

Fortaleza, CE / Outubro, 2025

OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL2 FOME ZERO
E AGRICULTURA
SUSTENTÁVEL

Técnica de hibridização fluorescente para detecção de fungos associados à resinose do cajueiro

Celli Rodrigues Muniz⁽¹⁾, Marlon Vagner Valentim Martins⁽²⁾, Milton Epitácio Carneiro Monte Galvino⁽³⁾, José Roberto Vieira Júnior⁽⁴⁾, Sandra Maria Moraes Rodrigues⁽⁵⁾, Patricia do Nascimento Bordallo⁽⁶⁾, Gildas Mbemba Tetaping⁽⁷⁾, Cleberson de Freitas Fernandes⁽⁸⁾, Antonio Lindemberg Martins Mesquita⁽⁹⁾ e Paulo Ricardo de Oliveira Bersano⁽¹⁰⁾

⁽¹⁾Bióloga, doutora em Biotecnologia, analista da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE. ⁽²⁾Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitossanidade, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical. ⁽³⁾Estudante de Agronomia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. ⁽⁴⁾Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE. ⁽⁵⁾Engenheira-agrônoma, doutora em Entomologia, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE. ⁽⁶⁾Engenheira-agrônoma, doutora em Produção Vegetal, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE. ⁽⁷⁾Farmacêutico, doutor em Ciências Veterinárias, bolsista da Universidade Estadual do Ceará Fortaleza, CE. ⁽⁸⁾Farmacêutico, doutor em Bioquímica, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE. ⁽⁹⁾Engenheiro-agrônomo, doutor em Entomologia Agrícola, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE. ⁽¹⁰⁾Médico-Veterinário, doutor em Patologia Animal, professor da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE.

Introdução

A resinose é uma doença relevante para o cajueiro no Semiárido nordestino, causando danos significativos às plantas afetadas. Geralmente aparece em plantas submetidas a estresses e, com o avanço da doença, pode ocorrer amarelecimento das folhas, podridão seca dos ramos e formação de cancos nos ramos lenhosos e no tronco, geralmente acompanhados de exsudação de goma e escurecimento dos tecidos (Figura 1).

Fungos do gênero *Lasiodiplodia* podem sobreviver em materiais de propagação aparentemente saudáveis, e em ramos de cajueiro sintomáticos é possível observar uma extensa colonização fúngica interna nos tecidos doentes. Apesar da liberação de resina pela planta ser uma manifestação da doença, outros danos, como, por exemplo, os causados por insetos, também são indutores de sua exsudação.

A broca-do-tronco do cajueiro, *Marshallius anacardii*, tem sido também um agente de danos ao cajueiro, no qual induz a liberação de resina.

O ataque desse inseto ocasiona sintomas como amarelecimento e queda das folhas, levando à morte dos ramos e também da própria planta. Alguns dos sintomas são similares aos da resinose e, muito frequentemente, essas coleobrocas são encontradas também em plantas que apresentam a doença.



Foto: Marlon Vagner Valentim Martins

Figura 1. Planta com resinose e tecidos escurecidos.

