

JACIARA DOS SANTOS SANTANA

**FUNGOS ENDOFÍTICOS RADICULARES DA BANANEIRA E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DA FUSARIOSE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Olinto Liparini Pereira
Coorientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S232 Santana, Jaciara dos Santos, 1997-
2023 Fungos endofíticos radiculares da bananeira e avaliação do
potencial para o controle biológico da fusariose / Jaciara dos
Santos Santana. – Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (64 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Olinto Liparini Pereira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.244>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Banana - Doenças e pragas - Controle biológico. 2.
Fusarium. 3. *Chaetomiaceae*. 4. *Chaetosphaeriaceae*. I. Pereira,
Olinto Liparini, 1975-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Microbiologia. Mestrado em Microbiologia
Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 632.96

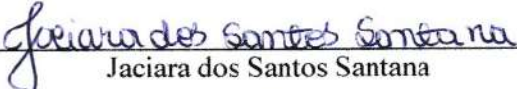
JACIARA DOS SANTOS SANTANA

**FUNGOS ENDOFÍTICOS RADICULARES DA BANANEIRA E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DA FUSARIOSE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de fevereiro de 2023.

Assentimento:



Jaciara dos Santos Santana
Autora



Olinto Liparini Pereira
Orientador

Aos meus pais, Félix Santana e Angela Maria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as experiências que passei, e por todas as conquistas. Aos meus pais Félix Santana (em memória) e Angela Maria dos Santos por sempre me incentivarem a estudar e correr atrás dos meus objetivos. Aos meus irmãos Angelica e Félix Júnior pelo apoio durante todo esse período.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade.

Ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC) pelo apoio. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Programa Mai/Dai pelo apoio e concessão das bolsas de mestrado e iniciação científica para realizar este trabalho. À CAPES (código de financiamento 001) e Fapemig pelo apoio.

Ao Sítio Barreiras pela parceria e apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Olinto Pereira pelo apoio, orientação e confiança para que este trabalho fosse desenvolvido.

Às amigas formadas a partir do ingresso no programa de pós-graduação, por todo apoio, companheirismo e por tornar esta caminhada mais leve. Em especial Jaqueline, Andressa, Emuriela, Ana e Verônica por dividirem muitos momentos que foram importantes para mim em Viçosa.

Aos amigos do Forró, que contribuíram para que esta etapa fosse um pouco mais divertida e leve.

Aos meus colegas de grupo do Laboratório de Micologia e Etiologia de Doenças Fúngicas de Plantas pelo apoio. Em especial, ao Fábio e Jaqueline por todo o apoio, incentivo, colaboração, conselhos e paciência durante todo desenvolvimento deste trabalho.

À Letícia Monteiro, secretária do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela paciência, dedicação e auxílio nos assuntos burocráticos.

Às Professoras Maria Catarina Kasuya e Denise Bazzolli, e à Doutora Thalita Monteiro por aceitarem participar como membros da banca de defesa deste trabalho.

À todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

SANTANA, Jaciara dos Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Fungos endofíticos radiculares da bananeira e avaliação do potencial para o controle biológico da fusariose.** Orientador: Olinto Liparini Pereira. Coorientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya.

A banana é uma das frutas mais consumida mundialmente, sendo o Brasil o terceiro maior produtor. A cadeia produtiva da banana enfrenta grandes perdas, especialmente em decorrência de pragas e doenças que afetam a cultura. Uma das principais doenças que acometem a cultura é a murcha vascular causada pelo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, que pode levar a perdas de até 100% da produção a depender da cultivar infectada. Os fungos endofíticos vêm sendo estudados como uma estratégia para controlar a murcha-de-fusário, pois podem utilizar diferentes mecanismos de ação que levam a redução da população do patógeno, tais como a antibiose, competição por espaço, hiperparasitismo, entre outros. Este trabalho teve como objetivo identificar e testar o potencial antagonista de fungos endofíticos das famílias Chaetomiaceae e Chaetosphaeriaceae associados a raízes de bananeira contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e *Fusarium sacchari* *in vitro*. Os fungos foram identificados por análises morfológica e filogenética, e testados em cultura dupla com os fitopatógenos. Foram identificadas uma espécie nova do gênero *Codinaea* e uma espécie nova do gênero *Dichotomopilus*, e relatado pela primeira vez *Fusarium sacchari* causando murcha vascular em bananeira no Brasil. Os isolados de *Codinaea* e *Dichotomopilus* apresentam capacidade de antagonismo contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e *Fusarium sacchari* *in vitro*. Fungos endofíticos radiculares da bananeira são pouco conhecidos e possuem a capacidade de antibiose contra fitopatógenos *in vitro*, podendo contribuir para o controle biológico da doença no campo.

Palavras-chave: Chaetomiaceae. Chaetosphaeriaceae. Controle biológico. Mal do Panamá. Murcha de fusário.

ABSTRACT

SANTANA, Jaciara dos Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2023. **Root endophytic fungi of banana and evaluation of the potential for the biological control of fusariosis.** Adviser: Olinto Liparini Pereira. Co-adviser: Maria Catarina Megumi Kasuya.

Banana is one of the most consumed fruits worldwide, being Brazil the third largest producer. The banana production chain faces huge losses, and this specially due to pests and diseases that affect the crop. One of the main diseases that affect the crop is the vascular wilt caused by the phytopathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, which can lead to losses of up to 100% of production depending on the infected cultivar. Endophytic fungi have been studied as a strategy to control Fusarium wilt, as they can develop different mechanisms of action that lead to the reduction of the pathogen population, such as the antibiosis, competition for space, hyperparasitism, among others. This work aimed to identify and test the antagonistic potential of endophytic fungi of the families Chaetomiaceae and Chaetosphaeriaceae associated with banana roots against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and *Fusarium sacchari* *in vitro*. Fungi were identified by morphological and phylogenetic analyses, and tested in double culture with phytopathogens. A new species of the genus *Codinaea* and a new species of the genus *Dichotomopilus* were identified, and reported for the first time *Fusarium sacchari* causing vascular wilt in banana in Brazil. *Codinaea* and *Dichotomopilus* isolates have antagonism ability against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and *Fusarium sacchari* *in vitro*. Banana root endophytic fungi are little known and have the ability to antibiosis against phytopathogens *in vitro*, which may contribute to the biological control of the disease in the field.

Keywords: Chaetomiaceae. Chaetosphaeriaceae. Biological control. Panama disease. Fusarium wilt.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	9
REFERÊNCIAS	11
CAPÍTULO 1	12
Isolamento de Chaetomiaceae endofíticos de raízes de bananeira e seu potencial antagonista contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> e <i>Fusarium sacchari</i>	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1. Coleta das amostras e isolamento	16
2.2. Teste de Patogenicidade	17
2.3. Extração de DNA e sequenciamento	17
2.5. Análise morfológica de Chaetomiaceae	19
2.6. Teste de antagonismo	20
3. RESULTADOS	29
3.1. Isolamento e teste de patogenicidade	29
3.2. Análise Filogenética	29
.....	33
3.3. Taxonomia	35
.....	37
3.4. Teste de antagonismo	38
4. DISCUSSÃO	39
5. CONCLUSÃO	40
CAPÍTULO 2	44
Fungos endofíticos do tipo <i>Dark Septate Endophytes</i> associados ao sistema radicular de <i>Musa</i> sp. e seu potencial de antagonismo contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> e <i>Fusarium sacchari</i>	44
RESUMO	45
ABSTRACT	46
1. INTRODUÇÃO	47
2. MATERIAL E MÉTODOS	48
2.2. Extração de DNA	49
2.3. Análises Filogenéticas	50
2.4. Análise morfológica	51

2.5. Teste de antagonismo.....	51
3. RESULTADOS	55
3.1. Taxonomia	56
3.2. Teste de antagonismo.....	58
4. DISCUSSÃO	58
5. CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS	61
CONCLUSÕES GERAIS	64

INTRODUÇÃO GERAL

A banana é uma das principais culturas agronômicas mundial, e apresenta propriedades nutricionais e medicinais (RANJHA *et al.*, 2022). Atualmente a maior parte das bananas comestíveis comercializadas são oriundas do cruzamento intraespecífico entre diploides de *Musa acuminata* (gerando triploides AAA), ou do cruzamento entre *Musa acuminata* e *Musa balbisiana* (gerando triploides AAB ou ABB) (CHRISTELOVÁ *et al.*, 2017). O Brasil é o quarto maior produtor de banana do mundo, e as cultivares dos subgrupos Prata e Maça (AAB), Cavendish (AAA) (Nanica, Nanicão, Grand Naine) são as mais produzidas nacionalmente (NAPOLEÃO; JESUS; LEONEL, 2021).

A bananeira pode ser afetada por diferentes tipos de pragas e doenças, e isso tem levado a grandes perdas na produção mundial dessa cultura (HECK *et al.*, 2021). Uma das principais doenças que afeta a cultura é a fusariose, doença que causou grandes perdas na produção global de banana no século passado (ORDONEZ *et al.*, 2015). Essa doença é causada pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), um patógeno que consegue infectar o sistema radicular e os feixes vasculares da bananeira, levando ao aparecimento de sintomas como o apodrecimento da raiz e pseudocaule, e murcha (PLOETZ, 2015a; SÁNCHEZ-ESPINOSA; VILLARRUEL-ORDAZ; MALDONADO-BONILLA, 2020).

Foc é subdividido em três raças fisiológicas: raça 1, 2 e 4 (BUDDENHAGEN, 2009; MAYMON *et al.*, 2020; MOSTERT *et al.*, 2017). Em meados dos anos 1900 Gros Michel era a principal variedade de banana produzida e altamente suscetível a Foc raça 1, e isso gerou grandes perdas na produção de bananas na época (BUDDENHAGEN, 2009). No entanto, essa variedade foi substituída pela Cavendish, que é resistente a raça 1 de Foc, mas é suscetível a raça 4 (BUDDENHAGEN, 2009).

Foc raça 4 é subdividido em dois tipos: Foc raça 4 tropical (TR4) que infecta a variedade Cavendish em climas tropicais e subtropicais, e Foc raça 4 subtropical (TS4) que infecta a variedade Cavendish em clima subtropical (BUDDENHAGEN, 2009; MAYMON *et al.*, 2020; MOSTERT *et al.*, 2017). Dessas duas, Foc TR4 é a mais preocupante, pois é relatada como uma grande ameaça para segurança alimentar e isso se deve ao seu efeito devastador em cultivares do subgrupo Cavendish, que pode contribuir para perdas significativas e reduzir significativamente a oferta da fruta no mercado global (BUDDENHAGEN, 2009).

Existem diferentes estratégias de manejo da fusariose como, por exemplo, o controle químico, o melhoramento genético e a exclusão do patógeno de áreas de plantio, no entanto, os resultados podem ser insatisfatórios (PLOETZ, 2015b). Por outro lado, muitos microrganismos

vêm sendo estudados como alternativas para controlar *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (TCHAMGOUE *et al.*, 2020; SAVANI *et al.*, 2021). Alguns fungos endofíticos são relatados como agentes de controle biológico de doença de plantas (TCHAMGOUE *et al.*, 2020; SAVANI *et al.*, 2021). Os gêneros *Rigidiporus* e *Trichoderma*, por exemplo, quando testados em ensaios *in vivo* contra *F. oxysporum* f. sp. *cubense* promoveram a redução de até 33% da doença (SAVANI *et al.*, 2021).

Os fungos colonizadores de raízes tipo *Dark Septate Endophytes* (DSE) também vêm sendo estudados como agentes de controle biológico e promotores de crescimento vegetal (HE; WANG; HOU, 2019; YAKTI *et al.*, 2018). Estudos têm demonstrado que os DSE podem ser potencialmente utilizados de forma generalizada em outros tipos de plantas hospedeiras, e não só em hospedeiros de onde foram originalmente isolados (HARSONOWATI *et al.*, 2020; KHASTINI *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2018). Espécies dos gêneros *Exophiala* e *Cladophialophora* isoladas de raízes de orquídeas quando inoculados em morangueiro reduziram em até 90% a incidência da doença causada por *Fusarium* (HARSONOWATI *et al.*, 2020). Alguns DSE pertencentes ao gênero *Cadophora*, isolados de repolho chinês, quando inoculados em plantas de melão tratadas com diferentes fontes de nitrogênio reduziram em até 62% a doença do meloeiro causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (KHASTINI *et al.*, 2014).

A atividade antifúngica apresentada por muitos microrganismos inclui diferentes mecanismos de ação como hiperparasitismo, competição por espaço e produção de metabólitos secundários que agem na inibição do crescimento de fungos patogênicos (AGHNA; LISNAWITA; LAHMUDDIN, 2019; AL-ANI, 2019; KADDES *et al.*, 2019). A utilização de agentes de controle biológico pode ser uma alternativa viável, que pode reduzir a utilização de compostos tóxicos para o meio ambiente e para a saúde humana.

O presente estudo teve como objetivo identificar fungos endofíticos associados ao sistema radicular da bananeira e avaliar o potencial *in vitro* desses fungos contra o agente causal da fusariose da bananeira. Teve como objetivo também, isolar fungos do gênero *Fusarium* relacionados com o desenvolvimento da fusariose da bananeira.

REFERÊNCIAS

- AGHNA, A.; LISNAWITA; LAHMUDDIN. Potency of non pathogenic *Fusarium* to control *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in Barangan cultivar. **Journal Agroekoteknologi FP**, v.7, n.2, p. 303-311, 2019.
- AL-ANI, L. K. T. Secondary metabolites of non-pathogenic *Fusarium*: Secondary metabolites of plant growth promoting rhizomicroorganisms. **Scope in Agriculture**, p. 59–76, 2019. doi:10.1007/978-981-13-5862-3_3
- BUDDENHAGEN, I. Understanding strain diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and history of introduction of “tropical race 4” to better manage banana production. **Acta horticulturae**, n. 828, p. 193–204, (2009). doi:10.17660/actahortic.2009.828.19
- HECK, D. W.; DITA, M.; DEL PONTE, E. M.; MIZUBUTI, E. S. G. Incidence, spatial pattern and temporal progress of *Fusarium* wilt of bananas. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 646, 2021.
- KADDES, Amine et al. Endophytic fungal volatile compounds as solution for sustainable agriculture. *Molecules*, v. 24, n. 6, p. 1065, 2019.
- MAYMON, M.; SELA, N.; SHPATZ, U.; GALPAZ, N.; FREEMAN, S. The origin and current situation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 in Israel and the Middle East. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020. doi:10.1038/s41598-020-58378-9
- MOSTERT, D.; MOLINA, A. B.; DANIELLS, J.; FOURIE, G.; HERMANTO, C.; CHAO, C.-P.; ... VILJOEN, A. The distribution and host range of the banana *Fusarium* wilt fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, in Asia. **Plos One**, v. 12, n. 7, 2017. e0181630. doi:10.1371/journal.pone.0181630
- NAPOLEÃO, G. M.; DE JESUS, P. R. R.; LEONEL, S. Cultivar diversification of banana production in Brazil. **Agronomy Science and Biotechnology**, Rec. 127, v. 7, p. 1-14, 2021.
- ORDONEZ, N.; SEIDL, M. F.; WAALWIJK, C.; DRENTH, A.; KILIAN, A.; THOMMA, B. P. H. J.; PLOETZ, R. C.; KEMA, G. H. J. Worse comes to worst: bananas and Panama disease—when plant and pathogen clones meet. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 11, 2015. e1005197. doi:10.1371/journal.ppat.1005197
- PLOETZ, R. C. *Fusarium* wilt of banana. **Phytopathology**, v.105, n. 12, p. 1512–1521, 2015. doi:10.1094/phyto-04-15-0101-rvw
- PLOETZ, R. C. Management of *Fusarium* wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. **Crop Protection**, v. 73, p. 7-15, 2015.
- SANCHEZ-ESPINOSA, A. C.; VILLARRUEL-ORDAZ, J. L.; MALDONADO-BONILLA, L. D. The cause and potential solution to the *Fusarium* wilt disease in banana plants. **Terra Latinoam**, Chapingo, v. 38, n. 2, p. 435-442, 2020. Doi <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.617>.
- SAVANI, A. K.; BHATTACHARYYA, A.; BORO, R. C.; DINESH, K.; JC, N. S. Exemplifying endophytes of banana (*Musa paradisiaca*) for their potential role in growth stimulation and management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing panama wilt. **Folia Microbiologica**, v. 66, n. 3, p. 317–330, 2021. doi:10.1007/s12223-021-00853-5
- TCHAMGOUE, E. N.; FANCHE, S. A. Y.; NDJAKOU, B. L.; MATEI, F.; NYEGUE, M. A. Diversity of endophytic fungi of *Psidium guajava* (Myrtaceae) and their antagonistic activity against two banana pathogens. **JAMB**, v. 20, n. 11, p. 86-101, 2020.

CAPÍTULO 1

Isolamento de Cahetomiaceae endofíticos de raízes de bananeira e seu potencial antagonista contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* e *Fusarium sacchari*

RESUMO

SANTANA, Jaciara dos Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Isolamento de Chaetomiaceae endofíticos de raízes de bananeira e seu potencial antagonista contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e *Fusarium sacchari*.** Orientadora: Olinto Liparini Pereira. Co-orientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya.

A família Chaetomiaceae inclui fungos com ampla distribuição geográfica e que colonizam diferentes substratos. Alguns fungos desta família já são relatados como potenciais agentes de controle biológico de doenças de plantas. Este trabalho teve como objetivo identificar e avaliar o potencial de Chaetomiaceae endofíticos de raízes de bananeira contra *F. oxysporum* f. sp. *cubense* e *F. sacchari* *in vitro*. Os fungos endofíticos da família Chaetomiaceae foram isolados de raízes de bananeiras vigorosas de uma área com alta incidência de fusariose. Os fitopatógenos foram isolados de bananeiras que apresentavam sintomas de fusariose. Todos os isolados foram submetidos a análises morfológica e filogenética, e depositados na Coleção de Culturas Fúngicas (CCF) do Laboratório de Micologia e Etiologia de Doenças Fúngicas de Plantas. Para avaliar a capacidade de antagonismo dos isolados endofíticos contra os agentes causais da fusariose da bananeira, foi realizado um teste de cultura pareada. Foram obtidos cinco isolados da família Chaetomiaceae. Com base nas análises morfológica e filogenética os isolados CCF 754, CCF 755 e CCF 756 constituem uma nova espécie do gênero *Dichotomopilus*, o isolado CCF 757 pertence a espécie *Dichotomopilus variostiolatus*, e o isolado CCF 758 pertence a espécie *Chaetomium globosum*. Os fitopatógenos pertencem ao gênero *Fusarium*, sendo o CCF 697 representante da espécie *Fusarium sacchari* e CCF 750 representante da espécie *Fusarium triseptatum*. Com base no teste de cultura pareada realizado os isolados de Chaetomiaceae reduziram em até 51% o crescimento de *Foc* e *Fusarium sacchari*. Neste trabalho relatamos pela primeira vez isolados do gênero *Dichotomopilus* e das espécies *Fusarium triseptatum* e *Fusarium sacchari* associados aos tecidos da bananeira. Os isolados de Chaetomiaceae obtidos neste trabalho apresentam potencial de antagonismos contra os agentes causais da fusariose da bananeira.

