

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO

**AGRESSIVIDADE, PATOGENICIDADE E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Fusarium* spp.
CAUSADORAS DE PODRIDÃO EM *Ananas comosus* var
*comosus***

CÉSAR MARQUES BORGES QUERINO

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
2021**

**AGRESSIVIDADE, PATOGENICIDADE E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE *Fusarium* spp. CAUSADORAS DE PODRIDÃO
EM *Ananas comosus* var *comosus***

CÉSAR MARQUES BORGES QUERINO
Engenheiro agrônomo
Universidade Federal da Bahia, 1992

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências Agrárias (Área de concentração: Fitotecnia)

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança
Coorientador: Dr. Aristóteles Pires de Matos
Coorientador: Dr. Davi Theodoro Junghans
Coorientador: Dr. Leandro de Souza Rocha

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
2021**

FICHA CATALOGRÁFICA

Q4a

Querino, César Marques Borges.

Agressividade, patogenicidade e caracterização molecular de fusarium spp. causadoras de podridão em *Ananas comosus* Var Comosus / César Marques Borges Querino. Cruz das Almas, Bahia, 2021.
104f.; il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Doutorado em Ciências Agrárias.
Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança.
Coorientador: Prof. Dr. Aristóteles Pires de Matos.

1.Abacaxi – Melhoramento genético. 2.Abacaxi – Controle biológico. 3.Doença – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Junghans, Davi Theodoro. III.Rocha, Leandro de Souza. IV.Título.

CDD: 634.774

Ficha elaborada pela Biblioteca Central de Cruz das Almas - UFRB.

Responsável pela Elaboração - Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615).
(os dados para catalogação foram enviados pelo usuário via formulário eletrônico).

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA CENTRO DE
CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**AGRESSIVIDADE, PATOGENICIDADE E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE *Fusarium* spp. CAUSADORAS DE PODRIDÃO
EM *Ananas comosus* var *comosus***

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE
CÉSAR MARQUES BORGES QUERINO**

Aprovada em 04 de junho de 2021

Prof. Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB
Examinador Interno (Orientador)

Prof. Dr. Delson Laranjeira
Universidade Federal do Rural de Pernambuco - UFRPE
Examinador externo

Prof. Dra. Leilane Silveira D'Ávila
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Examinador externo

Prof. Dr. Miguel Alves Júnior
Universidade Federal do Pará - UFPA
Examinador externo

Prof. Dr. Rafael Oliva Trocoli
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano – IF BAIANO
Examinador externo

DEDICATÓRIA

À memória de **meu pai Antonio Luiz Querino**, uma mente formidável

À memória de **meu irmão querido Adilson Borges Querino**, vítima da
Pandemia

À minha **mãe querida Maria Letícia Borges Querino**, à minha **esposa e amiga Niara de Albuquerque Vianna Querino**, aos meus filhos amados **César Marques Borges Querino Filho** e **Gustavo Marques Vianna Querino**, pelo amor, pelo carinho, pelos sacrifícios em favor da concretização de nossos projetos de vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu criador e mantenedor, por me dar saúde, sabedoria, orientação, e por colocar em meu caminho pessoas especiais e mãos amigas,

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias e meu orientador, professor Carlos Augusto Dórea Bragança pela confiança, orientação e oportunidade ímpar de realizar este trabalho,

Ao pesquisador Dr. Aristóteles Pires de Matos pela amizade, experiência, conhecimentos, confiança, orientação e conselhos transmitidos,

Ao Dr. Leandro de Souza Rocha pela amizade, por suas orientações, tempo e ensinamentos valiosos,

Aos servidores Andresa Priscila de Souza Ramos, Raimundo Zanon S. Gonçalves, Flávia Melo Moreira e todos os demais colegas dos Laboratórios de Fitopatologia e Biologia Molecular por todo apoio em atividades no Laboratório de Biologia Molecular

Ao Dr. Davi Theodoro Junghans por me disponibilizar tempo e apoio.

Aos servidores Benedito Conceição, Raimundo Rocha da Conceição e demais servidores de Campo pelo apoio,

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura da Embrapa pela concessão do espaço e recursos financeiros para execução do trabalho;

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, por ter me concedido a oportunidade de cursar o Doutorado,

Ao IF Baiano pela oportunidade de qualificação para o exercício de minhas atividades no ensino, pesquisa e extensão

A todos que direta ou indiretamente contribuíram pelo sucesso deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
 ARTIGO 1	
PATOGENICIDADE E AGRESSIVIDADE DE <i>Fusarium</i> spp. SOBRE MUDAS DE <i>Ananas comosus</i> var <i>comosus</i> CULTIVAR PÉROLA.....	19
 ARTIGO 2	
OCORRÊNCIA DE <i>Fusarium</i> spp. CAUSADORAS DE PODRIDÃO EM <i>Ananas comosus</i> var <i>comosus</i>	46
 ARTIGO 3	
FILOGENIA DE <i>Fusarium</i> spp. DE DIFERENTES REGIÕES PRODUTORAS DE <i>Ananas comosus</i> var <i>comosus</i> DO BRASIL.....	75
 CONSIDERAÇÕES FINAIS	95

PATOGENICIDADE, AGRESSIVIDADE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Fusarium* spp. ASSOCIADAS A PODRIDÃO EM *Ananas comosus* var *comosus*

Autor: César Marques Borges Querino

Orientador: Carlos Augusto Dórea Bragança

Resumo: A fusariose é a maior ameaça fitossanitária ao cultivo do abacaxi no Brasil. O uso de cultivares resistentes é a melhor estratégia de controle de doenças em plantas. Todavia, o aumento de áreas plantadas com cultivares resistentes exerce uma pressão de seleção que leva ao aumento da frequência de isolados capazes de suplantar a resistência. A agressividade diferencial dos isolados, bem como outras características das populações do patógeno podem resultar em uma menor durabilidade da resistência. Este trabalho objetivou estabelecer uma coleção de isolados de *Fusarium* spp. de diversas regiões de cultivo no Brasil e caracterizar a agressividade como subsídio a um programa de melhoramento do abacaxizeiro. Foi estabelecida uma coleção de 192 isolados monospóricos de áreas de produção de 10 estados produtores do Brasil e todos eles foram inoculados em mudas de abacaxi 'Pérola' para avaliação da patogenicidade e agressividade. Dos isolados obtidos, 172 foram patogênicos. Considerando variáveis como a área abaixo da curva de progresso da doença, o índice de doença externo e interno os isolados foram distribuídos em três grupos de similaridade pelo método UPGMA. Os isolados de maior agressividade estão distribuídos em sete estados: Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Pará, Paraíba, São Paulo e Tocantins. Sequências parciais dos genes RPB2, TEF-1 α e β -Tubulina de quatro isolados alinharam com as sequências de *F. oxysporum*, (*F. oxysporum*, (TEF-1 α 99,11%) *F. proliferatum* (99,14% TEF-1 α ; 99,66% β -Tubulina), *F. incarnatum* (100% TEF-1 α ; 99,34% β -Tubulina; 98,43% RPB2) e *F. guttiforme* (98,5% TEF-1 α) depositadas no GenBank. Por meio da análise filogenética de 128 sequências parciais de TEF-1 α foram identificadas as espécies *F. irregulare* (complexo *F. incarnatum-equisetum*), *F. inflexum* (complexo *F. oxysporum*), *F. circinatum*, *F. proliferatum* (complexo *F. fujkuroi*) e *Fusarium* sp. Este é o primeiro trabalho que relata a ocorrência de *F. proliferatum*, *Fusarium irregulare*, *F. inflexum* e *F. circinatum* como agentes causais de fusariose em abacaxizeiro no Brasil.

Palavras chave: fusariose, *F. incarnatum-equisetum*, *F. oxysporum*, *F. fujkuroi*

PATHOGENICITY, AGGRESSIVENESS AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Fusarium* spp. ASSOCIATED WITH ROT IN *Ananas comosus* var *comosus*

Author: César Marques Borges Querino
Advisor: Carlos Augusto Dórea Bragança

Abstract: Fusarium disease is the most serious phytosanitary threat of pineapple cultivation in Brazil. The use of resistant cultivars is the best disease control strategy in plants. However, the increase in areas planted with resistant cultivars exerts a selection pressure that leads to an increase in the frequency of isolates capable of overcoming resistance. The differential aggressiveness of the isolates, as well as other characteristics of the pathogen populations, may result in lower resistance durability. This work aimed at establishing a collection of *Fusarium* spp. isolates from several pineapple growing regions in Brazil and to characterize the aggressiveness as a subsidy for a pineapple breeding program. A collection of 192 monosporic isolates from production areas in 10 producing states in Brazil was established and all of them were inoculated into 'pineapple plantlets, cv. Pérola, to assess pathogenicity and aggressiveness. In total, 172 isolates were pathogenic. Considering variables such as the area under the disease progress curve, the external and internal disease index, the isolates were placed in three similarity groups based on the UPGMA method. The most aggressive isolates are distributed in seven states: Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Pará, Paraíba, São Paulo and Tocantins. Partial sequences of the RPB2, TEF-1 α and β -Tubulin genes from four isolates aligned with the sequences of *F. oxysporum*, (TEF-1 α 99.11%) *F. proliferatum* (99.14% TEF-1 α ; 99.66% β -Tubulin), *F. incarnatum* (100% TEF-1 α ; 99.34% β -Tubulin; 98.43% RPB2) and *F. guttiforme* (98.5% TEF-1 α) deposited in GenBank. Based on phylogenetic analysis of 128 partial TEF-1 α sequences, the following species were identified: *F. irregulare* (*F. incarnatum-equisetum* complex), *F. inflexum* (*F. oxysporum* complex), *F. circinatum*, *F. proliferatum* (*F. fujkuroi* complex) and *Fusarium* sp. This is the first report of *F. proliferatum*, *Fusarium irregulare*, *F. inflexum* and *F. circinatum* causing fusariosis in pineapple in Brazil.

Keywords: fusariosis, *F. incarnatum-equisetum*, *F. oxysporum*, *F. fujkuroi*

REFERENCIAL TEÓRICO

O abacaxizeiro (*Ananas comosus var comosus* ((L.) Merrill) Coppens & Leal)) é a principal espécie comercial da família *Bromeliaceae*. Originária da América do Sul, nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco na região amazônica, ela é cultivada comercialmente principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (PALMA-SILVA *et al.*, 2016). É muito apreciada pelos produtores/consumidores por ser planta rústica, tolerante a déficits hídricos e por suas boas características organolépticas. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial da fruta (2,43 milhões de toneladas), ficando atrás das Filipinas (2,75 milhões de toneladas) e Costa Rica (3,33 milhões de toneladas). As principais regiões produtoras no Brasil são Nordeste (35,7%), Norte (31,4%), Sudeste (26,5%), Centro Oeste (5,1%) e Sul (1,3%) (FAO, 2019; IBGE, 2019) (Figura 1). Os cinco Estados maiores produtores são Pará (22.231 frutos.ha⁻¹), Paraíba (30.510 frutos.ha⁻¹), Minas Gerais (29.986 frutos.ha⁻¹), Rio de Janeiro (28.181 frutos.ha⁻¹) e Tocantins (19.980 frutos.ha⁻¹) (IBGE, 2019).

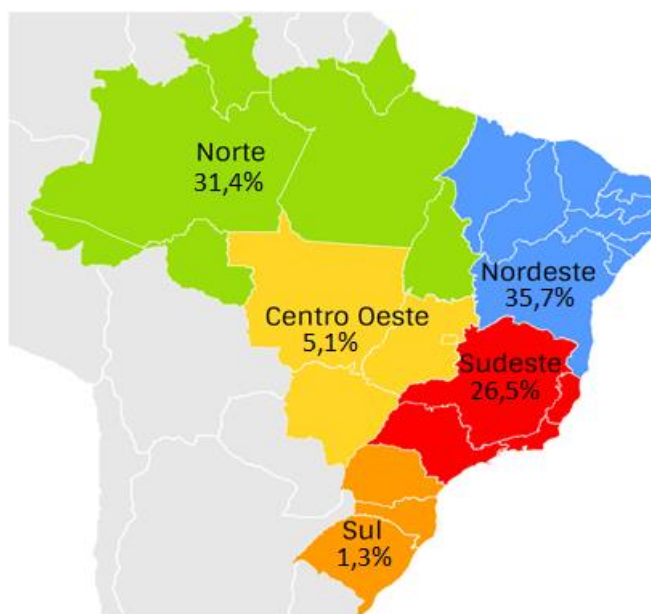


Figura 1. Distribuição da produção de abacaxi por região do Brasil. UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021
Fonte: IBGE, 2019

No Brasil, a produção de abacaxi é constantemente ameaçada por doenças tais como a fusariose e a podridão negra do fruto causadas pelos fungos *Fusarium guttiforme* Nirenberg e O'Donnell (1998) e *Thielaviopsis paradoxa*, respectivamente. O abacaxizeiro pode ser infectado por várias espécies de *Fusarium* contaminando a planta com micotoxinas. Recentes pesquisas, identificaram isolados de *F. proliferatum*, *F. ananatum* e *F. oxysporum* de abacaxi como produtores de fumonisinas e beauvericinas *in vitro*, ao tempo em que em frutas de abacaxi infectadas sua produção foi limitada pela presença de metabólitos produzidos pela planta durante a infecção (BARRAL *et al*, 2020; STEPIEŃ; KOCZYK; WAŚKIEWICZ, 2013); GORNA *et al*, 2017). No entanto, a fusariose pode causar perdas de até 80% no campo se constituindo na doença mais destrutiva e ameaçadora ao cultivo da espécie no mundo (PLOETZ, 2006).

F. guttiforme (**Fgt**) foi descrito pela primeira vez na Argentina e logo depois no Brasil por Nirenberg e O'Donnell (1998) por meio de caracterização morfológica e filogenética. Atualmente o patógeno está disperso por outros países da América do Sul incluindo Uruguai, Paraguai e Bolívia onde causa sérios prejuízos na produção (MATOS *et al*, 1992). No Brasil a doença foi observada pela primeira vez em São Paulo em 1964 em plantas da variedade Smooth Cayenne (KIMATI; TOKESHI, 1964). De acordo com Matos *et al* (2012), e Ventura e Goes, (2016), o fungo é patogênico apenas ao abacaxizeiro e apresenta um elevado grau de especificidade. Por outro lado, de acordo com Jacobs (2010), a incidência geográfica das espécies *Fusarium ananatum*, *Fusarium subglutinans* e **Fgt** ainda não está determinada.

Quando relatada pela primeira vez no Brasil, a fusariose do abacaxizeiro teve seu agente causal identificado apenas a nível de gênero, relatado como *Fusarium* sp. (Kimati & Tokeshi, 1964). Posteriormente foi identificado como sendo *F. moniliforme* Sheld var *subglutinans* Wr. E Reink (PISSARRA *et. al.*, 1979). Em 1983, o patógeno foi reclassificado como *F. subglutinans* (Wollenw e Reinking) P. E. Nelson Toussoun e Marasas (*F. moniliforme* J. Sheld var *subglutinans* Wollenw e Reinking) conforme análises morfológicas e fisiológicas. Utilizando o cruzamento com outras espécies hospedeiras suscetíveis, Ventura *et al* (1993) comprovaram a especificidade do patógeno e propuseram sua renomeação para *F. subglutinans* var *ananas*. Logo em seguida, ao avaliar nove isolados do Brasil como causadores da fusariose em abacaxizeiro, Nirenberg e O'Donnell (1998), mediante exames de

DNA e caracterização morfológica descreveu o *F. subglutinans* var *ananas* como sendo *F. guttiforme* (VENTURA; GOES, 2016).

A cultura do abacaxi

O abacaxizeiro é uma planta monocotiledônea, herbácea perene, constituída por um caule curto e grosso, folhas em forma de calhas, estreitas e rígidas que crescem no seu entorno, e no qual também se inserem raízes axilares. O sistema radicular é fasciculado superficial concentrado normalmente nos primeiros 30cm do solo (KRAUSS, 1948; BARTHOLOMEW, 2009;) A planta pode alcançar a altura de até 1,2m e diâmetro de até 1,5m.

No caule insere-se, também, o pedúnculo que sustenta a inflorescência e o fruto daí resultante. É um fruto composto formado pela coalescência dos frutos individuais, do tipo baga, numa espiral ascendente sobre o eixo central que é a continuidade do pedúnculo. Compõe-se de 100 a 200 flores individuais arrumadas em espiral em volta de um eixo. O ciclo do abacaxizeiro é dividido em fases vegetativa ou de crescimento vegetativo, reprodutiva ou de formação do fruto e propagativa, de formação de mudas tipo filhotes e rebentões, que se sobrepõe, parcialmente, à segunda fase. (BARTHOLOMEW, 2009).

A qualidade e desenvolvimento dos frutos são ótimos quando cultivados sob faixa de temperatura de 22°C a 32°C (SANFORD, 1962), insolação anual de 2.500 a 3.000 horas, umidade relativa do ar média anual de 70% ou superior e precipitação de 1.200 mm a 1.500 mm anuais, bem distribuída ao longo do ano. A altitude mais indicada para cultivo é de até 400m acima do nível médio do mar. A faixa de pH entre 4,5 a 5,5 é a mais recomendada para o seu cultivo.

A produção mundial de abacaxi é baseada nas cultivares Smooth Cayenne, Gold ou MD2, Pérola, Queen, Singapore Spanish, Española Roja e Perolera (REINHARDT *et al.*, 2018). No Brasil, 95% dos plantios comerciais são constituídos pelas cultivares Smooth Cayenne e Pérola, porém cerca de 85% de toda produção está fundamentada na cultivar Pérola. Em áreas bem menores são plantadas as cultivares Imperial, Vitória, Gomo de mel, Ajubá, Fantástico, Turiaçú, Rio Branco, Senador Guiomar, Gigante de Tarauacá, Cabeça de onça e Quinari. A propagação

do abacaxi é feita de forma vegetativa por meio mudas, tipo coroa, filhote, filhote rebentão e rebentão (CABRAL *et al.*, 2010; SCHERER *et al.*, 2015).