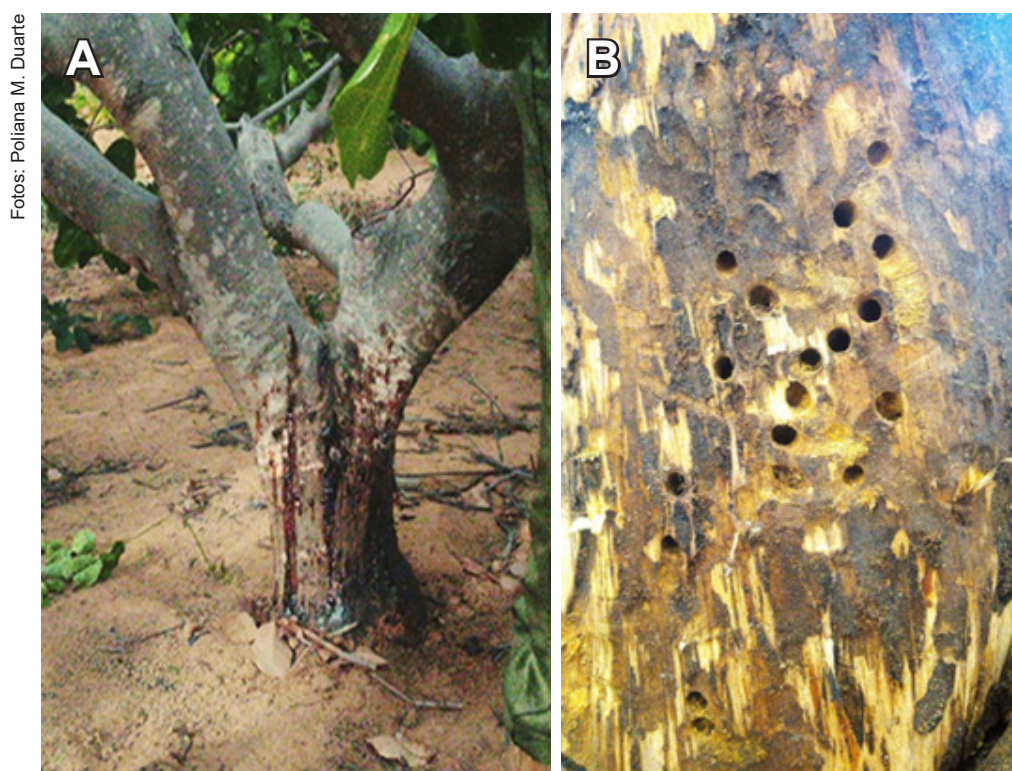
Apesar do patógeno fúngico e do inseto-praga ocuparem o mesmo nicho ecológico no cajueiro, não existem informações na literatura relacionadas a essa interação.

Plantas com liberação de resina, associadas ou não à resinose do cajueiro, atraem uma grande população da broca-do-tronco. Furos, galerias e necrose de tecidos são observados em ataques desse inseto e, em condições severas, a planta entra em colapso e morre (Figura 2).

No entanto, nos tecidos necrosados nem sempre é detectada a presença de fungos da família Botryosphaeriaceae, que tem o gênero *Lasiodiplodia* como um dos representantes, o que descartaria a ocorrência da resinose na planta. Por sua vez, a presença de resina geralmente leva o agricultor

e os técnicos a fazerem um diagnóstico incorreto, levando-os a atribuir todos os sintomas à resinose. Por outro lado, quando há a presença da broca-do-tronco e do fungo, é importante saber se o inseto-praga também pode ser um agente importante de disseminação da doença.

Nesse contexto, caracterizado pela presença tanto do fungo quanto do inseto-praga na planta de cajueiro, torna-se relevante gerar informações sobre essa interação no cajueiro. Assim, a detecção assertiva de espécies de Botryosphaeriaceae em cajueiros com resinose, associados ou não à presença de coleobrocas, destacaria-se como uma estratégia efetiva para entender melhor o patossistema, controlar a doença e evitar as perdas na produção do fruto.



Fotos: Poliana M. Duarte

Figura 2. Presença de exsudado de resina na região atacada do tronco (A) e “furo de bala” (B), dano característico do ataque da broca-do-tronco.

Tradicionalmente, a identificação das espécies de *Lasiodiplodia* baseia-se em um conjunto de características morfológicas do fungo. Porém, os métodos tradicionais baseados apenas em marcadores morfológicos podem ser demorados e laboriosos, além de totalmente não resolutivos para a correta identificação das espécies. Dessa forma, o uso de sequências ITS (*Internal Transcribed Spacers*) polimórficas pode facilitar a identificação do fungo no próprio tecido do hospedeiro ou da broca-do-tronco,

seja essa no estágio larval ou adulto. A detecção do fungo em cajueiros com resinose, associados ou não à presença de coleobrocas e nas diferentes fases do ciclo biológico do inseto, é importante para entender o patossistema, facilitar o diagnóstico e manejar a doença em áreas de produção do cajueiro.

A fim de verificar se há interação entre a resinose e a broca-do-tronco do cajueiro, torna-se importante que seja desenvolvido um método eficaz e

preciso na identificação e detecção de representantes de *Lasiodiplodia* em amostras de tecidos vegetais sintomáticos ou até mesmo no adulto ou na larva da broca-do-tronco. Portanto, o desenvolvimento de um protocolo confiável e simples utilizando técnicas microscópicas de fluorescência para identificar esses fungos é útil no conhecimento de qual agente causal, fungo e/ou broca-do-tronco, é responsável pelo desenvolvimento dos sintomas no cajueiro-anão. Neste trabalho, objetivou-se avaliar técnicas microscópicas de fluorescência e desenvolver uma sonda de hibridização in situ de fluorescência (FISH) com potencial para a detecção de fungos pertencentes ao gênero *Lasiodiplodia* cultivados em laboratório. Para isso, foram realizadas as etapas que se seguem.