Palavras-chave: Fusariose. Antagonismo. Filogenia.

ABSTRACT

SANTANA, Jaciara dos Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2023. **Isolation of endophytic Chaetomiaceae from banana roots and their potential antagonist against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* e *Fusarium sacchari*.** Advisor: Olinto Liparini Pereira. Co-Adivisor: Maria Catarina Megumi Kasuya.

The Chaetomiaceae family includes fungi with a wide geographic distribution and that colonize different substrates. Some fungi of this family are already reported as potential biological control agents for plant diseases. This work aimed to identify and evaluate the potential of endophytic Chaetomiaceae from banana roots against *F. oxysporum* f. sp. *ubense* and *F. sacchari* in vitro. Endophytic fungi of the Chaetomiaceae family were isolated from vigorous banana roots in an area with a high incidence of fusariosis. Phytopathogens were isolated from banana trees that showed symptoms of fusariosis. All isolates were submitted to morphological and phylogenetic analysis, and deposited in the Fungal Culture Collection (CCF) of the Laboratory of Mycology and Etiology of Fungal Diseases of Plants. To evaluate the antagonism capacity of the endophytic isolates against the causal agents of banana fusariosis, a paired culture test was carried out. Five isolates of the Chaetomiaceae family were obtained. Based on the morphological and phylogenetic analyses, the isolates CCF 754, CCF 755 and CCF 756 constitute a new species of the genus *Dichotomopilus*, the isolate CCF 757 belongs to the species *Dichotomopilus variostiolatus*, and the isolate CCF 758 belongs to the species *Chaetomium globosum*. The phytopathogens belong to the genus *Fusarium*, with CCF 697 representing the species *Fusarium sacchari* and CCF 750 representing the species *Fusarium triseptatum*. Based on the paired culture test performed, the Chaetomiaceae isolates reduced the growth of *Foc* and *Fusarium sacchari* by up to 51%. In this work, we report for the first time isolates of the genus *Dichotomopilus* and the species *Fusarium triseptatum* and *Fusarium sacchari* associated with banana tissues. The Chaetomiaceae isolates obtained in this work show antagonism potential against the causal agents of banana fusariosis.

Keywords: Fusariosis. Antagonism. Filogeny.

1. INTRODUÇÃO

A banana (*Musa* spp.) é uma das principais culturas produzidas mundialmente, e apresenta propriedades nutricionais e medicinais e pode ser consumida fresca, frita, cozida ou processada (RANJHA *et al.*, 2022). No entanto, a bananeira é afetada por doenças que levam a queda da produção anual desta cultura, como é o caso da fusariose na bananeira ou mal-do-Panamá, doença causada pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) (PLOETZ, 2015; SÁNCHEZ-ESPINOSA *et al.*, 2020).

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* pode infectar o sistema vascular da bananeira e os feixes vasculares, podendo produzir substâncias tóxicas que atuam na morte celular e desenvolvimento de sintomas da doença (PLOETZ, 2015; SÁNCHEZ-ESPINOSA *et al.*, 2020). Maryani *et al.*, (2019) relatam que espécies do complexo *Fusarium oxysporum* causam a doença e que outras espécies do gênero como *Fusarium mangiferae*, *Fusarium proliferatum* *Fusarium sacchari* podem ser encontradas associadas a doença. O controle da fusariose ainda é um desafio, pois os métodos químicos não trazem resultados satisfatórios e o melhoramento genético pode demandar muito tempo e aceitação do mercado (ORDONEZ *et al.*, 2015).

Muitos fungos endofíticos vêm sendo estudados como estratégia de controle de diversas doenças de plantas, como a fusariose da bananeira (YAN *et al.*, 2018; HARSONOWATI *et al.*, 2020; TCHAMGOUE *et al.*, 2020). Alguns fungos membros da família Chaetomiaceae já foram estudados como agentes de controle biológico, e têm sido isolados de diferentes culturas de importância agrônômica tais como a banana, trigo, cana-de-açúcar, entre outras (FARR; ROSSMAN, 2023; MENDES; URBEN, 2023).

Estudos relatam que fungos do gênero *Chaetomium* e espécies da família Chaetomiaceae apresentam potencial para controlar fitopatógenos, e o mecanismo de ação desses fungos pode ocorrer de diferentes formas como, por exemplo, a partir da produção de substâncias antimicrobianas (ZHAO *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019). A espécie *Chaetomium globosum* produz uma substância chamada Chaetoviridina A (3), a substância que atua na inibição de patógenos como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Phytophthora capsici* e *Fusarium moniliforme* (YAN *et al.*, 2018).

A família Chaetomiaceae, inclui fungos que produzem na reprodução sexuada ascoma ostiolado com a parede coberta por apêndices desenvolvidos, e ascósporos acastanhados (WANG *et al.*, 2016a; WANG *et al.*, 2022). Muitos fungos dessa família foram por muito tempo considerados como pertencentes ao gênero *Chaetomium*, por apresentarem características similares às desse gênero. Com o avanço do uso de caracteres moleculares em análises filogenéticas,

a taxonomia desse grupo de fungos vem sofrendo alterações significativas, com diversos membros de Chaetomiaceae redefinidos dentro da família (WANG *et al.*, 2016a; WANG *et al.*, 2022). Alguns estudos propõem a definição de novos gêneros dentro da família, principalmente daqueles que apresentam características morfológicas similares às de *Chaetomium*, chamados de *Chaetomium*-like (WANG *et al.*, 2016a; WANG *et al.*, 2016b; WANG *et al.*, 2022).

As espécies de Chaetomiaceae podem ser encontradas na natureza colonizando diferentes substratos como o solo, material em decomposição, endófitos de plantas, além disso, esses fungos apresentam uma ampla distribuição geográfica (WANG *et al.*, 2016a). Este grupo de fungos apresenta uma grande importância médica, ecológica e biotecnológica, pois são fungos que produzem substâncias de interesse comercial e podem ser utilizadas em processos biotecnológicos como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas (YAN *et al.*, 2018; TIAN *et al.*, 2022).

Chaetomiaceae inclui membros com potencial para utilização agroindustrial (ZHAO *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019), e ainda há poucos relatos de fungos desta família associados a bananeira. Portanto, este trabalho teve como objetivo isolar fungos do gênero *Fusarium* que estão relacionados com a fusariose da bananeira, e identificar e avaliar o potencial de Chaetomiaceae endofíticos de raízes de bananeira contra *F. oxysporum* f. sp. *cubense* e *F. sacchari* *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta das amostras e isolamento

Amostras de raízes de bananeiras vigorosas foram coletadas em dezembro de 2021 em uma fazenda com alta incidência de fusariose que pertencia ao grupo Sítio Barreiras Ltda, no município de Itinga do Maranhão, Maranhão, Brasil. Todos os testes e processamento das amostras foram realizados no Laboratório de Micologia e Etiologia de Doenças Fúngicas de Plantas, localizado no Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa.

Os fungos foram isolados pelo método de isolamento indireto baseado na metodologia descrita por Pereira e Zambolim, 2012. As amostras foram lavadas em água corrente, fragmentadas e desinfestadas em álcool 70% (1 min), hipoclorito de sódio 2% (3 min) e lavada em água destilada estéril. Após a desinfestação as amostras foram secas em papel de filtro e transferidas para placas de Petri contendo meio de cultivo Potato Dextrose Agar (PDA). As placas foram incubadas a 25 °C até que fosse observado o crescimento fúngico e transferi-los para novas

placas de Petri contendo PDA. A obtenção da cultura pura foi realizada pelo método de transferência de ponta de hifa crescida em Ágar água (DHINGRA; SINCLAIR, 1995) para placas de PDA.

Os isolados obtidos foram depositados na Coleção de Culturas Fúngicas (CCF) do Laboratório de Micologia e Etiologia de Doenças Fúngicas de Plantas.

2.2. Teste de Patogenicidade

Amostras de pseudocaule de bananeiras que apresentavam sintomas do mal-do-Panamá foram coletadas para o isolamento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. O isolamento foi realizado conforme metodologia descrita por Pereira e Zambolim (2012), conforme descrito no item anterior. Após o isolamento foi realizado teste para confirmar a patogenicidade dos isolados de *Fusarium* obtidos. Cada isolado foi inoculado no pseudocaule de mudas de bananeiras saudáveis, de aproximadamente um ano de idade. O teste de patogenicidade consistiu em colocar um disco de meio de cultura PDA contendo micélio do fungo em um pequeno ferimento feita na base do pseudocaule da planta. No tratamento controle, um disco de PDA sem a presença de micélio foi colocado da mesma forma no ferimento no pseudocaule da planta. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara tipo nevoeiro por 48 horas para manter a umidade, após isto, as plantas foram mantidas em casa de vegetação a ± 25 °C. O teste de patogenicidade foi avaliado para a presença ou ausência de sintomas do mal-do-Panamá, 30 dias após a inoculação. Verificada a presença dos sintomas da doença, o patógeno foi re-isolado para identificação e confirmação dos postulados de Koch.

2.3. Extração de DNA e sequenciamento

Os isolados cresceram no escuro em meio de cultivo PDA por 7 dias a 25 °C para a extração do DNA genômico. As estruturas dos fungos foram removidas e transferidas para microtubos de 2,0 mL contendo 600 μ L de Nuclei Lysis Solution – Wizard Genomic DNA Extraction Kit (Promega), 100 mg de Polivinilpirrolidona (PVP; Sigma-Aldrich) e quatro esferas de aço. Posteriormente, as amostras foram misturadas e trituradas no disruptor de células e tecidos L-BEADER 6 (Loccus Biotecnologia), por 60 segundos a 4000 rpm. Após isso a extração foi conduzida de acordo com a metodologia descrita por Pinho *et al.* (2013).

As regiões gênicas ITS, *rpb2* e *tub2* foram amplificadas para os fungos da família *Chaetomiaceae*, a região *tef1- α* para os isolados de *Fusarium* (**Tabela 1**). As regiões gênicas foram amplificadas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), e cada reação foi preparada utilizando 18 μ L de Platinum® PCR SuperMix, 0,4 μ L de cada primer forward e reverse a 10 μ M sintetizado pela Invitrogen (Carlsbad, EUA), 1,2 μ L de DNA genômico (25 ng/ μ L). As

temperaturas de desnaturação e anelamento foram escolhidas de acordo com cada primer utilizado e com as indicações do fabricante da Platinum® PCR SuperMix. Para incubar as reações utilizou-se um termociclador com temperatura inicial de desnaturação 94 °C/2 min e 35 ciclos de desnaturação a 94 °C/30 segundos, anelamento (*rpb2*, *tub2* 56 °C, *tef1-α* 50 °C)/30 segundos, extensão a 72 °C/90 segundos. Posteriormente, utilizou-se GelRed (Biotium Inc.) para corar os produtos da PCR e a analisa-los por eletroforese em géis de agarose 2%, por 45 min, a 80 V em tampão Tris-acetato-EDTA 1 ×. Em seguida, esses produtos foram submetidos a luz UV a visualização, verificação da pureza e tamanho dos fragmentos após amplificação. Os produtos da PCR foram purificados e sequenciados pela Macrogen Inc.,

Coréia do Sul.

Tabela 1- Primers usados para amplificação e sequenciamento

Locus	Primer	Sequência 5'-3'
<i>rpb2</i>	5F2	GGG GWG AYC AGA AGA AGG C
	7cR	CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT
<i>tub2</i>	T1	AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT
	TUB4Rd	CCR GAY TGR CCR AAR ACR AAG TTG TC
ITS	ITS5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
<i>tef1-α</i>	EF2	GGA RGT ACC AGT SAT CAT GTT
	EF1	ATG GGT AAG GAG GAC AAG AC

2.4. Análise Filogenética

O BioEdit v 7.0.9 software system (HALL, 2012) foi utilizado para visualizar e formar a sequência consensus das sequências obtidas. Em seguida, utilizando o software MEGA BLAST, foi realizada uma comparação entre as sequências obtidas neste trabalho e com outras de Chaetomiaceae ou do gênero *Fusarium* depositadas no Genbank. Em seguida, as sequências geradas no presente trabalho foram alinhadas com sequências de espécies representantes dos gêneros *Chaetomium*, *Dichotomopilus* (Tabela 2) e *Fusarium* (Tabela 3) depositadas no GenBank, utilizado o algoritmo MUSCLE® (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation; EDGAR, 2004), realizado no programa MEGA X (KUMAR *et al.* 2018), usando os parâmetros padrão. Os alinhamentos foram verificados e ajustes manuais foram feitos quando necessário. A ausência de alguns loci no alinhamento concatenado foi tratada como dado perdido. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi determinado para cada gene pelo MrModeltest v. 2.3 (POSADA; BUCKLEY, 2004), de acordo com o Akaike Information Criterion (AIC). Foram realizadas análises filogenéticas por Inferência Bayesiana usando o método da cadeia de

Markov Monte Carlo (MCMC) de forma individual e concatenada das regiões *rpb2*, ITS e *tub2* para os Chaetomiaceae, e *tef1- α* para os *Fusarium* utilizados. Para determinar o melhor modelo evolucionário foi utilizado o software MrModeltest 2, as árvores filogenéticas foram geradas no CIPRES Science Gateway V. 3.3 (MILLER *et al.*, 2015), visualizadas no FigTree v.1.4.4 e editadas no CorelDRAW®.

As análises filogenéticas por Inferência Bayesiana foram realizadas no portal CIPRES Science Gateway V. 3.3 (MILLER *et al.* 2015), utilizando o software MrBayes v. 3.2.6 (RONQUIST; HUELSENBECK 2003). No MrBayes, os dados foram particionados por locus, e os parâmetros dos modelos de substituição de nucleotídeos para cada partição foram definidos conforme descrito acima. Foram realizadas simultaneamente. Quatro cadeias MCMC foram executadas simultaneamente em cada execução, começando de árvores aleatórias por 10.000.000 gerações. As árvores foram amostradas a cada 1.000 gerações, totalizando 20.002 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas na fase de queima de cada análise. Probabilidades posteriores (RANNALA; YANG 1996) foram determinadas a partir de uma árvore de consenso de regra de maioria gerada com as árvores remanescentes. As análises de Máxima Verossimilhança, com 1000 replicatas de bootstrapping foram conduzidas no software RAxML-HPC v.8 XSEDE usando parâmetros padrão estabelecidos no CIPRES Science Gateway V. 3.3 (MILLER *et al.* 2015). As árvores geradas no foram visualizadas no aplicativo FigTree v.1.4.4, e posteriormente editadas em programas gráficos. As árvores foram enraizadas com: *Dichotomopilus dolichotrichus* CBS 162.48 T, na árvore do gênero *Chaetomium*; *Chaetomium elatum* CBS 142034 neoT na árvore do gênero *Dichotomopilus*; *Fusarium foetens* CBS 110286 na árvore do complexo de espécies *F. oxysporum* e *Fusarium inflexum* NRRL 20433 na árvore do complexo de espécies *F. fujikuroi*.

2.5. Análise morfológica de Chaetomiaceae

A caracterização morfológica baseou-se na metodologia descrita por Wang *et al.* (2016a). Para a visualização e análise de estruturas reprodutivas os isolados foram cultivados em quatro meios de cultura diferentes por 7 dias no escuro: Oatmeal Agar (OA), Potato Carrot Agar (PCA) e Corn meal Agar (CMA) para o desenvolvimento de estruturas como o ascoma e Malt Extract Agar (MEA) para crescimento vegetativo. Após 7 dias de incubação as estruturas do fúngicas foram transferidas para lâminas e uma gota de solução de lactoglicerol ou ácido láctico foi adicionada e coberta por lamínula. Essas estruturas foram observadas e avaliadas em um microscópio Olympus BX53 equipado com uma câmera digital, Olympus Q-Color5™. Fo-

ram mensuradas diferentes estruturas reprodutivas tais como: comprimento e largura do ascoma, diâmetro do apêndice ascomatal, comprimento e largura da asca e ascósporos. Para a mensuração foram utilizadas 30 estruturas reprodutivas dos isolados, por meio do software Olympus cellSens Dimension 1.9.

2.6. Teste de antagonismo

Os isolados foram investigados quanto à atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e *Fusarium sacchari* seguindo a metodologia descrita por Yakti *et al.* (2019), com modificações. Os fungos foram cultivados a 25 °C por 7 dias em placas de Petri contendo meio Potato Dextrose Agar (PDA) (Sigma Aldrich, Espanha). Em seguida, discos de aproximadamente 5 mm de diâmetro de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* ou *F. sacchari* foram depositados de um lado da placa, e do outro lado um disco de 5 mm de diâmetro de cada isolado do fungo endofítico, com distância de 5 cm entre os dois discos. O patógeno foi cultivado em cultura pura como controle com 1,5 cm de distância da borda da placa, cada combinação foi feita em 4 repetições e todo o experimento foi repetido 3 vezes. As colônias foram cultivadas até que o patógeno cobrisse toda a placa controle. A atividade antagonista foi expressa como a porcentagem de inibição do crescimento de Foc ou *F. sacchari* por fungos endofíticos e calculada de acordo com a equação descrita por La Spada *et al.* (2020), conforme abaixo:

$$\text{PICM} = \frac{R1-R2}{R1} \times 100\%$$

Onde:

PICM = Porcentagem de inibição do crescimento micelial

R1 = Raio da colônia de Foc ou *F. sacchari* na placa controle

R2 = Raio da colônia de Foc ou *F. sacchari* em direção ao fungo endofítico

Análise dos dados

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro replicatas para cada tratamento. A análise dos dados foi realizada por meio da Análise de variância ANOVA, e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$).

