicas (SANTOS, et. al., 2015).

Tabela 4: Dimensões morfológicas de conídios e apressórios de *C.musae* de bananas de quinze municípios do Estado de Alagoas.

Isolado	CONIDIO			APRESSORIO		
	Largura	Comprimento	C/L	Largura	Comprimento	C/L
BLA3	3,62	7,84	2,16	3,98	4,91	1,23
BPI13	3,58	8,23	2,30	3,93	5,06	1,29
BB8	3,60	9,24	2,57	4,09	4,97	1,21
BPC8	3,77	8,45	2,24	3,87	4,80	1,24
BJG21	3,34	9,15	2,74	4,18	5,33	1,28
BMS15	3,54	9,43	2,66	4,24	4,86	1,15
BMI9	3,21	9,31	2,90	4,00	5,47	1,37
BMU8	3,64	9,69	2,66	4,46	5,46	1,22
BTA1	3,94	8,32	2,11	4,43	5,12	1,16
BM3	3,76	9,45	2,51	4,44	5,78	1,30
BTD18	3,55	8,20	2,31	4,32	5,95	1,38
BQ9	3,55	8,20	2,31	4,32	5,95	1,38
BI11	3,56	7,72	2,17	3,89	4,71	1,21
BTF6	3,65	8,78	2,41	3,81	5,11	1,34
BMG14	3,89	9,06	2,33	4,19	5,29	1,26
MÉDIA	3,61	8,74	2,42	4,14	5,25	1,27

C/L: Relação Comprimento/Largura

Fonte: Dados da Pesquisa (2023)

O conhecimento da morfologia de conídios e apressórios é um dado relevante para caracterização das espécies, mas não deve ser considerado como único parâmetro na identificação, uma vez que o patógeno sofre influências do ambiente e pode apresentar alterações morfológicas plásticas. Diferenças encontradas entre as dimensões morfológicas de conídios de *C. musae* descritas neste estudo e as descritas por ZARRAQ, et al, (2022) na Arábia Saudita em um isolado patogênico de café descritos com 14 µm de comprimento e 7 µm de largura. Portanto, é necessária à utilização conjunta destas técnicas morfológicas a análises moleculares (KAMEI, et. al., 2014).