Coleta de material vegetal e isolamento do fungo

Cinquenta amostras de caules e ramos de cajueiro-anão apresentando sintomas típicos da resinose, associados ou não a coleobrocas, foram coletados em pomares em distintas localidades da região Nordeste do Brasil (Santana do Matos, RN; Beberibe, CE; Mauriti, CE; e São Gonçalo do Amarante, RN) em diferentes épocas entre os anos de 2021 e 2024. Para o isolamento do fungo dos tecidos sintomáticos, fragmentos de 1 x 1 cm foram excisados, submetidos à assepsia com hipoclorito de sódio a 1% e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura batata-cenoura-dextrose ágar (BCA), que foram incubadas a 28 °C sob 12 horas de fotoperíodo claro e escuro. Um total de 22 colônias de fungos crescidas, típicas da família Botryosphaeriaceae, foram repicadas para meio batata-dextrose ágar (BDA) contendo acículas de pinheiros esterilizados, incubados sob as mesmas condições acima, por pelo menos 20 dias para indução da esporulação. Os isolados crescidos e contendo esporos foram purificados conforme a técnica de cultura monospórica e armazenados em geladeira para trabalhos posteriores de microscopia.

Uso da microscopia de fluorescência

Utilizou-se um microscópio invertido acoplado a um sistema de excitação fluorescente para observar o fungo cultivado. Seções de ágar com o crescimento fúngico cortadas com bisturi flambado foram posicionadas em lâminas de microscópio, e lâminulas

circulares foram cuidadosamente colocadas sobre as seções de ágar antes das observações sob fluorescência. Essa montagem foi feita em quintuplicata. A coloração por fluorescência de Botryosphaeriaceae envolveu a aplicação de algumas gotas de CalcoFluor White (CFW; Fluka 18.909) e solução de hidróxido de potássio a 10% (p/v), e utilizou-se o filtro A sob excitação UV (Band Pass 340–380 nm; espelho dicromático 400 nm; Long Pass 425 nm). O CFW detecta quitina, um polissacarídeo linear composto por resíduos de N-acetilglicosamina ligados por β -1,4, presente nas paredes celulares de fungos filamentosos, bem como outros β -1,4-glucanos, como celulose e quitosana. Porém, a melanina pode ser um interferente na detecção da fluorescência (Rangel-Montoya et al., 2020).

Desenho da sonda FISH

Os oligonucleotídeos LtITS-F (5'-GATCATTACCGAGTTTTTCGG-3') e LtITS-R (5'-CGGGCGACGCCAACCA-3'), específicos para a família Botryosphaeriaceae (Muniz et al., 2012), foram marcados com o fluoróforo 6-carboxifluoresceína (6-FAM), corante fluorescente utilizado em biologia molecular e que emite fluorescência de cor verde quando excitado por luz com comprimento de onda próximo a 495 nm (máxima de excitação) e emite em torno de 520 nm.

Aplicação da sonda in vitro e visualização em microscópio de fluorescência

Lâminulas circulares de microscópio com hifas do fungo crescido por 7 dias foram colocadas em placas de cultivo celular de 12 poços para aplicação das soluções de tratamentos. No interior dos poços, as lâminulas com as hifas foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% (m/v) em solução salina tamponada com fosfato (PBS) como solvente por uma hora sob temperatura de 28±1 °C e depois foram lavadas com tampão PBS três vezes. A seguir, os micélios foram tratados com quitinase com o intuito de degradar a quitina da parede celular. Também foram preparados tratamentos sem o uso da quitinase. Lavagens com detergente não iônico (Triton X-100) e PBS sucederam-se a esta etapa. As sondas foram diluídas em água livre de nucleases, aplicando-se 50 μ L dessa solução de hibridização sobre as lâminulas, que foram incubadas por uma hora a 37 °C em banho-maria em sala escura.