Tabela 2 - Número de acesso GenBank das sequências de fungos da família Chaetomiaceae utilizados neste trabalho

Taxon	Accession number	GenBank accession numbers			Referência
		ITS	<i>rpb2</i>	<i>tub2</i>	
<i>Chaetomium afropilosum</i>	CBS 145.38 (T)	KT214574	KT214675	KT214751	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium angustispirale</i>	CBS 137.58 (T)	JN209862	KF001824	JN256141	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium ascotrichoides</i>	CBS 113.83 (T)	KC109752	KF001832	KC109770	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium capillare</i>	CBS 128489 (T)	KT214583	KT214686	KT214760	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium cervicicola</i>	CBS 128492 (T)	KT214558	KT214662	KT214735	Wang et al., 2022.
<i>Chaetomium citrinum</i>	CBS 693.82 (T)	KT214587	KT214691	KT214764	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium coarctatum</i>	MUCL 18697 = CBS 162.62 (T)	JN209863	KF001802	JN256142	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium cochliodes</i>	CBS 155.52 (epiT)	KC109754	KF001811	KC109772	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium contagiosum</i>	CBS 128494 (T)	KT214555	KT214659	KT214732	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium cucumericola</i>	CBS 378.71 (T)	KT214579	KT214680	KT214756	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium elatum</i>	CBS 142034 neoT	KX976612	KX976832	KX976954	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium fimeti</i>	DSM 62108 = CBS 139034	KT214559	KT214663	KT214736	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium globosporum</i>	CBS 108.83 (T)	KC109750	KF001825	KC109768	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium globosum</i>	CBS 160.62 (neoT)	KT214565	KT214666	KT214742	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium graminiforme</i>	CBS 506.84 (T)	KT214584	KT214687	KT214761	Wang et al., 2016.

<i>Chaetomium grande</i>	IRAN 1064C = CBS 126780 (T)	HM365253	KT214657	HM365273	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium interruptum</i>	IRAN 1278C = CBS 126660 (T)	HM365246	KT214665	KT214741	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium madrasense</i>	CBS 315.74 (T)	KC109751	KF001831	KC109769	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium megalocarpum</i>	MUCL 9589 = CBS 149.59 (epiT)	KC109744	KF001828	KC109762	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium novozelandicum</i>	CBS 124555 (T)	KT214576	KT214677	KT214753	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium nozdrenkoae</i>	CBS 163.62 (T)	KT214556	KT214660	KT214733	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium olivaceum</i>	CBS 418.80A	JN209914	KF001806	JN256184	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium pilosum</i>	CBS 335.67 (T)	KT214586	FJ666387	KT214763	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium pseudocochliodes</i>	CGMCC 3.9441 (T)	JN209925	KF001816	JN256195	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium pseudoglobosum</i>	CBS 574.71 (T)	KT214573	KT214674	KT214750	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium rectangulare</i>	IRAN 1641C = CBS 126778 (T)	HM365239	KT214688	HM365285	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium spiculipilium</i>	CBS 373.66 (T)	KC109756	KF001809	KC109774	Wang et al., 2022.
<i>Chaetomium spirochaete</i>	CBS 730.84 (epiT)	JN209921	KF001819	JN256191	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium subaffine</i>	CBS 637.91 (T)	JN209929	KF001817	JN256199	Wang et al., 2016.

<i>Chaetomium subglobosum</i>	MUCL 18694 = CBS 149.60 (T)	JN209930	KF001808	JN256200	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium telluricola</i>	CBS 151.59 (T)	KT214582	KT214685	KT214759	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium tenue</i>	CBS 139.38 (T)	KT214568	KT214669	KT214745	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium umbonatum</i>	CBS 293.83 (T)	KT214575	KT214676	KT214752	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium undulatum</i>	IRAN 857C = CBS 126775 (T)	HM365251	KT214682	HM365279	Wang et al., 2016.
<i>Chaetomium unguicola</i>	CBS 128446 (T)	KT214567	KT214668		Wang et al., 2016.
<i>Dichotomopilus dolichotrichus</i>	CBS 162.48 T	HM449049	KX976852	JF772462	Wang et al., 2016.
<i>Dichotomopilus dolichotrichus</i>	CGMCC 3.14189	HM449048	KX976853	JF772455	Wang et al., 2016.
<i>Dichotomopilus erectus</i>	CBS 140.56 T	HM449044	KX976854	JF772458	Wang et al., 2016.
<i>Dichotomopilus erectus</i>	CGMCC 3.12900	KC109760	KX976855	KC109778	Wang et al., 2016.
<i>Dichotomopilus finlandicus</i>	SZMC 26529	MW541926	MZ665531	MZ665529	Wang et al., 2016.
<i>Dichotomopilus funicola</i>	CBS 159.52 eT	GU563369	KX976856	JF772461	Wang et al., 2016.
<i>Dichotomopilus funicola</i>	CBS 136.38	HM449046	KX976857	JF772457	Wang et al., 2016.
<i>Dichotomopilus fusus</i>	CBS 372.66 T	KX976660	KX976859	KX977002	Wang et al., 2016.
<i>Dichotomopilus fusus</i>	CBS 114.83	KX976661	KX976860	KX977003	Wang et al., 2016.
<i>Dichotomopilus indicus</i>	CGMCC 3.14184 eT	GU563367	KX976861	JF772453	Wang et al., 2016.
<i>Dichotomopilus indicus</i>	CGMCC 3.14182	GU563366	KX976862	JF772451	Wang et al., 2016.

<i>Dichotomopilus pratensis</i>	CBS 133396 T	GU563372	KX976866	JF772450	Wang et al., 2016.
<i>Dichotomopilus pratensis</i>	CBS 804.83	KX976665	KX976867	KX977007	Wang et al., 2016.
<i>Dichotomopilus pseudoerectus</i>	CBS 252.75 T	KX97666	KX976869	KX977009	Wang et al., 2016.
<i>Dichotomopilus pseudofunicola</i>	CBS 142033 T	KX976668	KX976870	KX977010	Wang et al., 2016.
<i>Dichotomopilus ramosissimus</i>	CGMCC 3.14183 T	GU563371	KX976871	JF772452	Wang et al., 2016.
<i>Dichotomopilus ramosissimus</i>	CGMCC 3.12930	HM449045	KX976872	JF772449	Wang et al., 2016.
<i>Dichotomopilus reflexus</i>	CBS 157.49 T	HM449051	KX976873	JF772460	Wang et al., 2016.
<i>Dichotomopilus reflexus</i>	CBS 141.56	KX976669	KX976874	KX977011	Wang et al., 2016.
<i>Dichotomopilus subfunicola</i>	CGMCC 3.12892 T	JX867125	KX976875	JX867122	Wang et al., 2016.
<i>Dichotomopilus subfunicola</i>	CGMCC 3. 9466	GU563368	KX976876	JF772446	Wang et al., 2016.
<i>Dichotomopilus variostiolatus</i>	CBS 179.84 T	KX976672	KX976879	X977014	Wang et al., 2016.
<i>Myceliophthora thermophila</i>	CBS 669.85 T		HQ871806	KX977028	Wang et al., 2016.

T = cultura ex-tipo

Tabela 3- Número de acesso GenBank das sequências de *Fusarium* utilizadas neste trabalho

Complexo de espécies <i>Fusarium fujikuroi</i>			Complexo de espécies <i>Fusarium oxysporum</i>		
Taxon	Número de acesso	Nº acesso GenBank	Taxon	Número de acesso	Nº acesso GenBank
		<i>tef1-α</i>			<i>tef1-α</i>
<i>F. acutatum</i> T	CBS 402.97 T	MW402125	<i>F. callistephi</i> T	CBS 187.53 T	MH484966
<i>F. agapanthi</i> T	NRRL 54463 T	KU900630	<i>F. carminascens</i> T	CPC 25800 T	MH485028
<i>F. ananatum</i> T	CBS 118516 T	LT996091	<i>F. carminascens</i>	CPC 25792	MH485025
<i>F. andiyazi</i> T	CBS 119857 T	KP662901	<i>F. contaminatum</i> T	CBS 114899 T	MH484992
<i>F. annulatum</i> T	CBS:258.54 T	MT010994	<i>F. contaminatum</i>	CBS 117461	MH485002
<i>F. anthophilum</i> eT	CBS 222.76 ET	MW402114	<i>F. cugenangense</i>	CBS 620.72	MH484970
<i>F. aquaticum</i> T	LC7502 T	MW580448	<i>F. cugenangense</i> T	InaCC F984 T	LS479757
<i>F. awaxy</i> T	LGMF 1930 T	MG839004	<i>F. curvatum</i> T	CBS 238.94 T	MH484984
<i>F. babinda</i> eT	NRRL 25807 ET	AF160305	<i>F. curvatum</i>	CBS 247.61	MH484967
<i>F. babinda</i>	NRRL 25540 T	KU171718	<i>F. duoseptatum</i>	CBS 102026	MH484987
<i>F. bactridioides</i> T	CBS 100057 T	MN533993	<i>F. duoseptatum</i> T	InaCC F916	LS479688
<i>F. begoniae</i> T	CBS 452.97 T	MN533994	<i>F. elaeidis</i> T	CBS 217.49 T	MH484961
<i>F. brachiariae</i> T	CML 3032 T	MT901348	<i>F. elaeidis</i>	CBS 255.52	MH484965
<i>F. bulbicola</i> T	CBS 220.76 T	AF160294	<i>F. fabacearum</i> T	CPC 25802 T	MH485030
<i>F. caapi</i> T	CML 3657	MT901350	<i>F. fabacearum</i>	CPC 25801	MH485029
<i>F. casha</i> T	PPRI 21883	MF787261	<i>F. foetens</i>	CBS 110286 T	MT011001
<i>F. chinoyiense</i> T	NRRL 25221 T	MN534050	<i>F. glycines</i> T	CPC 25808 T	MH485033
<i>F. chuoi</i> T	CBS 148464 T	OK626308	<i>F. glycines</i>	CBS 176.33	MH484959
<i>F. circinatum</i> T	CBS 405.97 T	MN533997	<i>F. gossypinum</i> T	CBS 116613 T	MH485000
<i>F. coicis</i> T	NRRL 66233 T	KP083251	<i>F. gossypinum</i>	CBS 116611	MH484998
<i>F. concentricum</i> T	CBS:450.97 T	MT010992	<i>F. grosMichelii</i> T	InaCC F833	LS479744
<i>F. curculicola</i> T	PPRI 20458 T	MF787266	<i>F. hexaseptatum</i> T	InaCC F866	LS479805
<i>F. denticulatum</i> T	CBS 407.97 T	MN534000	<i>F. hoodiae</i> T	CBS 132474 T	MH485020

<i>F. dhileepanii</i> T	BRIP 71717 T	OK509072	<i>F. hoodiae</i>	CBS 132477	MH485022
<i>F. dlaminii</i>	CBS 672.94	MN534005	<i>F. inflexum</i>	CBS 716.74 T	AF008479
<i>F. dlaminii</i> T	CBS 119860 T	MW40199 5	<i>F. kalimantana-nense</i>	InaCC F917 T	LS479690
<i>F. echinatum</i>	CBS 146496	MW83427 2	<i>F. languescens</i> T	CBS 645.78 T	MH484971
<i>F. echinatum</i> T	CBS:146497 T	MW83427 3	<i>F. languescens</i>	CBS 872.95	MH484986
<i>F. elaeagni</i> T		MW58046 6	<i>F. libertatis</i> T	CPC 28465 T	MH485035
<i>F. ficicrescens</i> T	CBS:125178 T	MT011004	<i>F. libertatis</i>	CPC 25782	MH485023
<i>F. fracticaudum</i> T	CBS 137234 T	KJ541059	<i>F. nirenbergiae</i> T	CBS 840.88 T	MH484978
<i>F. fractiflexum</i> T	NRRL 28852 T	AF160288	<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 130303	MH485014
<i>F. fujikuroi</i> T	CBS 221.76 T	MN534010	<i>F. odoratissimum</i>	CBS 130310	MH485013
<i>F. giganteum</i> T	CMM 3557 T	KY490537	<i>F. odoratissimum</i>	CBS 794.70	MH484969
<i>F. globosum</i> T	CBS:428.97 T	MT010993	<i>F. odoratissimum</i> T		LS479828
<i>F. guttiforme</i> T	CBS:409.97 T	MT010999	<i>F. oxysporum</i> eT	CBS 144134 ET	MH485044
<i>F. hechiense</i> T	CGMCC 3.20824 T	MW58049 4	<i>F. oxysporum</i>	CBS 221.49	MH484963
<i>F. konzum</i> T	CBS 119849 T	LT996098	<i>F. pharetrum</i> T	CPC 30824 T	MH485043
<i>F. lactis</i> ET	CBS:411.97 ET	MT011010	<i>F. pharetrum</i>	CPC 30822	MH485042
<i>F. longicornicola</i> T	NRRL 52706 T	JF740788	<i>F. phialophorum</i> T	InaCC F971	LS479741
<i>F. longicornicola</i>	NRRL 52713	JF740795	<i>F. phialophorum</i>	NRRL 36112	LS479664
<i>F. lumajangense</i> T	InaCCF872 T	LS479441	<i>F. queenslandicum</i> T	BRIP 70769a T	MW038834
<i>F. lumajangense</i>	InaCCF993	LS479442	<i>F. sangayamense</i>	InaCC F960	LS479732
<i>F. madaense</i> T	CBS 146669 T	MW40209 8	<i>F. tar-dichlamydosporum</i>	CBS 102028	MH484988
<i>F. mangiferae</i> T	CBS 120994 T	MN534017	<i>F. tar-dichlamydosporum</i> T	InaCC F958 T	LS479729
<i>F. marasasianum</i> T	CMW 25261 T	KJ541063	<i>F. triseptatum</i> T	CBS 258.50 T	MH484964

<i>F. mexicanum</i> <i>T</i>	NRRL 53147 T	GU737282
<i>F. mirum</i> <i>T</i>	CML 3859 T	MK895725
<i>F. mundagurra</i> <i>T</i>	RBG5717 T	KP083256
<i>F. musae</i> <i>T</i>	NRRL 25059 T	FN552086
<i>F. napiforme</i> <i>T</i>	CBS 748.97 T	KR071712
<i>F. nygamai</i> <i>T</i>	CBS 749.97 T	MW40215 1
<i>F. ophioides</i> <i>T</i>	CBS 118512 T	MN534022
<i>F. panlongense</i> <i>T</i>	CGMCC 3.20825	MW58051 0
<i>F. phyllophilum</i> <i>T</i>	CBS 216.76 T	AB674283
<i>F. pilosicola</i> <i>T</i>	NRRL 29124 T	MN534055
<i>F. prieskaense</i> <i>T</i>	CBS 146498 T	MW83427 5
<i>F. proliferatum</i> <i>T</i>	CBS 480.96 T	MN534059
<i>F. pseudoanthophilum</i> <i>T</i>	CBS:414.97 T	MW40212 8
<i>F. pseudocircinatum</i> <i>T</i>	CBS 449.97 T	MT011003
<i>F. pseudonygamai</i> <i>T</i>	CBS 417.97 T	MT011008
<i>F. ramigenum</i> <i>T</i>	CBS:418.97 T	MT011012
<i>F. sacchari</i> <i>ET</i>	CBS 223.76 ET	MW40211 5
<i>F. secorum</i> <i>T</i>	NRRL 62593 T	KJ189225
<i>F. siculi</i> <i>T</i>	CPC 27188 T	LT746214
<i>F. sterilyphosum</i> <i>T</i>	NRRL 25623 T	MN193869
<i>F. subglutigans</i> <i>NT</i>	CBS 747.97 NT	MW40215 0
<i>F. succisae</i> <i>ET</i>	CBS 219.76 ET	AF160291
<i>F. sudanense</i> <i>T</i>	CBS 454.97 T	MN534037
<i>F. temperatum</i> <i>T</i>	MUCL 52463 T	KM487197
<i>F. terricola</i> <i>T</i>	CBS 483.94 T	KU711698
<i>F. thapsinum</i> <i>T</i>	CBS 776.96 T	MN534044
<i>F. tjaetaba</i> <i>T</i>	NRRL 66243 T	KP083263
<i>F. tupiense</i> <i>T</i>	NRRL 53984 T	GU737404
<i>F. udum</i> <i>ET</i>	BBA 65058 ET	KY498862
<i>F. verticillioides</i> <i>T</i>	CBS 218.76 T	MW40211 3

<i>F. volatile</i>	T	CBS 143874	T	LR596007
<i>F. werrikimbe</i>	T	CBS 125535	T	MN534048
<i>F. xylarioides</i>	T	NRRL 25486	T	
<i>F. xyrophilum</i>	T	NRRL 62721	T	MN193877
<i>F. inflexum</i>				AF008479

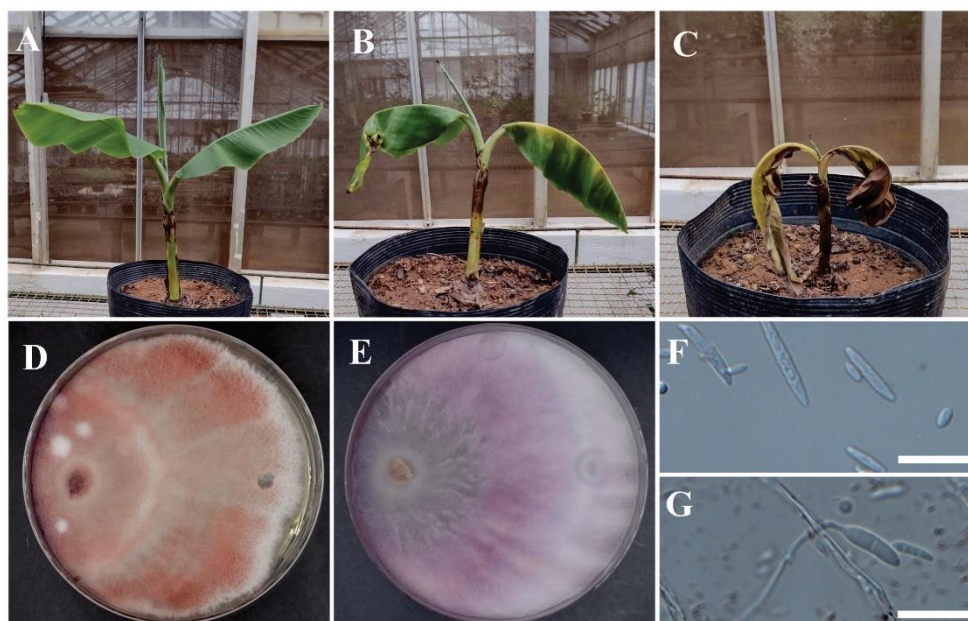
T = cultura ex-tipo

3. RESULTADOS

3.1. Isolamento e teste de patogenicidade

Foram isolados 70 fungos endofíticos de raízes de bananeiras vigorosas de uma área de alta incidência de fusariose. Desses, cinco pertenciam a família Chaetomiaceae. Foram isolados 27 fungos de amostras de pseudocaule de bananeiras com sintomas de fusariose. Os isolados que apresentavam características morfológicas semelhantes as do gênero *Fusarium* foram submetidos ao teste de patogenicidade em mudas micropropagadas de bananeira para confirmar a patogenicidade e cumprir os postulados de Koch. Após 30 dias de inoculação as mudas de bananeiras apresentavam sintomas de murcha vascular e escurecimento dos feixes vasculares (**Figura 1**).