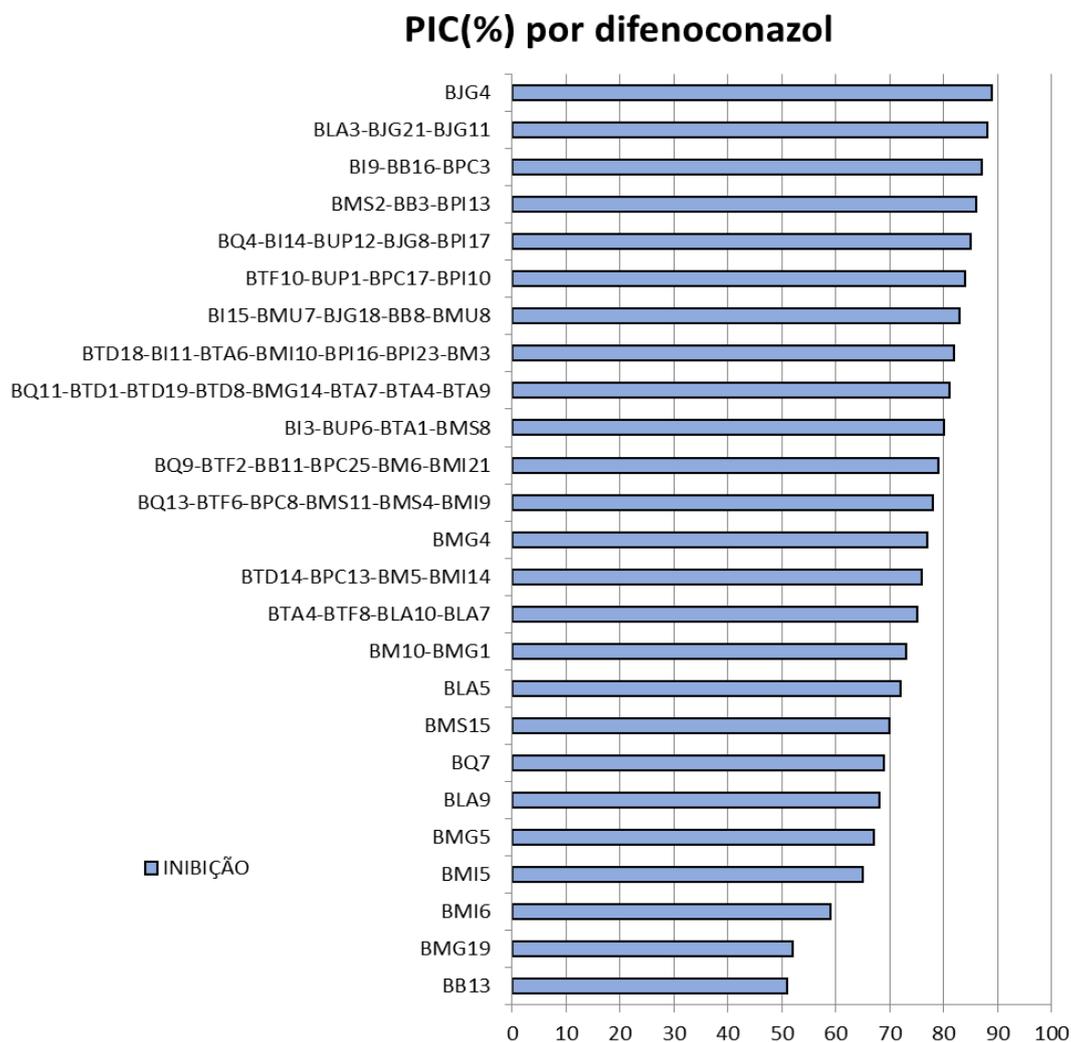
A identificação correta de fitopatógenos é de extrema importância para evitar dados ambíguos em relação a classificação de espécies, como ocorreu principalmente com *C. musae* que por vezes era classificado como *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. A solução encontrada foi demonstrada em trabalhos recentes desenvolvidos com isolados de banana que enfim determinaram as características fenotípicas e moleculares da espécie como um grupo monofilético dentro do complexo “*C. gloeosporioides*” (DOS SANTOS, 2015; VIEIRA, et al, 2017; SILVEIRA et al, 2019).

6.4 Sensibilidade *in vitro* de *c. musae* ao difenoconazol

Um total de 149 isolados submetidos ao teste de sensibilidade ao fungicida difenoconazol apresentou inibição de crescimento micelial maior que 80% (Gráfico 1). Este resultado corroborou com Veloso et al. (2021), que descreveram o fungicida difenoconazol como um inibidor moderado do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. associadas a cajueiro, reduzindo de 5- 59% e como inibidor da esporulação em até 96%.

Para os isolados do município de Joaquim Gomes (BJG4, BJJ21, BJJ11) e Limoeiro de Anadia (BLA3) a inibição do crescimento micelial por difenoconazol chegou a 88% (Figura 14). Caracterizando este fungicida como altamente eficiente em controlar o crescimento *in vitro* de *C. musae*, não sendo observada resistência dos isolados do patógeno ao fungicida. O difenoconazol foi altamente eficiente em controlar o crescimento *in vitro* de *C. gloeosporioides* isolados de abacate por FISCHER, et al. (2017) que, também, não observaram resistência a este fungicida.

Gráfico 1: Percentual de inibição do crescimento micelial (PIC) em *C.musae* por difenoconazol