A seguir, as lamínulas foram submetidas à visualização em microscópio invertido com fluorescência utilizando-se excitação e emissão características do 6-FAM. As amostras foram avaliadas e as imagens registradas. A autofluorescência do fungo também foi testada para validar a emissão de fluorescência como única do fluoróforo. Tratamentos com o uso de isolados pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, da família Glomerellaceae, também foram preparados para os testes com as sondas a fim de verificar a especificidade da sonda.

Os resultados obtidos pela técnica de microscopia de fluorescência mostram que a marcação dos fungos com CalcoFluor White e emissão da fluorescência (Figura 3) não foi impedida pela melanina, produzida caracteristicamente pela família

Botryosphaeriaceae, indicando que esta é uma técnica adequada para visualização das estruturas desses fungos. Regiões mais novas e com menos melanina fluoresceram com mais intensidade. A melanina produzida por fungos fitopatogênicos está envolvida numa variedade de funções biológicas, sendo uma delas a proteção de suas células contra a radiação UV e agentes oxidantes. Portanto, havia o receio de que a microscopia de fluorescência não fosse uma técnica adequada para detectar fungos da família Botryosphaeriaceae, mas, pelos resultados apresentados, a técnica possui potencial para ser empregada futuramente na detecção de *Lasiodiplodia* em tecidos sintomáticos do cajueiro com resinose ou verificar a presença desse fungo na broca-do-tronco.

Foto: Gildas Mbemba Tetaping



Figura 3. Hifas e picnídios/conídios do fungo *Lasiodiplodia* sp. emitindo a fluorescência característica do CalcoFluor White.

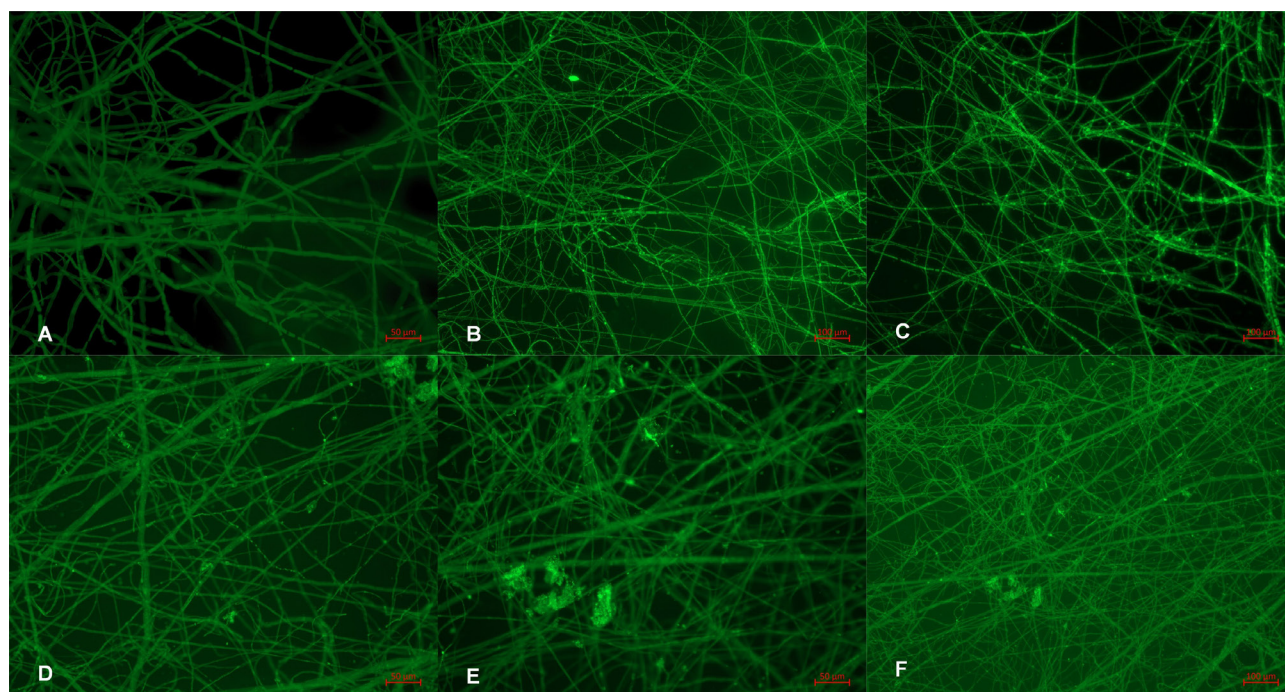
Considerando-se o uso da sonda FISH em visualização na microscopia de fluorescência, foi constatado que as sondas compostas pelos oligonucleotídeos LtITS-F e LtITS-R mostraram-se eficientes na marcação das hifas de fungos da família Botryosphaeriaceae (*Lasiodiplodia* sp.), principalmente após o tratamento com quitinase, com fluorescência

emitida em torno de 520 nm, típica da 6-FAM (Figura 4), indicando um potencial da técnica para detecção de Botryosphaeriaceae.