Figura 1 – Teste de patogenicidade de isolados de *Fusarium* em mudas de bananeira após 30 dias de inoculação



(A) Tratamento controle, (B) muda de bananeira inoculada com o isolado CCF 697 de *Fusarium oxysporum*, (C) muda de bananeira inoculada com o isolado CCF 750 de *Fusarium sacchari*, (D) Cultura de *Fusarium oxysporum* CCF 697 crescida em BDA, (E) Cultura de *Fusarium sacchari* CCF 750 crescida em BDA, (F) conídios de CCF 697 e (G) conídios de CCF 750. Barra de escala = 20 μm .

3.2. Análise Filogenética

Foram obtidos cinco isolados pertencentes a família Chaetomiaceae, dos quais quatro pertencem ao gênero *Dichotomopilus* e um ao gênero *Chaetomium*, e dois isolados do gênero *Fusarium*. A análise filogenética de cada gênero foi realizada utilizando-se o conjunto de dados

individual e combinando as regiões. Na tabela 4, estão apresentadas as informações estabelecidas em cada análise filogenética.

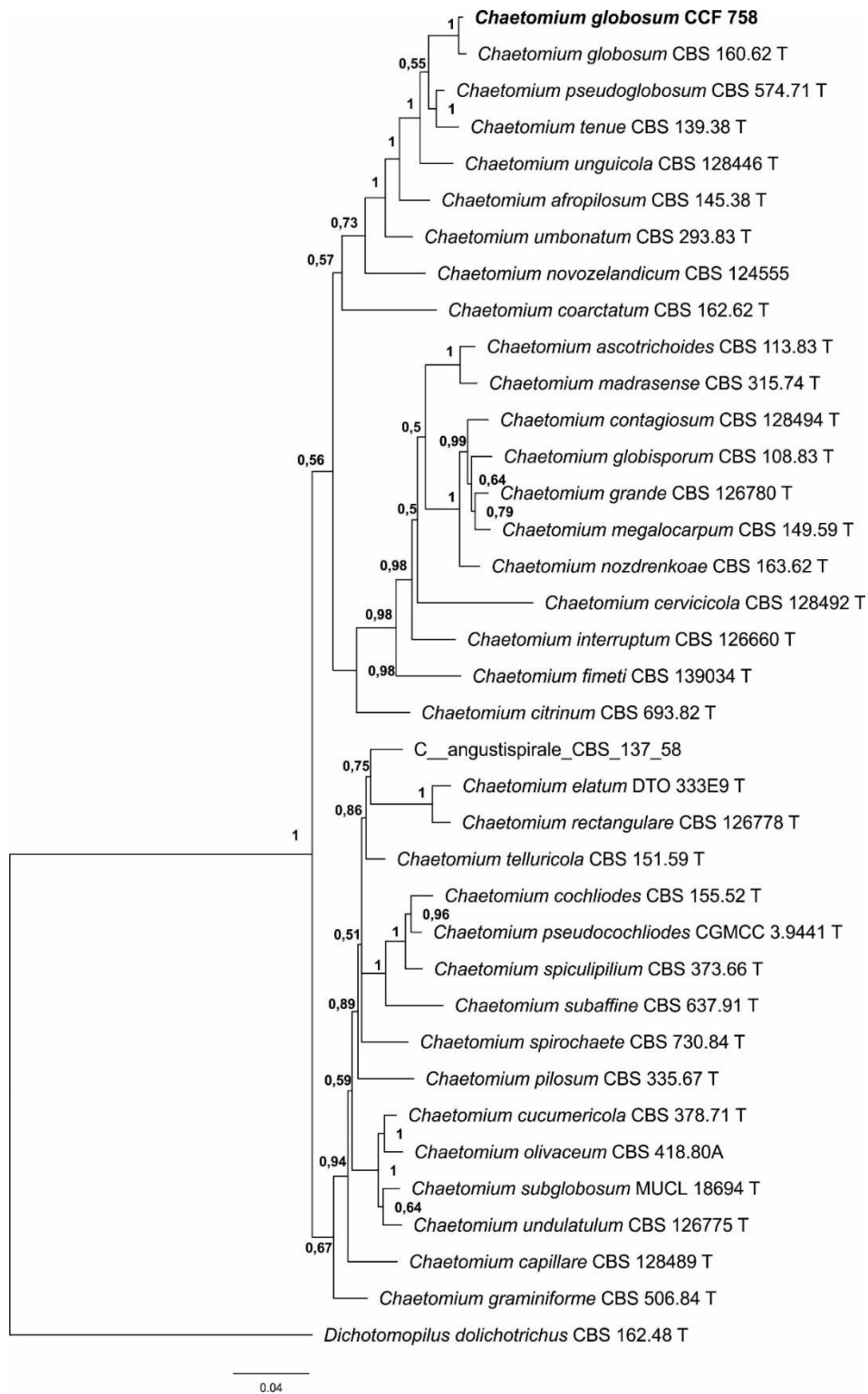
Tabela 4 - Informações sobre os conjuntos de dados de cada grupo na análise filogenética

Partição	<i>Chaetomium</i>			<i>Dichotomopilus</i>			<i>F. oxysporum</i>			<i>F. sacchari</i>		
	NI	T	MM	NI	T	MM	NI	T	MM	NI	T	MM
ITS	37	563	GTR	23	566	HKY	-	-	-	-	-	-
			+I+G			+I+G						
rpb2	37	597	GTR	27	565	HKY	-	-	-	-	-	-
			+I+G			+I+G						
tef1-a	-	-	-	-	-	-	51	619	HKY	80	701	GTR+I +G
tub2	37	733	HKY	27	716	HKY +I+G	-	-	-	-	-	-

NI= número de isolados; T= tamanho da sequência; MM= melhor modelo de substituição de nucleotídeos.

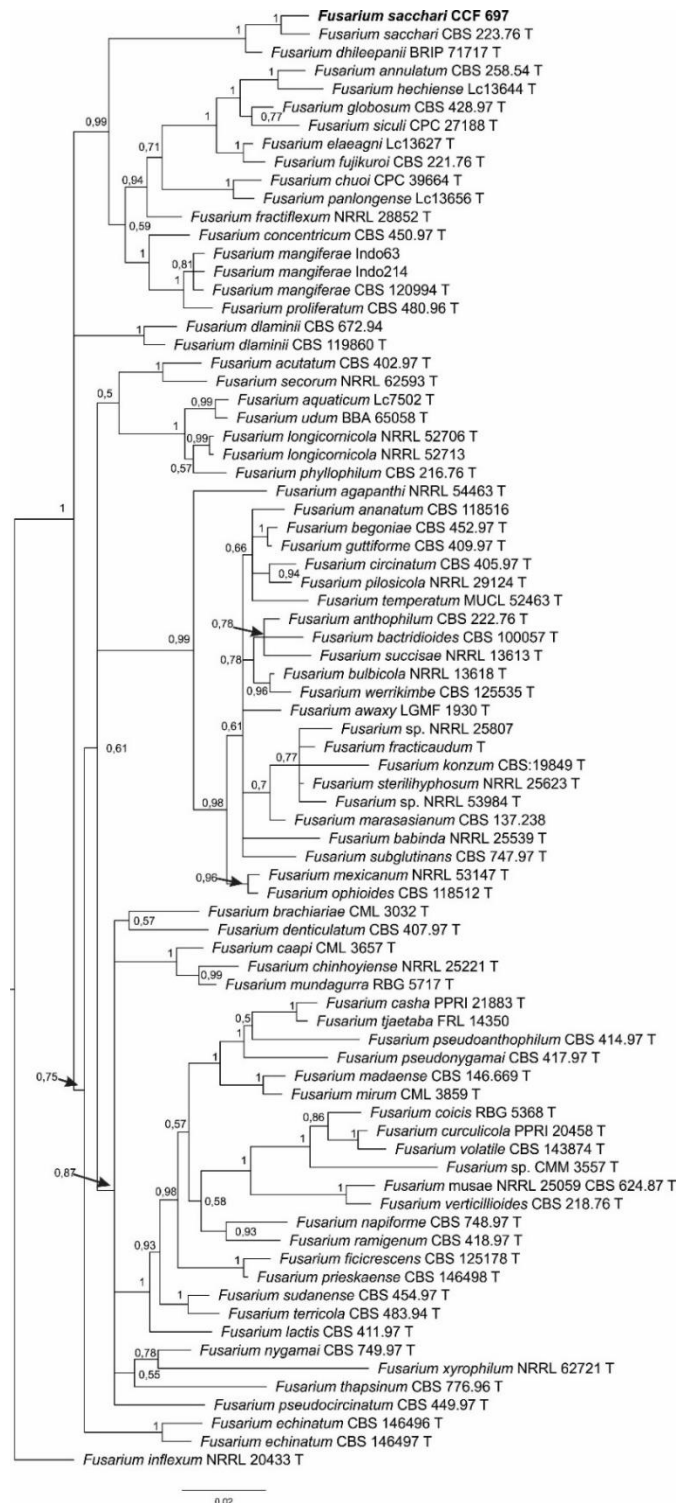
De acordo com a análise filogenética obtida pelo método de Inferência Bayesiana, o isolado CCF 758 pertence a espécie *Chaetomium globosum* (**Figura 2**). Os isolados CCF 754, CCF 755, CCF 756 e CCF 757 pertencem ao gênero *Dichotomopilus* (**Figura 3**). Os isolados CCF 754, CCF 755, CCF 756 formaram um clado próximo as espécies *Dichotomopilus erectus*, *Dichotomopilus pseudoerectus* e *Dichotomopilus ramosissimus*, e provavelmente pertencem a uma espécie nova. Já o isolado CCF 757 agrupou com a espécie *Dichotomopilus variostiolatus*. Os isolados pertencentes ao gênero *Fusarium* CCF 697 e CCF 750 são representantes dos complexos de espécies *Fusarium fujikuroi* (**Figura 4**) e do complexo de espécies *Fusarium oxysporum* (**Figura 5**), respectivamente. O isolado *Fusarium* CCF 697 agrupou com a espécie *Fusarium sacchari*, no complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. Já o isolado *Fusarium* CCF 750 agrupou com a espécie *Fusarium triseptatum* dentro do complexo de espécies *Fusarium oxysporum*.

Figura 2 - Árvore filogenética concatenada baseada em sequências das regiões ITS, *rpb2* e *tub2* de representantes do gênero *Chaetomium*



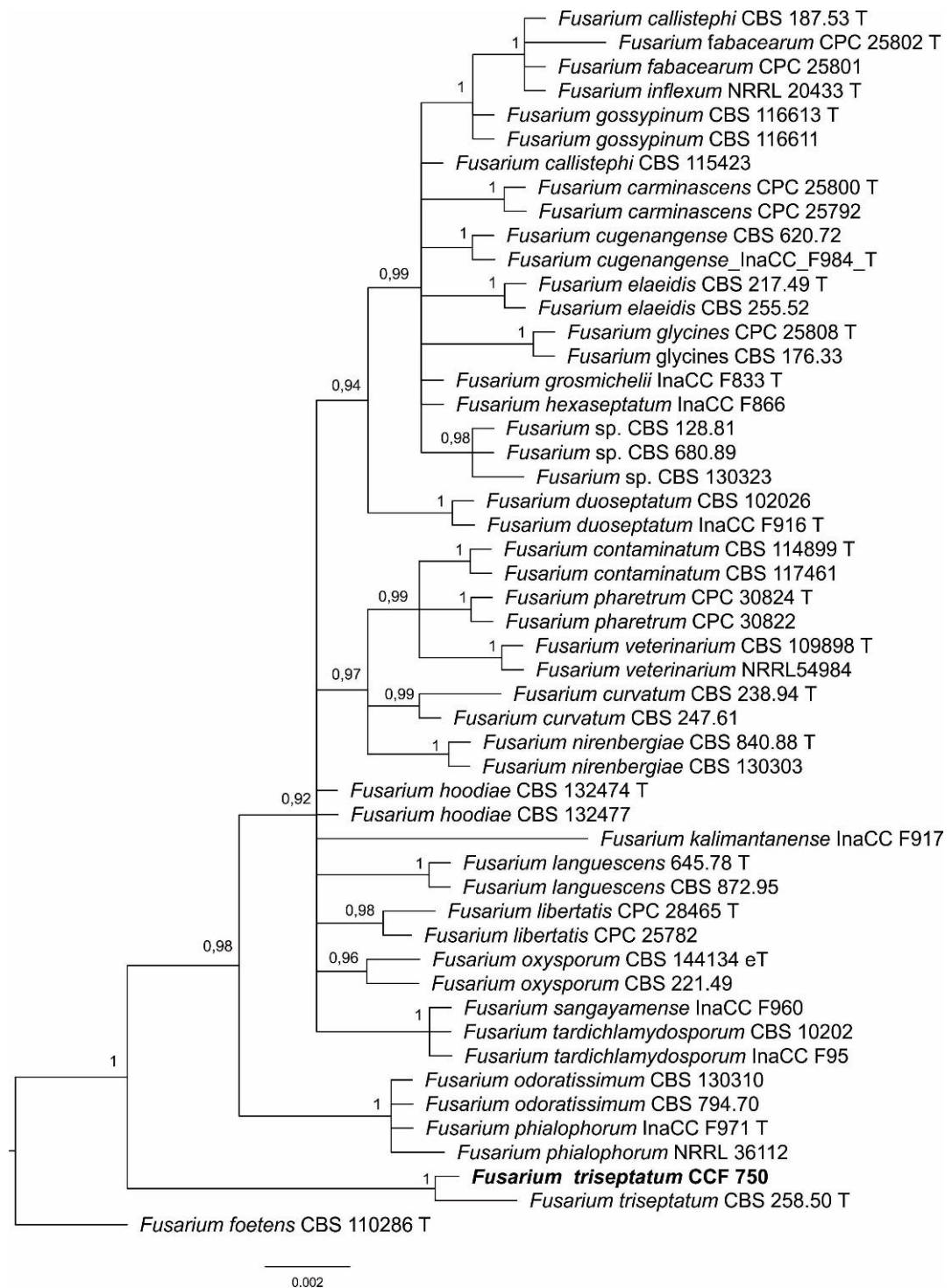
Os valores de probabilidade posterior da Inferência Bayesiana estão indicados acima dos nós. O isolado obtido neste trabalho está grafado em negrito. O isolado ex-tipo de *Dichotomopilus dolichotrichus* CBS 162.48 foi utilizado como grupo externo.

Figura 4 - Árvore filogenética baseada em sequências da região *tef1-α* de representantes do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*



Os valores de probabilidade posterior da Inferência Bayesiana estão indicados acima dos nós. O isolado obtido neste trabalho está grafado em negrito. O isolado ex-tipo de *Fusarium inflexum* NRRL 20433 foi utilizado como grupo externo.

Figura 5 - Árvore filogenética baseada em sequências da região *tef1-α* de representantes do complexo de espécies *Fusarium oxysporum*

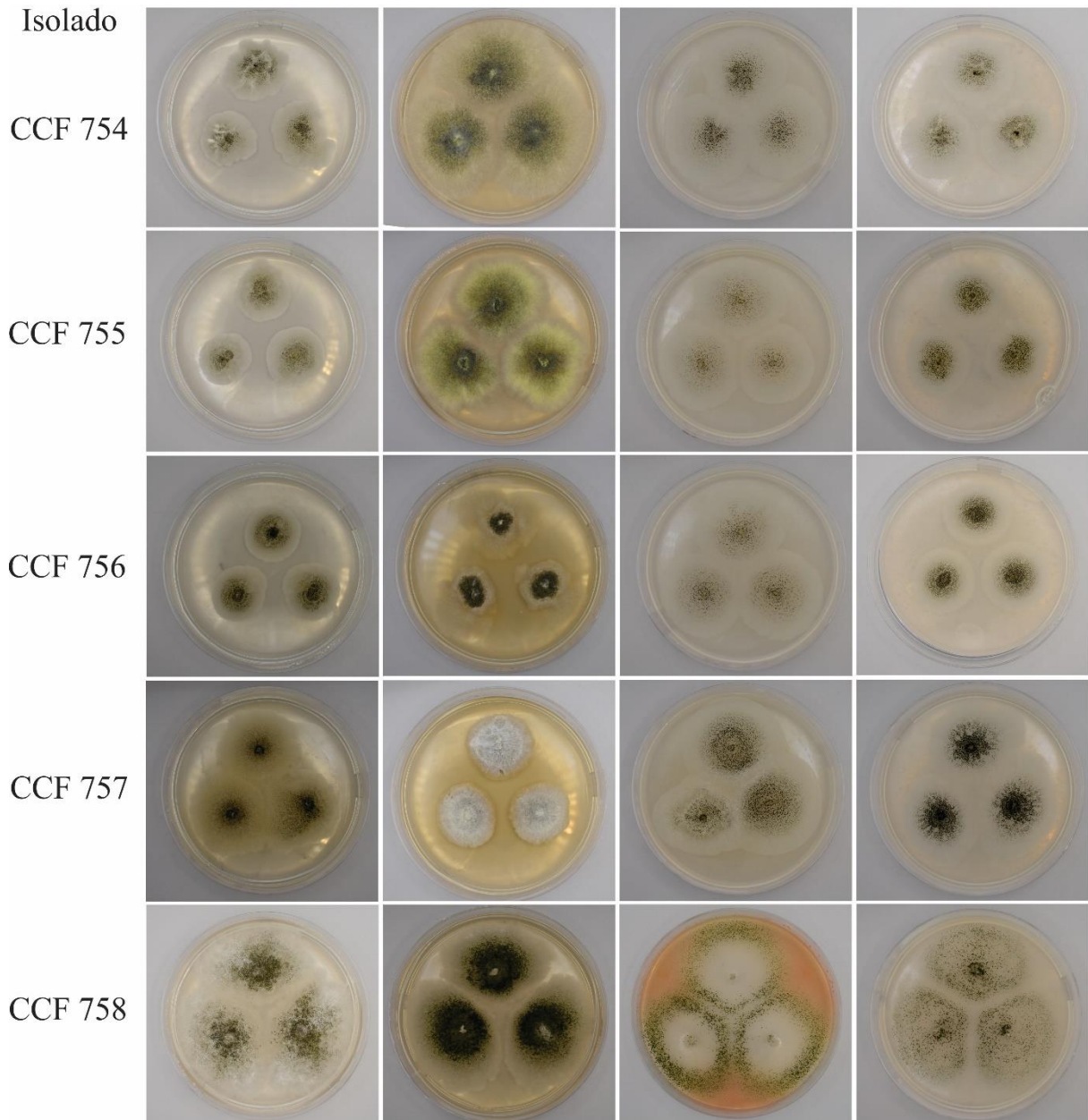


Os valores de probabilidade posterior da Inferência Bayesiana estão indicados acima dos nós. O isolado obtido neste trabalho está grafado em negrito. O isolado ex-tipo de *Fusarium foetens* CBS 110286 foi utilizado como grupo externo.