A fusariose do abacaxizeiro

A fusariose ou gomose do abacaxizeiro é o principal motivo de perdas de produtividade no campo. Acredita-se que a partir da disseminação de mudas doentes do Estado de São Paulo, a doença tenha alcançado outras regiões do país (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002). Assim, a doença está presente nos principais estados produtores da fruta no país, o que dificulta um aumento da área plantada e onera o custo de produção devido a necessidade de uso de fungicidas já que as duas principais cultivares plantadas no Brasil são suscetíveis (ZORZAL *et al.*, 2008).

A doença se manifesta por toda a planta, contudo a maior percepção das consequências da ação do patógeno está nos sintomas exibidos nos frutos. Eles se caracterizam pela exsudação de uma substância gomosa através da cavidade floral, apodrecimento da polpa e presença de resina nos lóculos do ovário (VENTURA; GOES, 2016). Externamente, os frutinhos afetados evidenciam descoloração amarronzada e apresentam-se em nível inferior em comparação com os vizinhos sadios devido à colonização dos tecidos internos. Além disso, ocorre curvatura do caule, morte da região apical, encurtamento das folhas, alteração na filotaxia, redução no desenvolvimento, clorose e morte da planta. Os sintomas no fruto provocam perda do seu valor comercial (MATOS *et al.*, 2012).

A infecção das mudas ocorre quando elas ainda estão aderidas à planta mãe. Nos estágios iniciais da doença os sintomas são quase imperceptíveis o que facilita o deslocamento de mudas contaminadas entre produtores cujos sintomas evidentes somente serão notados posteriormente ao plantio. Isto favorece a forma de disseminação mais frequente e efetiva da doença a longas distâncias (REINHARDT *et al.*, 2000), enquanto por meio de vento, água da chuva, insetos e pássaros ocorre a disseminação a curtas distâncias (VENTURA; GOES, 2016). Sob condições favoráveis de temperatura e umidade, a infecção das flores ocorre nos estágios iniciais de florescimento. Mudas com infecção incipiente vão expressar sintomas após o plantio durante a fase de desenvolvimento vegetativo e, a

dependem das condições ambientais, algumas plantas morrem mesmo antes da formação do fruto. (PLOETZ, 2003).

Como o patógeno sobrevive nas mudas e nas plantas elas passam a ser importante fonte de inóculo e disseminação do fungo. O período crítico da doença ocorre logo após a indução floral até o final da antese pois as flores se constituem no principal sítio de infecção do patógeno. Conídios são transportados pelo vento ou por insetos e se depositam na roseta foliar até infectar a inflorescência (REINHARDT *et al.*, 2018) (Figura 2).

As medidas de manejo integrado em plantios estabelecidos com variedades suscetíveis, tais como Pérola e Smooth Cayenne, têm sido baseadas no uso de mudas sadias, monitoramento e arranquio de plantas sintomáticas, proteção das inflorescências em desenvolvimento pela aplicação de fungicidas, eliminação de restos culturais e de plantios abandonados. Contudo, a medida de controle menos onerosa e ambientalmente correta consiste no plantio de variedades resistentes tais como, BRS Ajubá', BRS Imperial', BRS Vitória' e IAC Fantástico (MATOS *et al.*, 2012).

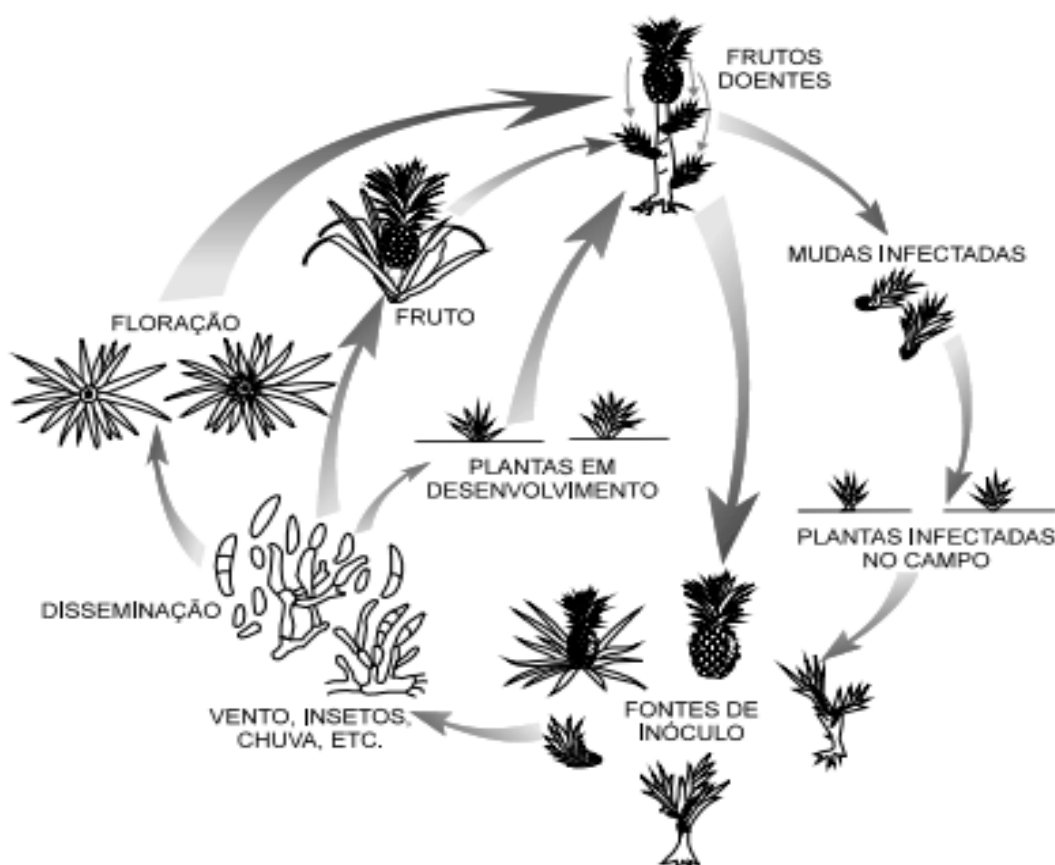


Figura 2. Ciclo da Fusariose do abacaxi, causada pelo fungo *Fusarium guttiforme*, disseminação epidemiologia e controle. (VENTURA *et al.*, 1993; VENTURA;ZAMBOLIM, 2002). UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021

O gênero *Fusarium*

As espécies do gênero *Fusarium* são as mais estudadas nos últimos 200 anos, motivo de constantes divergências quanto a sua taxonomia, amplamente distribuídas no globo terrestre e em quase todos os ecossistemas muitas possuem ampla gama de hospedeiros (JAMES *et al*, 2006). Em vegetais são responsáveis por perdas significativas nos campos de cultivo com ênfase para as espécies de importância econômica. Muitas das espécies deste gênero são também potenciais produtoras de micotoxinas tais como beauvericinas, zearalenona, fumonisininas, moniliforminas (BARRAL *et al*, 2020) que causam podridões em frutos que, consumidos, são causas de doenças em humanos como câncer por exemplo. O gênero foi primeiramente descrito por Link, (1809) com base no caráter distintivo dos conídios em forma de banana, mas *Fusarium* recebeu mais atenção quando “Die Fusarien” foi publicado por Wollenweber e Reinking em 1935 (SUMMERELL, 2019).

Durante muitas décadas, praticamente todos os estudos se baseavam na classificação taxonômica do gênero por meio de análise das características morfológicas e na especificidade do hospedeiro (SUMMERELL, 2019). É fato que muitas espécies deste complexo não podem ser diferenciadas apenas por suas características morfológicas e além disso suas sequências são muito semelhantes (90%) (BRANKOVICS *et al*, 2020). O advento das técnicas moleculares e sua aplicação na taxonomia das espécies, aumentou a capacidade de separação entre espécies do gênero morfolologicamente pouco distintas mediante o sequenciamento de DNA. Ficou explícito que o número de espécies, até então descritas nesse gênero, estava subestimado (KVAS *et al.*, 2009).

O complexo de espécies *Fusarium oxysporum*

É um complexo que comporta mais de 150 espécies que estão amplamente distribuídas no solo e normalmente formadoras de estruturas de sobrevivência chamadas de clamidósporos (ASHA *et al*, 2011; BAAYEN *et al*, 2000). Está entre as dez espécies de fungo mais danosas a agricultura e é capaz de alta especificidade em relação aos seus hospedeiros podendo constituir formas especiais recebendo nomes de acordo com a identidade de seu hospedeiro (GORDON e MARTYN, 1997; BAAYEN, *et al*. 2000). As formas especiais não são

filogeneticamente monofiléticas e podem ser para e polifiléticas dentro de várias formas especiais como *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e também várias formas especiais podem infectar e causar doença em hospedeiros diferentes. Ao longo do tempo sistemas de classificação subspecíficos, foram adicionados a *F. oxysporum* tais, grupos de compatibilidade vegetativa (VCG), raça e haplótipos. Este é baseado no sistema de genótipos multilóculos únicos dentro do complexo de espécies (O'DONNELL *et al.* 2008). O sistema de classificação como raça é baseado na especificidade do cultivar ligada a genes de resistência específicos da cultivar hospedeira (LIEVENS *et al.* 2008; EPSTEIN *et al.*, 2017). A compatibilidade vegetativa é baseada na similaridade genética em loci específicos e não na patogenicidade, e fornece um marcador bruto para estudos genéticos populacionais (LESLIE e SUMMERELL, 2006).

O complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equisetum*

É um complexo que compreende dois grandes clados *F. incarnatum* e *F. equisetum* com mais de 30 espécies crípticas reconhecidas (FIESC 1 a FIESC 37), logo isso complica muito a sua identificação mediante marcadores morfológicos (SANTOS *et al.*, 2019; O'DONNELL *et al.* 2013; VILLANI *et al.*, 2016; XIA *et al.*, 2019). Apenas as espécies *F. equiseti* (FIESC 14), *F. lacertarum* (FIESC 4) e *F. scirpi* (FIESC 9), todos pertencentes ao clado Equiseti tem seu binômio latino conhecidos até o momento (O'DONNELL *et al.*, 2009). *F. equisetum* é um fungo cosmopolita que habita o solo (LESLIE; SUMMERELL, 2006). *Fusarium incarnatum*, *F. irregulare*, *F. pallidoroseum* e *F. semitectum*, bem como outros nomes de espécies sinonimizadas, estão ligados ao clado Incarnatum (WANG *et al.*, 2019). Algumas espécies são consideradas como fitopatógenos de culturas economicamente importantes (SUMMERELL *et al.*, 2019; LESLIE; SUMMERELL, 2010) ou oportunistas de tecidos de plantas (AYOUBI; SOLEIMANI, 2016). Outras com potencial para controle de insetos pragas e produtoras de micotoxinas como beauvericina e equisetina (BARROS *et al.*, 2012; VILLANI *et al.*, 2016) .

O complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*

O complexo grupo de espécie *Fusarium fujikuroi* (FFSC) é um táxon monofilético que inclui espécies ou linhagens de *Fusarium* com características morfológicas similares e sobrepostas que dificultam a sua diferenciação por meios morfológicos e/ou biológicos. Muitas das espécies neste complexo estão associadas a doenças devastadoras de plantas de importância econômica. Estudos envolvendo DNA mitogenômico sugerem a ocorrência de transferência horizontal de genes entre espécies deste complexo ao longo do tempo possivelmente por introgressão e análise filogenética sugere importante papel do fluxo gênico na história evolutiva dessas espécies (BRANKOVICS *et al.*, 2020).

A identificação de espécies do FFSC tem sido possível pelo estudo das relações filogenéticas (O'DONNELL *et al.*, 1998, 2000), enquanto dados morfológicos, fisiológicos e ecológicos adicionais e dados sobre o comportamento reprodutivo são também incluídos na avaliação. A combinação desta estratégia tem sido a mais utilizada e demonstra ser a mais eficaz para reconhecimento de espécies do FFSC. Desta forma, a maioria das descrições e definições das espécies do FFSC tem sido realizada utilizando essas estratégias taxonômicas integrativas (KVAS *et al.*, 2009; ZELLER *et al.*, 2003; DAYRAT, 2005; WILL *et al.*, 2005).

F. guttiforme e sua diversidade genética

Fgt faz parte do FFSC, um dos complexos de espécies mais bem estudados em todo o mundo (KVAS *et al.*, 2009). O estágio sexuado de **Fgt** ainda é desconhecido em condições de campo e ele é assim chamado por possuir conídios em forma de gotas nas extremidades de conidióforos. Os macroconídios apresentam paredes finas, delgadas e lisas a ligeiramente curvadas, a base tem forma de pé afilando-se para a extremidade superior, trissepitados e raramente encontrados em esporodóquios. Os microconídios são asseptados e ocasionalmente com um septo, formados em falsas cabeças na extremidade de conidióforos, nunca em cadeias, e a partir de monofiálides ou polifiálides. Essa espécie não produz clamidósporos (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Estudos anteriores com isolados de **Fgt** obtidos de algumas regiões produtoras de abacaxi não identificaram diferenças morfológicas e, por meio de

análise filogenética, revelaram ausência de agrupamento de isolados de acordo com a região de coleta (TSUJI, 2012). Por outro lado, ao estudar 40 isolados obtidos em Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, Paraíba e São Paulo, Crespo (2010) identificou 17 grupos de compatibilidade vegetativa (VCG). A diversidade de VCGs em um único estado e a ocorrência de vários VCGs com um único isolado evidenciaram alta diversidade genética na população de *F. guttiforme*. Segundo Goes, (1986), *F. guttiforme* pode se reproduzir sexuadamente em laboratório, o que dá indícios de que a diversidade genética pode ser gerada por recombinação sexual e que a reprodução sexuada esteja ocorrendo no campo para esta população.

Para Croll e Line (2016), a evolução do patógeno pode torná-lo capaz de causar doença em novos genótipos da planta hospedeira tida como resistente ou mesmo interagir e provocar doença em outras espécies, desta forma seu estudo também é determinante na epidemiologia. Além disso, o movimento de plantas hospedeiras geneticamente idênticas e patógenos na agricultura entre os diversos continentes, favorece o contato entre patógenos locais e os introduzidos e por consequência o surgimento de patógenos híbrido virulentos (MÖLLER; STUKENBROCK, 2017; ISLAM *et al.*, 2016; BRASIER; KIRK, 2010; BRASIER, 2001)

Dentre os diferentes mecanismos evolutivos que podem moldar as populações de microrganismos, tem-se como principais a mutação, a recombinação e o fluxo gênico. A mutação é a responsável pelo surgimento de novos alelos na população, e por isso, pela geração de variabilidade. Já a recombinação é responsável pelo rearranjo alélico, e ampliação da variabilidade criada pela mutação. Estes importantes mecanismos evolutivos geralmente estão ligados com o surgimento de indivíduos com diferenças no padrão de virulência e/ou agressividade (MILLER; JOHNSON 2000). Atribui-se ao fluxo gênico a responsabilidade pela introdução de novos genótipos do patógeno em diferentes áreas, desta forma associada ao aumento da diversidade e diferenças na patogenicidade pela introdução de novas variantes de um patógeno (GOODWIN 1997; LINDE *et al.*, 2010).

Apesar do reconhecimento de que variações na resistência do hospedeiro, e a virulência e agressividade do patógeno sejam importantes para o entendimento dos padrões de infecções, poucos estudos buscam compreender a relação entre a

estrutura genética da população e a dinâmica de doenças ou fatores que influenciam na coevolução planta-patógeno (BURDON; THRALL, 2008). Nos ecossistemas naturais é rotina a interação entre plantas hospedeiras e patógeno e isso permite que os processos coevolutivos aconteçam de maneira dinâmica. Plantas procuram evoluir para evitar a superação de suas defesas pelo patógeno, e este por sua vez evolui para suplantar os sistemas de defesa da planta. Esses processos evolutivos culminam com a modelagem de variação genômica e populacional de plantas hospedeiras e patógenos (MÖLLER, M; STUKENBROCK, 2017). Em sistemas agrícolas, essa seleção de genótipos da planta é artificial e em cada estação de cultivo novos genótipos podem ser estabelecidos para desfavorecer ao patógeno. Contudo, a substituição completa dos genótipos em confrontação com fatores de resistência do patógeno poderá provocar o surgimento de novos genótipos virulentos por causa da pressão de seleção exercida (MÖLLER, M; STUKENBROCK, 2017; KANZAKI *et al.*, 2012; DODDS *et al.*, 2006; BARRETT *et al.*, 2009; BERGELSON *et al.*, 2001).

Alguns fatores associados ao manejo, como também características da população do patógeno podem reduzir a durabilidade da resistência. O plantio de um único genótipo em extensas áreas pode exercer uma pressão de seleção na população do patógeno e, conseqüentemente, aumentar a frequência de isolados capazes de suplantar a resistência (CAMARGO, 2018). Além disso, a seleção de genótipos no programa de melhoramento, quando não considera a variabilidade genética, a agressividade diferencial dos isolados, bem como outras características das populações do patógeno, também pode resultar em uma menor durabilidade da resistência (STAM; McDONALD, 2018).

Conhecer a estrutura genética de populações de patógenos permite compreender os processos evolutivos que moldaram a população no passado e, portanto, inferir sobre o potencial evolutivo e risco de suplantação de resistência (McDONALD; LINDE, 2002). A caracterização genética da população de patógenos deve ser realizada periodicamente, pois condições de cultivo, manejo adotado e a introdução de haplótipos em uma população via transporte de material vegetal infectado podem causar mudanças na estrutura genética e, conseqüentemente, afetar o manejo de doenças baseado no controle genético. Estudos de caracterização molecular de populações de **Fgt** são incipientes, as populações estudadas são pequenas e poucos estudos adotaram o uso de marcadores

moleculares como ferramenta no estudo de diversidade. Para efeito de melhoramento genético, é importante buscar fontes de resistência a fusariose no Banco Ativo de Germoplasma - BAG de Abacaxi e conhecer a agressividade de isolados no sentido de otimizar a seleção de genótipos tidos como resistentes e garantir maior durabilidade da resistência em campo.