O fungo *Colletotrichum*, por sua vez, apresentou menor emissão de fluorescência após a aplicação da sonda, e a presença da quitina no tratamento sem quitinase pode ter sido um interferente.

A técnica de hibridização fluorescente in situ (FISH) se apresenta como um método de identificação, quantificação e localização relativamente simples e eficiente de fitopatógenos. Tem sido empregada para detectar fungos em

tecidos vegetais e também em insetos. No nosso estudo, a autofluorescência foi descartada, e a hibridização com *Colletotrichum* não se mostrou tão significativa e marcante como para a família Botryosphaeriaceae.



Fotos: Gildas Mbemba Tetaping

Figura 4. Isolado do fungo da família Botryosphaeriaceae (*Lasiodiplodia* sp.) tratado com os oligonucleotídeos LtITS-F e LtITS-R, marcados com o fluoróforo 6-FAM e visualizados em microscópio invertido acoplado a um sistema de excitação fluorescente. A, B e C: sonda com LtITS-R, objetivas de 10 e 20x; D, E e F: sonda com LtITS-F, objetivas de 10 e 20x.

Considerações finais

O presente estudo apresenta, de forma inédita, a aplicação da técnica de sonda FISH (hibridização fluorescente in situ) para a visualização de patógenos fúngicos da família Botryosphaeriaceae associados à resinose do cajueiro. Os resultados obtidos indicam potencial da técnica na detecção precoce de material vegetal infectado e, possivelmente, também em amostras de coleobrocas. Ressalta-se, contudo, que investigações adicionais são necessárias para confirmar e ampliar as evidências aqui relatadas.

Referências

- MUNIZ, C. R.; FREIRE, F. C. O.; VIANA, F. M. P.; CARDOSO, J. E.; CORREIA, D.; JALINK, H.; KEMA, G. H. J.; SILVA, G. F. da; GUEDES, M. I. F. Polyclonal antibody-based ELISA in combination with specific PCR amplification of internal transcribed spacer regions for the detection and quantitation of *Lasiodiplodia theobromae*, causal agent of gummosis in cashew nut plants. **Annals of Applied Biology**, v. 160, p. 217-224, 2012.
- RANGEL-MONTOYA, E. A.; PAOLINELLI, M.; ROLSHAUSEN, P.; HERNANDEZ-MARTINEZ, R. The role of melanin in the grapevine trunk disease pathogen *Lasiodiplodia gilanensis*. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 59, n. 3, p. 549-563, 2020.
- DOI: <https://doi.org/10.14601/Phyto-116852020>.

Embrapa Agroindústria Tropical

Rua Pernambuco, 2.270, Pici
60511-110 Fortaleza, CE
www.embrapa.br/agroindustria-tropical
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente: *José Roberto Vieira Junior*

Secretária-executiva: *Celli Rodrigues Muniz*

Membros: *Afrânio Arley Teles Montenegro, Aline Saraiva Teixeira, Eveline de Castro Menezes, Francisco Nelsieudes Sombra Oliveira, Helenira Ellery Marinho Vasconcelos, Kirley Marques Canuto, Laura Maria Bruno, Marlon Vagner Valentim Martins, Pablo Busatto Figueiredo, Roselayne Ferro Furtado e Sandra Maria Morais Rodrigues*

Comunicado Técnico 297

ISSN 1679-6535

Outubro, 2025

Edição executiva: *Celli Rodrigues Muniz*

Revisão de texto: *José Cesamildo Cruz Magalhães*

Normalização bibliográfica: *Rita de Cassia Costa Cid* (CRB-3/624)

Projeto gráfico: *Leandro Sousa Fazio*

Diagramação: *José Cesamildo Cruz Magalhães*

Publicação digital: PDF



**Ministério da
Agricultura e Pecuária**

Todos os direitos reservados à Embrapa.