3.3. Taxonomia

Dichotomopilus sp. nov. (Figuras 6 e 7)

Figura 6 – Morfologia da colônia de *Dichotomopilus* sp. nov. (A-C), *Dichotomopilus variostiolatus* CCF 757 (D) e *Chaetomium globosum* CCF 758 (E) após 7 dias de cultivo



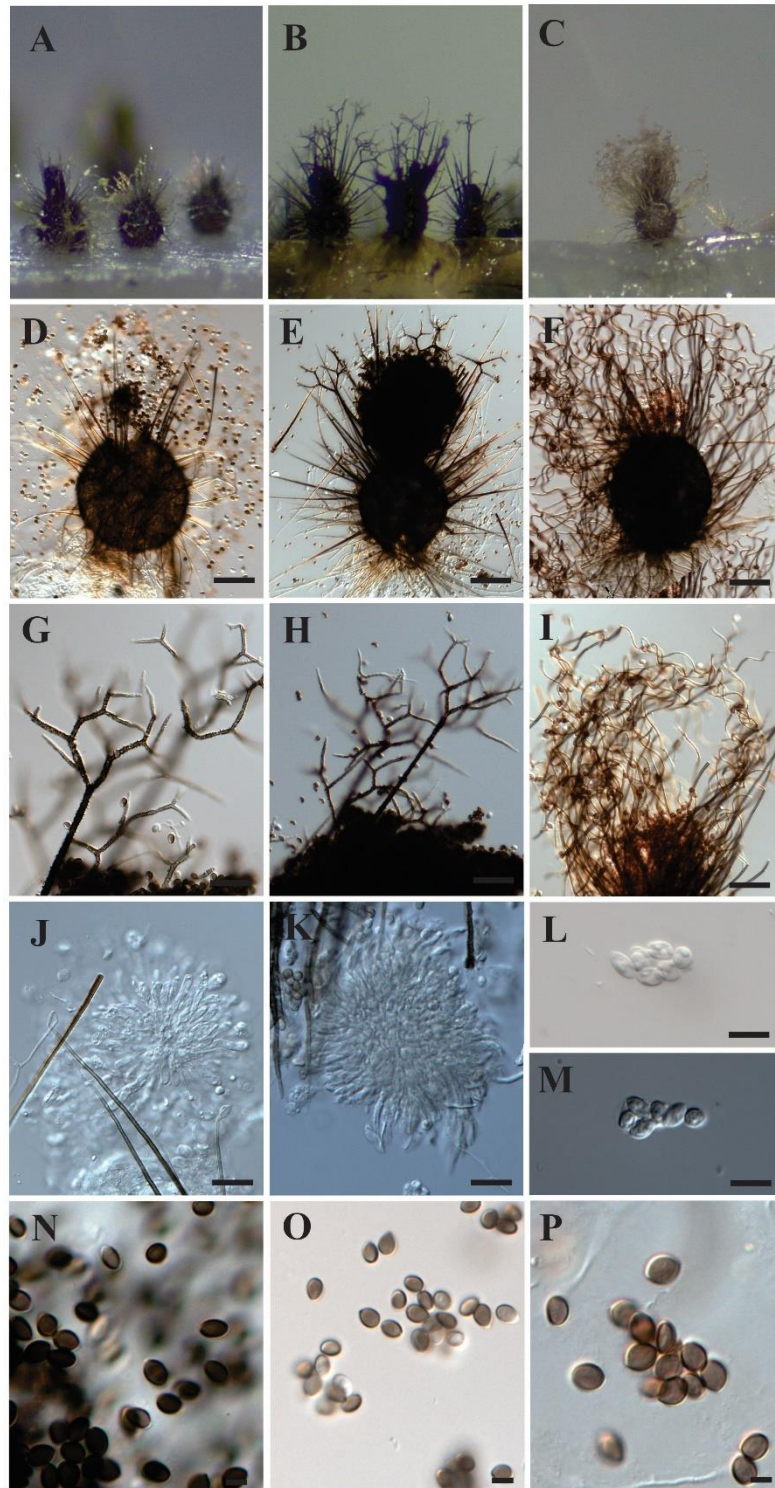
Dichotomopilus sp. nov. CCF 754, *Dichotomopilus* sp. nov. CCF 755, *Dichotomopilus* sp. nov. CCF 756, *Dichotomopilus variostiolatus* CCF 757 e *Chaetomium globosum* CCF 758, cultivados em diferentes meios. Os meios de cultivo utilizados da esquerda para a direita: CMA, MEA, OA, PCA.

***Dichotomopilus* sp. nov. CCF 756 (a ser proposto como holótipo).**

Características da colônia aos 7 dias (Figura 6): Em CMA apresenta borda inteira a levemente ondulada, com 39-60 mm de diâmetro, translúcida, sem hifas aéreas, reverso translúcido próximo a borda e oliváceos no centro da colônia, sem produção de exsudato. Em MEA borda inteira a fimbriada, 43-62 mm de diâmetro, translúcida, hifas aéreas brancas em forma de teia de aranha, reverso translúcido na borda e marrom oliváceos no centro. Em OA borda inteira a levemente ondulada, 41-58 mm de diâmetro, translúcida, sem hifas aéreas, sem produção de exsudatos, reverso translúcido. Em PCA borda inteira a levemente ondulada, 47-62 mm de diâmetro, translúcida, sem hifas aéreas, sem produção de exsudatos, reverso translúcido.

Características microscópicas (Figura 7): Em OA produz *ascoma* superficial, ostiolado, oliváceos, globoso a subgloboso, (71,5-) 78,5-130,5 μm comprimento e (71,5-) 75-121 (-126) μm diâmetro. Parede do *ascoma* marrom composta por células irregulares. *Apêndices* terminais marrons, verruculosos, irregulares com ramificações dicotômicas, com diâmetro próximo a base 3-6 (-6,5) μm . *Asca* fasciculada, com 8 ascósporos em arranjo irregular, bitunicada, 15-24 μm de comprimento e 8,8-15,5 μm de diâmetro. *Ascósporos* oliváceos a acastanhados, oval, 5,5-7 μm de comprimento e 3,7-5,5 μm de diâmetro, possui poro germinativo na extremidade.

Figura 7 - Estruturas reprodutivas de isolados de Chaetomiaceae obtidos neste trabalho



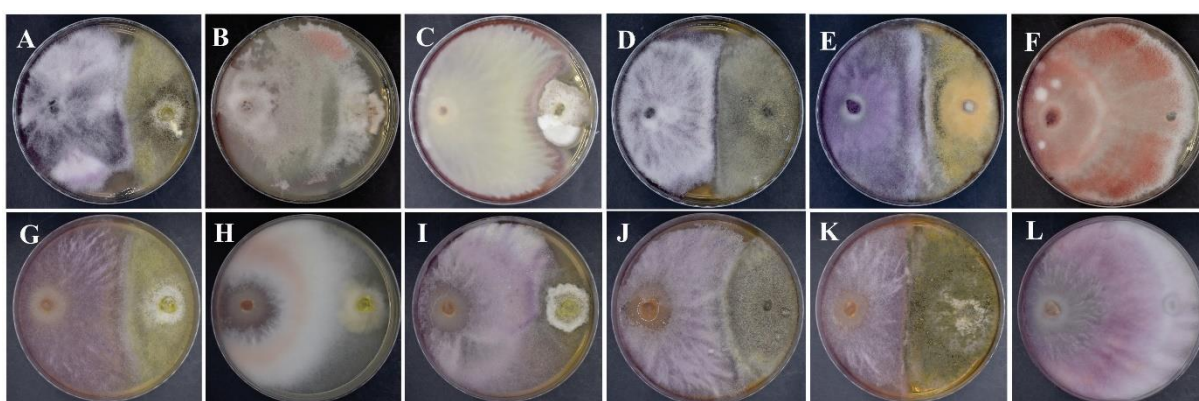
(A-C) Ascoma maduro em OA de *Dichotomopilus* sp. nov. CCF 756, *Dichotomopilus variostiolatus* CCF 757 e *Chaetomium globosum* CCF 758, respectivamente. (D-F) Ascoma de *Dichotomopilus* sp. nov. CCF 755, *Dichotomopilus variostiolatus* CCF 757 e *Chaetomium globosum* CCF 758, respectivamente. (G-I) Apêndices terminais de *Dichotomopilus* sp. nov. CCF 755, *Dichotomopilus variostiolatus* CCF 757 e *Chaetomium globosum* CCF 758, respectivamente. (J e L) Ascas de *Dichotomopilus* sp. nov. CCF 755, (K e M) Ascas de *Dichotomopilus variostiolatus* CCF 757, respectivamente. (N-P) Ascósporos de *Dichotomopilus* sp. nov. CCF

755, *Dichotomopilus variostiolatus* CCF 757 e *Chaetomium globosum* CCF 758, respectivamente. Barra de escala (D-M) = 20 μm , (N-P) = 10 μm .

3.4. Teste de antagonismo

De acordo com os testes de antagonismo realizados, alguns isolados apresentam antagonismo contra *Foc* e *F. sacchari* *in vitro* (**Figura 8**). Os isolados *Dichotomopilus* sp. nov. CCF 754, *Dichotomopilus* sp. nov. CCF 757 e *Chaetomium globosum* CCF 758 apresentaram as maiores taxas de inibição (**Tabela 5**).

Figura 8 – Teste de antagonismo entre isolados de Chaetomiaceae e os patógenos *Foc* CCF 750 (A-F) e *F. sacchari* CCF 697 (G-L)



Teste contra *Foc*: (A) *Dichotomopilus* sp. nov. CCF 754, (B) *Dichotomopilus* sp. nov. CCF 755, (C) *Dichotomopilus* sp. nov. CCF 756, (D) *Chaetomium globosum* CCF 758, (E) *Dichotomopilus variostiolatus* CCF 757 e (F) *Foc* CCF 750, placa controle; Teste contra *F. sacchari*: (G) *Dichotomopilus* sp. nov. CCF 754, (H) *Dichotomopilus* sp. nov. CCF 755, (I) *Dichotomopilus* sp. nov. CCF 756, (J) *Chaetomium globosum* CCF 758, (K) *Dichotomopilus variostiolatus* CCF 757 e (L) *F. sacchari* CCF 697, placa controle.

Tabela 5 – Potencial antagônico de isolados de Chaetomiaceae contra *Foc* CCF 750 e *F. sacchari* CCF 697 *in vitro*

Isolados	% inibição de <i>Foc</i> CCF 750	% inibição de <i>F. sacchari</i> CCF 697
CCF 754	51,4 ^a	48,6 ^a
CCF 755	36,4 ^{ab}	-
CCF 756	32,1 ^b	17,9 ^b
CCF 757	44,3 ^{ab}	43,3 ^a
CCF 758	40,7 ^{ab}	40,7 ^a

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

Os isolados CCF 754, CCF 755 e CCF 756 foram agrupados em um clado próximo as espécies *D. erectus*, *D. pseudoerectus* e *D. ramosissimus*, tanto na análise filogenética individual quanto na análise combinada das regiões gênicas *rpb2* e *tub2*. Por outro lado, o isolado CCF 757 agrupou com o isolado de referência (ex-tipo) de *D. variostiolatus* CBS 179.84 apenas na análise individual de *tub2* e na combinação das três regiões. Isso pode ter ocorrido porque *D. variostiolatus* está incluso no complexo de espécies *D. funicula* (WANG *et al.*, 2016a), e na análise filogenética individual das regiões ITS e *rpb2* o isolado CCF 757 agrupou com outras espécies dentro do complexo.

As análises morfológicas mostram que, os isolados de Chaetomiaceae apresentam as características típicas dos membros desta família (WANG *et al.*, 2016a; WANG *et al.*, 2016b; WANG *et al.*, 2022). *Dichotomopilus variostiolatus* CCF 757 diferiu na morfologia da colônia, mas apresenta características microscópicas semelhantes ao isolado ex-tipo de *D. variostiolatus* CBS 179.84. O isolado *Chaetomium globosum* CCF 758 apresenta características semelhantes às do isolado ex-tipo *Chaetomium globosum* CBS 160.62 como a coloração e forma da colônia, formato e comprimento dos ascomata, asca e ascósporos. Os isolados de *Dichotomopilus* sp. nov. apresentam características semelhantes às das espécies próximas, entretanto, algumas características como o formato do ascoma que é mais globoso do que o produzido pelas espécies *D. erectus*, *D. pseudoerectus* e *D. ramosissimus*.

Esse é o primeiro relato de representantes de *Dichotomopilus* no Brasil. Por outro lado, *Chaetomium globosum* já foi relatado em diferentes espécies de plantas, tais como *Lycopersicon esculentum* Mill, *Piper nigrum* L., *Ricinus communis* L., *Saccharum officinarum* L. (MENDES; URBEN, 2023), mas ainda não havia relatos deste gênero associado a bananeira no Brasil. O gênero *Fusarium* já é relatado em uma ampla gama de hospedeiros (MENDES; URBEN, 2023), e esses fungos podem ser patogênicos ou não-patogênicos (CARMONA *et al.*, 2020).

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* faz parte do complexo de espécies *Fusarium oxysporum* (FOSC) que incluem espécies relacionadas com a murcha vascular em diferentes culturas agrônomicas, e a *formae speciales* é uma denominação dada de acordo com uma especialização fisiológica do isolado quanto a capacidade de causar doença em hospedeiro específico (EDEL-HERMANN; LECOMTE, 2019). No entanto, todas as espécies dentro do complexo FOSC encontradas associadas a doença no centro de origem da bananeira são relatadas como agentes causais do mal-do-Panamá (MARIANY *et al.*, 2019). *Fusarium sacchari* é membro do

complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC) que incluem espécies patogênicas de importantes culturas agrônômicas como a cana-de-açúcar (BAO *et al.*, 2022), arroz (CEN *et al.*, 2020), entre outras.

Neste trabalho, relatamos pela primeira vez um isolado da espécie *F. sacchari* causando sintomas de murcha vascular em bananeira no Brasil. No Brasil, *Fusarium sacchari* já foi relatado em *Ananas comosus* e *Saccharum officinarum* (MENDES; URNBEN, 2023), é um patógeno que causa podridão do caule e deformação da parte aérea da planta (NORDAHLIAWATE *et al.*, 2008). *Fusarium sacchari* já foi relatado em bananeiras sintomáticas em países como a Indonésia (MARYANI *et al.*, 2019) e Malásia (UJAT *et al.*, 2021), no entanto, não são patogênicos na variedade Cavendish (MARYANI *et al.*, 2019; UJAT *et al.*, 2021).

No presente trabalho, os isolados de Chaetomiaceae foram testados em ensaios *in vitro* contra Foc e *F. sacchari*, fitopatógenos que causam a fusariose na bananeira. Os isolados *Dichotomopilus* sp. nov. CCF 754, *Dichotomopilus variostiolatus* CCF 757 e *Chaetomium globosum* CCF 758 apresentam potencial de antagonismo *in vitro* contra Foc e *Fusarium sacchari*. Fungos da família Chaetomiaceae já são relatados como agentes de controle biológico de fitopatógenos (ZHAO *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019). A espécie *Chaetomium globosum* produz substâncias que atuam na inibição do crescimento de fungos (ZHAO *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019), todavia, o gênero *Dichotomopilus* ainda não é estudado como agente de controle biológico.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho relatamos pela primeira vez o gênero *Dichotomopilus* no Brasil e de *Chaetomium globosum* associado aos tecidos da bananeira. Os isolados *Dichotomopilus* CCF 754, *Dichotomopilus* CCF 755 e *Dichotomopilus* CCF 756 constituem uma nova espécie do gênero *Dichotomopilus*, a ser proposta. Além disso, a espécie *Fusarium sacchari* também é relatada pela primeira vez associada a fusariose da bananeira no Brasil.

Os isolados de Chaetomiaceae endofíticos de raízes de bananeira apresentam potencial de antagonismo *in vitro* contra Foc e *F. sacchari*, patógenos que causam a fusariose na bananeira. Estudos *in vivo* podem contribuir para entender como esses fungos endofíticos atuam na inibição desses fitopatógenos e na redução da incidência da doença.

REFERÊNCIAS

- BAO, Y.; AKBAR, S.; YAO, W.; XU, Y.; XU, J.; POWELL, C. A.; ... ZHANG, M. Genetic diversity and pathogenicity of *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC) causing sugarcane pokkah boeng disease in China. **Plant Disease**, n. ja, 2022.
- CARMONA, S. L.; BURBANO-DAVID, D.; GÓMEZ, M. R.; LOPEZ, W.; CEBALLOS, N.; CASTAÑO-ZAPATA, J.; ... SOTO-SUÁREZ, M. Characterization of pathogenic and non-pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates associated with commercial tomato crops in the Andean region of Colombia. **Pathogens**, v. 9, n. 1, p.70, 2020.
- CEN, Y. K.; LIN, J. G.; WANG, Y. L.; WANG, J. Y.; LIU, Z. Q.; ZHENG, Y. G. The gibberellin producer *Fusarium fujikuroi*: Methods and technologies in the current toolkit. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 232, 2020.
- COLLADO, J.; PLATAS, G.; PAULUS, B.; BILLS, G. F. Cultivo de alto rendimento de fungos de serapilheira por uma técnica de diluição para extinção. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 60, p. 521–533, 2007. doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00294.x
- CUSTÓDIO, F.A., BROMMONSCHENKEL, T.C., SILVA, A.D.A. et al. *Colletotrichum pereskiae* sp. nov. causing anthracnose on *Pereskia aculeata* in Brazil. **Mycol Progress**, v. 20, 1583–1593, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11557-021-01758-w>
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Basic plant pathology methods. Boca Raton: CRC Press, 1995.
- EDEL-HERMANN, V.; LECOMTE, Charline. Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. **Phytopathology**, v. 109, n. 4, p. 512-530, 2019.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v.32, n.1, p.1792–1797, 2004.
- FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Disponível em: <<https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>>. Acesso em: 01 de fevereiro de 2023.
- HAL, T. BioEdit v7.0.9: Biological sequence alignment editor for Win95/98/2K/XP/7, 2012. <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit.html>.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547, 2018.
- MARYANI, N.; LOMBARD, L.; POERBA, Y. S.; SUBANDIYAH, S.; CROUS, P. W.; KEMA, G. H. J. Phylogeny and genetic diversity of the banana *Fusarium* wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. **Studies in Mycology**, v. 92, n. 1, p. 155-194, 2019.

