

IDENTIFICAÇÃO DE RAÇAS FISIOLÓGICAS DE *MYCOSPHAERELLA FIJIIENSIS* POR MEIO DE REAÇÃO DE CULTIVARES DE BANANEIRAS

Vaneza Silva dos SANTOS¹; Rogério Eiji HANADA²; Rafael Maciel dos SANTOS³; Luadir Garparotto⁴; Gilvan Ferreira da Silva⁴

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Orientador CPPF/INPA; ³Colaborador DTI/CNPq/EMBRAPA;

⁴Colaborador/CPAA/EMBRAPA; ⁴Colaborador/CPAA/EMBRAPA

1. Introdução

Mycosphaerella fijiensis Morelet (fase anamófica: *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton), é o agente causal da doença mais destrutiva da bananeira conhecida como Sigatoka-negra (Gasparotto *et al.*, 2006). É caracterizada pela presença de estrias marrom na face inferior das folhas, progredindo para estrias negras que formam lesões necróticas destruindo toda a área foliar resultando na redução da produção (Marin, 2003). A doença foi descrita em 1963, pela primeira vez, no vale da Sigatoka, na ilha de Vitu Levu em Fiji (Rodes, 1964). No Brasil ela foi relatada pela primeira vez em 1998, na cidade de Tabatinga, no Estado do Amazonas, na fronteira com a Colômbia e Peru (Pereira *et al.*, 1998). Hoje se encontra disseminada em todas as regiões do país, exceto na região do nordeste. A natureza heterotática do *M. fijiensis* potencializa a taxa de recombinação gênica, desempenhando importante papel na geração de variabilidade genética dentro das populações do fungo (Carlier *et al.*, 2003). Esta variabilidade pode, por consequência, conduzir a uma rápida adaptação do patógeno a mudança nas condições ambientais. Outros fatores, tais como a natureza de dispersão do patógeno e a seleção imposta pelos cultivares resistentes, também podem influenciar a variabilidade encontrada nas populações do patógeno (Nakyanzi, 2002). O conhecimento das estruturas genéticas da população é uma importante ferramenta para os programas de melhoramento genético de plantas que visam à resistência contra doenças, por gerar informações sobre o nível e distribuição da variabilidade dos isolados existentes em uma população ou região. Fungos fitopatogênicos com alto nível de variabilidade genética são difíceis de controlar, uma vez que eles podem superar mais rapidamente qualquer medida de controle, seja ela química ou pela introdução de cultivares resistente (Carlier *et al.*, 2003). Diante do exposto, fica evidente que o sucesso no desenvolvimento de cultivares resistentes vão depender do entendimento do nível de variabilidade dentro de raças, para que se possam adotar melhores estratégias que permitam ampliar a durabilidade da resistência das variedades de bananeira. A estrutura genética populacional de *M. fijiensis* tem sido estudada por quase todos países onde a doença ocorre por meio de marcadores moleculares (Carlier *et al.*, 2003; Hayden, *et al.* 2003; Sánchez e Rodríguez *et al.*, 2008; Zandjanakou-Tachin *et al.*, 2009). Estes estudos têm confirmado que populações de *M. fijiensis* apresentam alta diversidade genética e que recombinação genética apresenta importante função para este patógeno. No entanto, os marcadores moleculares apenas admitem a existência da variabilidade de fungo, porém não explicam o grau de patogenicidade que esta variabilidade está expressando nos diferentes cultivares de bananeira. Diante disso, o termo raças fisiológicas vem sendo utilizado para descrever o patógeno da mesma espécie, morfológicamente semelhante e com mesma virulência. Assim, patógeno de distintas raças fisiológicas apresentam diferentes níveis de virulência. As raças fisiológicas são identificadas ou diferenciadas pela reação que causam num grupo de hospedeiro cujos componentes são denominadas cultivares diferenciadoras (Bueno *et al.*, 2001). Em geral existem dois tipos de reação: resistente e suscetível. Diante deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade de raças fisiológicas de 15 isolados de *M. fijiensis* inoculados em mudas de bananas prata anã e pacovan utilizadas como diferenciadoras.

2. Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Ocidental passando pelas seguintes etapas: Obtenção dos isolados - os isolados de *M. fijiensis* foram obtidos de folhas de bananeiras de diferentes regiões do país e de diferentes variedades. As folhas foram coletadas e levadas para o laboratório e submetidas a isolamento direto de acordo com o método descrito por Gasparotto *et al.* (2006). As estruturas reprodutivas visualizadas sob microscópio estereoscópico foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-agar) (200g de batata, 20g de dextrose e 20 g de agar em 1000 ml de água) ou V8 (200 ml de suco V8, 2,0 de CaCO₃, 20g de Agar e 800 ml de água destilada) e mantidas em 25 °C. Após o desenvolvimento das colônias, as mesmas foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio BDA ou V8 e mantidos em 25 °C por 10 dias. Em seguida, as colônias foram armazenadas em refrigeradores a 5 °C para estudo de diversidade genética. Produção do inóculo - Os inóculos foram

produzidos a partir da metodologia descrita por Gasparotto *et al.* (2006). Os isolados foram submetidos ao crescimento em meio de V8 e as colônias formadas foram submetidas mediante o processo de maceração. Para tanto, a colônia do fungo foi colocada em um tubo de ensaio com água destilada estéril e, com o auxílio de uma espátula, foi macerada e a suspensão de micélio foi transferida para uma placa de Petri contendo meio. As placas foram mantidas a 25 °C no escuro, em incubadora, por 10 dias e mais 5 dias sob regime de luminosidade. Após o período de incubação foi preparada uma suspensão de micélio e sua concentração ajustada para 10^5 fragmentos de micélio.ml⁻¹, com auxílio da câmara de Neubauer. Inoculação - Duas variedades de cultivares, suscetíveis (prata anã e pacovan) foram utilizadas para a avaliação, sendo preparadas cerca de 50 mudas de cada cultivar. As plantas foram cultivadas em sacos plásticos de 10 Kg com mistura de terra, areia, e esterco na proporção de 3:1:1. A inoculação foi feita por atomização, na face inferior e superior das folhas 1 e 2 de cada planta, onde uma folha foi delimitada com 6 quadrados medindo 25 cm, sendo três do lado direito e três do esquerdo. Os isolados foram inoculados em duas mudas de cada cultivar em casa de vegetação (CPAA), onde foram mantidas em temperatura ambiente, sendo regadas três vezes ao dia. As avaliações foram iniciadas a partir de 30 dias após as inoculações, a severidade da doença nas folhas das mudas inoculadas foram avaliadas mediante a utilização de uma escala diagramática descrita proposta por GAUHL (1994) com modificações, como segue: 0 - sem sintomas; 1 - menos de 1% da área foliar inoculada com sintomas; 2 - de 1 a 5% da área foliar inoculada com sintomas; 3 - de 6 a 15% da área foliar inoculada com sintomas; 4 - de 16 a 33% da área foliar inoculada com sintomas, 5 - de 34 a 50% da área foliar inoculada com sintomas; 6 - de 51 a 100% da área foliar inoculada com sintomas. Para determinar a resistência das cultivares classificaram-se conforme a metodologia de avaliação citada por Gasparotto *et al.* (2006): como resistentes as que receberam nota média de 0 a 2; moderadamente resistentes com notas de 2,1 a 4 e suscetível com notas de 4,1 a 6.

3. Resultados e discussão

Dos quinze isolados avaliados apenas um não apresentou sintomas na variedade prata anã aos 60 dias de inoculação, provavelmente devido à interação diferencial (Tabela 1). A presença de variabilidade de raças fisiológicas entre os quinze isolados de *M. fijiensis* pode ser visualizada com os resultados do teste de virulência, onde alguns isolados apresentaram respostas diferenciadas, indicando a presença de interação diferencial isolado-cultivar. Apesar das cultivares Prata anã e Pacovan serem infectadas por todos isolados inoculados. A variação de virulência foi avaliada pela análise da severidade da doença aos 60 e 81 dias de inoculação de Fitopatógeno (Tabela 1 e 2), obtida pela escala de GAUHL (1994).