Filogenia molecular

É relevante a disponibilidade de ferramentas moleculares cada vez mais sensíveis e capazes de identificar pequenas variações em populações de microrganismos, bem como a identificação de espécies filogenéticas. Essas tem sido fundamentais para aumentar o conhecimento de pesquisadores a respeito da diversidade genética de fitopatógenos de importância na agricultura. Desta forma, é cada vez mais comum os estudos sobre o aumento e frequência de isolados mais agressivos em sistemas agrícolas onde o genótipo da planta hospedeira é homogêneo e cultivado em larga escala.

Nos estudos filogenéticos, nem sempre a relação evolutiva entre os isolados baseada em regiões do DNA como o ITS, IGS entre outros, corresponde a relação biológica, como a agressividade e virulência. A relação evolutiva baseada em outras regiões no genoma, como aquelas relacionadas à patogenicidade podem ser mais congruentes com a relação biológica.

Entre os muitos marcadores moleculares utilizados para reconstrução da filogenia, as regiões da segunda maior subunidade da RNA polimerase II nuclear (RPB2), a Actina (ACT), o fator de alongação -1α (TEF- 1α) e β -Tubulina (Tub2), se apresentam como sendo os mais usados em estudos taxonômicos de fungos, especialmente do complexo grupo de espécies *Fusarium fujikuroi* – FFSC, bem como em outros complexos do gênero *Fusarium* (GEISER *et al.* 2004; KRISTENSEN *et al.* 2005). O estudo filogenético tem possibilitado a reconstrução filogenética de organismos com representantes de diferentes áreas geográficas, bem como a investigação da história evolutiva das espécies que estão em constantes interações simbióticas, ou em interações entre patógeno e hospedeiro, e de coevolução (SCHNEIDER, 2003). Segundo SUMMERELL (2019), a região espaçadora interna transcrita do gene ribossômico ITS não deve ser recomendada para identificação de espécies de *Fusarium* porque ela é pouco informativa sobre

grande parte das espécies desse gênero. Ele também recomenda o uso do gene TEF-1 α como código de barras de rotina para a identificação de *Fusarium* sp. especialmente no FFSC, além de incentivar o sequenciamento de RPB1 e RPB2 para corroborar essa identificação pois eles atuam em todo o espectro do gênero. Neste estudo foram utilizados estes últimos genes e mais β -tubulina para identificação das espécies isoladas.

Foi objetivo deste trabalho conhecer a agressividade e as espécies de *Fusarium* nas populações amostradas como subsídio ao programa de melhoramento do abacaxizeiro desenvolvido no Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura da Embrapa. Para tornar possível o proposto, as ações foram divididas em etapas como a seguir:

Etapa 1 - Coleção e estudos de patogenicidade e agressividade entre isolados de *Fusarium* spp e abacaxizeiro 'Pérola'

- 1.1. Estabelecer uma coleção representativa de isolados de *Fusarium* spp a partir de coletas de plantas doentes em áreas de plantio comercial de abacaxi no Brasil
- 1.2. Testar a patogenicidade e avaliar a agressividade com identificação dos isolados mais agressivos da coleção de isolados de *Fusarium* spp em abacaxizeiro 'Pérola'

Etapa 2 – Caracterizar molecularmente isolados de *Fusarium* spp de diferentes regiões produtoras do Brasil

- 2.1. Identificar, por meio de filogenia, as espécies de *Fusarium* associadas a fusariose do abacaxizeiro como subsídio ao programa de melhoramento do abacaxizeiro desenvolvido no Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura da Embrapa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYOUBI, N.; SOLEIMANI, M.J. Morphological and molecular identification of pathogenic *Fusarium* spp. on strawberry in Iran. **Sydowia**, v. 68, p.163–171, 2016.

ASHA, B.B.; CHANDRA NAYAKA, S.; UDAYASHANKAR, A.C.; SRINIVAS, C.; NIRANJANA, S;R. Seleção de bactérias bio-antagonistas eficazes para o controle biológico da murcha do tomate causada por *Fusarium oxysporum*. **BioScan**, v.6, 239–244, 2011.

BAAYEN, R.P. *et al.* As genealogias gênicas e análises de AFLP no complexo *Fusarium oxysporum* identificam formas especiais monofiléticas e não monofiléticas que causam murcha e podridão. **Phytopathology**, n.90, p.891–900, 2000.

BARRAL, B.; CHILLET, M.; DOIZY, A.; GRASSI, M.; RAGOT, L.; LÉCHAUDEL, M.; DURAND, N.; ROSE, L.J.; VILJOEN, A.; SCHORR-GALINDO, S. Diversity and Toxicity of Fungi that Cause Pineapple Fruitlet Core Rot. **Toxins**, n.12, 339, 2020.

BARRETT, L. G. *et al.* Diversity and evolution of effector loci in natural populations of the plant pathogen *Melampsora lini*. **Journal Molecular Biology**, vol., n.26, p.2499–2513, 2009.

BERGELSON, J.; KREITMAN, M.; STAHL, E. A.; TIAN, D. Evolutionary dynamics of plant R-genes. **Science**, n.292, p.2281–2285, 2001.

BARTHOLOMEW, D.P. 'MD-2' pineapple transforms the world's pineapple fresh fruit export industry. **Pineapple News**, Honolulu, v.16, p.2-5, 2009. Disponível em: <http://www.ishs-orticulture.org/workinggroups/pineapple/PineNews16.pdf>. [Links]

BARROS, G.; ZANON, M.A.; PALAZZINI, J.M.; HAIDUKOWSKI, M.; PASCALE, M.; CHULZE, S. Trichothecenes and zearalenone production by *Fusarium equiseti* and *Fusarium semitectum* species isolated from Argentinean soybean. **Food Additives & Contaminants Part A**, v.29, p.1436-1442, 2012

BRANKOVICS, B.; VAN DIEPENINGEN, A. D.; D. E HOOG G. S.; VAN DER LEE TAJ AND WAALWIJK C. Detecting Introgression Between Members of the *Fusarium fujikuroi* and *F. oxysporum* Species Complexes by Comparative Mitogenomics. **Journal Frontiers in Microbiology**, n.11, 2020. doi: 10.3389/fmicb.2020.01092

BRASIER, C. M. Rapid evolution of introduced plant pathogens via interspecific hybridization. **Bioscience**, n.51, p.123, 2001.

BRASIER, C. M.; KIRK, S. A. Rapid emergence of hybrids between the two subspecies of *Ophiostoma novo-ulmi* with a high level of pathogenic fitness. **Plant Pathology**, n.59, p.186–199, 2010.

BURDON, J.J.; THRALL, P.H.; Pathogen evolution across the agro-ecological interface: implications for disease management. **Evolutionary Applications.**, v.11, p.57-65, 2008. doi: 10.1111/j.1752-4571.2007.00005.x. PMID: 25567491; PMCID: PMC3352394.

CABRAL, J.R.S.; MATOS, A.P. de; JUNGHANS, D.T. Cultivar de abacaxi 'Imperial'. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2010. 2p. folder

CAMARGO, L. E. A. Genética da interação patógeno-hospedeiro. In: AMORIN, L., REZENDE, J. A. M., BERGAMI, A. F. **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**. 5. ed. Minas Gerais: Agronômica Ceres, 2018. v. cap. 6, p.85-92.

CRESPO, N.C. **Diversidade genética de isolados do agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro no Brasil**. 2010. 36 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CROLL, D.; LAINE, ANNA-LIISA. What the population genetic structures of host and pathogen tell us about disease evolution. **New Phytologist**, n.212, p. 537–539, 2016.

DODDS, P. N. *et al.* Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.103, p.8888–8893, 2006.

DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, n 85, p.407-415, 2005.

EPSTEIN, L.; KAUR, S.; CHANG P.L.;, *et al.* Races of the celery pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* are polyphyletic. **Phytopathology**, v.107, p.463–473, 2017.

FAOSTAT: Agricultural Statistic Database. Rome: world agriculture information centre, 2014. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em 06 de jun. 2019.

GEISER, D.M. *et al.* FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal Plant Pathology**, n.110, p.473–479, 2004.

GOES, A. G. **Caracterização patogênica, controle químico e obtenção de fase sexuada de *Fusarium moniliforme* Sheld var *subglutinans* Wr. Rg. do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill)**, 1986, 97p. Dissertação (Mestrado em agronomia) – Escola Superior de agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

GOODWIN, S. B. The population genetics of *Phytophthora*. **Phytopathology**, n.87, p. 462-473, 1997.

GORDON, T.R.; MARTYN, R.D.. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. **Annual Review of Phytopathology**, n.35, p.111–128, 1997.

GORNA, K.; PERLIKOWSKI, D.; KOSMALA, A.; STEPIEŃ, Ł. Host extracts induce changes in the proteome of plant pathogen *Fusarium proliferatum*. **Fungal Biology**, 2017. doi: 10.1016/j.funbio.2017.04.008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Culturas temporárias e permanentes. Produção Agrícola Municipal, 2017. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 13 mai. 2019.

ISLAM, M. T. *et al.* Emergence of wheat blast in Bangladesh was caused by a South American lineage of *Magnaporthe oryzae*. **BMC Biology**, v.14, p.84, 2016.

JACOBS, A. *et al.* *Fusarium ananatum* sp. nov. in the *Gibberella fujikuroi* species complex from pineapples with fruit rot in South Africa. **Fungal Biology**, n.114, p.515–527, 2010.

JAMES, T., KAUFF, F., SCHOCH, C. *et al.* Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. **Nature**, v. 443, n.818-822, 2006. <https://doi.org/10.1038/nature05110>.

KANZAKI, H. *et al.* Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae* AVR-Pik and rice Pik genes driven by their physical interactions. **The Plant Journal**, n.72, p.894–907, 2012.

KARIM N.F.; MOHD M.; NOR N.M.; ZAKARIA L. Saprophytic and Potentially Pathogenic *Fusarium* Species from Peat Soil in Perak and Pahang. **Tropical Life Science Research**, v.27, n.1, p.1–20, 2016.

KIMATI, H.; TOKESHI, H. Nota sobre a ocorrência de *Fusarium* sp. causando resinose fúngica em abacaxi. **Revista de Agricultura**, v. 39, n. 3, p.131-133, 1964.

KRAUSS, B.H. Anatomy of the vegetative organs of the pineapple, *Ananas comosus* (L) Merr. I. Introduction, organography, the stem, and the lateral branches or axillary buds. **Botanical Gazette**, v.110, p.159–217, 1948.

KRISTENSEN, R. *et al.* A. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. **Mycological Research**, n.9, p.173–186, 2005.

KVAS, M.; MARASAS, W.F.O.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J.; STEENKAMP, E.T. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. **Fungal diversity**, v. 34, p.1-21, 2009.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. *Fusarium* laboratory manual. Malden: Blackwell. 2006. 388p.

LIEVENS, B.; REP M.; THOMMA B.P.H.J. Recent development in the molecular discrimination of formae speciales of *Fusarium oxysporum*. **Pest Management Science**, v.64: n.781–788, 2008.

LINDE, C. C., LILES, J. A., THRALL, P. H. Expansion of genetic diversity in randomly mating founder populations of *Alternaria brassicicola* infecting *Cakile*

maritima in Australia. **Applied and Environmental Microbiology**, v 76, p.1946. 2010.

LINK, H.F. Observations in ordines plantarum natural, dissertation. **Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin**, v.3, n.3-42, 1809.

MATOS, A. P. de; CORDEIRO, Z. J. M; HADDAD, F. XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura. *Fusarium* em fruteiras. Bento Gonçalves, R.S. 22 a 26/10/2012.

MATOS, A. P. DE; MOURICHON, X.; PINON, A. Occurrence of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* on pineapple in Bolivia. **Fruits**, v. 47, n. 1, p.33, 1992

McDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Reviews Phytopathology.**, v.40, p.349–79, 2002 doi: 10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443

MILLER, J. S., JOHNSON, D. A. Competitive fitness of *Phytophthora infestans* isolates under semiarid field conditions. **Phytopathology**, v. 90, p.220-227. 2000.

MÖLLER, M; STUKENBROCK, E. H. Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, p.1-16. 2017/08/07/online.

NIRENBERG, H.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* species and combinations within the *Giberella fujikuroi* species complex. **Micologia**, v.90, p.434-458, 1998.

O'DONNELL, K. *et al.*, Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. **Fungal Genetics and Biology**, USA, v. 52, p. 20-31, 2013.

O'DONNELL, K.; SUTTON, D.A.; FOTHERGILL, A.; . Diversidade filogenética molecular, nomenclatura de haplótipos multilocus e resistência antifúngica in vitro dentro do complexo de espécies de *Fusarium solani*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.2477–2490, 2008.

O'DONNELL, K. *et al.* A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**, n.41, p.61–78, 2000.

O'DONNELL K. *et al.* Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, n.95, p.2044–2049, 1998.

PALMA-SILVA, C.; LEAL, B. S. S.; CHAVES, C. J. N.; FAY, M. F. Advances in and perspectives on evolution in Bromeliaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 181, n. 3, p. 305-322, 2016.

PISSARRA, T. B.; CHAVES, G. M.; VENTURA, J. A. A sintomatologia da Fusariose (*F. moniliforme* J. Sheld var *Subglutinans* Wollenw e Reinking) do abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 4, p.255-263, 1979.

PLOETZ, R. C. *Fusarium*-induced diseases of tropical, perennial crops. **Phytopathology**. Sant Paul, v.96. n.6, p.648-52, jun.,2006.

PLOETZ, R. C. Diseases of tropical fruits crops. CAB Publishing. Florida – EUA. 2003. 543p.

REINHARDT, D. H. C.; BARTHOLOMEW. D. P.; SOUZA, F. V. D.; CARVALHO, A. C. P. P. DE; PÁDUA, T. R. P. DE; JUNGHANS, D.T.; MATOS, A, P. DE. Advances in pineapple plant propagation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 6: (e-302), Jaboticabal, 2018.

REINHARD, R.D.; SOUZA, L.F.S; CABRAL, J.R.S. Abacaxi produção e aspectos técnicos. Brasília: Ministério da Agricultura e abastecimento. Frutas do Brasil/EMBRAPA, 2000, 77p.

Sanford, W.G. Pineapple crop log-concept and development Better Crops. **Plant Food**, v.46, p.32-43, 1962.

SANTOS, A. C. S.; TRINDADE, J. V. C.; LIMA, C. S.; BARBOSA, R. N.; COSTA, A. F.; TIAGO. P. V.; OLIVEIRA, N. T. Morphology, phylogeny, and sexual stage of *Fusarium caatingaense* and *Fusarium pernambucanum*, new species of the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex associated with insects in Brazil, **Mycologia**, v.111, n.2, p.244-259, 2019. DOI: 10.1080/00275514.2019.1573047.

SCHNEIDER, H. Métodos de análise filogenética: um guia prático. **Holos**, 2003.

SCHERER, R.F.; OLKOSKI, D., SOUZA, F.V.D. Gigante de Tarauacá: a triploid pineapple from Brazilian Amazonia. **Scientia Horticulturae**, Leuven, v.181, p.1- 3, 2015.

STĘPIEŃ, Ł; KOCZYK, G; WAŚKIEWICZ, A. Diversity of *Fusarium* species and mycotoxins contaminating pineapple. **Journal Application Genetics**, v. 58, n.3, p.367-380, 2013.

STAM, R.; MCDONALD, B. A. When resistance gene pyramids are not durable—the role of pathogen diversity. **Molecular plant pathology**, v.19, n.3, p. 521–524, 2018.

SUMMERELL, B. A. Resolving *Fusarium*: Current Status of the Genus. **Annual Review of Phytopathology**, v.57, n.1, p.323-339, 2019.

SUMMERELL, B. A., LAURENCE, M. H., LIEW, E. C. Y; LESLIE, J. F. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. **Fungal Diversity**, v.44, n.1, p.3–13, 2010.

TSUJI, S. S. **Análise filogenética e patogênica do agente causal da Fusariose do abacaxizeiro no Brasil**. 2012. 51 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

XIA, J.W.; SANDOVAL-DENIS, M.; CROUS, P.W.; ZHANG, X.G.; LOMBARD, L. Numbers to names – restyling the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex. **Persoonia**, n.43, p. 186–221, 2019.

VENTURA, J.A; GOES, A de. Doenças do abacaxizeiro In: Amorim, L; Bergamim Filho, A; Camargo, LEA; Rezende, JAM. (Org.). **Manual de Fitopatologia**, 2, 5. ed. Ouro Fino-MG: Ceres, 2016. p. 9-21.

VENTURA, J.A; ZAMBOLIM, L; GILBERTSON L Proposição de nova forma *specialis* em *Fusarium subglutinans* no abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira** Suplemento, n.18, p. 280, 1993.

VENTURA, J.A.; ZAMBOLIM, L. Controle das doenças do abacaxizeiro. In: ZAMBOLIM, L. *et al.* **Controle de doenças de plantas fruteiras**. v.1, Viçosa-MG: UFV, 2002. p.445-509.

VILLANI, A.; MORETTI, A.; SAEGER, S.; HAN, Z.; MAVUNGU, J.D.; SOARES, C.M.G.; PROCTOR, R.H.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N.; STEA, G.; PACIOLLA, C.; LOGRIECO, A.F.; SUSCA, A. A polyphasic approach for characterization of a collection of cereal isolates of the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex. **International Journal of Food Microbiology**, v.234,p.24–35, 2016.

WANG, M.M.; CHEN, Q.; DIAO, Y.Z.; DUAN, W.J.; CAI, L. *Fusarium incarnatum-equiseti* complex from China. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, 43: 70–89, 2019. doi: 10.3767/persoonia.2019.43.03.

WILL, K.; MISHLER, B.D.; WHEELER, Q.D. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. **Systematic Biology**, n. 54, p.844-851, 2005.