MARYANI, N.; SANDOVAL-DENIS, M.; LOMBARD, L.; CROUS, P. W.; KEMA, G. H. J. New endemic *Fusarium* species hitch-hiking with pathogenic *Fusarium* strains causing Panama disease in small-holder banana plots in Indonesia. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 43, n. 1, p. 48-69, 2019.

MENDES, M. A. S.; URBEN, A. F.; Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp>. Acesso em: 25/1/2023.

MILLER, M.A.; SCHWARTZ, T.; PICKETT, B.E.; HE, S.; KLEM, E.B.; SCHEUERMANN, R.H.; PASSAROTTI, M.; KAUFMAN, S.; O'LEARY, M.A. A RESTful API for access to phylogenetic tools via the CIPRES science gateway. **Evolutionary Bioinformatics**, v.11, n.1, p.43–48, 2015.

NORDAHLIAWATE, M. S.; IZZATI, M. Z.; AZMI, A. R.; SALLEH, B. Distribution, Morphological Characterization and Pathogenicity of *Fusarium sacchari* Associated with Pokkah Boeng Disease of Sugarcane in Peninsular Malaysia. **Pertanika. Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 31, n. 2, 2008.

PEREIRA, O.L; ZAMBOLIM, L. Isolamento de fungos. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W.C.; PEREIRA, O. L. O essencial da Fitopatologia. Suprema Gráfica e Editora Ltda., Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora Ltda, 2012. p. 253-286.

PINHO, D. B.; FIRMINO, A. L.; FERREIRA-JUNIOR, W. G.; PEREIRA, O. L. An efficient protocol for DNA extraction from Meliolales and the description of *Meliola centellae* sp. nov. **Mycotaxon**, v. 122, n.1, p.333-345, 2013.

RAHAYU, G., SURONO, OCTAVIANI, D. A. Antagonistic capacity of dark septate endophytes (DSE) against *Ganoderma boninense* from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) IOP Conf. Ser.: **Earth Environmental Sciences**, 2021. 948 012074

UJAT, A. H.; VADAMALAI, G.; HATTORI, Y.; NAKASHIMA, C.; WONG, C. K. F.; ZULPERI, D. Current classification and diversity of *Fusarium* species complex, the causal pathogen of *Fusarium* wilt disease of banana in Malaysia. **Agronomy**, v. 11, 10, 2021, 1955.

WANG, X. W.; HAN, P. J.; BAI, F. Y.; LUO, A.; BENSCH, K.; MEIJER, M.; ... HOUBRAKEN, J. Taxonomy, phylogeny and identification of Chaetomiaceae with emphasis on thermophilic species. **Studies in Mycology**, v. 101, n. 1, p. 121-243, 2022.

WANG, Z.; XUE, R.; CUI, J.; WANG, J.; FAN, W.; ZHANG, H.; ZHAN, X. Antibacterial activity of a polysaccharide produced from *Chaetomium globosum* CGMCC 6882. **International Journal of Biological Macromolecules**, 125, 376-382, 2019.

WANG, X.W.; HOUBRAKEN, J.; GROENEWALD, J.Z.; MEIJER, M.; ANDERSEN, B.; NIELSEN, K.F.; CROUS, P.W.; SAMSON, R.A. Diversity and taxonomy of *Chaetomium* and chaetomium-like fungi from indoor environments. **Studies in Mycology**, v. 84, pg. 145-224, 2016a, ISSN 0166-0616, <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.11.005>.

WANG XW, LOMBARD L, GROENEWALD JZ, LI J, VIDEIRA SI, SAMSON RA, LIU XZ, CROUS PW. Phylogenetic reassessment of the *Chaetomium globosum* species complex. **Persoonia**. v. 36, p. 83-133, 2016b. doi: 10.3767/003158516X689657

YAN, W.; CAO, L. L.; ZHANG, Y. Y.; ZHAO, R.; ZHAO, S. S.; KHAN, B.; YE, Y. H. New metabolites from endophytic fungus *Chaetomium globosum* CDW7. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2873, 2018.

YAKTI, W.; KOVÁCS, G. M.; FRANKEN, P. Differential interaction of the dark septate endophyte *Cadophora* sp. and fungal pathogens in vitro and in planta, **FEMS Microbiology Ecology**, v. 95, 2019. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz164>

ZHAO, S. S.; ZHANG, Y. Y.; YAN, W.; CAO, L. L.; XIAO, Y.; YE, Y. H. *Chaetomium globosum* CDW7, a potential biological control strain and its antifungal metabolites. **Microbiology Letters**, v. 364, n. 3, p. fnw287, 2017.

CAPÍTULO 2

Fungos endofíticos do tipo *Dark Septate Endophytes* associados ao sistema radicular de *Musa* sp. e seu potencial de antagonismo contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* e *Fusarium sacchari*

RESUMO

SANTANA, Jaciara dos Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Fungos endofíticos do tipo *Dark Septate Endophytes* associados ao sistema radicular de *Musa* sp. e seu potencial de antagonismo contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e *Fusarium sacchari*.** Orientador: Olinto Liparini Pereira. Coorientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya.

Os Dark septate endophytes (DSE) são fungos colonizadores de raízes e podem ser encontrados em associação com diversas espécies de plantas. Dentre os DSE podem ser encontrados fungos do gênero *Codinaea*, que pertencem a família Chaetophariaceae e apresentam características morfológicas como conídios setulados e hialinos. Muitos DSE vêm sendo estudados como agentes de controle biológico e promotores de crescimento vegetal. Este trabalho teve como objetivo identificar com base em análises morfológicas e filogenéticas, isolados DSE com características de *Codinaea* obtidos de raízes de bananeira, e avaliar a capacidade antagonista dos isolados contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e *Fusarium sacchari* *in vitro*. Os fungos foram isolados de raízes de bananeiras vigorosas de uma área de alta incidência de fusariose pelo método de cultivo por extinção e filtração de partículas. Após a obtenção dos isolados foram realizadas análises morfológica e molecular para identificação completa dos fungos. As regiões ITS e *tefl-α* foram utilizadas para a amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase e análise filogenética. Os isolados foram submetidos a testes de antagonismo contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e *Fusarium sacchari*. Foram isolados 507 fungos de raízes de bananeira, e desses, três (CCF 751, CCF 752 e CCF753) apresentavam características morfológicas típicas do gênero *Codinaea*. De acordo com a análise filogenética os isolados CCF 751, CCF 752 e CCF753 compõem uma espécie nova do gênero *Codinaea*, e agruparam próximo a espécie *Codinaea fertilis*. Os testes de antagonismos mostraram que os isolados CCF 751, CCF 752 e CCF753 podem inibir em até 56% *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e até 61% *Fusarium sacchari* *in vitro*. Neste trabalho foi relatada pela primeira vez a uma espécie de *Codinaea* associada aos tecidos da bananeira, e os isolados CCF 751, CCF 752 e CCF753 de *Codinaea* sp. nov. apresentam potencial de inibição contra os fitopatógenos causadores da fusariose na bananeira.

Palavras-chave: *Codinaea*. DSE. Fusariose.

ABSTRACT

SANTANA, Jaciara dos Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2023. **Endophytic fungi of the Dark Septate Endophytes type associated with the root system of *Musa* sp. and its antagonism potential against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* and *Fusarium sacchari*.** Orientador: Olinto Liparini Pereira. Coorientador: Maria Catarina Megumi Kasuya.

Dark septate endophytes (DSE) are root-colonizing fungi and can be found in association with several plant species. Among the DSE fungi of the genus *Codinaea* can be found, which belong to the Chaetophariaceae family and have morphological characteristics such as setulate and hyaline conidia. Many DSE have been studied as biological control agents and plant growth promoters. This work aimed to identify, based on morphological and phylogenetic analyses, DSE isolates with characteristics of *Codinaea* obtained from banana tree roots, and to evaluate the antagonist capacity of the isolates against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* and *Fusarium sacchari* *in vitro*. The fungi were isolated from vigorous banana roots from an area of high incidence of fusariosis by the extinction culture and particle filtration method. After obtaining the isolates, morphological and molecular analyzes were performed for complete identification of the fungi. The ITS and *tefl-a* regions were used for Polymerase Chain Reaction amplification and phylogenetic analysis. The isolates were submitted to antagonism tests against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* and *Fusarium sacchari*. A total of 507 fungi were isolated from banana tree roots, and of these, three (CCF 751, CCF 752 and CCF753) had typical morphological characteristics of the genus *Codinaea*. According to the phylogenetic analysis, the isolates CCF 751, CCF 752 and CCF753 compose a new species of the genus *Codinaea*, and grouped close to the species *Codinaea fertilis*. Antagonism tests showed that isolates CCF 751, CCF 752 and CCF753 can inhibit by up to 56% *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* and up to 61% *Fusarium sacchari* *in vitro*. In this work, a species of *Codinaea* associated with banana tissues was reported for the first time, and the isolates CCF 751, CCF 752 and CCF753 of *Codinaea* sp. nov. present inhibition potential against phytopathogens that cause fusariosis in banana.

Keywords: *Codinaea*. DSE. Fusariosis.

1. INTRODUÇÃO

Dark Septate Endophytes (DSE) são fungos endofíticos colonizadores de raízes que apresentam hifas septadas, com coloração que varia entre cinza escuro, marrom escuro e preto, além de, na maioria dos casos, produzirem microescleródios (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998; FORS *et al.*, 2020). Os DSE vêm sendo relatados em culturas agrícolas, tais como o arroz, cana-de-açúcar, milho, entre outras (YAKTI *et al.*, 2018; FORS *et al.*, 2020; HARSONOWATI *et al.*, 2020). Este grupo de fungos endofíticos podem viver como biotróficos facultativos, colonizando desde os tecidos vasculares até o córtex da planta hospedeira (RODRIGUEZ *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2018; FORS *et al.*, 2020).

Entre os DSE podem ser encontrados alguns fungos representantes do gênero *Codinaea* ou fungos similares, chamados de *Codinaea*-like. O gênero *Codinaea* e similares são fungos hifomicetos que apresentam conidiogênese fialídica, cujo conídios são hialinos, falcados e podem apresentar ou não sétulas (apêndices) quando cultivados *in vitro* (RÉBLOVÁ *et al.*, 2021; WU; DIAO, 2022). Estes fungos pertencem a família Chaetosphaeriaceae (RÉBLOVÁ *et al.*, 1999) e tem uma ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrados em regiões de clima seco, temperado ou tropical (GRANADOS *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2016; RÉBLOVÁ *et al.*, 2021; WU; DIAO, 2022). O gênero *Codinaea* foi descrito pela primeira vez em 1937 na Espanha por Maire, e desde então mais de 50 espécies já foram relatadas em diferentes países como, por exemplo, o Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2016; RÉBLOVÁ *et al.*, 2021), Costa Rica (GRANADOS *et al.*, 2014), França (RÉBLOVÁ *et al.*, 2020), China (WU; DIAO, 2022).

O gênero *Codinaea*, por muito tempo, foi considerado polifilético devido às características morfológicas compartilhadas por grupos similares (RÉBLOVÁ *et al.*, 2021). Nos últimos anos, diferentes trabalhos utilizando análises filogenéticas vêm redefinindo a taxonomia do gênero, com novas combinações e renomeações de táxons que foram inicialmente considerados *Codinaea* (RÉBLOVÁ; WINKA, 2000; RÉBLOVÁ *et al.*, 2020; RÉBLOVÁ *et al.*, 2021; WU; DIAO, 2022). Dessa forma, muitos outros gêneros foram propostos para alocar os fungos com características morfológicas similares ao gênero *Codinaea*, mas que são filogeneticamente diferentes, e *Codinaea* passou a ser considerado um gênero monofilético (RÉBLOVÁ *et al.*, 2021; WU; DIAO, 2022).

Os fungos endofíticos, incluindo os DSE, vêm sendo estudados com perspectivas de utilização no controle de pragas e doenças de plantas (KHASTINI *et al.*, 2014; Yakti *et al.*,

2018; YAKTI *et al.*, 2019; HARSONOWATI *et al.*, 2020; TCHAMGOUE *et al.*, 2020), promoção do crescimento vegetal (LI *et al.*, 2018; YAKTI *et al.*, 2019) contribuindo para redução do uso de agrotóxicos e fertilizantes químicos no meio ambiente. Os fungos endofíticos possuem potencial para o controle de doenças de plantas em culturas agrícolas de grande importância socioeconômica como na cultura da bananeira. Fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Rigidiporus* isolados de tecidos da bananeira apresentaram potencial para controle *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e redução da incidência do mal-do-Panamá (SAVANI *et al.*, 2021).

Fungos do gênero *Codinaea* são relatados como endofíticos de plantas (RÉBLOVÁ *et al.*, 2021). Entretanto, não existem estudos utilizando espécies de *Codinaea* como agente de controle biológico de doenças de plantas. A busca por agentes de controle biológico é uma boa alternativa e se faz necessária em casos como o de doenças como o mal-do-Panamá, visto que estratégias de controle da doença como o controle químico, normalmente não são eficazes ou satisfatórios (PLOETZ, 2015a) e o melhoramento genético é dependente da aceitação do mercado para a implementação e comercialização de novas cultivares (ORDONEZ *et al.*, 2015; PLOETZ *et al.*, 2015b). Desse modo, o presente estudo teve como objetivo identificar com base em análises morfológicas e filogenéticas, isolados DSE com características de *Codinaea* obtidos de raízes de bananeira, e avaliar a capacidade antagonista dos isolados contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e *Fusarium sacchari* *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta das amostras e isolamento

Amostras de raízes de bananeiras vigorosas foram coletadas em dezembro de 2021, em uma fazenda produtora de banana com alta incidência de mal-do-Panamá que pertencia ao grupo Sítio Barreiras Ltda, no município de Itinga do Maranhão, estado do Maranhão, Brasil. Os fungos foram isolados pelo método de cultivo por extinção e filtração de partículas descrito por Collado *et al.* (2007) com modificações, como descrito a seguir. As amostras de raízes foram lavadas em água corrente, desinfestadas em álcool 70% (1 min) e hipoclorito (3 min), enxaguadas em água autoclavada (1 min) e trituradas em liquidificador contendo 300 mL de solução salina 0,85%. Após trituração, as partículas foram filtradas com o auxílio de três peneiras de diferentes aberturas (mesh) 32, 65 e 150, utilizando apenas as partículas retidas na peneira de mesh 150. Após a filtração, as partículas foram centrifugadas duas vezes por 5 minutos a 4000 g, descartando o sobrenadante e adicionando carboximetil celulose (CMC) e centrfu-

gando a terceira vez por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, as partículas foram resuspendidas em CMC e foram realizadas diluições de 1:2 até 1:16. Para o plaqueamento foram utilizados 150 µl de cada diluição em placas de Petri contendo meio de cultivo Extrato de malte e extrato de levedura (YMC) g/L: (13 g extrato de malte, 10 g extrato de levedura, 3 g de ágar); foram feitas 5 replicatas para cada diluição mais o controle plaqueado com a água da última lavagem das raízes. As placas foram incubadas a 25 °C e os fungos foram sendo periodicamente repicados para placas de Petri contendo meio de cultivo Potato Dextrose Agar (PDA) (Sigma-Aldrich, Espanha) conforme a observação do crescimento durante quatro semanas. Para obtenção da cultura pura, os fungos foram cultivados em meio Ágar-água a 2% (WA; Himedia tipo I) (DHINGRA; SINCLAIR, 1995) por 24h, em seguida fragmentos de pontas de hifas foram transferidos para placas contendo meio de cultivo PDA.

Os isolados obtidos neste trabalho foram depositados na Coleção de Culturas Fúngicas do Laboratório de Micologia e Etiologia de Doenças Fúngicas de Plantas.

Os isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* e *Fusarium sacchari* utilizados nos testes de antibiose foram provenientes do isolamento indireto realizado a partir das amostras de bananeiras com sintomas do mal-do-Panamá, conforme descrito no capítulo 1.

2.2. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído a partir do micélio fúngico dos isolados crescidos em placas de Petri contendo meio PDA (Sigma-Aldrich, Espanha) com membrana celofane por 7 dias no escuro. Após o período de incubação, o micélio crescido sobre o celofane foi removido e transferido para microtubos de 2,0 mL contendo 600 µl de Nuclei Lysis Solution – Wizard Genomic DNA Extraction Kit (Promega), 100 µl de Polivinilpirrolidona (PVP, Sigma-Aldrich), e quatro esferas de aço. Em seguida as amostras foram misturadas e trituradas no disruptor de células e tecidos L-BEADER 6 (Loccus Biotecnologia) por 60 segundos a 4 000 rpms. Após a etapa de maceração, a extração de DNA foi realizada de acordo com a metodologia descrito por Pinho et al. (2013).

A região ITS e o gene *tefl-α* (**Tabela 1**) foram amplificados por Polymerase Chain Reaction (PCR), a reação de PCR foi preparada utilizando 18 µl de Platinum® PCR SuperMix, 0,4 µL de cada primer forward e reverse a 10 µM sintetizado pela Invitrogen (Carlsbad, EUA), 1,2 µL de DNA genômico (25 ng/µL). As temperaturas de desnaturação e anelamento foram definidas de acordo com as especificações do fabricante da Platinum® PCR SuperMix e cada primer usado. Um termociclador foi utilizado para incubar as reações com temperatura inicial

de desnaturação 94 °C por 2 minutos e 35 ciclos desnaturante a 94 °C por 30 segundos, anelamento (ITS 49 °C; *tef1-α* 56 °C) por 30 segundos, e extensão a 72 °C 90 segundos. Em seguida, os produtos da PCR foram corados com GelRed (Biotium Inc.) e a análise foi realizada por eletroforese em géis de agarose 2%, por 45 min, a 80 V em tampão Tris-acetato-EDTA 1 ×. Para a visualização, verificação da pureza e tamanho dos fragmentos após amplificação utilizou-se luz UV. A purificação e sequenciamento dos produtos da PCR foram realizados pela MacroGen Inc., Coreia do Sul.