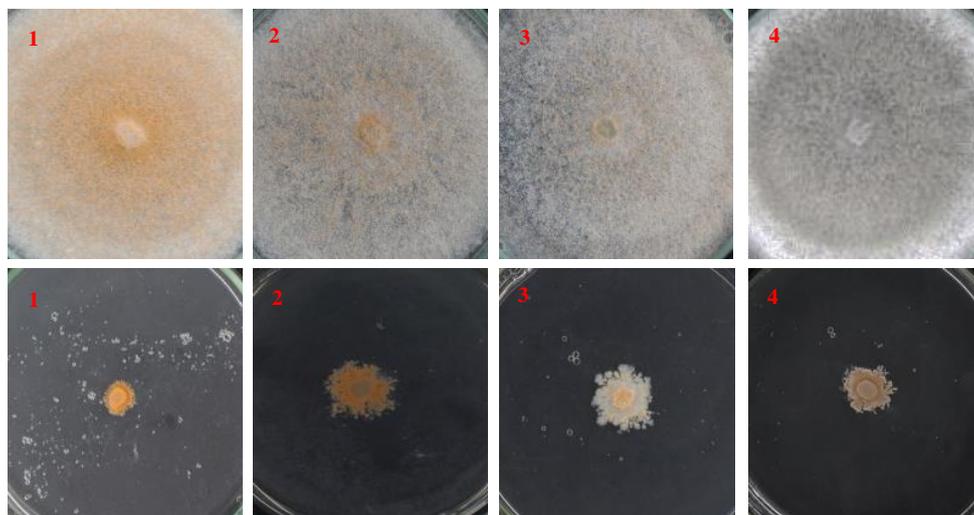
Fonte: Dados da Pesquisa (2023)

Como resistência a fungicidas trata-se de uma alteração estável e herdável de um patógeno a determinada dose ou princípio ativo, pode-se entender que os isolados de *C. musae* originários de municípios que apresentaram inibição superior a 60% até o presente momento, tiveram pouco e/ou nenhum contato com o difenoconazol. Sendo este um dado relevante para o monitoramento de possíveis resistências do patógeno para o estado de Alagoas (FRAC, 2011; SILVEIRA et al, 2020).

No entanto, pode ser observada ainda uma expressiva esporulação dos isolados em BDA tratados com difenoconazol, demonstrando ser uma estratégia de sobrevivência do patógeno utilizando energia advinda do pequeno disco de BDA ao centro da placa livre de fungicida. Portanto, sugere-se a realização de estudos quanto a

capacidade fugitoxica e fungistatica de difenoconazol sobre à esporulação de *C. musae* (SILVEIRA, et al, 2020; SALGADO, 2021).

Figura 14: Isolados de Joaquim Gomes (1,2,3) e Limoeiro de Anadia (4), em meio BDA e em meio BDA tratado com Difenoconazol



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Atualmente, não se encontram recomendações para o controle da antracnose em frutos de bananeira por difenoconazol, porém há recomendação pelo MAPA para sua utilização no controle de antracnoses em frutos tropicais como cajueiro e abacate (AGROFIT, 2023). No que diz respeito a bananeiras sua recomendação é para o controle da Sigatoka Negra, doença causada pelo fitopatógeno *Mycosphaerella fijiensis*. Sendo esta uma doença que ameaça chegar no estado Alagoas nos próximos anos, já que ocorre em estados fronteiriços como Pernambuco. Portanto, a utilização do difenoconazol seria conveniente para redução de custos de produção ao ser utilizado para o controle de duas doenças, pois aqui se sugere que tem efeito inibitório também para *C. musae* (VELOSO, et al, 2022;ADAGRO,2023).