ZELLER, K.A. *et al.* *Gibberella konza* (*Fusarium konzum*) sp. nov., a new biological species within the *Gibberella fujikuroi* species complex from prairie grass. **Mycologia**, n.95, p.943-954, 2003.

ZORZAL, P. B; AQUIJE, G. M. F. V.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, A. R.; FERNANDES, P. M. B. Análise Morfológica e Bioquímica Comparativa da Resistência a Fusariose em Abacaxizeiro. CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. Vitória ES, 2008.

ARTIGO 1

PATOGENICIDADE E AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp
SOBRE MUDAS DE *Ananas comosus* var *comosus*
CULTIVAR PEROLA¹

¹ 1 Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Tropical Plant Pathology em versão na língua inglesa.

PATOGENICIDADE E AGRESSIVIDADE DE *Fusarium* spp. SOBRE MUDAS DE *Ananas comosus* var *comosus* CULTIVAR PÉROLA

Autor: César Marques Borges Querino

Orientador: Carlos Augusto Dórea Bragança

Resumo: A fusariose é a maior ameaça fitossanitária ao cultivo do abacaxi no Brasil. Seu agente causal, o fungo *Fusarium guttiforme* é um patógeno agressivo e estudos comparativos sobre o perfil de agressividade de genótipos representativos de diversidade climática do Brasil são escassos. Este trabalho objetivou testar a patogenicidade e caracterizar agressividade de diversas espécies monospóricas de *Fusarium* isoladas de plantas doentes oriundas de 10 estados produtores de abacaxi de diferentes regiões do país. Todos os 192 isolados tiveram sua patogenicidade e agressividade avaliadas pela inoculação de suspensão na concentração de 10^5 conídios.ml⁻¹ em mudas de abacaxi 'Pérola' mantidas em casa de vegetação. Semanalmente foi avaliado o progresso da doença mediante contagem de plantas mortas por tratamento e sintomas de parte aérea utilizando escala de notas adaptada. Aos 90 dias após inoculação (DAI), a base do caule foi cortada longitudinalmente para avaliar a severidade da doença. Aos 13 DAI 97,73% dos isolados já haviam provocado sintomas foliares nas mudas. A patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. foi confirmada para 172 isolados. Considerando variáveis como a área abaixo da curva de progresso da doença, o índice de doença externo e interno os isolados foram distribuídos em três grupos de similaridade pelo método UPGMA. No agrupamento 1 foram estabelecidos os 39 isolados de maior agressividade, identificados nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraíba, Pará, São Paulo e Tocantins. Houve significativa variação na agressividade dos isolados.

Palavras chave: agressividade, *Fusarium* spp, fusariose

PATHOGENICITY AND AGGRESSIVENESS OF *Fusarium* spp. ON PLANTLETS OF *Ananas comosus* var *comosus* CULTIVAR PÉROLA

Author: César Marques Borges Querino
Advisor: Carlos Augusto Dórea Bragança

Abstract: Fusarium disease is the most serious phytosanitary threat to pineapple cultivation in Brazil. Its causal agent, the fungus *Fusarium guttiforme* is an aggressive pathogen, however comparative studies on the aggressiveness profile of representative genotypes of climatic diversity in Brazil are scarce. This work aimed at testing the pathogenicity as well as characterizing aggressiveness of several monosporic *Fusarium* species isolated from diseased plants from 10 pineapple producing states from different regions of Brazil. All 192 isolates had their pathogenicity and aggressiveness evaluated by inoculating a suspension, concentration of 10^5 conidia.ml⁻¹, in -pineapple plantlets of cultivar Pérola kept under greenhouse conditions. The disease progress was evaluated weekly by counting the dead plants per treatment and shoot symptoms using an adapted grading scale. At 90 days after inoculation (DAI), the base of the stem was cut longitudinally to assess disease severity. At 13 DAI 97.73% of the isolates had already caused leaf symptoms in the seedlings. The pathogenicity of *Fusarium* spp. isolates was confirmed for 172 isolates. Considering variables such as the area under the disease progress curve, the external and internal disease index, the isolates were placed in three similarity groups based on the UPGMA method. Group1 was composed by the 39 most aggressive isolates. Those isolates were from the states of Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraíba, Pará, São Paulo and Tocantins. There was significant variation in the aggressiveness of the isolates.

Keywords: aggressiveness, *Fusarium* spp., fusariosis

INTRODUÇÃO

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* var *comosus* ((L.) Merrill) Coppens & Leal)) é planta cultivada comercialmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo o Brasil o terceiro maior produtor da fruta (FAO, 2019). No Brasil a produção de abacaxi é constantemente ameaçada por doenças tais como fusariose e a podridão negra do fruto causadas pelos fungos *F. guttiforme* Nirenberg e O'Donnell 1998 e *Thielaviopsis paradoxa*, respectivamente. A fusariose pode causar perdas de até 80% da cultura no campo se constituindo na doença mais destrutiva e ameaçadora ao cultivo da espécie e responsável pelas maiores perdas de produção no mundo (PLOETZ, 2006).

Toda a planta exibe sintomas da doença, principalmente os frutos que exibem exsudação de uma substância gomosa através da cavidade floral, apodrecimento da polpa e presença de resina nos lóculos do ovário. Além disso, ocorre curvatura do caule, morte da região apical, encurtamento das folhas, alteração na filotaxia, redução no desenvolvimento, clorose e morte da planta. Tudo isto provoca completa e imediata perda do valor comercial da fruta (MATOS *et al*, 2012).

A disseminação da doença ocorre por meio de mudas contaminadas, vento, água da chuva, insetos e pássaros. Seu manejo é baseado principalmente no uso de material propagativo sadio, proteção das inflorescências com fungicidas e variedades resistentes (VENTURA; GOES, 2016).

F. guttiforme (**Fgt**) está presente no Brasil e também em outros países da América do Sul incluindo Argentina, Uruguai, Paraguai, Bolívia, Venezuela e Cuba (PLOETZ, 2006). No Brasil a doença foi observada pela primeira vez em São Paulo em 1964 em plantas da variedade Smooth Cayenne (KIMATI; TOKESHI, 1964). De acordo com Matos *et al*, (2012) e Ventura e Goes, (2016), o fungo é patogênico apenas ao abacaxizeiro e apresenta um elevado grau de especificidade.

É sabido que os diferentes mecanismos evolutivos como a mutação e a recombinação geralmente estão ligados com o surgimento de indivíduos com diferenças no padrão de virulência e/ou agressividade (MILLER; JOHNSON 2000). Enquanto o fluxo gênico é responsável pela introdução de novos genótipos do

patógeno em diferentes áreas, desta forma associada à aumento da diversidade e diferenças na patogenicidade pela introdução de novas variantes de um patógeno (GOODWIN 1997; LINDE *et al.*, 2010). Além disso, a seleção de genótipos no programa de melhoramento, quando não considera a variabilidade genética, a agressividade diferencial dos isolados, bem como outras características das populações do patógeno, também pode resultar em uma menor durabilidade da resistência.

Diante disso, este trabalho objetivou testar a patogenicidade e avaliar a agressividade e de isolados de **Fgt** em mudas de abacaxizeiro 'Pérola' a partir de uma coleção representativa de isolados das principais regiões de produção de abacaxi do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Avaliação da patogenicidade e agressividade dos isolados de Fgt frente a mudas de abacaxi 'Pérola'

Os trabalhos de pesquisa foram realizados no Laboratório de Fitopatologia, Telado, Viveiro a céu aberto, Casa de vegetação e na Câmara de crescimento do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura da Embrapa no município de Cruz das Almas – BA.

Amostragem de plantas, isolamento, cultivo e preservação de Fgt - Foram coletadas folhas, mudas tipo filhote, frutos e plantas inteiras de abacaxizeiro com sintomas de fusariose em diferentes áreas de produção nacional (Figura 1). Para coleta dos órgãos foram selecionadas pelo menos três plantas doentes por área georreferenciada. Fragmentos de tecidos sintomáticos foram desinfestados em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por 1min, lavagem em álcool 70% por 1 min e a seguir lavados em água destilada esterilizada – ADE por três vezes (MENEZES; OLIVEIRA,1993).

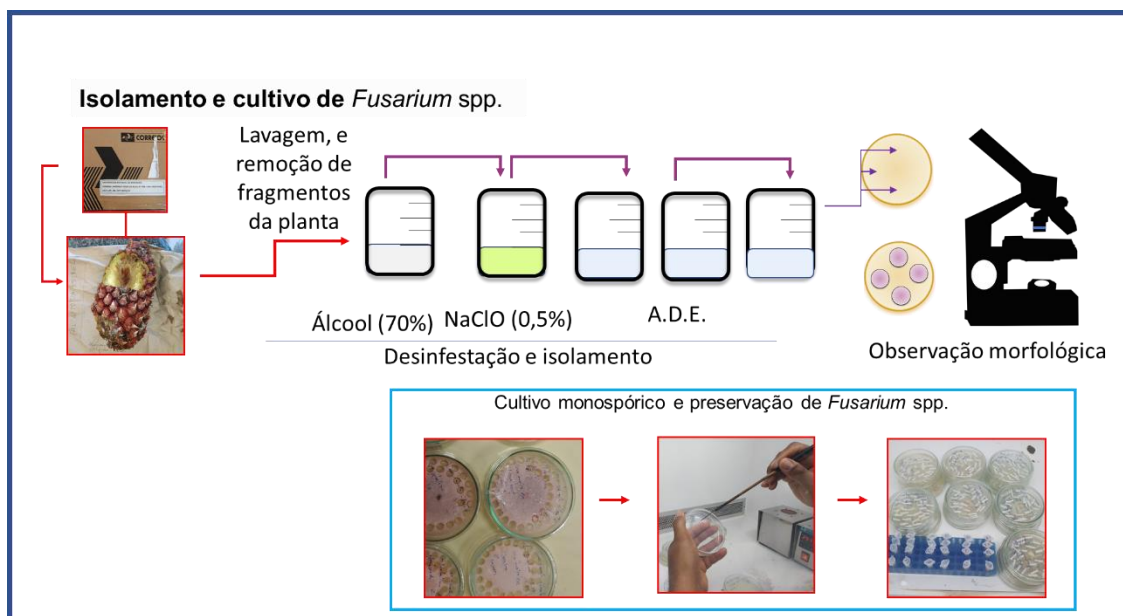


Figura 2. Etapas do Isolamento do fungo. A - Recepção amostras; B - Fruto doente; C -Fragmentos com micélio de Fgt; D e E: Desinfestação em álcool, Hipoclorito e ADE; F:-Fragmentos repicados para BDA. . Etapas da preservação do fungo. A- Cultivo monospórico; B-Preservação por Castellani; C - Preservação por Tiras de papel filtro. UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021

A caracterização do microrganismo foi realizada a partir dos atributos macro e micromorfológicos das culturas puras isoladas (NIRENBERG; O'DONNEL, 1998). Os indivíduos identificados como *Fusarium* spp. foram submetidos ao teste de patogenicidade de acordo com método estabelecido por Santos *et al.* (2002).

Produção e preparo das mudas - As mudas foram produzidas pelo método de seccionamento do caule de plantas de abacaxi 'Pérola' sadias (MATOS *et al.*, 2009) colhidas em áreas de cultivo na região do Centro-Norte, Recôncavo e Baixo Sul da Bahia. Elas foram desfolhadas e os caules foram seccionados longitudinalmente e tratados com inseticida Evidence® e fungicida Nativo® antes do plantio em canteiro com substrato a base de terra vegetal e esterco bovino curtido (Figura 3). As plântulas com cerca de 5cm de altura foram então transferidas para bandejas plásticas contendo 56 tubetes com substrato a base de fibra de coco e mantidas em telado 50% de sombra sob irrigação até atingirem altura de 15 a 20 cm quando foram inoculadas com os isolados de *Fusarium* spp. Para a inoculação, as mudas de abacaxizeiro 'Perola' foram retiradas do substrato, tiveram suas raízes lavadas, cortados o excesso e a base perfurada em quatro pontos equidistantes por um instrumento perfurador de 2mm de diâmetro até uma profundidade de 1cm.



Figura 3. Etapas do produção de mudas por secção do caule. A:- Plantas de abacaxi com folhas; B:- Remoção de folhas; C-Corte longitudinal no talo; D-Feixes de talos tratados com fungicida+inseticida; E- Plantio de talos em canteiro; F-Brotação de talos em canteiro; G- Visão geral de mudas transplantadas em telado. UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021

Preparo do inóculo e Inoculação. A suspensão conidial foi obtida a partir de colônias monospóricas do fungo, cultivados em placas de Petri contendo o meio BDA e incubadas em BOD por dez dias à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h. Após esse período, foi adicionada uma alíquota de 20 ml de ADE à placa de Petri para liberação de esporos com auxílio de escova de cerdas macias. O material suspenso foi filtrado em dupla camada de gaze esterilizada e ajustada a concentração em hemacitômetro para 10^5 conídios. ml^{-1} . A inoculação das mudas ocorreu conforme metodologia proposta por Matos (1978). As mudas previamente preparadas tiveram sua base imersa em suspensão conidial por 3 min. A seguir, elas foram replantadas em tubetes com substrato à base de fibra de coco esterilizado e mantidas em condições de controle de temperatura em casa de vegetação a 25°C (Figura 4).



Figura 4. Processo de preparo de inóculo e inoculação de mudas de abacaxi cultivar Pérola. A - Perfuração de mudas; B-C -Mudas organizadas/tratamento; D - Inóculo pronto em bandejas; E - Mudas mergulhadas em bacias com suspensão; F - Plantas inoculadas mantidas em casa de vegetação por 90 DAI. UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021

A severidade da doença foi avaliada aos 90 dias após a inoculação (DAI), quando as mudas inoculadas foram retiradas do substrato e seccionadas longitudinalmente, na região mediana, para avaliação da lesão (Figura 5). Foram atribuídas notas ao tamanho da lesão na base do caule, segundo a escala adaptada de Rohrbach e Johnson (2003): zero = sem sintomas; 1 = 1 a 2% de necrose da base do caule; 2 = necrose de 3 a 5% da base do caule; 3 = necrose de 6 a 10% da base do caule; 4 = necrose de 11 a 25% da base do caule; 5 = necrose de 26 a 50% da base do caule; 6 = necrose de 51 a 100% da base do caule (Figura 5 e 6). Esses dados permitiram calcular o índice de doença interno/severidade de ataque por meio da fórmula de Mckinney, como a seguir: $IDI = \frac{\sum [(grau\ da\ escala \times\ frequência)]}{(N^\circ\ de\ plantas \times\ grau\ máximo)} \times 100$ (McKINNEY, 1923). Para completar os postulados de Koch, procedeu-se o ré-isolamento e cultivo do patógeno em meio de cultura BDA para avaliação das suas características morfológicas para confirmação do agente causal. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado - DIC com 192 isolados e cinco repetições por isolado.

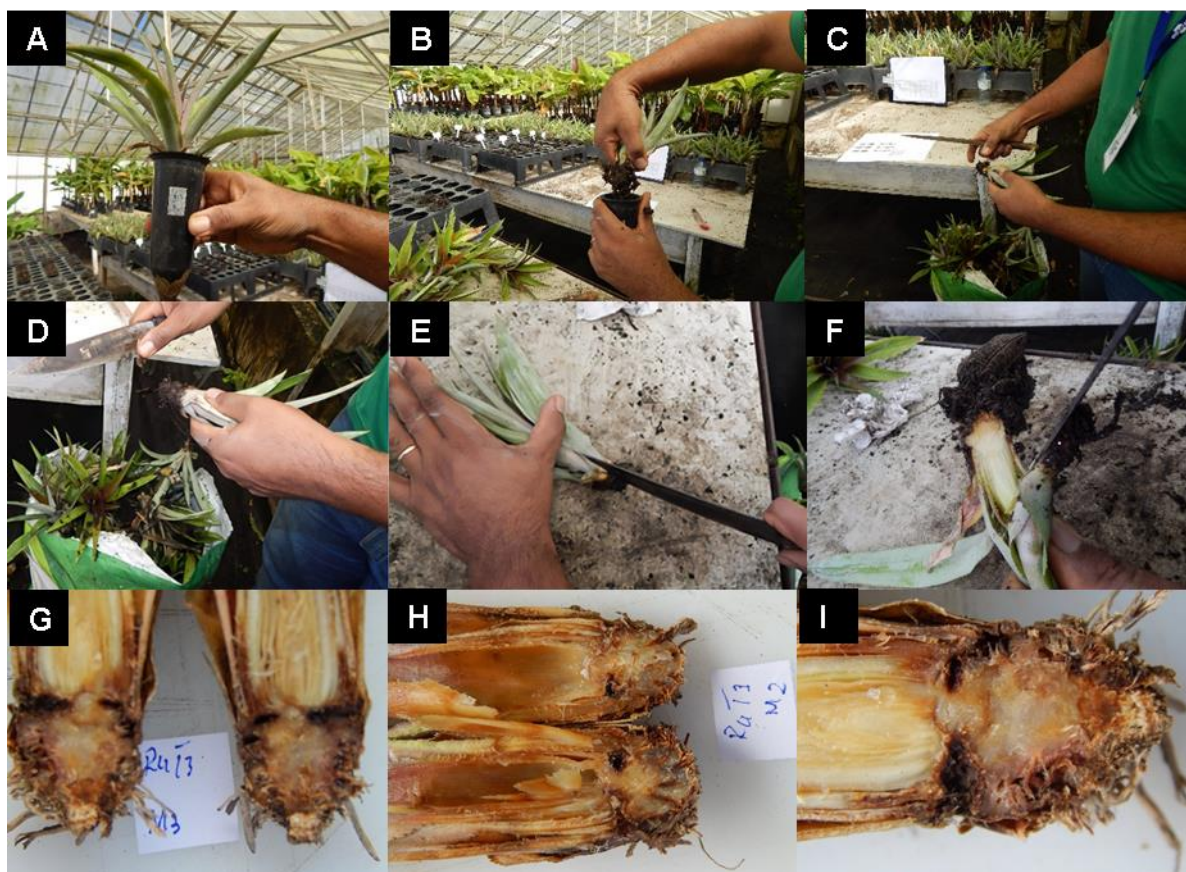


Figura 5. Processo de avaliação de patogenicidade de isolados fúngicos em mudas de abacaxi cultivar Pérola. A- Muda identificada com tratamento; B-Retirada da muda do tubete; C-D Retirada do substrato e raízes; E-F-Corte longitudinal na base da muda base exposta; G-I- Sintoma de necrose na base da muda. UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021