Tabela 1. Primers utilizados para amplificação e sequenciamento do DNA de isolados de *Codinaea*

Locus	Primer	Sequência 5'-3'
ITS	ITS5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G
	LR6	CGC CAG TTC TGC TTA CC
<i>tef1-α</i>	EF1-983F	GCY CCY GGH CAY CGT GAY TTY AT
	EF1-2218R	ATG ACA CCR ACR GCR ACR GTY TG

2.3. Análises Filogenéticas

As sequências foram visualizadas no BioEdit v 7.0.9 software system (HALL, 2012) para controle da qualidade e formação do contig. Em seguida, as sequências obtidas no presente estudo, foram comparadas com sequências depositadas no GenBank utilizando o software Mega Blast. As sequências geradas no presente estudo foram alinhadas com sequências de espécies representantes do gênero *Codinaea* (**Tabela 2**) depositadas no GenBank, utilizando o algoritmo MUSCLE® (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation; EDGAR, 2004), realizado no programa MEGA X (KUMAR *et al.* 2018), utilizando os parâmetros padrão. Os alinhamentos foram verificados e ajustes manuais foram feitos quando necessário. A ausência de alguns loci no alinhamento concatenado foi tratada como dado perdido. o melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi determinado para cada gene pelo MrModeltest v. 2.3 (POSADA; BUCKLEY, 2004), de acordo com o Akaike Information Criterion (AIC). Foram realizadas análises filogenéticas por Inferência Bayesiana usando o método da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) analisando as regiões individuais e concatenadas (ITS e *tef1-α*).

As análises filogenéticas por Inferência Bayesiana foram realizadas no portal CIPRES Science Gateway V. 3.3 (MILLER *et al.* 2015), utilizando o software MrBayes v. 3.2.6 (RONQUIST; HUELSENBECK 2003). No MrBayes, os dados foram particionados por locus, e os

parâmetros dos modelos de substituição de nucleotídeos para cada partição foram definidos conforme descrito acima. Foram realizadas simultaneamente. Quatro cadeias MCMC foram executadas simultaneamente em cada execução, começando de árvores aleatórias por 10.000.000 gerações. As árvores foram amostradas a cada 1.000 gerações, totalizando 20.002 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas na fase de queima de cada análise. Probabilidades posteriores (RANNALA; YANG, 1996) foram determinadas a partir de uma árvore de consenso de regra de maioria gerada com as árvores remanescentes. As árvores geradas foram visualizadas no aplicativo FigTree v.1.4.4, e posteriormente editadas em programas gráficos. As árvores foram enraizadas com o isolado ex-tipo *Nimesporella capillacea* IMI 358908.

2.4. Análise morfológica

A caracterização morfológica dos isolados de *Codinaea* foi realizada conforme Reblová et al. (2021). Os isolados foram cultivados por 28 dias a 25 °C no escuro em quatro meios de cultivo para a visualização e análise de estruturas reprodutivas: Oatmeal Agar (OA), Potato Carrot Agar (PCA) e Modified Leonian's agar (MLA), cornmeal dextrose agar (CMD), synthetic nutrient agar (SNA) com acícula de pinho. Após o cultivo, as estruturas fúngicas foram transferidas para lâminas contendo uma gota de lactoglicerol, cobertas por lamínulas e levadas ao microscópio Olympus BX53 equipado com câmera digital Olympus Q-Color5™ para observação e obtenção de imagens. Foram realizadas medições do diâmetro das hifas, diâmetro e comprimento dos conidióforos, célula conidiogênica, colarete, conídios e comprimento da sé-tula. A mensuração foi realizada para cada 30 estruturas reprodutivas de cada isolado utilizando o software Olympus cellSens Dimension 1.9.

2.5. Teste de antagonismo

Os isolados foram investigados quanto a capacidade de antibiose contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e *Fusarium sacchari* seguindo a metodologia descrita por Yakti et al. (2019), com modificações. Os isolados foram cultivados por 10 dias em meio de cultivo BDA (Sigma-Aldrich, Espanha), posteriormente, discos de micélio dos isolados de DSE de aproximadamente 5 mm de diâmetro foram transferidos 7 dias antes do patógeno para placas de Petri contendo BDA e incubados a 25 °C. Os isolados de DSE e os fitopatógenos foram dispostos em lados opostos da placa com distância de 5 cm entre os discos de micélio. O controle foi realizado cultivando cada fitopatógeno em cultura pura com distância de 1,5 cm da borda da placa. Cada isolado consistiu de 01 tratamento contendo 4 repetições. O teste foi realizado 3 vezes. A avaliação da inibição foi realizada após o patógeno crescer em toda a placa controle. Após a avaliação da inibição, os fitopatógenos foram transferidos para placas de Petri contendo

meio de cultivo PDA para avaliar a viabilidade. A porcentagem de inibição foi determinada seguindo fórmula utilizada por (LA SPADA *et al.*, 2020) como descrito a seguir:

$$\text{PIMG} = \frac{R1-R2}{R1} \times 100\%$$

Onde:

PICM = Porcentagem de inibição do crescimento micelial

R1 = Raio da colônia de *Foc* ou *F. sacchari* na placa controle

R2 = Raio da colônia de *Foc* or *F. sacchari* em direção ao fungo endofítico

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro replicatas para cada tratamento. A análise dos dados foi realizada por meio da Análise de variância ANOVA, e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 2 – Número de acesso GenBank das sequências de representantes de *Codinaea* e *Nimesporella capillacea* (grupo externo) utilizados na análise filogenética

Taxon	Número de acesso	Origem	Número de acesso GenBank		Referência
			ITS	TEF	
<i>Codinaea amazonensis</i>	MUCL 4117	Brasil	OL654076	OL653996	Réblová et al., 2021.
<i>Codinaea assamica</i>	CBS 139907T	Malásia	OL654077	OL653997	Réblová et al., 2021.
<i>Codinaea dwaya</i>	CBS 261.77 T	Índia	OL654078	OL653998	Réblová et al., 2021.
<i>Codinaea fertilis</i>	CBS 242.66	Bananeira, Guadalupe	OL654079	OL653999	Réblová et al., 2021.
<i>Codinaea fertilis</i>	IMI 233824	Nova Zelândia	OL654080	OL654000	Réblová et al., 2021.
<i>Codinaea gonytrichodes</i>	CBS 593.93	Japão	AF178556	OL654001	Réblová et al., 2021.
<i>Codinaea paniculata</i>	CBS 145098 T	Folhas secas, França	MT118230	OL654002	Réblová et al., 2021.
<i>Codinaea paniculata</i>	CBS 126573	França	MT118231	OL654003	Réblová et al., 2021.
<i>Codinaea phasma</i>	CBS 147516 T	Porto Rico	OL654081	OL654006	Réblová et al., 2021.
<i>Codinaea pandanicola</i>	KUMCC 16-0153		MH388338	MH388373	Réblová et al., 2021.
<i>Codinaea ellipsoidea</i>	MFLU 18-1612		NR_168798	MN194080	Réblová et al., 2021.
<i>Codinaea lignicola</i>	MFLU 18-1613		NR_168799	MN194081	Réblová et al., 2021.
<i>Codinaea terminalis</i>	MFLU 19-0214		NR_166297		Réblová et al., 2021.

<i>Codinaea vermispota</i>	YMF1.4260		MK165444		Réblová et al., 2021.
<i>Codinaea siamensis</i>	CBS 194.96	Papua Nova Guiné	OL654082	OL654007	Réblová et al., 2021.
<i>Codinaea siamensis</i>	MFLUCC:15-0614		KX609955		WU e DIAO, 2022
<i>Codinaea clavatophora</i>	NN047943	Serrapilheira, China	OL627680		WU e DIAO, 2022
<i>Codinaea dinghushanensis</i>	NN054218	Serrapilheira, China	OL627723		WU e DIAO, 2022
<i>Codinaea fanglanii</i>	NN058983	Serrapilheira, China	OL627950		WU e DIAO, 2022
<i>Codinaea kendrickii</i>	NN057551	Folha de bambu em decomposição, China	OL627885		WU e DIAO, 2022
<i>Codinaea latispora</i>	NN077341	Folha de bambu em decomposição, China	OL628329		WU e DIAO, 2022
<i>Codinaea oxenbolliae</i>	NN077595	Serrapilheira, China	OL628418		WU e DIAO, 2022
<i>Codinaea pyriformis</i>	NN045929	Serrapilheira, China	OL627653		WU e DIAO, 2022
<i>Codinaea trisetula</i>	NN044720	Galho em decomposição, China	OL627631		WU e DIAO, 2022
<i>Nimesporella capillacea</i>	IMI 358908 T	Costa do Marfim	OL654114	OL654051	Réblová et al., 2021.

Fonte: Adaptado de WANG et al. (2016a, b)

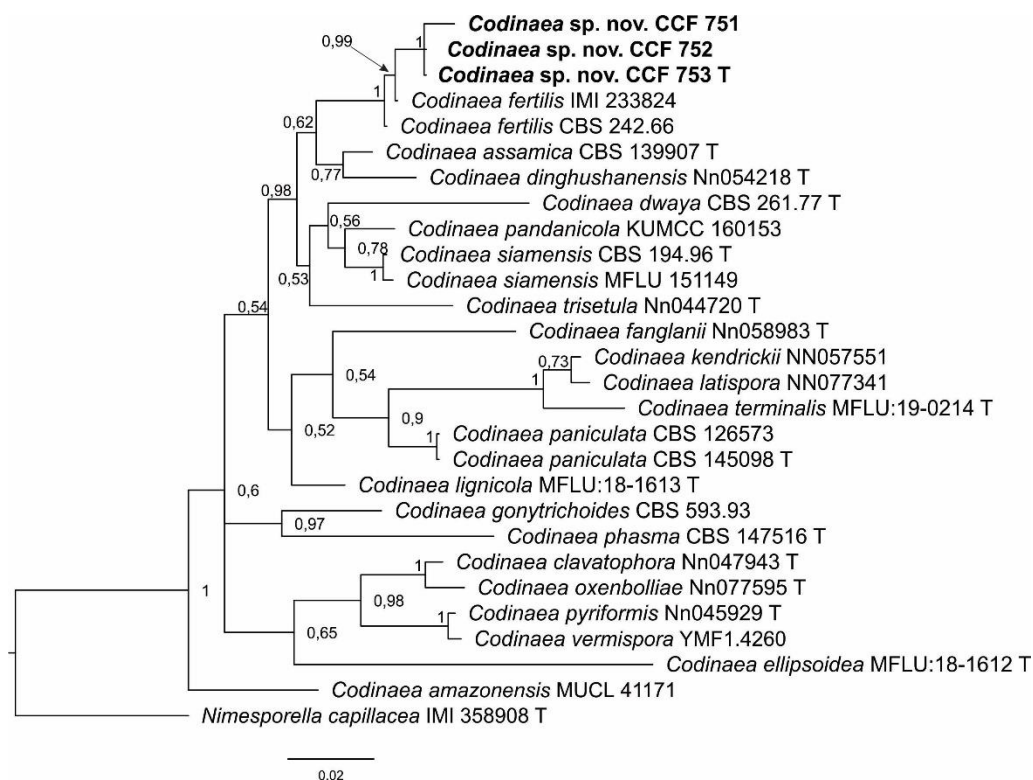
3. RESULTADOS

Foram isolados 507 fungos de raízes de bananeiras vigorosas em uma área de alta incidência de fusariose. Desses 507, três foram identificados com características típicas do gênero *Codinaea*.

O conjunto de dados individual e combinados das regiões ITS e *tef1-α* foram utilizados para a análise filogenética. O conjunto de dados concatenado continha 29 isolados de espécies representativas do gênero *Codinaea* e 2048 caracteres, dos quais 517 pertenciam a região ITS e 934 pertenciam ao *tef1-α*. Da região ITS, 371 sítios eram conservados, 125 variáveis e 76 informativos para parcimônia. Já para a região *tef1-α*, 742 sítios eram conservados, 189 variáveis e 105 informativos para parcimônia. O Tempo Geral Reversível (GTR+I+G) foi o melhor modelo de substituição de nucleotídeos selecionado para a Inferência Bayesiana nas duas partições.

De acordo com as análises filogenéticas realizadas por Inferência, os isolados CCF 751, CCF 752 e CCF 753 pertencem ao gênero *Codinaea*. Os três isolados se agruparam formando um clado distinto, com elevado suporte filogenético, representando uma possível espécie nova (Figura 1).

Figura 1 – Árvore filogenética baseada em sequências das regiões ITS e *tef1-α* de espécies do gênero *Codinaea*



Os valores de probabilidade posterior estão indicados próximo aos nós. Os isolados obtidos neste trabalho estão grafados em negrito. O isolado ex-tipo *Nimesporella capilaceae* IMI 358908 foi utilizado como grupo externo.

3.1. Taxonomia

***Codinaea* sp. nov. (Figura 2 e 3)**

Figura 2 – Características culturais (cor e forma) dos três isolados de *Codinaea* sp. nov. após 28 dias de cultivo em CMD, MLA, AO e PCA



Isolados de *Codinaea* sp. nov cultivados nos meios da esquerda para direita: CMD, MLA, OA, PCA.

Características da cultura:

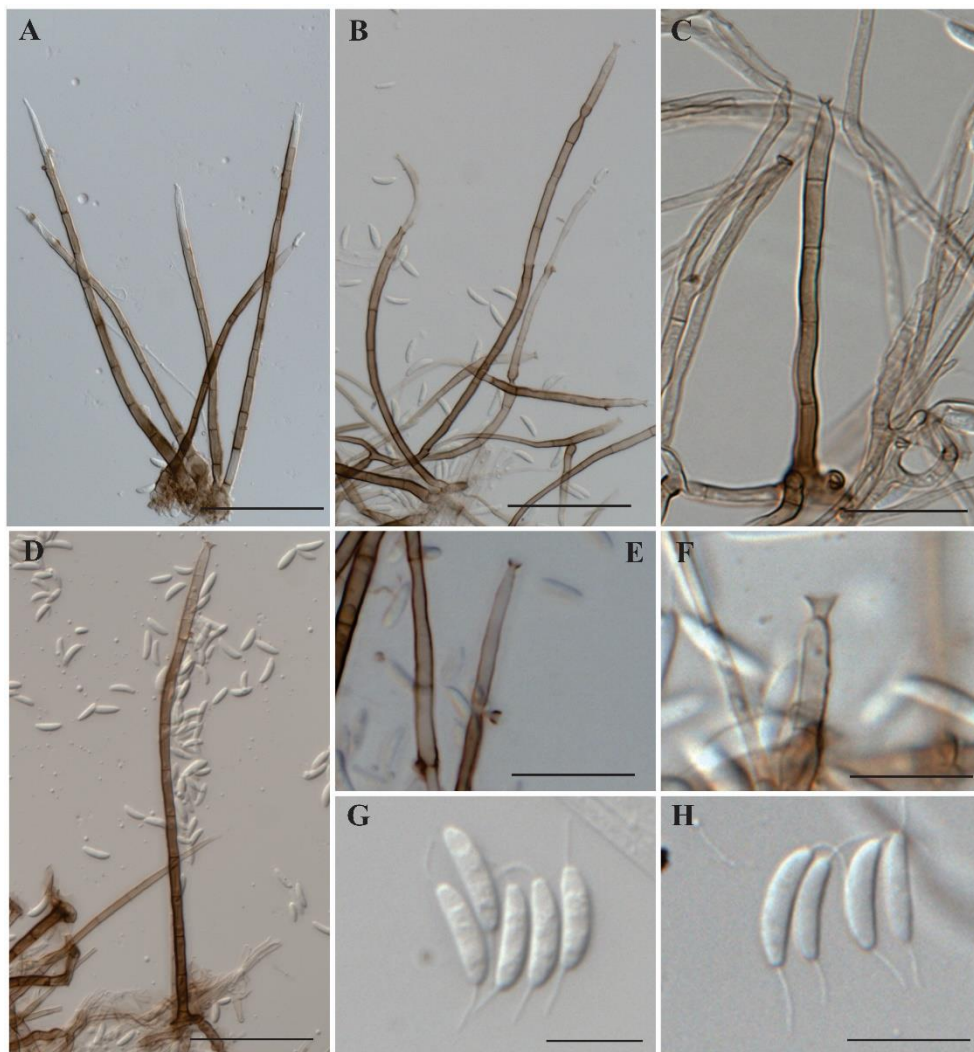
***Codinaea* sp. nov. CCF 753 (a ser proposto como holótipo)**

A cultura crescida em CMD apresenta 41-46 mm de diâmetro, circular, com exudatos escuros, cinza oliva, reverso da mesma cor; em MLA 55-57 mm de diâmetro, circular, plana, lisa, branca, mesma cor no reverso; em OA 51-60 mm circular, plana, cinza, reverso da mesma cor; em PCA 58-62 mm circular, plana, forma um anel mais escuro em volta do disco de micélio, cinza do anel em direção as bordas, bordas cinza escuro, reverso da mesma cor. Os isolados apresentaram maior esporulação em PCA e OA, moderada em CMD e baixa em MLA (Figura 2).

Características microscópicas (colônia crescida em CMD):

Micélio composto por hifas ramificadas hialinas a amarronzadas, septadas, com 2,59-4,86 μm diâmetro. *Conidióforos* macromentosos, retos ou flexuosos, septados, possuem de 5-22 células, com comprimento (36-) 55-235 (-327) e diâmetro 2,2-5,9 μm próximo a base. *Células conidiogênicas* mono ou polifialídicas, terminais ou em aberturas laterais direto na parede das células, (15-) 17,7-47,7 (-49) x (2,8) 3-4,7 (5,2-) μm afunilando para (1,2-) 1,45-2,9 (-3,2) μm na base do *colarete*. *Colaretes* castanhos com 1,45-2,90 (3,93-) x 2-4,4 μm de diâmetro, caliciforme. *Conídios* hialinos, falcados a alantóides, comprimento 10,89-14,97 μm e 2,49-3,93 μm de diâmetro, com presença de sétula apical e basal, hialinas, curva e raramente retas nas extremidades com 3,2-8 (-9,5) μm de comprimento (Figura 3).