8 CONCLUSÃO

A espécie *Colletotrichum musae* é o fitopatógeno mais prevalente em associação à antracnose em frutos de banana no Estado de Alagoas, porém não é a única (*Colletotrichum siamense*), e o fungicida difenoconazol exerceu neste estudo inibição variável entre 50 e 80% em seu crescimento micelial *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. 2º edição. ISBN: 978-85-7269-559-6 - Editora UFV. 2016
- ALMEIDA, Laís Bentes de. Patogenicidade Cruzada de Isolados de *Colletotrichum* Spp. **XX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA–CNPq/FAPEAM**, 2011.
- ADAGRO, Agência de Defesa Agropecuária do Estado de Pernambuco. **Sigatoka Negra**. Acesso em <<http://www2.adagro.pe.gov.br/web/adagro/sigatoka-negra>>. Recife-PE, 23 de janeiro de 2023.
- ARAUJO, L.; STADNIK, M. J. Múltiplos apressórios e tubos de anastomoses conidiais no processo infeccioso de *Colletotrichum gloeosporioides* em macieira. **Bragantia**, v. 72, p. 180-183, 2013.
- CARVALHO, B. M. Infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* em folhas de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims). Tese (doutorado). **Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF campos dos goytacazes - RJ** Fevereiro , 2016.
- DA SILVEIRA, A. L. et al. Genetic diversity of isolates of *Colletotrichum* spp. in banana. **Revista Caatinga**, v. 32, n. 3, 2019.
- DIXON, R. A.; LAMB, C. J. Molecular communication in interactions between plant with microbial pathogens. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.41, p. 339-367, June 1990.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- DOYLE, V.P.; et al. Habitat and host indicate lineage identity in *Colletotrichum gloeosporioides* sl from wild and agricultural landscapes in North America. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e62394, 2013.
- FISCHER, I., et al. Ocorrência de antracnose em abacate, agressividade e sensibilidade de *Colletotrichum gloeosporioides* a fungicidas. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 13, n. 2, p. 130-137, 2017.
- FRAC - **Fungicide resistance action committee**. 2015. Disponível em: <http://www.frac.info/home>. Acesso em: 10 de Jul de 2021.
- GARRIDO, L. da R.; GAVA, Renata . **Manual de doenças fúngicas da videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2014.
- GONÇALVES, A.E.; STADNIK, M.J. Interferência de ulvana no desenvolvimento e melanização de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Tropical Plant Pathology**, v.37, p.431-437, 2012. DOI: 10.1590/S1982-56762012000600010
- GONÇALVES, A.E.; VELHO, A.C.; STADNIK, M.J. Formação de tubos de anastomose conidial e melanização de apressórios são processos antagônicos em *Colletotrichum* spp. de maçã, **Eur. J. Plant Pathol.** 146 (3) 497–506. 2016.

- KAMEI, Sandra Hiromi et al. Identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose de anonáceas no estado de Alagoas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 209-216, 2014.
- LI, et al. Responses of phospholipase D and antioxidant system to mechanical wounding in postharvest banana fruits. **Journal of Food Quality**, v. 2017, 2017.
- LI, Q., et al. *Colletotrichum* species associated with mango in southern China. **Scientific reports**, 9(1), 1-10, 2019.
- NECHET, K. L.; ABREU, M. S. Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. 26 (6): 135-1142, 2002.
- PEREIRA, F. D. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. Provenientes de diferentes frutas tropicais. Tese (doutorado). **Universidade Estadual Paulista – UNESP**, 2016.
- RODRIGUES, A. C; AMANO, É; ALMEIDA, S. L. de. **Anatomia Vegetal**. Florianópolis: Biologia/EaD/UFSC, 2015. ISBN: 978-85-61485-27-6
- ROJAS, E. I.; REHNER, S. A.; SAMUELS, G. J.; VAN BAEL, S. A.; HERRE, E. A., CANNON, P.; PENG, Y. Q. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. **Mycologia**, 102(6), 1318-1338, 2010.
- SALGADO, G. H. dos S. S. Sensibilidade in vitro de *Colletotrichum* spp. associados a *Citrus sinensis* a fungicidas triazóis (DMI) e suas combinações às estrobilurinas. Dissertação. **Universidade Estadual Paulista** 2021.
- SANTOS, P. C. das M., et al. Diversidade genotípica e patogênica de *Colletotrichum musae* no estado de pernambuco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, p. 355-366, 2015.
- SANTOS, P. C. das M., et al. Diversidade genotípica e patogênica de *Colletotrichum musae* no estado de pernambuco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, p. 355-366, 2015.
- SANTOS, P.; LIMA, C. M.; BEZERRA W. G.; MICHEREFF C. S., CÂMARA, M. P. S. Diversidade genotípica e patogênica de *Colletotrichum musae* no estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Fruticultura** v.37, p.355-366. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-034/14>. (2015)
- SEADES, Secretaria de Estado da Assistência e Desenvolvimento Social de Alagoas. **Mapa das Regiões**. Acesso em < <http://www.assistenciasocial.al.gov.br/mapas-das-regioes>>, Acesso em 15/01/2023. Maceió- Al, 2022
- SILVEIRA, L. da.; SOARES, M. G. de O.; GUIMARÃES, S. da S. C.; PEREIRA, F. D.; POZZEBON, B. C.; ALVES, D. Avaliação da sensibilidade in vitro de isolados de