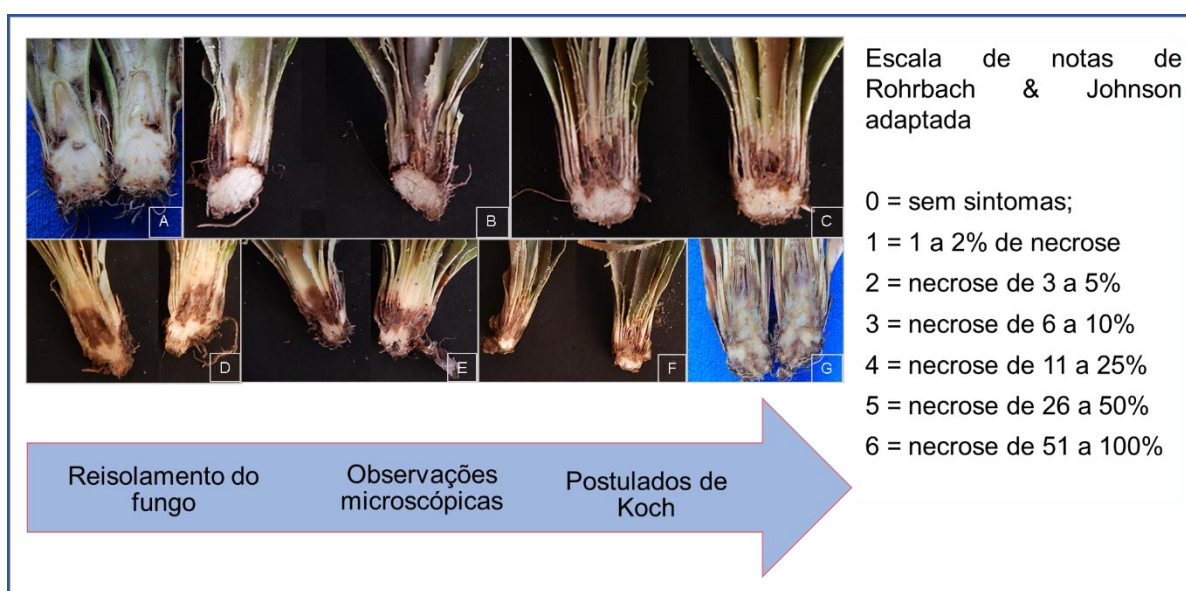


Figura 6. Representação da escala de notas adaptada de Rohrbach & Johnson (2003) adotada para medição das lesões para avaliar a severidade da fusariose em mudas de abacaxizeiro cultivar Pérola inoculadas. A(0) = sem sintomas; B(1) = 1 a 2% de necrose da base do caule; C(2) = necrose de 3 a 5% da base do caule; D(3) = necrose de 6 a 10% da base do caule; E(4) = necrose de 11 a 25% da base do caule; F(5) = necrose de 26 a 50% da base do caule; G(6) = necrose de 51 a 100% da base do caule. UFRB, Cruz das Almas, BA 2021

A agressividade dos isolados foi avaliada semanalmente após o período de incubação do patógeno até os 90 DAI. Foram anotadas a expressão dos sintomas externos, observando-se seca das folhas basais, amarelecimento e clorose foliar, seca de extremidade das folhas, retorcimento de folhas, alteração de filotaxia, 'olho aberto', folhas centrais soltas e o número de mudas mortas por tratamento, a cada semana. Adotou-se um sistema de escala de notas adaptada de Rohrbach & Johnson (2003), onde, 0 = ausência de sintomas; 1 = seca de folhas basais/intermediárias; 2 = seca de extremidade folhas; 3 = retorcimento de folhas; 4 = alteração de filotaxia; 5 = morte de região apical. A partir dos dados de sintomas externos coletados semanalmente foi calculado o índice de doença externo (IDE) de McKinney utilizando a fórmula a seguir: $IDE = \frac{\sum [(grau \ da \ escala \times \ frequ\u00eancia)]}{(N^\circ \ de \ plantas \times \ grau \ m\u00e1ximo)} \times 100$ (McKINNEY, 1923). Para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença – AACPD, foram utilizados dados coletados dos 13 aos 90 DAI baseados no IDE (Figura 7).

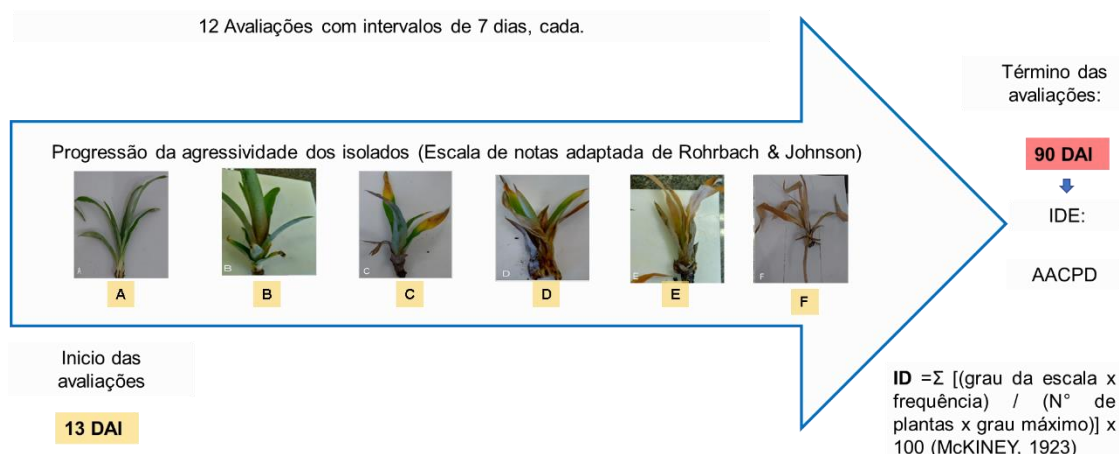


Figura 7. Representação da escala de notas adaptada de Rohrbach & Johnson (2003) adotada para avaliar a agressividade da fusariose em mudas de abacaxizeiro cultivar Pérola inoculadas. A(0) = ausência de sintomas; B(1) = seca de folhas basais/intermediárias; C(2) = seca de extremidade folhas; D(3) = retorcimento de folhas; E(4) = alteração de filotaxia; F(5) = morte de região apical. UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021

O delineamento utilizado foi um DIC com 192 isolados e cinco repetições. A partir dos resultados, foram realizadas análises multivariadas de agrupamentos com 172 isolados patogênicos visando agrupar aqueles semelhantes em relação às variáveis IDE, IDI e AACPD. Grupos foram formados a partir da medida de dissimilaridade Euclidiana e a seguir identificada a similaridade entre os grupos pelo método Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages-UPMGA no

programa R visando agrupar os genótipos semelhantes em relação às variáveis citadas.

A validação dos agrupamentos foi determinada pelo coeficiente de Correlação cofenética (CCC). A AACPD, o Índice de doença interna e externa seguiram de acordo os pacotes Factoextra e ade4 do software estatístico R. Para análise de componentes principais foi utilizado o pacote FactoMineR. Para o número ideal de clusters, foi utilizado o pacote NbClust do software R. As análises foram realizadas pelo programa estatístico R (R CORE TEAM, 2021).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados monospóricos utilizados representam regiões com diferentes características edafoclimáticas do Brasil assim distribuídas com exemplares dos estados da Bahia, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Rio de Janeiro, São Paulo e Tocantins (Figura 1). Para Summerell *et al* (2010) e Karim *et al* (2016), a geografia, o clima e o hospedeiro podem ser excelentes parâmetros para informar sobre a origem de muitas espécies de *Fusarium*. McDonald e Linde (2002), acrescentam que para o estudo detalhado e de maior impacto desse gênero, é necessária uma amostragem geográfica ampla.

Agressividade / Patogenicidade

Um conjunto de 192 isolados de *Fusarium* spp. foram testados quanto a patogenicidade e avaliados quanto a agressividade em mudas de abacaxizeiro 'Pérola'. Apenas 172 dos isolados demonstraram ser patogênicos na medida que provocaram sintomas típicos externos e internos da doença, verificados semanalmente e aos 90 DAI mediante sintomas na parte aérea e corte longitudinal da base do caule, respectivamente. 78 isolados foram capazes de provocar a morte de mudas. Os sintomas típicos não foram vistos nas mudas controle com ADE.

De acordo com o método de agrupamento UPGMA, os isolados foram distribuídos em três grupos. No grupo 1, estão isolados de maior agressividade (22,67%), no grupo 2, os de agressividade intermediária (38,96%) e no grupo 3 os de menor agressividade.(38,37%) dos isolados O isolado CMF-0660 apresenta-se em destaque, pois foi também o que apresentou 100% de mudas mortas, maior IDI, IDE e AACPD. O estado da Bahia se destacou com 38,46% dos isolados, Pará

12,82%, Espírito Santo 12,82%, Paraíba 15,38%, Minas Gerais 10,26%, São Paulo 7,70% e Tocantins 2,56%. Logo, 51,28% dos isolados mais agressivos têm origem no Nordeste, 30,77% no Sudeste e 17,95% no Norte do país (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Grupos de isolados de acordo com a agressividade ao abacaxi 'Pérola'

Agrupamento	Isolados de <i>Fusarium</i> spp.* (CMF)
1	0516, 0517, 0537, 0580, 0570, 0571, 0573, 0579, 0582, 0589, 0628, 0660, 0667, 0690, 0603, 0518, 0526, 0525, 0569, 0515, 0534, 0521, 0522, 0581, 0591, 0629, 0655, 0656, 0702, 0523, 0710, 0565, 0566, 0712, 0705, 0700, 0583, 0538 e 0708
2	0614, 0647, 0682, 0543, 0590, 0633, 0519, 0670, 0557, 0627, 0696, 0542, 0575, 0520, 0540, 0554, 0558, 0559, 0560, 0561, 0562, 0563, 0564, 0572, 0577, 0578, 0587, 0588, 0604, 0605, 0606, 0607, 0608, 0612, 0619, 0620, 0651, 0658, 0661, 0671, 0673, 0674, 0678, 0689, 0584, 0631, 0641, 0711, 0508, 0609, 0613, 0654, 0687, 0694, 0695, 0704, 0709, 0713, 0714, 0691, 0693, 0706, 0675, 0697, 0716, 0718, 0596
3	0535, 0541, 0616, 0683, 0639, 0646, 0630, 0680, 0637, 0638, 0632, 0533, 0681, 0568, 0524, 0530, 0544, 0545, 0546, 0547, 0548, 0549, 0550, 0551, 0552, 0555, 0556, 0574, 0585, 0586, 0592, 0593, 0594, 0595, 0598, 0600, 0615, 0617, 0618, 0621, 0622, 0623, 0624, 0634, 0635, 0645, 0650, 0659, 0664, 0668, 0669, 0676, 0677, 0504, 0553, 0626, 0513, 0685, 0699, 0707, 0715, 0722, 0644, 0625, 0636, 0642.

CMF-isolados da micoteca do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura da Embrapa obtidos de *Ananas comosus* var *comosus*. * As informações dos isolados foram detalhadas na tabela 2.

Houve uma diversidade de sintomas na parte aérea das plantas que inicialmente se caracterizaram por amarelecimento e secamento de folhas basais finalizando com seca total e morte das plantas. Observou-se uma variação na agressividade dos isolados como revelado pelas variáveis IDE, IDI e AACPD. Aos 13 DAI 97,73% dos isolados já provocaram sintomas foliares nas mudas. Resultados semelhantes obtiveram Burlakoti *et al*, 2012, ao testarem a patogenicidade e virulência de *F. graminearum*, *F. oxysporum* e *Fusarium* sp. nov. sobre mudas de beterraba. Esses autores concluíram que isolados mais virulentos de cada espécie induziram sintomas foliares mais cedo do que os isolados menos virulentos. Essa variação na agressividade entre isolados pode estar associada a a uma possível diversidade de genótipos envolvidas. As espécies de *Fusarium* produzem diferentes micotoxinas envolvidas na patogênese. Por exemplo *F.*

ananatum e *F. proliferatum* podem produzir fumonisinas B1-B3 (FUM), beauvericina (BEA) e moniliformina (MON), que de maneira geral atuam direta ou indiretamente na patogênese rompendo membranas plasmática, alterando apoptose, interrompendo sinalização celular e inibindo crescimento de plantas. *F. oxysporum* produz apenas MON. Cada enzima atua em um ou mais processos fisiológicos da planta (PERINCHERRY *et al*, 2019; BARRAL *et al*, 2020). Logo, pode ser que as três micotoxinas de **Fp** o deixem em vantagem na patogênese em relação a **Fo**. Assim pode ser que a variação na severidade da doença seja uma expressão da diversidade genética dos isolados em estudo.

Considerando-se os resultados obtidos pela análise dos componentes principais, os dois primeiros componentes responderam por 99,4% da variação total, em que o CP 1 foi responsável por 90,0% e o CP 2, por 9,40% das variações dos dados. A análise de componentes principais permite inferir que houve uma alta estimativa de correlação de IDE e AACPD com o CP1 e IDI tendo maior contribuição no PC2. De maneira geral as três variáveis contribuíram positivamente para determinar a agressividade dos isolados, porém as variáveis IDE e AACPD estão mais proximamente correlacionadas nessa resposta e com vetores mais próximos ao eixo do PC1, o que significa que os isolados com altos valores de AACPD, tendem a apresentar também altos valores de IDE (Figura 8). De maneira geral, o IDE, AACPD e IDI estão explicados quase que 100% nos dois primeiros componentes.

O dendograma relacionado à análise das variáveis citadas está representado na figura 9. A análise acurada da Tabela 1, sugere uma relação correspondente direta entre o IDI, IDE e a AACPD dos isolados, ou seja, de maneira geral quanto maior a área necrosada na base do caule, maior foi a intensidade de sintomas na parte aérea da muda. Para Askun (2018), necrose dos tecidos está diretamente relacionada com a severidade da espécie de *Fusarium*.

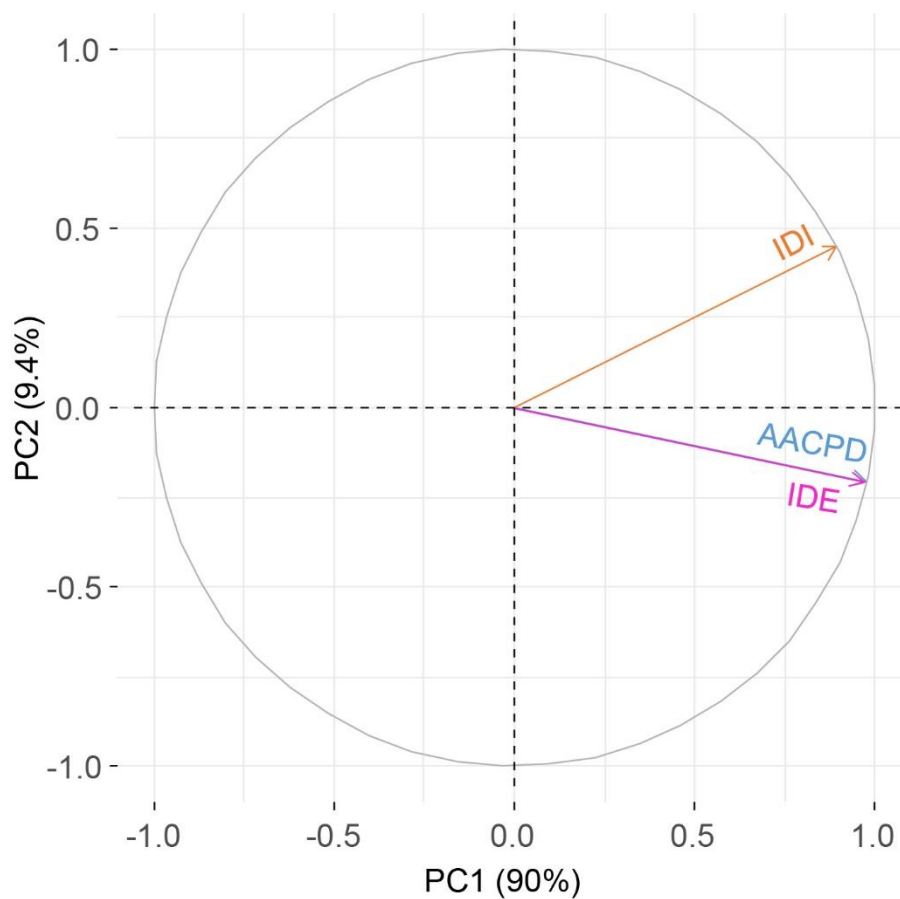


Figura 8. Gráfico do componente principal 1 x componente principal 2 sobre as variáveis AACPD X IDE X IDI pela PCA. UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021