Figura 3 – Estruturas reprodutivas de *Codinaea* sp. nov. em CMD

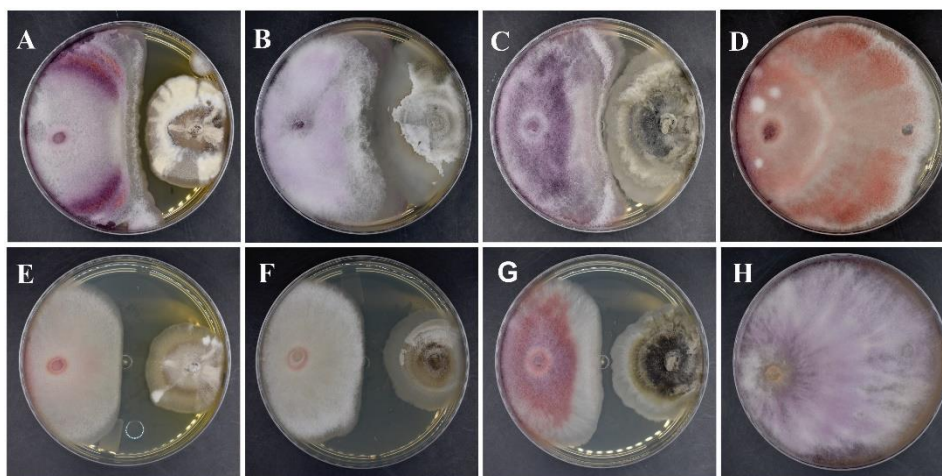


(A) Seta com conidióforos; (B-D) Conidióforos; (E-F) Célula conidiogênica com colarete; (G-H) Conídios. Barra de escala = 20 μm (A-F e H), (G) = 10 μm .

3.2. Teste de antagonismo

Os isolados testados apresentaram potencial antagônico contra Foc e *F. sacchari* (Figura 4). O isolado *Codinaea* sp. nov. CCF 751 foi o que apresentou maior taxa de inibição do Foc com média de 56,15% comparado ao controle, já o isolado *Codinaea* sp. nov. CCF 753 foi o que apresentou maior inibição do crescimento micelial de *F. sacchari*, com taxa de inibição de 61,15%, no entanto, não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos (Tabela 3).

Figura 4 – Isolados de *Codinaea* sp. nov. testados contra Foc CCF 750 e *F. sacchari* CCF 697



Teste contra Foc CCF 750 (A-D) – (A) CCF 751, (B) CCF 752, (C) CCF 753 e (D) CCF 750; teste contra *F. sacchari* CCF 697 – (E) CCF 751, (F) CCF 752, (G) CCF 753 e (H) CCF 697.

Tabela 3 – Potencial antagônico dos isolados endofíticos CCF 751, CCF 752 e CCF 753 do gênero *Codinaea* contra Foc CCF 750 e *F. sacchari* CCF 697 *in vitro*

Isolados	% inibição de Foc CCF 750	% inibição de <i>F. sacchari</i> CCF 697
CCF 751	56,15 ^a	56,15 ^a
CCF 752	53,07 ^a	51,91 ^a
CCF 753	50,00 ^a	61,15 ^a

N/S.

4. DISCUSSÃO

No Brasil já foram relatadas duas espécies de *Codinaea*, a saber: *Codinaea amazonensis*, isolada de folha em decomposição na Mata Avenca-Santa Rita; *Codinaeae fertilis* isolada de folhas em decomposição de plantas da família Marantaceae, entretanto, não há relatos desse

gênero associado a bananeira no país (MENDES; URBEN, 2023). Desse modo, este é primeiro relato de uma espécie de *Codinaea* associada aos tecidos de bananeira no Brasil.

De acordo com as análises filogenéticas, os isolados CCF 751, CCF 752 e CCF 753 constituem uma nova espécie dentro do gênero *Codinaea*, a nova espécie é filogeneticamente próxima a espécie *Codinaea fertilis*. Com base nas sequências obtidas, a região ITS é pouco informativa para separar em nível de espécie, e é mais conservada em relação a região *tefl- α* . As sequências de *tefl- α* dos isolados CCF 751, CCF 752 e CCF 753 apresentavam muitos polimorfismos quando comparadas ao tipo da espécie *C. fertilis*, isso possibilitou a separação em duas espécies diferentes. No presente trabalho, o isolado *C. fertilis* IMI 233824 que anteriormente se agrupava com o isolado de referência da espécie *C. fertilis* CBS 242.66, se diferenciou com um alto valor de suporte filogenético. O isolado *C. fertilis* IMI 233824 apresenta polimorfismos na sequência *tefl- α* quando comparado ao isolado *C. fertilis* CBS 242.66 e, possivelmente, com a adição dos isolados de *Codinaea* sp. nov. eles se separaram na análise filogenética. Novas análises devem ser realizadas para confirmar se é necessária uma nova combinação para o isolado *C. fertilis* IMI 233824.

Alguns caracteres morfológicos presentes nos isolados CCF 751, CCF 752 e CCF 753 diferem daqueles presentes em *C. fertilis* (RÉBLOVÁ *et al.*, 2021), reforçando a futura proposição da nova espécie. Como exemplos podem ser citados o tamanho e forma da colônia nos meios de cultivo CMD, MLA, OA e PCA, produção de exsudato, o colarete caliciforme é mais estreito na base e mais circular na extremidade, diferentemente daqueles produzidos por *C. fertilis* que possuem formato de funil. Recentemente, a espécie *C. fertilis* era considerada integrante do gênero *Dictyochaeta*, mas com trabalhos recentes desenvolvidos com base em morfologia e filogenia, esta espécie foi renomeada passando a fazer parte do gênero *Codinaea*, pois apresenta sétula nos conídios, que é uma das características aceitas recentemente para diferenciar os dois gêneros citados (RÉBLOVÁ *et al.*, 2021).

Codinaea fertilis é relatada causando podridão radicular em *Trifolium repens* L. (MENZIES, 1973), *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris* e *Zea mays* (FARR; ROSSMAN, 2023). *Codinaea fertilis* já foi encontrada em raiz de *Musa* sp., no entanto, não há relatos dessa espécie associada a bananeira no Brasil. Os isolados de *Codinaea* sp. nov. obtidos neste trabalho, portanto, podem ser considerados DSE pois são fungos colonizadores de raiz e que apresentam características típicas deste grupo, como hifas septadas (RODRIGUEZ *et al.*, 2009).

Alguns DSEs dos gêneros *Cadophora* (KHASTINI *et al.*, 2014; YAKTI *et al.*, 2019), *Exophiala* e *Cladophialophora* (HARSONOWATI *et al.*, 2020), já foram estudados quanto a

capacidade inibição de fitopatógenos. Não há relatos de espécies de *Codinaea* sendo estudadas como potenciais agentes de controle biológico de doenças de plantas. Neste trabalho, os isolados de *Codinaea* sp. nov. apresentaram a capacidade de inibição do crescimento micelial dos dois fitopatógenos testados. Os isolados *Codinaea* sp. nov. CCF 751 e *Codinaea* sp. nov. CCF 753 foram os que apresentaram as maiores taxas de inibição contra Foc e *F. sacchari*, respectivamente.

O mecanismo de ação dos isolados de *Codinaea* sp. nov. ainda não foi confirmado, porém, pode ter ocorrido a produção de metabólitos secundários que atuam na redução do crescimento fúngico (KADDES *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2019; MITRA *et al.*, 2023). A redução do crescimento dos patógenos não acarretou na morte deles, pois eles ainda apresentavam crescimento quando transferidos para novas placas de cultivo, como foi observado em ensaios *in vitro* realizado com isolados do gênero *Cadophora* (YAKTI *et al.*, 2019).

5. CONCLUSÕES

No presente trabalho é descrita uma nova espécie do gênero *Codinaea*, colonizadora de raiz de bananeira no Brasil. Além disso, esse é o primeiro relato do gênero *Codinaea* associado a raiz de bananeira no país.

Os isolados de *Codinaea* sp. nov. obtidos neste trabalho apresentam potencial antagonista contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e *Fusarium sacchari*, patógenos que causam a fusariose na bananeira. Entretanto, mais análises como perfil de metabólitos e compostos orgânicos voláteis devem ser realizadas para conhecer/entender o mecanismo de ação deles e verificar se há possibilidade de serem patogênicos para a bananeira.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, M. A.; COSTA, P. M.; MALOSSO, E.; CASTANEDA-RUIZ, R. F. *Codinaea leomaiae* sp. nov. from the Brazilian Atlantic Forest. **Mycotax**, v. 131, n. 2, p. 423-428, 2016.
- COLLADO, J.; PLATAS, G.; PAULUS, B.; BILLS, G. F. Cultivo de alto rendimento de fungos de serapilheira por uma técnica de diluição para extinção. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 60, p. 521–533, 2007. doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00294.x
- CUSTÓDIO, F. A.; BROMMONSCHENKEL, T. C.; SILVA, A. D.; PEREIRA, O. L. *Colletotrichum pereskiae* sp. nov. causing anthracnose on *Pereskia aculeata* in Brazil. **Mycological Progress**, v. 20, p. 1583-1593, 2021.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Métodos básicos de patologia vegetal. **CRC Press**, Boca Raton, Flórida, EUA, 1995.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v.32, n.1, p.1792–1797, 2004.
- FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Disponível em: <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. Acesso em: 19 de janeiro de 2023.
- FORS, R. O.; PATREZE, C. M.; LOURO BERBARA, R. L.; CARBONE CARNEIRO, M. A.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J. Dark septate endophytic fungi associated with sugarcane plants cultivated in São Paulo, Brazil. **Diversity**, v. 12, n. 9, 351, 2020. doi:10.3390/d12090351
- GRANADOS, M.; CASTAÑEDA-RUIZ, R. F.; CASTRO, O.; MINTER, D. W.; KENDRICK, B. Microfungi from Costa Rica. A new species and a new combination in *Codinaea*. **Mycotaxon**, v. 127, n. 1, p. 115-120, 2014.
- HALL, T. BioEdit v7.0.9: Biological sequence alignment editor for Win95/98/2K/XP/7, 2012. <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit.html>.
- HARSONOWATI, W.; MARIAN, M.; SURONO E NARISAWA, K. The effectiveness of a dark septate endofitic fungus, *Cladophialophora chaetospora* sk51, to mitigate strawberry fusarium wilt disease and with growth promotion activities. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 585, 2020. doi: 10.3389/fmicb.2020.00585
- JUMPPONEN, A. R. I.; TRAPPE, James M. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. **The New Phytologist**, v. 140, n. 2, p. 295-310, 1998.
- KADDES, A.; FAUCONNIER, M. L.; SASSI, K.; NASRAOUI, B.; JIJAKLI, M. H. Endophytic fungal volatile compounds as solution for sustainable agriculture. **Molecules**, v. 24, n. 6, 1065, 2019.
- KHASTINI, R. O.; OGAWARA, T.; SATO, Y.; NARISAWA, K. Control of Fusarium wilt in melon by the fungal endophyte, *Cadophora* sp. **European Journal of Plant Pathology**, v. 139, n. 2, p. 339–348, 2014. doi:10.1007/s10658-014-0389-6

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M., KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, v. 35, n. 6, 1547, 2018.

LA SPADA, F.; STRACQUADANIO, C.; RIOLO, M.; PANE, A.; CACCIOLA, S. O. *Trichoderma* counteracts the challenge of *Phytophthora nicotianae* infections on tomato by modulating plant defense mechanisms and the expression of crinkler, necrosis-inducing *Phytophthora* protein 1, and cellulose-binding elicitor lectin pathogenic effectors. **Frontiers in plant science**, v. 11, 583539, 2020.

LI, X.; HE, X.; HOU, L.; REN, Y.; WANG, S.; SU, F. Dark septate endophytes isolated from a xerophyte plant promote the growth of *Ammopiptanthus mongolicus* under 25 drought condition. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018. Doi:10.1038/s41598-018-26183-0

MAIRE, R-C-J-E. Fungi Catalaunici. Series altera. Contribution á l'étude de la flore mycologique de la Catalogne. 1937.

MENZIES, S. A. Root rot of clover caused by *Codinaea fertilis*. **New Zealand journal of agricultural research**, v. 16, n. 2, p. 239-245, 1973.

MILLER, M. A.; SCHWARTZ, T.; PICKETT, B. E.; HE, S.; KLEM, E. B.; SCHEUERMANN, R. H.; ... O'LEARY, M. A. (2015). A RESTful API for access to phylogenetic tools via the CIPRES science gateway. *Evolutionary Bioinformatics*, 11, EBO-S21501.

MITRA, M.; VENKATESH, P.; GHISSING, U.; BISWAS, A.; MITRA, A., MANDAL, M.; ... MAITI, M. K. Fruity-scented antifungal volatiles from endophytic *Geotrichum candidum* PF005: Broad-spectrum bioactivity against stored grain pathogens, mode of action and suitable formulation for mycofumigation. **Biological Control**, v. 177, 105129, 2023.

OLIVEIRA, M. S.; MALOSSO, E.; CASTAÑEDA-RUIZ, R. F. A new species and a new combination in *Codinaea* from Brazil. **Mycotax**, v. 130, n. 4, p. 1045-1049, 2015.

OLIVEIRA, S. A. B. D.; BARBOSA, F. R.; ANDRADE, E. A.; FERRARINI, S. R.; BONALDO, S. M. Compostos voláteis de fungos conidiais sapróbios da Amazônia Meridional no controle *in vitro* de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 45, p. 302-307, 2019.

ORDONEZ, N.; SEIDL, M. F.; WAALWIJK, C.; DRENTH, A.; KILIAN, A.; THOMMA, B. P. H. J.; PLOETZ, R. C.; KEMA, G. H. J. Worse comes to worst: bananas and Panama disease—when plant and pathogen clones meet. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 11, 2015. e1005197. doi:10.1371/journal.ppat.1005197

PLOETZ, R. C. Management of Fusarium wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. **Crop Protection**, v. 73, p. 7-15, 2015.

PLOETZ, R. C., KEMA, G. H., MA, L. J. Impact of diseases on export and smallholder production of banana. **Annual review of phytopathology**, 53, 269-288, 2015.

POSADA, D.; BUCKLEY, T.R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Syst Biol** v. 53, p. 793–808, 2004.

- RANNALA, B.; YANG, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. **J Mol Evol** v. 43, p. 304–311, 1996.
- RÉBLOVÁ, M.; WINKA, K. Phylogeny of Chaetosphaeria and its anamorphs based on morphological and molecular data. **Mycologia**, v. 92, n. 5, p. 939-954, 2000.
- RÉBLOVÁ, M.; KOLAŘÍK, M.; NEKVINDOVÁ, J.; RÉBLOVÁ, K.; SKLENÁŘ, F.; MILLER, A. N.; HERNÁNDEZ-RESTREPO, M. Phylogenetic reassessment, taxonomy, and biogeography of Codinaea and similar Fungi. *Journal of Fungi*, v. 7, n. 12, 1097, 2021.
- RÉBLOVÁ, M.; NEKVINDOVÁ, J.; FOURNIER, J.; MILLER, A. N. Delimitation, new species and teleomorph-anamorph relationships in *Codinaea*, *Dendrophoma*, *Paragaemannomyces* and *Striatosphaeria* (Chaetosphaeriaceae). *MycKeys*, 74, 17.
- RÉBLOVÁ, M.; BARR, M.; SAMUELS, G. Chaetosphaeriaceae, a new family for Chaetosphaeria and its relatives. **Sydowia** v. 51, p. 49–70, 1999.
- RODRIGUEZ, R. J.; WHITE JR, J. F.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v. 182, n. 2, p. 314–330, 2009. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x
- RONQUIST, F.; HEULSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** v. 19, p. 1572– 1574, 2003. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- SAVANI, A. K.; BHATTACHARYYA, A.; BORO, R. C.; DINESH, K.; JC, N. S. Exemplifying endophytes of banana (*Musa paradisiaca*) for their potential role in growth stimulation and management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing panama wilt. **Folia Microbiologica**, v. 66, n. 3, p. 317–330, 2021. doi:10.1007/s12223-021-00853-5
- SOUZA JUNIOR, C. A.; MARCON, J.; ANDRADE, P. A. M.; SILVA, J. A.; FARALDO, M. I. F.; VERDI, M. C. Q.; MELO FILHO, A. A.; AZEVEDO, J. L. Endophytic bacterial and fungi associated to banana leaves (*Musa* spp.) cultivated under organic management. **Journal of Agricultural Science**; v. 10, n. 10, 2018.
- TCHAMGOUE, E. N.; FANCHE, S. A. Y.; NDJAKOU, B. L.; MATEI, F.; NYEGUE, M. A. Diversity of endophytic fungi of *Psidium guajava* (Myrtaceae) and their antagonistic activity against two banana pathogens. **JAMB**, v. 20, n. 11, p. 86-101, 2020.
- WU, Wenping; DIAO, Yongzhao. Anamorphic Chaetosphaeriaceous Fungi from China. **Fungal Diversity**, 2022.
- YAKTI, W.; KOVÁCS, G. M.; FRANKEN, P. Differential interaction of the dark septate endophyte *Cadophora* sp. and fungal pathogens in vitro and in planta, **FEMS Microbiology Ecology**, v. 95, 2019. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz164>
- YAKTI, W.; KOVÁCS, G. M.; VÁGI, P.; FRANKEN, P. Impact of dark septate endophytes on tomato growth and nutrient uptake, **Plant Ecology & Diversity**, v. 11, n. 5-6, p. 637-648, 2018. DOI: 10.1080/17550874.2019.1610912

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho relatamos pela primeira vez o gênero *Dichotomopilus* e duas espécies novas associadas aos tecidos da bananeira no Brasil. Os fungos endofíticos da bananeira ainda são pouco conhecidos, aqui relatamos alguns representantes de duas famílias: Chaetomiaceae e Chaetosphaeriaceae.

A fusariose da bananeira pode ser causada por isolados do complexo de espécies *Fusarium oxysporum* e por um representante do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. Os sintomas são similares, e está é primeira vez que um representante do complexo de espécies *F. fujikuroi* é relatado causando fusariose em bananeiras no Brasil. Mais de um patógeno causando a doença pode dificultar as estratégias de controle. Por outro lado, a bananeira abriga fungos endofíticos dos gêneros *Codinaea*, *Chaetomium* e *Dichotomopilus* que apresentam potencial para controlar os fitopatógenos responsáveis pela fusariose, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e *Fusarium sacchari*.

Assim, estudos que visem estudar o mecanismo de ação desses isolados e testá-los *in vivo* podem contribuir para a elucidação de estratégias para controlar a incidência da fusariose da bananeira, reduzindo o impacto financeiro causado por essa doença.