Tabela 1- Severidade média da Sigatoka-Negra observada aos 60 dias após a inoculação em variedades de Prata anã e Pacovan de *Musa spp.* com quinze isolados de *Mycosphaerella fijiensis*

Nº Do Isolado	Origem	Genótipo	Severidade*	
			Prata Anã**	Pacovan**
01	Presidente Figueiredo-AM	Maçã	2,5 M	1,5 R
27	Cajoti-SP	Prata	1,0 R	0,5 R
111	Caroebe-RR	Prata	1,5 R	1,5 R
121	Caroebe-RR	Prata	1,5 R	1,0 R
150	Itacoatiara-AM	Prata	0,5 R	1,0 R
188	Itacoatiara-AM	Maçã	2,0 R	2,5 M
189	Itacoatiara-AM	Casada	1,0 R	1,0 R
190	Itacoatiara-AM	Prata	1,0 R	0,0 R
192	Itacoatiara-AM	Baiê	0,5 R	1,5 R
195	Itacoatiara-AM	Pacovan	0,5 R	0,5 R
202	Pedro de Toledo-SP	Prata	0,0 R	1,0 R
206	Juquía-SP	Prata	1,5 R	0,5 R
210	Eldorado-SP	Prata	0,5 R	1,5 R
216	Jacupiranga-SP	Nanica	1,0 R	1,5 R
243	Silves-AM	Maçã	1,0 R	2,5 M

*Média de severidade de duas repetições

**R=Resistente M=Moderadamente resistente e S=Suscetível

Tabela 2- Severidade média da Sigatoka-Negra observada aos 81 dias após a inoculação em variedades de Prata anã e Pacovan de *Musa* spp. com quinze isolados de *Mycosphaerella fijiensis*

Nº Do Isolado	Origem	Genótipo	Severidade*	
			Prata Anã**	Pacovan**
01	Presidente Figueiredo-AM	Maçã	4,5 S	5,0 S
27	Cajoti-SP	Prata	3,0 M	1,5 R
111	Caroebe-RR	Prata	3,0 M	2,5 M
121	Caroebe-RR	Prata	2,5 M	4,0 M
150	Itacoatiara-AM	Prata	1,5 R	2,5 M
188	Itacoatiara-AM	Maçã	2,5 M	4,0 M
189	Itacoatiara-AM	Casada	1,5 R	4,0 M
190	Itacoatiara-AM	Prata	1,5 R	1,5 R
192	Itacoatiara-AM	Baiê	1,5 R	3,0 M
195	Itacoatiara-AM	Pacovan	2,5 M	2,5 M
202	Pedro de Toledo-SP	Prata	1,0 R	2,5 M
206	Juquía-SP	Prata	2,5 M	1,5 R
210	Eldorado-SP	Prata	2,5 M	4,5 M
216	Jacupiranga-SP	Nanica	2,0 M	2,0 R
243	Silves-AM	Maçã	2,5 M	5,5 S

*Média de severidade de duas repetições

**R=Resistente M=Moderadamente resistente e S=Suscetível

Estes resultados comprovaram a existência de variabilidade patogênica deste fungo, pois houve reação de suscetibilidade diferenciada nas cultivares, quando inoculados com isolados de diferentes procedências e genótipos. Além disso, o número de variedades cultivadas no Brasil, certamente é maior do que na maioria das outras regiões produtoras de banana do mundo, a diversidade climática em que a fruta é produzida de norte a sul do país, a presença da reprodução sexuada na espécie, o fato de *M. fijiensis* ser um fungo heterotálico, são fatores que aumentam a capacidade de variação do patógeno e, conseqüentemente, a capacidade de adaptar-se a situações diversas, como favorecendo a criação de novas raças com combinações inéditas de genes de virulência Carlier *et al.*, 2003. Outro mecanismo que pode estar gerando dentro de uma população assexuada e a ocorrência do ciclo parassexual. Para isso, é necessário formar anastomose entre hifas. A fusão das hifas é um pré-requisito para compatibilidade vegetativa, e, conseqüentemente, para formação do heteriocário que é fundamental na ocorrência do ciclo parassexual (Alexopoulos *et al.*, 1996).

4-Conclusão

Diante do exposto, fica evidente que o sucesso no desenvolvimento de cultivares resistentes vai depender do entendimento do nível de variabilidade de raças e da população de patógeno, para que se possam adotar melhores estratégias que se permitam ampliar a durabilidade de resistência das cultivares da bananeira.