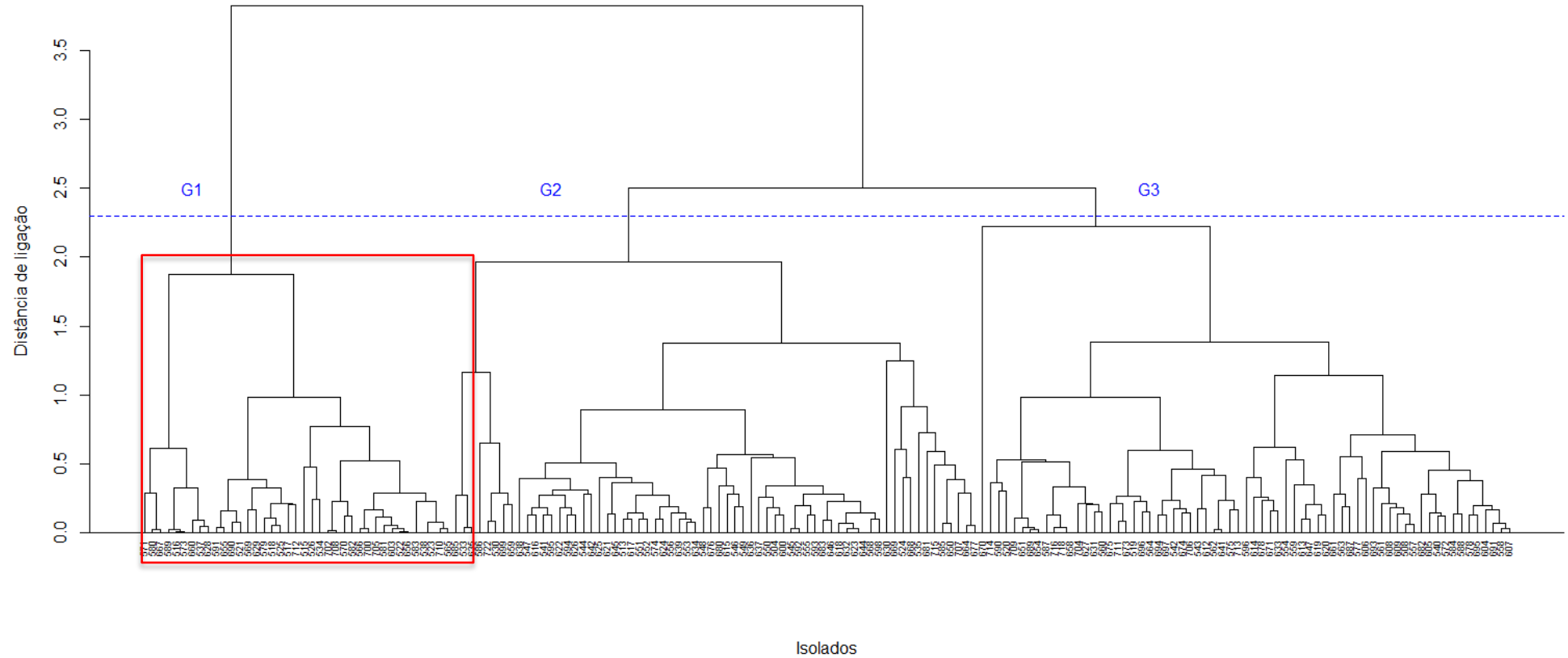


Figura 9. Dendrograma gerado pela análise de agrupamento pelo método UPGMA com distribuição de isolados em grupos de agressividade de fusariose sobre mudas de abacaxi cultivar Pérola. G1-Grupo de isolados mais agressivos. G2-Grupo de isolados medianamente agressivos. G3-Grupo de isolados menos agressivos. A linha pontilhada representa o nível de fusão entre os grupos. UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021

Tabela 2. Isolados usados neste estudo informando sobre hospedeira, substrato, origem, coordenadas, índice de doença externo e interno, área abaixo da curva de progresso da doença e agrupamento com base no método UPGMA. UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021.

Código isolados(CMF*)	Hospedeira*	Tecido vegetal	Origem	Latitude	Longitude	IDE*	M*	IDI*	AACPD*	C*
0515	ACC	Filhote	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	64,7	40	76,67	5124	1
0534	ACC	Filhote	C. Araguaia-PA	7°33' 40"S	49°30' 37"O	60,3	60	83,33	4858	1
0535	ACC	Filhote	C. Araguaia-PA	7° 33' 40"S	49°30' 37"O	18,1	Nd	36,1	644	3
0537	ACC	Fruto	Lencóis-BA	12°33'45.33"S	41°23'38.99"O	88,0	100	100,00	7126	1
0541	ACC	Fruto	Lencóis-BA	12°33'45.33"S	41°23'38.99"O	28,0	0	36,67	2262	3
0570	ACC	Filhote	Itaberaba-BA	12°23'32.86"S	40°14'46.24"O	63,0	100	100,00	5374	1
0571	ACC	Filhote	Frutal-MG	20°1' 38.00"S	48° 57' 2.66"O	76,7	100	100,00	6504	1
0579	ACC	Folha	Marataízes-ES	21° 04' 06"S	40° 53' 07" W	70,7	100	100,00	6000	1
0582	ACC	Folha	Marataízes-ES	21° 04' 06"S	40° 53' 07" W	64,3	100	100,00	5482	1
0589	ACC	Filhote	Frutal-MG	20°1' 38.00"S	48° 57' 2.66"O	84,7	100	100,00	6832	1
0591	ACC	Filhote	Frutal-MG	20°1' 38.00"S	48° 57' 2.66"O	68,0	40	100,00	5522	1
0614	ACC	Folha	S. Felix-BA	12°40'25" S	39°41'15" O	44,0	20	66,67	3496	2
0616	ACC	Folha	S. Felix-BA	12°40'25" S	39°41'15" O	26,3	0	33,33	2152	3
0647	ACC	Coroa	Ourolândia-BA	10°.39'.50,4"S	41° 12' 0,9"W	39,7	0	60,00	3160	2
0682	ACC	Nd	Turiaçu-MA	45° 22' 17"W	1° 39' 48" S	35,0	40	76,67	2974	2
0629	ACC	Base caule	Ourolândia-BA	10°.39'.50,4"S	41° 12' 0,9"W	71,0	20	93,33	5772	1

Tabela 2. Isolados usados neste estudo informando sobre hospedeira, substrato, origem, coordenadas, índice de doença externo e interno, área abaixo da curva de progresso da doença e agrupamento com base no método UPGMA (continuação). UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021.

Código isolados	Hospedeira*	Tecido vegetal	Origem	Latitude	Longitude	IDE*	M*	IDI*	AACPD*	C*
0660	ACC	Fruto	Itapororoca-PB	6° 45' 29"S	35° 17' 40"W	88,7	100	100,00	7196	1
0628	ACC	Base caule	Ourolândia-BA	10° 39' 50,4"S	41° 12' 0,9"W	87,3	100	100,00	7112	1
0543	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	39,0	0	100,00	3014	2
0683	ACC	Nd	São Luis-MA	44° 18' 09"W	2° 31' 47"S	30,0	0	50,00	2516	3
0580	ACC	Folha	Marataízes-ES	21° 04' 06"S	40° 53' 07" W	81,0	100	100,00	6496	1
0526	ACC	Rebentão	C. Araguaia-PA	7° 33' 40"S	49° 30' 37"O	60,0	80	86,67	5110	1
0639	ACC	Caule	Ourolândia-BA	10° 39' 50,4"S	41° 12' 0,9"W	26,0	0	26,67	2012	3
0590	ACC	Filhote	Frutal-MG	20°1' 38.00"S	48° 57' 2.66"O	48,0	60	86,67	4042	2
0646	ACC	Filhote	Ourolândia-BA	10° 39' 50,4"S	41° 12' 0,9"W	31,0	0	50,00	2442	3
0633	ACC	Filhote	Ourolândia-BA	10° 39' 50,4"S	41° 12' 0,9"W	46,0	20	70,00	3650	2
0630	ACC	Filhote	Ourolândia-BA	10° 39' 50,4"S	41° 12' 0,9"W	10,3	20	70,00	870	3
0680	ACC	Nd	Turiação-MA	45° 22' 17"W	1° 39' 48"S	32,7	0	56,67	2640	3
0573	ACC	Filhote	Frutal-MG	20°1' 38.00"S	48° 57' 2.66"O	84,7	100	100,00	6860	1
0637	ACC	Fruto	Ourolândia-BA	10° 39' 50,4"S	41° 12' 0,9"W	31,0	20	43,33	2810	3
0638	ACC	Fruto	Ourolândia-BA	10° 39' 50,4"S	41° 12' 0,9"W	24,3	0	36,67	2530	3
0525	ACC	Rebentão	C. Araguaia-PA	7° 33' 40"S	49° 30' 37"O	71,3	80	100,00	6082	1
0519	ACC	Coroa	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	42,7	0	80,00	3426	2
0569	ACC	Filhote	Itaberaba-BA	12°23'32.86"S	40°14'46.24"O	69,0	80	93,33	5888	1
0670	ACC	Filhote	Umburanas-BA	10°36'13.7"S	41°19'24.48"O	12,3	40	90,00	4168	2
0667	ACC	Filhote	Arareceida Rio Negro-TO	S 09° 47' 11,8" W47° 56' 54,4"	47° 56' 54,4" W	81,0	100	100,00	6524	1
0557	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	33,3	0	90,00	2610	2
0632	ACC	Base caule	Ourolândia-BA	10° 39' 50,4"N	41° 12' 0,9"W	30,3	0	43,33	2446	3
0581	ACC	Folha	Marataízes-ES	21° 04' 06"S	40° 53' 07" W	60,3	20	100,00	4840	1
0533	ACC	Filhote	C. Araguaia-PA	7° 33' 40"S	49° 30' 37"O	19,0	0	16,67	1590	3
0681	ACC	Nd	Chapadinha-MA	43° 21' 37"W	3° 44' 31"S	16,3	0	30,00	1406	3

Tabela 2. Isolados usados neste estudo informando sobre hospedeira, substrato, origem, coordenadas, índice de doença externo e interno, área abaixo da curva de progresso da doença e agrupamento com base no método UPGMA (continuação). UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021.

Código isolados	Hospedeira*	Tecido vegetal	Origem	Latitude	Longitude	IDE*	M*	IDI*	AACPD*	C*
0627	ACC	Filhote	Ourolândia-BA	10°39'.50,4"N	41° 12' 0,9"W	50,0	100	100,00	4232	2
0696	ACC	Filhote	Eunápolis-BA	16°10'08.1"S	39°22'13.6"W	45,0	80	80,00	3564	2
0690	ACC	Filhote	Eunápolis-BA	16° 10'08.1"S	39°22'13.6"W	70,3	100	100,00	5642	1
0516	ACC	Filhote	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	84,87	100	100,00	6860	1
0517	ACC	Fruto(344xSC11)	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	69,0	100	100,00	5878	1
0518	ACC	Fruto(344xSC11)	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	72,0	80	100,00	6120	1
0542	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	42,7	20	100,00	3342	2
0568	ACC	Filhote	Itaberaba-BA	12°23'32.86"S	40°14'46.24"O	30,0	0	46,67	2404	3
0575	ACC	Filhote	Itaberaba-BA	12°23'32.86"S	40°14'46.24"O	39,7	40	86,67	3328	2
0520	ACC	Fruto(344xSC11)	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	50,0	40	93,33	3958	2
0521	ACC	Rebentão	C. Araguaia-PA	7° 33' 40"S	49° 30' 37"O	69,7	60	100,00	5566	1
0522	ACC	Rebentão	Stª Terezinha-PB	6° 44' 16.18"	35° 7' 46.17"O	61,0	20	100,00	4882	1
0524	ACC	Rebentão	C. Araguaia-PA	7° 33' 40"S	49° 30' 37"O	20,7	0	60,00	1702	3
0530	ACC	Filhote	C. Araguaia-PA	7° 33' 40"S	49° 30' 37"O	7,3	0	6,67	596	3
0538	ACC	Fruto	Lencóis-BA	12°33'45.33"S	41°23'38.99"O	57,7	60	100,00	4574	1
0540	ACC	Fruto	Lencóis-BA	12°33'45.33"S	41°23'38.99"O	37,0	40	83,33	2936	2
0544	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	30,0	20	36,67	2446	3
0545	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	33,0	0	50,00	2642	3
0546	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	37,3	0	53,33	2992	3
0547	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	26,3	0	36,67	2138	3
0548	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	37,0	0	46,67	2992	3
0549	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	35,3	20	53,33	2824	3
0550	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	31,7	0	40,00	2572	3
0551	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	26,7	0	30,00	2194	3
0552	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	27,7	0	30,00	2278	3

Tabela 2. Isolados usados neste estudo informando sobre hospedeira, substrato, origem, coordenadas, índice de doença externo e interno, área abaixo da curva de progresso da doença e agrupamento com base no método UPGMA (continuação). UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021.

Código isolados	Hospedeira*	Tecido vegetal	Origem	Latitude	Longitude	IDE*	M*	IDI*	AACPD*	C*
0554	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	42,0	0	53,33	3432	2
0555	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	33,0	0	46,67	2656	3
0556	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	25,3	0	30,00	2082	3
0558	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	33,3	0	80,00	2670	2
0559	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	40,7	40	70,00	3258	2
0560	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	53,0	40	96,67	4196	2
0561	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	34,7	0	86,67	2712	2
0562	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	39,0	0	90,00	3046	2
0563	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	28,3	0	73,33	2248	2
0564	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	46,0	20	83,33	3520	2
0565	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	58,3	20	100,0	4630	1
0566	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	62,3	0	100,0	4966	1
0572	ACC	Filhote	Itaberaba-BA	12°23'32.86"S	40°14'46.24"O	38,3	20	83,33	3034	2
0574	ACC	Filhote	Itaberaba-BA	12°23'32.86"S	40°14'46.24"O	24,7	0	23,33	2054	3
0577	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	29,7	0	83,33	2348	2
0578	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	32,7	0	73,33	2614	2
0585	ACC	Folha	Marataízes-ES	21° 04' 06"S	40° 53' 07" W	15,7	0	40,00	1262	3
0586	ACC	Folha	Marataízes-ES	21° 04' 06"S	40° 53' 07" W	11,3	0	16,70	942	3
0587	ACC	Folha	Marataízes-ES	21° 04' 06"S	40° 53' 07" W	55,0	0	96,67	4378	2
0588	ACC	Folha	Marataízes-ES	21° 04' 06"S	40° 53' 07" W	33,7	0	66,67	2716	2
0592	ACC	Filhote	Itaberaba-BA	12° 44' 19,33" S	40° 17' 05,06"	33,3	0	50,00	2670	3
0593	ACC	Filhote	Itaberaba-BA	12° 44' 19,33" S	40° 17' 05,06"	33,0	0	43,33	2670	3
0594	ACC	Filhote	Itaberaba-BA	12° 44' 19,33" S	40° 17' 05,06"	27,3	0	40,00	2208	3
0595	ACC	Filhote	Itaberaba-BA	12° 44' 19,33" S	40° 17' 05,06"	28,0	0	33,33	2292	3
0598	ACC	Filhote	Itaberaba-BA	12° 44' 19,33" S	40° 17' 05,06"	31,0	0	46,67	2488	3
0600	ACC	Filhote	Itaberaba-BA	12° 44' 19,33" S	40° 17' 05,06"	33,3	0	40,00	2712	3

Tabela 2. Isolados usados neste estudo informando sobre hospedeira, substrato, origem, coordenadas, índice de doença externo e interno, área abaixo da curva de progresso da doença e agrupamento com base no método UPGMA (continuação). UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021.

Código isolados	Hospedeira*	Tecido vegetal	Origem	Latitude	Longitude	IDE*	M*	IDI*	AACPD*	C*
0603	ACC	Filhote	T. Neves-BA	13°22'23.87S	39°22'17.79"O	61,0	100	100,00	4854	1
0604	ACC	Filhote	T. Neves-BA	13°22'23.87S	39°22'17.79"O	34,7	0	76,67	2710	2
0605	ACC	Filhote	T. Neves-BA	13°22'23.87S	39°22'17.79"O	37,3	0	80,0	2978	2
0606	ACC	Filhote	T. Neves-BA	13°22'23.87S	39°22'17.79"O	25,7	0	86,67	2036	2
0607	ACC	Filhote	T. Neves-BA	13°22'23.87S	39°22'17.79"O	33,7	0	80,00	2698	2
0608	ACC	Folha	S. Felix-BA	12°40'25" S	39°41'15" O	32,7	0	93,33	2614	2
0612	ACC	Folha	S. Felix-BA	12°40'25" S	39°41'15" O	37,7	20	96,67	2918	2
0615	ACC	Folha	S. Felix-BA	12°40'25" S	39°41'15" O	36,0	0	60,00	2852	3
0617	ACC	Filhote	S. Felix-BA	12°40'25" S	39°41'15" O	27,7	0	26,67	2292	3
0618	ACC	Filhote	S. Felix-BA	12°40'25" S	39°41'15" O	31,3	0	43,33	2530	3
0619	ACC	Filhote	S. Felix-BA	12°40'25" S	39°41'15" O	39,0	0	63,33	3090	2
0620	ACC	Caule	S. Felix-BA	12°40'25" S	39°41'15" O	39,0	0	66,67	3076	2
0621	ACC	Caule	S. Felix-BA	12°40'25" S	39°41'15" O	23,3	0	30,00	1882	3
0622	ACC	Caule	S. Felix-BA	12°40'25" S	39°41'15" O	25,7	0	40,00	2052	3
0623	ACC	Filhote	T. Neves-BA	13°22'23.87S	39°22'17.79"O	30,7	0	43,33	2474	3
0624	ACC	Filhote	S. Felix-BA	12°40'25" S	39°41'15" O	23,7	0	23,33	1970	3
0634	ACC	Base caule	Ourolândia-BA	10° 39' 50,4"N	41° 12' 0,9"S	25,0	0	26,67	2068	3
0635	ACC	Folha	Ourolândia-BA	10° 40' 00,9"S	41° 11' 55,5" W	18,7	0	16,67	1546	3
0645	ACC	Filhote	Ourolândia-BA	10° 40' 00,9"S	41° 11' 55,5" W	22,7	0	33,33	1844	3
0650	ACC	Filhote	Umburanas-BA	10°36'13.7"S	41°19'24.48"O	15,0	0	40,00	1194	3
0651	ACC	Filhote	Umburanas-BA	10°36'13.7"S	41°19'24.48"O	48,0	0	100,0	3762	2
0655	ACC	Filhote	Itapororoca-PB	6° 45' 29"S	35° 17' 40"W	68,0	40	100,00	5474	1
0658	ACC	Filhote	Itapororoca-PB	6° 45' 29"S	35° 17' 40"W	55,3	80	100,00	4378	2
0659	ACC	Fruto	Itapororoca-PB	6° 45' 29"S	35° 17' 40"W	6,0	0	3,33	450	3
0661	ACC	Fruto	Itapororoca-PB	6° 45' 29"S	35° 17' 40"W	30,3	0	73,33	2430	2
0664	ACC	Filhote	Eunápolis-BA	16° 10'08.1"S	39°22'13.6"W	16,3	0	46,67	1350	3

Tabela 2. Isolados usados neste estudo informando sobre hospedeira, substrato, origem, coordenadas, índice de doença externo e interno, área abaixo da curva de progresso da doença e agrupamento com base no método UPGMA (continuação). UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021.