Colletotrichum spp. há fungicidas Amanda. *Nativa*, Sinop, v. 8, n. 1, p. 01-07, jan./fev. 2020. **Pesquisas Agrárias e Ambientais**. DOI: <http://dx.doi.org/10.31413/nativa.v8i1.7443>.

SAKINAH, MA Intan; SUZIANI, I. V.; LATIFFAH, Z. Phenotypic and molecular characterization of Colletotrichum species associated with anthracnose of banana (*Musa* spp.) in Malaysia. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 2, p. 3627-3637, 2014.

SHARMA, G.; PINNAKA, A. K.; SHENOY, B. D. Resolving the Colletotrichum siamense species complex using ApMat marker. **Fungal Diversity**, v. 71, p. 247-264, 2015.

SOUZA, D. P. et al. Caracterização fisiológica de Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. Sacc. associados a Mangifera indica L. em diferentes regimes de temperatura. Dissertação (mestrado) **Universidade Federal de Goiás**. 2022.

SUTTON, B.C. The Coelomycetes: Fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata. 1973 **Kew: Commonwealth Mycological Institute**, 1980. 696p. 1973

VELOSO, J. S.; DUARTE, I. G.; FARIAS, O. R.; CÂMARA, M. P. S. Antracnose do cajueiro: etiologia, sintomatologia e aspectos epidemiológicos. **Revisão anual de patologias de plantas-RAPP**. 2022. doi: 10.31976/0104-038321v280009

VELOSO J.S.; LIMA, W.G; REIS A.; DOYLE V. P; MICHEREFF S.J.; CÂMARA, M.P.S. Factors influencing biological traits and aggressiveness of Colletotrichum species associated with cashew anthracnose in Brazil. **Plant Pathology** 70:167– 180. doi: 10.1111/ppa.13276, 2021.

VELHO, A. C.; STADNIK, M. J. Non-host resistance of arabidopsis and apple is associated with callose accumulation and changes in preinfective structures of Colletotrichum species. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 110, p. 101463, 2020.

VIEIRA, W.S.; LIMA, W.G.; NASCIMENTO, E.S.; MICHEREFF, S.J.; CÂMARA, M.P.S.; DOYLE, V.P. O impacto dos dados fenotípicos e moleculares na inferência da diversidade de Colletotrichum associada à Musa. **Mycologia** , 109, 912–934. 2017

YI, P., et al. Characterization and Expression of Phospholipase D Putatively Involved in Colletotrichum musae Disease Development of Postharvest Banana Fruit. **Horticulturae**, v. 8, n. 4, p. 312, 2022.

ZAKARIA, L. Diversity of colletotrichum species associated with anthracnose disease in tropical fruit crops—A review. **Agriculture**, v. 11, n. 4, p. 297, 2021.

ZARRAQ, A. L. et al. Fusarium oxysporum and Colletotrichum musae Associated with Wilt Disease of Coffea arabica in Coffee Gardens in Saudi Arabia. **The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology= Journal Canadien des Maladies Infectieuses et de la Microbiologie Médicale**, v.20, 2022.

ANEXO - Descrição da morfologia, índice de velocidade de crescimento inibição por difenoconazol e teste de patogenicidade para os 75 isolados de *C.musae* avaliados neste estudo.