5-Referências

- Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. 1996. *Introductory Fungi*. 4th ed. John Wiley & Sons, Inc. New York. 869pp.
- Bueno, L.C.S.; Mendes, N.A.G.; Carvalho, S.P. 2001. *Melhoramento genético de plantas: princípios e procedimento*. Lavras, UFLA. 282p.
- Cavalcante, M.J.B.; Sá, CP.; Gomes, P.C.R.; Gondim, T.M.S.; Cordeiro, Z.J.M.; Hessel, J.L. 2004. Distribuição e impacto da Sigatoka-Negra na bananicultura do estado do Acre. *Fitopatologia Brasileira*, 29:544-547.
- Carlier, J.; Hayden, H.; Rivas, G.; Zapater, M.F.; Abadie, C.; Aitken, E. 2003. Genetic differentiation in *Mycosphaerella* leaf spot pathogens. In: *Workshop on Mycosphaerella leaf spot diseases held in San Jose, 2002*, Costa Rica. *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas: present status and outlook. Montpellier: INIBAP. p. 123-129.

- Cordeiro, Z.J.M.; Kimati, H.; Dias, C.T dos. S. 2001. Variabilidade patogênica em *Mycosphaerella musicola*. *Summa Phytopathologica*, 27: 291-295.
- Gasparotto, L; Pereira, J. C. R.; Hanada, R.E.; Montorroyos, A. V. V. *Sigatoka-negra da bananeira*. 2006. Embrapa Amazônia Ocidental. Manaus. 177p.
- Gauhal, F. 1994. *Epidemiology and ecology of black sigatoka (Mycosphaerella fijiensis Morelet) on plantation and banana (Musa spp.) in Costa Rica*. Montpellier. Central America. Inibap. 120p.
- Hanada, R. E.; Gasparotto, L.; Pereira, J. C. R. 2004. Eficiência de desinfestantes na erradicação de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* aderidos à superfície de bananas. *Fitopatologia Brasileira*, 29(1): 94-96.
- Hanada, R. E.; Gasparotto, L; Pereira, J.C.R. 2002. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. *Fitopatologia Brasileira*, 27: 170-173.
- Hanada, R. E.; Gaspartto, L.; Pereira, J.C. R. 2002. Sobrevivência de conídios de *Mycosphaerella fijienses* em diferentes materiais. *Fitopatologia Brasileira*, 27:408-411.
- Hayden, H. L.; Carlier, J.; Aitken, E. A. B. 2003a. Genetic structure of *Mycosphaerella fijiensis* populations from Australia, Papua New Guinea and the Pacific Islands. *Plant Pathology*, 52; 703-712.
- Marin, D. H.; Romero, R. A.; Guzmán, M.; Sutton, T. B. 2003. Black Sigatoka: An Increasing Threat to Banana Cultivation. *Plant Disease*, 87(3): 208-222.
- Nakyanzi, M. 2002. Molecular and pathogenic diversity of isolates of *Mycosphaerella fijiensis* that Sigatoka disease of bananas in East Africa. Thesis (Doctor) – Natural Resources Intitute – University of Greenwich, England, 232p.
- Pereira, J. C. R. et al. 1998. Ocorrência da Sigatoka Negra no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 23; 295.
- Saabor, A.; Lopes, L. H. S.; Cunha, M. M. Banana. 2000. *Fruti Series*, 6: 1-8.
- Sánchez e Rodriguez, A.; Portal, O.; Rojas, L. E.; Ocanã, B.; Mendoza, M.; Acosta, M.; Jiménez, E.; Hofte, M. 2008. An efficient Method for the extraction of High-Quality fungal total RNA to study the *Mycosphaerella fijiensis* - *Musa* ssp. Interaction. *Mol. Biotechnol*, 40: 299-305.
- Zandjanakou-Tachin, M.; Vroh- Bi, I.; Ojiambo, P. S.; Tenkouano, A.; Gumedzoe, Y. M.; Bandyopadhyay, R. 2009. Idenfication and genetic diversity of *Mycosphaerella fijiensis* species on banana and plantain in Nigeria. *Plant Pathology*, 58: 536-546.