Código isolados	Hospedeira*	Tecido vegetal	Origem	Latitude	Longitude	IDE*	M*	IDI*	AACPD*	C*
0668	ACC	Filhote	Umburanas-BA	10°36'13.7"S	41°19'24.48"O	25,0	0	60,00	2038	3
0669	ACC	Filhote	Umburanas-BA	10°36'13.7"S	41°19'24.48"O	16,7	0	60,00	1336	3
0671	ACC	Fruto	Ourolândia-BA	10° 40' 00,9"S	41° 11' 55,5" W	45,0	40	73,33	3566	2
0673	ACC	Filhote	Ourolândia-BA	10° 40' 00,9"S	41° 11' 55,5" W	44,3	40	86,67	3480	2
0674	ACC	Fruto	Ourolândia-BA	10° 40' 00,9"S	41° 11' 55,5" W	44,7	20	96,67	3446	2
0676	ACC	Filhote	Umburanas-BA	10°36'13.7"S	41°19'24.48"O	37,0	0	43,33	2834	3
0677	ACC	Fruto	Ourolândia-BA	10° 40' 00,9"S	41° 11' 55,5" W	17,0	0	46,67	1378	3
0678	ACC	Fruto	Ourolândia-BA	10° 40' 00,9"S	41° 11' 55,5" W	43,0	0	73,33	3440	2
0689	ACC	Filhote	Eunápolis-BA	16° 10'08.1"S	39°22'13.6"W	47,7	0	100,00	3820	2
0504	ACC	Filhote	Goiás-GO	Nd	Nd	33,3	0	36,67	2726	3
0523	ACC	Rebentão	C. Araguaia-PA	7° 33' 40"S	49° 30' 37"O	57,7	60	100,00	4574	1
0553	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	24,3	0	26,67	1996	3
0584	ACC	Folha	Marataízes-ES	21° 04' 06"S	40° 53' 07" W	33,3	0	70,00	2698	2
0626	ACC	Caule	S. Felix-BA	12°40'25" S	39°41'15" O	27,3	0	43,33	2178	3
0631	ACC	Base caule	Ourolândia-BA	10°.39'.50,4"N	41° 12' 0,9"W	52,3	0	100,00	4126	2
0641	ACC	Filhote	Ourolândia-BA	10° 40' 00,9"S	41° 11' 55,5" W	38,7	0	90,00	3052	2
0656	ACC	Filhote	Itapororoca-PB	6° 45' 29"S	35° 17' 40"W	61,0	40	100,00	4896	1
0705	ACC	Coroa	Stª Terezinha-PB	6° 44' 16.18"	35° 7' 46.17"O	59,7	60	100,0	4758	1
0711	ACC	Folha	Piratinga-SP	22° 18' 54"S	49° 03' 39"W	43,3	40	86,67	3412	2
0508	ACC	Folha	Sapé-PB	Nd	Nd	32,7	0	90,00	2554	2
0513	ACC	Folha	CNPMF-BA	12°40'39" S	39°06'23" W	26,7	0	26,67	2208	3
0609	ACC	Folha	S. Felix-BA	12°40'25" S	39°41'15" O	33,3	0	86,67	2568	2
0613	ACC	Folha	S. Felix-BA	12°40'25" S	39°41'15" O	38,7	0	60,00	3076	2
0654	ACC	Filhote	Itapororoca-PB	6° 45' 29"S	35° 17' 40"W	47,7	40	100,00	3790	2
0685	ACC	Nd	São Luis-MA	44° 18' 09"W	2° 31' 47"S	20,0	0	10,00	1534	3
0687	ACC	Nd	São Luis-MA	44° 18' 09"W	2° 31' 47"S	27,3	0	70,00	2102	2

Tabela 2. Isolados usados neste estudo informando sobre hospedeira, substrato, origem, coordenadas, índice de doença externo e interno, área abaixo da curva de progresso da doença e agrupamento com base no método UPGMA (continuação). UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021.

Código isolados	Hospedeira*	Tecido vegetal	Origem	Latitude	Longitude	IDE*	M*	IDI*	AACPD*	C*
0694	ACC	Fruto	Ourolândia-BA	10° 40' 00,9"S	41° 11' 55,5" W	42,0	40	93,33	3326	2
0695	ACC	Fruto	Ourolândia-BA	10° 40' 00,9"S	41° 11' 55,5" W	33,0	20	76,67	2610	2
0699	ACC	Coroa	Ourolândia-BA	10° 40' 00,9"S	41° 11' 55,5" W	4,0	0	6,67	338	3
0700	ACC	Filhote	Eunápolis-BA	16° 10'08.1"S	39°22'13.6"W	62,7	80	100,0	4994	1
0702	ACC	Folha	Stª Terezinha-PB	6° 44' 16.18"	35° 7' 46.17"O	64,7	20	100,00	5178	1
0704	ACC	Coroa	Stª Terezinha-PB	6° 44' 16.18"	35° 7' 46.17"O	50,7	0	100,00	3984	2
0707	ACC	Folha	Piratininga-SP	22° 18' 54"S	49° 03' 39"W	19,3	0	50,00	1588	3
0708	ACC	Isol direto	Piratininga-SP	22° 18' 54"S	49° 03' 39"W	64,7	100	100,00	5162	1
0709	ACC	Folha	Piratininga-SP	22° 18' 54"S	49° 03' 39"W	49,0	0	100,00	3874	2
0710	ACC	Folha	Piratininga-SP	22° 18' 54"S	49° 03' 39"W	58,7	20	100,00	4658	1
0712	ACC	Caule	Piratininga-SP	22° 18' 54"S	49° 03' 39"W	72,0	80	100,0	5826	1
0713	ACC	Folha	Piratininga-SP	22° 18' 54"S	49° 03' 39"W	40,7	0	90,00	3230	2
0714	ACC	Isol direto	Piratininga-SP	22° 18' 54"S	49° 03' 39"W	53,3	60	86,67	4130	2
0715	ACC	Isol direto	Piratininga-SP	22° 18' 54"S	49° 03' 39"W	21,0	0	40,00	1700	3
0722	ACC	Folha	Stª Terezinha-PB	6° 44' 16.18"	35° 7' 46.17"O	8,0	0	6,67	676	3
0644	ACC	Filhote	Ourolândia-BA	10° 40' 00,9"S	41° 11' 55,5" W	30,7	0	43,33	2474	3

Tabela 2. Isolados usados neste estudo informando sobre hospedeira, substrato, origem, coordenadas, índice de doença externo e interno, área abaixo da curva de progresso da doença e agrupamento com base no método UPGMA (conclusão). UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021.

Código isolados	Hospedeira*	Tecido vegetal	Origem	Latitude	Longitude	IDE*	M*	IDI*	AACPD*	C*
0691	ACC	Superf. fruto	Ourolândia-BA	10° 40' 00,9"S	41° 11' 55,5" W	33,0	20	80,00	2612	2
0693	ACC	Superf. fruto	Ourolândia-BA	10° 40' 00,9"S	41° 11' 55,5" W	35,0	0	96,67	2690	2
0706	ACC	Superf. fruto	Stª Terezinha-PB	6° 44' 16.18"	35° 7' 46.17"O	44,0	0	100,0	3480	2
0625	ACC	Filhote	Ourolândia-BA	10° 39' 50,4"S	41° 12' 0,9"W	22,7	0	20,00	1900	3
0675	ACC	Filhote	Ourolândia-BA	10° 40' 00,9"S	41° 11' 55,5" W	45,7	0	86,67	3650	2
0697	ACC	Filhote	Itapororoca-PB	6° 45' 29"S	35° 17' 40"W	42,0	20	96,67	3300	2
0716	ACC	Fruto	Ourolândia-BA	10° 40' 00,9"S	41° 11' 55,5" W	54,7	40	100,0	4368	2
0718	ACC	Fruto	Itabapoara-RJ	21° 28' 12.6" S	41° 08' 29.6"	55,3	60	100,00	4378	2
0636	ACC	Fruto	Ourolândia-BA	10° 40' 00,9"S	41° 11' 55,5" W	34,7	0	33,33	2376	3
0583	ACC	Folha	Marataizes-ES	21° 04' 06"S	40° 53' 07" W	57,7	80	100,00	4880	1
0596	ACC	Filhote	Itaberaba-BA	12° 44' 19,33" S	40° 17' 05,06"	47,0	40	63,33	3762	2
0642	ACC	Filhote	Ourolândia-BA	10° 40' 00,9"S	41° 11' 55,5" W	30,7	0	36,67	2110	3

CMF-isolados da micoteca do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura da Embrapa; ACC – *Ananas comosus* var *comosus*; IDE-Índice de doença externo; M-Percentual de mudas mortas; IDI- Índice de doença interno; AACPD-Área abaixo da curva de progresso da doença; C- Cluster.

CONCLUSÕES

1. A patogenicidade de *Fusarium* spp foi confirmada para 172 isolados
2. Os elevados índices IDI, IDE AACPD demonstraram relação direta com a maior agressividade dos isolados nesse estudo.
3. Há agressividade diferencial na população de *Fusarium* spp em abacaxizeiro obtida neste estudo
4. Os isolados de maior agressividade de *Fusarium* spp. estão localizados nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraíba, Pará, São Paulo e Tocantins

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIAS

ASKUN, T. *Fusarium: Pathogenicity, Infections, Diseases, Mycotoxins and Management*. In: *Fusarium*. Ed., Askun, T. (org.), p.1-11, 2018. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.76507>. Acesso em: 13 de jun de 2019

BURLAKOTI, P.; RIVERA, V.; SECOR, G.A. Qi, A; RIO-MENDOZA, L.E.D.; KHAN M.F.R. Comparative pathogenicity and virulence of *Fusarium* species on sugar beet. **Plant Disease**, v.96, 1291– 6, 2012.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v.24, p.270-276, 1939

FAOSTAT: Agricultural Statistic Database. Rome: world agriculture information centre, 2014. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em 06 de jun. 2019.

GOODWIN, S. B. The population genetics of *Phytophthora*. **Phytopathology**, n.87, p. 462-473, 1997.

KARIM N.F.; MOHD M.; NOR N.M.; ZAKARIA L. Saprophytic and Potentially Pathogenic *Fusarium* Species from Peat Soil in Perak and Pahang. **Tropical Life Sciences Research**, v.27, n.1, p.1–20, 2016.

KIMATI, H.; TOKESHI, H. Nota sobre a ocorrência de *Fusarium* sp. causando resinose fúngica em abacaxi. **Revista de Agricultura**, v. 39, n. 3, p.131-133, 1964.

LINDE, C. C.; LILES, J. A.; THRALL, P. H. Expansion of genetic diversity in randomly mating founder populations of *Alternaria brassicicola* infecting *Cakile maritima* in Australia. **Applied and Environmental Microbiology**, v 76, p.1946. 2010.

MATOS, A. P. de; CORDEIRO, Z. J. M; HADDAD, F. XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura. *Fusarium* em fruteiras. Bento Gonçalves, R.S. 22 a 26/10/2012.

MATOS, A. P DE; REINHARDT, D. H.; SANCHES, N. F.; SOUZA, L. F. da S.; TEIXEIRA, F. A.; JÚNIOR, J. E.; GOMES, D. C. Produção de Mudanças Sadias de Abacaxi. Cruz das Almas: DCM/ Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. 12p. (Circular Técnica, 89).

MATOS, A. P.; MOURICHON, X.; PINON, A. Occurrence of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* on pineapple in Bolivia. **Fruits**, v. 47, n. 1, p. 33, 1992.

MATOS, A. P. de. A fusariose do abacaxi na Bahia. In: Encontro nacional de abacaxicultura, 1978, Salvador. Anais. Salvador: EMATERBA, 1978. p. 107-114.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. A. Fungos fitopatogênicos. Recife, UFRPE, Imprensa Universitária. 1993. 277p.

McDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review Phytopathology**, v.40, p.349–79, 2002. doi: 10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443

McKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedling by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v. 26, n. 5, p. 195-218, 1923

MILLER, J. S., JOHNSON, D. A. Competitive fitness of *Phytophthora infestans* isolates under semiarid field conditions. **Phytopathology**, v. 90, p. 220-227, 2000.

NIRENBERG, H.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* species and combinations within the *Giberella fujikuroi* species complex. **Micologia**, v.90, p.434-458, 1998.

PLOETZ, R. C. *Fusarium*-induced diseases of tropical, perennial crops. **Phytopathology**. Sant Paul, v.96. n.6, p.648-52, jun.,2006.

R Core Development Team, 2021. R: A language and environment for statistical computing, reference index version 2.12.1. ISBN 3-900051-07-0. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>

ROHRBACH, K. G.; JOHNSON, M. W. Pests, diseases and weeds. In: BARTHOLOMEW, D. P.; PAULL, R. E.; ROHRBACH, K. G. The pineapple: botany, production and uses. Wallingford: CABI Publishing, 2003, p. 203-251.

SANTOS, B. A. *et al.* Severidade de isolados de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* sensíveis e resistentes ao benomyl, em abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.27, n.1, p.101-103, 2002.

SUMMERELL, B. A.; LAURENCE, M. H.; LIEW, E. C. Y.; LESLIE, J. F. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review **Fungal Diversity**, v.44, n.1, p.3–13, 2010.

VENTURA. JA; GOES, A de. Doenças do abacaxizeiro In: Amorim, L; Bergamim Filho, A; Camargo, LEA; Rezende, JAM. (Org.). Manual de Fitopatologia, 2, 5. ed. Ouro Fino-MG: Ceres, 2016. p. 9-21

ARTIGO 2

OCORRÊNCIA DE *Fusarium* spp. CAUSADORAS DE PODRIDÃO EM *Ananas comosus* var *comosus*

¹ Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Plant Disease em versão na língua inglesa.

OCORRÊNCIA DE *Fusarium* spp. CAUSADORAS DE PODRIDÃO EM *Ananas comosus* var *comosus*

Autor: César Marques Borges Querino

Orientador: Carlos Augusto Dórea Bragança

Resumo: As podridões são a causa de perdas significativas no cultivo de abacaxi em todo o mundo. Algumas espécies de fungos têm sido identificadas como responsáveis por essa doença, prevalecendo as espécies do gênero *Fusarium*. No Brasil a fusariose é a maior ameaça fitossanitária ao seu cultivo e seu agente causal, o fungo *Fusarium guttiforme* é um patógeno presente em todo o país. Este trabalho objetivou elucidar a causa da fusariose do abacaxizeiro em diferentes regiões do Brasil. De plantas de abacaxi com sintomas de fusariose foram isoladas e identificadas outras espécies de *Fusarium* provocando sintomas semelhantes a fusariose. Elas foram caracterizadas morfológicamente e molecularmente. Sequências parciais dos genes RPB2, TEF-1 α e β -Tubulina de quatro isolados alinharam com as sequências de *F. oxysporum*, (TEF-1 α 99,11%) *F. proliferatum* (99,14% TEF-1 α ; 99,66% β -Tubulina), *F. incarnatum* (100% TEF-1 α ; 99,34% β -Tubulina; 98,43% RPB2) e *F. guttiforme* (98,5% TEF-1 α) depositadas no GenBank. A patogenicidade dos isolados ocorreu em três experimentos. No primeiro, foi utilizado o método do palito contaminado onde frutos de abacaxi 'Pérola' e 'Imperial' foram perfurados com palitos de dente cobertos por micélio do isolado em questão. Em segundo experimento, os frutos foram inoculados com discos com meio BDA colonizados inseridos em pontos abertos por perfurador de metal esterilizado. A avaliação ocorreu aos seis dias após inoculação mediante corte longitudinal dos frutos e quantificação da lesão na polpa. Em terceiro experimento, a inoculação foi realizada por meio da pulverização de suspensão de inóculo de cada isolado na concentração de 10^5 conídios.ml⁻¹ em inflorescências de abacaxi cultivar 'Pérola' e avaliados na fase de 'abertura da malha' do fruto pela quantificação de tamanho de lesão no fruto. Todos os isolados foram patogênicos quando inoculados nos frutos independentemente do método e da variedade utilizada. Apenas *F. guttiforme* foi patogênico quando inoculado na inflorescência. *F. proliferatum* foi o isolado mais agressivo quando inoculado em frutos de abacaxi cultivar Pérola mediante os

métodos do palito contaminado e do disco de colônia. Este é o primeiro relato *F. oxysporum*, *F. proliferatum* e *F. incarnatum* associados a fusariose em abacaxizeiro no Brasil.