Isolado	Cor	Seto r	IVMC (mm)		Inibição por Difenoconazol (%)	Teste de Patogenicidade	
						Banana	Manga
BB3	2	-	17	a	86	*	
BMI14	4	-	17	a	86	*	
BPI13	2	-	17	a	86	*	
BTD18	3	*	17	a	86	*	
BM110	2	*	16,95	a	86	*	
BMU8	3	-	16,925	ab	83	*	
BTD8	3	-	16,9	abc	81	*	
BMS2	2	-	16,85	abc	81	*	
BLA10	1	-	16,8	abcd	75	*	
BLA3	5	-	16,8	abcd	88	*	
BTF10	2	-	16,775	abcd	84	*	
BPC13	2	-	16,7	abcde	76	*	
BPC3	2	-	16,7	abcde	87	*	
BPC17	2	-	16,7	abcde	84	*	
BI11	2	*	16,75	abcde	82	*	
BTA7	5	*	16,75	abcde	81	*	
BPC25	2	*	16,25	abcde	79	*	
BPI10	2	*	16,25	abcde	84	*	
BTA1	3	*	16,25	abcde	80	*	
BMS8	2	*	16,6	abcdef	80	*	
BPI23	2	*	16,6	abcdef	82	*	
BB16	3	*	16,55	abcdef	87	*	
BTF2	2	-	16,52	abcdef	79	*	
BUP12	2	*	16,50	abcdef	85	*	
BMS4	3	*	16,475	abcdef	78	*	
BMS11	2	-	16,325	abcdefg	78	*	
BTF8	2	-	16,275	abcdefg	75	*	*
BM5	2	-	16,275	abcdefg	76	*	
BQ4	2	-	16,175	abcdefg	85	*	
BMI21	4	-	16,075	abcdefg	79	*	*
BQ13	2	-	16,150	abcdefg	78	*	
BB8	2	-	16,075	abcdefg	83	*	
BMG5	4	-	16,0	abcdefg	67	*	
BUP6	3	-	16,0	abcdefg	80	*	
BTF4	3	-	15,95	abcdefg	75	*	
BTF6	3	-	15,825	abcdefg	78	*	

BPC8	2	-	15,7	abcdefgh	78	*	*
BJG4	4	-	15,675	abcdefgh	89	*	
BPI16	2	-	15,6	abcdefgh	86	*	
BQ11	2	-	15,575	abcdefgh	81	*	
BMU7	2	-	15,5	abcdefgh	83	*	
BPI17	2	-	15,425	abcdefgh	85	*	
BI14	4	-	15,295	abcdefgh	85	*	
BI9	3	-	15,295	abcdefgh	87	*	
BMI9	3	-	15,175	abcdefgh	79	*	
BTA4	5	-	15,15	abcdefgh	81	*	
BUP1	3	-	15,075	abcdefgh	84	*	
BJG21	2	-	14,9	abcdefghi	88	*	
BMG14	4	-	14,9	abcdefghi	81	*	
BJG11	2	-	14,875	abcdefghi	88	*	
BPC8	2	-	14,8	abcdefghij	78	*	
BTD19	5	-	14,5	abcdefghij	81	*	
BJG8	2	-	14,4	abcdefghij	85	*	
BM10	2	--	14,275	abcdefghij	73	*	
BMG4	4	-	13,95	abcdefghijk	77	*	
BI3	2	-	13,85	bcdefghijk	83	*	
BM6	2	-	13,775	bcdefghijkl	79	*	
BMI5	4	-	13,75	cdefghijkl	65	*	
BB11	2	-	13,65	defghijkl	72	*	
BTD14	5	-	13,6	efghijkl	76	*	
BQ9	2	-	13,45	fghijkl	79	*	
BTA9	5	-	13,275	ghijkl	81	*	
BM3	2	-	12,45	hijkl	82	*	
BJG18	2	*	12,325	hijkl	83	*	
BMS15	4	*	12,075	hijklm	70	*	
BTD1	3	*	12	hijklm	81	*	
BI15	2	*	11,8	ijklm	86	*	
BLA5	5	-	11,7	jklm	72	*	
BMG1	2	-	11,375	jklm	73	*	
BB13	2	-	11,15	jklmn	86	*	
BMI6	4	-	10,9	klmn	59	*	
BTA6	5	-	10,775	lmn	82	*	
BMG19	3	-	9,825	mn	52	*	
BLA9	5	-	9,55	mn	68	*	
BLA7	5	-	9,5	mn	75	*	
BQ7	2	-	8,1750	n	69	*	