Palavras chave: *Fusarium guttiforme*, fusariose, *Fusarium* spp, TEF-1 α

OCCURRENCE OF *Fusarium* spp. CAUSAL AGENTS OF ROT IN *Ananas comosus* var *comosus*

Author: César Marques Borges Querino
Advisor: Carlos Augusto Dórea Bragança

Abstract: Rots are the cause of significant losses in pineapple cultivation around the world. Among the fungi that have been identified as causal agents of such diseases, those belonging to the genus *Fusarium* are the prevailing. In Brazil, fusariosis is the most serious phytosanitary threat of the pineapple crop and its causal agent, the fungus *Fusarium guttiforme*, is a pathogen present throughout the country. This work aimed at elucidating the cause of the pineapple fusariosis in several pineapple growing regions of Brazil. Besides *F. guttiforme*, other *Fusarium* species were isolated from pineapple infected plants and they were able to incite similar symptoms to those of fusariosis.. They have been characterized morphologically and molecularly. Partial sequences of the RPB2, TEF-1 α and β -Tubulin genes from four isolates aligned with the sequences of *F. oxysporum* (TEF-1 α 99.11%), *F. proliferatum* (99.14% TEF-1 α ; 99.66% β -Tubulin), *F. incarnatum* (100% TEF-1 α ; 99.34% β -Tubulin; 98.43% RPB2) and *F. guttiforme* (98.5% TEF-1 α) were deposited in GenBank. The pathogenicity of the isolates was evaluated in three experiments. In the first, the contaminated toothpick method was used, where pineapple fruits cultivars Pérola and Imperial were perforated with toothpicks covered with mycelium from the isolate in question. In a second experiment, pineapple fruits were inoculated by inserting colony discs of the pathogen into holes perforated by a sterilized metal device. For evaluation, six days after inoculation the fruits were longitudinal cut and quantification of the lesion in the pulp was performed. In a third experiment, inoculation was carried out by spraying the inoculum suspension of each isolate at a concentration of 10^5 conidia.ml⁻¹ on pineapple inflorescences cultivar Pérola. Evaluation was performed at fruit apparent ripeness stage by size quantification of lesion in the fruit pulp. All isolates were pathogenic when inoculated into fruits regardless of the method and variety used. Only *F. guttiforme* was pathogenic when inoculated by spraying the inflorescence. *F. proliferatum* was the most aggressive isolate when inoculated in pineapple fruits,

cultivar Pérola, using the contaminated toothpick and colony disk methods. This is the first report of *F. oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. incarnatum* associated with fusariosis in pineapple in Brazil

Keywords: *Fusarium guttiforme*, fusariose, *Fusarium* spp., TEF-1 α

INTRODUÇÃO

O abacaxizeiro (*Ananas comosus var comosus* ((L.) Merrill) Coppens & Leal)) é planta cultivada comercialmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. É muito apreciada pelos produtores por ser rústica, tolerante a déficits hídricos e por suas boas características organolépticas. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial da fruta (2,43 milhões de toneladas) com destaque para as regiões Nordeste (**35,7%**), Norte (**31,4%**), Sudeste (**26,5%**), Centro Oeste (**5,1%**) e Sul (**1,3%**). (FAO, 2019; IBGE, 2019).

É também uma planta cuja produção é ameaçada por diversas doenças e pragas. Podridões são a causa de significativas perdas na produção do abacaxizeiro em diversos países produtores da fruta. Elas são provocadas por espécies fúngicas tais como *Fusarium guttiforme* (**Fgt**), *F. proliferatum*(**Fp**), *F. oxysporum* (**Fo**), *F.verticillioides*, *F. ananatum*, *F. saccharis* e *F. solani*. Com exceção de **Fgt**, os demais patógenos já haviam sido identificados causando a doença em abacaxizeiro em países como, Costa Rica (Vásquez-Jiménez *et al*, 2014), Malásia (Ibrahim *et al*, 2017; Jacobs *et al*, 2010) e nas Ilhas Reunion (Barral *et al*, 2020). Além disso, essas espécies estão organizadas em diferentes complexos tais como *Fusarium Fujikuroi* (FFSC), *Fusarium oxysporum* (FOSC) e *F. solani* (FSSC). No Brasil, o principal agente responsável por esse tipo de podridão é o fungo *F. guttiforme* (**Fgt**), que provoca além da podridão de frutos, a exsudação de gomas como principal sintoma (PISSARRA *et al*, 1979). Este patógeno também foi encontrado causando podridão em abacaxizeiro em países como Argentina, Uruguai, Paraguai, Bolívia, Venezuela e Cuba (PLOETZ, 2006). Entende-se que o gênero *Fusarium* é um grupo de fungos cosmopolita, polífago e polifilético e que no Brasil apenas Fgt havia sido identificado causando fusariose em áreas de produção de abacaxi (OSBORNE ; STEIN, 2007; DITA *et al* 2018; VAN DER DOES *et al*, 2019). As podridões no abacaxizeiro tornam os frutos inúteis à sua comercialização e esses prejuízos podem chegar a 80% de perdas da produção no Campo (PLOETZ, 2006).

Desta forma esse trabalho teve como objetivo elucidar a etiologia desta doença mediante caracterização morfológica, sequenciamento dos genes da segunda maior subunidade da RNA polimerase II nuclear (RPB2), o fator de

elongação e tradução 1 α (TEF-1 α) e β -Tubulina e testes de patogenicidade das espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

Avaliação da patogenicidade/agressividade dos isolados em mudas, inflorescências e frutos

Os trabalhos de pesquisa foram realizados no Laboratório de Fitopatologia, Telado, Viveiro a céu aberto, Casa de vegetação e na Câmara de crescimento do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura da Embrapa no município de Cruz das Almas – BA. As plantas de onde foram isoladas as espécies em estudo apresentavam sintomas de podridão de frutos, folhas e mudas tipo filhote semelhantes aos mencionados para a fusariose por Matos (1995).

Amostragem de plantas, isolamento, cultivo e preservação de isolados –

Foram coletadas aleatoriamente folhas, frutos e plantas inteiras de abacaxizeiro com sintomas de fusariose em diversas áreas da produção nacional. Coletou-se pelo menos três plantas sintomáticas da fusariose por área de produção nacional com georreferenciamento. Fragmentos de tecidos de folhas, frutos, coroa e filhote sintomáticos foram desinfestados em álcool 70%, hipoclorito 0,5%, a seguir lavados três vezes em água destilada esterilizada – ADE e transferidos para placas contendo meio de cultura batata, dextrose e ágar - BDA e mantidas em BOD à temperatura de 25 \pm 2 $^{\circ}$ C e fotoperíodo de 12 horas visando ao isolamento do patógeno (MENEZES; OLIVEIRA,1993).

Os isolados foram repicados para placas de Petri com meio de cultura BDA e mantidos durante dez dias à temperatura de 25 \pm 2 $^{\circ}$ C e fotoperíodo de 12 horas visando sua purificação. As culturas com características típicas de *Fusarium* foram transferidas para meio ágar-água para obtenção de culturas monospóricas. Essas culturas foram preservadas pelos métodos de Castellani (CASTELLANI, 1939) e tiras de papel-filtro esterilizadas e foram mantidos na micoteca do Laboratório de Fitopatologia do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura da Embrapa.

Foi realizada a caracterização morfológica apenas dos isolados CMF-0515, CMF-0535, CMF-0532 e CMF-0537 a partir dos atributos macro e micromorfológicos das culturas puras isoladas (NIREMBERG; O'DONNELL, 1998). Os indivíduos identificados como *Fusarium* sp. foram submetidos ao teste de patogenicidade de acordo com método estabelecido por Santos *et al.* (2002) e caracterizados por meio do sequenciamento parcial dos genes RPB2, TEF-1 α e β -Tubulina.

Caracterização morfológica

Um disco de colônia do patógeno de 6,6mm de diâmetro foi depositado no centro de placas de Petri contendo meio de cultura BDA para avaliação da taxa de crescimento micelial. Foram realizadas avaliações com medições diametralmente opostas do crescimento micelial ao fundo da placa a cada 48 horas a partir do segundo dia após incubação (DAI) até o fechamento da placa pelo micélio da espécie fúngica. A metodologia para calcular o índice de velocidade de crescimento micelial – IVCM ocorreu de acordo Oliveira (1991), pelo uso da fórmula $IVCM = \frac{\sum (D - D_a)}{N}$, sendo D: o diâmetro médio atual da colônia; D_a : o diâmetro médio da colônia do dia anterior; N: número de dias após a incubação. O experimento foi estabelecido no delineamento inteiramente casualizado - DIC com 4 tratamentos/isolados e cinco repetições. Foram avaliadas características macroscópicas como diâmetro da colônia, coloração da colônia, pigmentação e aparência micelial.

Além disso foram avaliadas características microscópicas estruturais como presença de macroconídios; comprimento e largura, número de septos; ausência/presença de clamidósporo; tipo de célula conidiogênica (monofiálide; polifiálide); disposição de microconídios sobre a célula conidiogênica (em cadeias; "falsas cabeças"). Foram mensurados 30 macroconídios e 30 microconídios de cada isolado, selecionados de forma arbitrária, em lâminas de microscopia coradas com azul de bromotimol. Para tanto, os isolados foram previamente cultivados em meio de cultura Ágar pobre em nutrientes (SNA). Utilizando a técnica de microcultivo em lâmina, um bloco de meio ágar-água foi posto sobre o centro de uma lâmina esterilizada localizada sobre dois palitos de dentes esterilizados em placa de Petri esterilizada com papel filtro esterilizado ao fundo. Fragmento de

micélio fúngico do isolado foi transferido do meio SNA para as quatro extremidades do bloco de ágar. Sobre o bloco de ágar depositou-se uma lamínula flambada. Para concluir foi depositado sobre o papel filtro na placa 1 µl de ADE, e incubada em BOD. Após cinco dias de incubação fez-se a leitura das estruturas ao microscópio óptico tipo LEICA DM500 acoplada a Câmera LEICA ICC50 E na objetiva de 40x e utilizando o software Leica Application Suite, Version 7.1.

Extração de DNA

Os Isolados monospóricos de *Fusarium* spp foram cultivados em placa de Petri contendo meio BDA e incubados em BOD durante 10 dias. O micélio foi raspado e posto a secar sobre papel filtro esterilizado em Capela de exaustão por 24 horas. Cerca de 100 mg de micélio de cada isolado foi posto em microtubo de 1500 µl e macerado em nitrogênio líquido. A extração de DNA genômico foi realizada pelo método de Doyle e Doyle modificado (1990). Quando necessário, a concentração de DNA das amostras foi diluída para 5 ng/µL e usado para as reações posteriores. As concentrações de DNA foram avaliadas mediante eletroforese em gel de agarose a 1%.

Obtenção de sequências

Para análise dos caracteres moleculares dos isolados, o DNA extraído foi usado para amplificar por meio de PCR as regiões dos genes TEF-1α, β-Tubulina e RPB2. Foram utilizados os pares de Primers e condições de amplificações conforme tabela 1. A amplificação do DNA foi realizada com 25 µl de aliquota de mistura contendo, 1 U de Taq DNA polimerase (Takara Ex Taq, Japan), 20 ng of genomic DNA/µl, 1X tampão Taq, 0,2 mM de dNTP e 0,2 uM de cada primer. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e as bandas estimadas quanto ao seu peso molecular e concentração por comparação com o marcador 1kb ladder (invitrogen). Os produtos de PCR purificados com o kit Genenlute™ PCR Clean up da Sigma foram enviados para a ACTGenes análises moleculares – Rio Grande do Sul para sequenciamento.

As sequencias diretas e reversas foram alinhadas com auxílio do software BioEdit v.7.1.9 (Hall, 1999) para obtenção das sequencias consenso de cada

isolado. A fim de confirmar o gênero e a região amplificada, todas as sequências obtidas foram alinhadas por meio da ferramenta BLAST (Altschul *et al*, 1990) com sequências depositadas no GenBank.

Tabela 1. Primers e condições de amplificação utilizadas neste estudo. UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021

Gene	Primer	Sequência 5' 3'	Condições térmicas	TA
EF	EF1	5' ATGGGTAAGGAGGACAAGAC 3'	Temperatura de anelamento 94 °C por 2 min seguidos por 30 ciclos em 94 °C por 1 min, 54 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, e uma extensão final de 72 °C por 5 min e resfriamento a 40C.	600
		5' GGAGGTACCAAGTGATCATGTT 3'		
Tub2	EF2	5' AACATGCGTGAGATTGTAAGT 3'	Temperatura de anelamento 94 °C por 2 min seguidos por 30 ciclos em 94 °C por 1 min, 54 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, e uma extensão final de 72 °C por 5 min e resfriamento a 40C.	650
	T1	5' AACATGCGTGAGATTGTAAGT 3'		
Rpb2	Bt2b	5 ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGCC 3'	Temperatura de anelamento 94 °C por 90s, seguidos por 40 ciclos em 94 °C por 30s, 55 °C por 90s, 68 °C por 2 min, e uma extensão final de 68 °C por 5 min e resfriamento a 40C	800
	RPB2 7cr	5' CCATRGCTTGYYTTRCCAT 3'		
		5' GGGGWGAYCAGAAGAAGGC 3'		
	RPB2 5T2			

TA – tamanho do amplicons

Produção, preparo, coleta e aquisição de mudas e frutos - Para o teste de patogenicidade em inflorescências, mudas de abacaxi 'Pérola' com seis meses de idade coletadas no BAG do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura da Embrapa foram cultivadas em vasos com substrato a base de fibra de coco em casa de vegetação. A indução floral (IF) ocorreu aos 60 dias de cultivo e inoculação na sétima semana após a IF. A avaliação da patogenicidade ocorreu cinco meses após a IF. Para o teste de patogenicidade em frutos, os frutos de abacaxi 'Pérola' foram adquiridos no mercado municipal local e os frutos de abacaxi

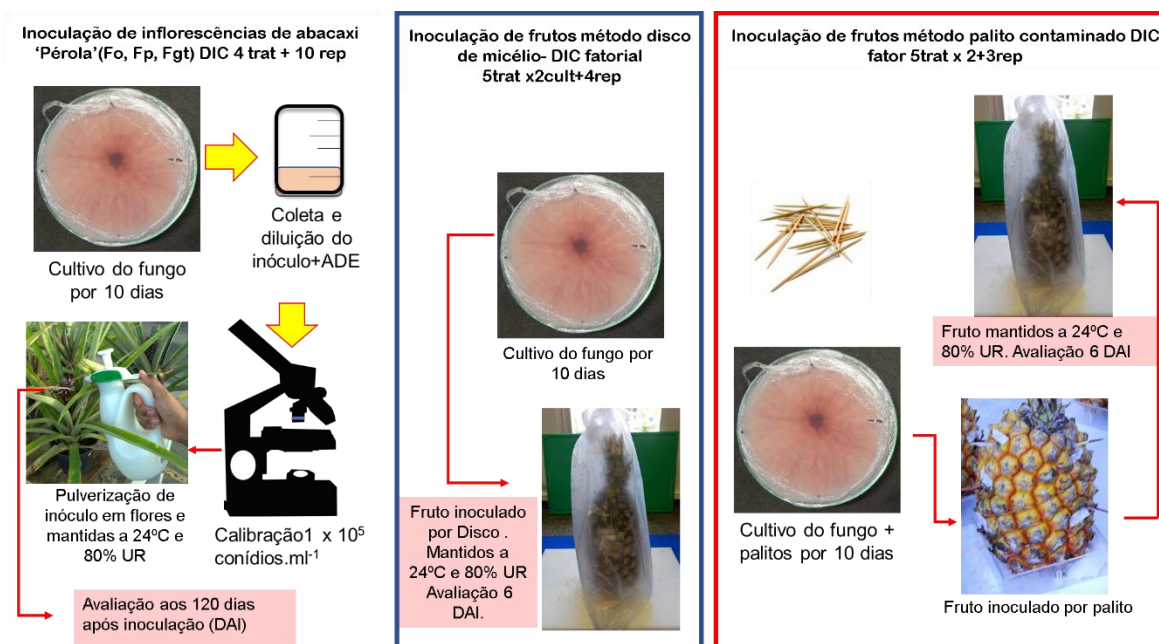
'Imperial' foram coletados no Campo Experimental Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura da Embrapa.

Preparo do inóculo – Visando a inoculação das inflorescências, suspensão conidial de *Fusarium* spp. foi obtida a partir de colônias monospóricas do fungo, cultivadas em placas de Petri contendo o meio BDA e incubadas em BOD por dez dias à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Para isso, foi adicionada uma alíquota de 20 ml de ADE em placa de Petri para liberação de esporos com auxílio de escova de cerdas macias. O material suspenso foi filtrado em dupla camada de gaze estéril e ajustada a concentração em hemacitômetro para 10^5 conídios. ml^{-1} da suspensão. Para inoculação dos frutos, palitos esterilizados foram colocados em Placas de Petri contendo meio de cultura BDA com um disco do isolado em estudo e mantidos em BOD por 10 dias até que os palitos estivessem totalmente colonizados (Figura 1).

Inoculação – Para o teste de patogenicidade em inflorescências, plantas de abacaxi 'Pérola' com 12 meses de idade tiveram sua inflorescência pulverizada com suspensão conidial dos isolados na concentração 1×10^5 conídios. ml^{-1} até o escorrimento. A seguir as inflorescências foram cobertas com sacos de papel pardo para evitar contaminação cruzada entre isolados e as plantas foram incubadas em Câmara de crescimento a 24°C e 80% de UR. Cento e cinquenta dias após IF, quando os frutos estavam prontos para colheita, foram cortados longitudinalmente para avaliação do número de frutinhos lesionados. O delineamento utilizado foi o DIC com quatro tratamentos e 10 repetições. Cada tratamento representado por um isolado fúngico sendo três isolados sendo um deles o controle positivo representado pelo fungo *F. guttiforme* + controle negativo com ADE (Figura 1).

Para o teste de patogenicidade em frutos destacados de abacaxi 'Pérola' e 'Imperial' pelo método do palito, estes foram perfurados a uma profundidade de 2,50 cm em cinco pontos equidistantes, sendo três furos num lado e dois furos no lado oposto do fruto com palito esterilizado. Em cada furo foi inserido um palito coberto por micélio fúngico do isolado correspondente ao tratamento a ser avaliado, ou seja, em cada furo, um isolado. Além disso um palito esterilizado sem micélio como controle negativo foi inserido em um quinto furo. A seguir cada fruto foi coberto por um saco plástico transparente e neste colocado um chumaço de algodão embebido em água destilada esterilizada e mantido em Câmara de

crescimento a 24°C e 80% UR por 72 horas e aos seis DAI procedeu-se a avaliação da severidade de doença. O delineamento utilizado foi o DIC em esquema fatorial 5 x 2, (quatro isolados + 01 tratamento controle negativo com ADE) e duas



variedades com quatro repetições por tratamento. Foi feita análise não paramétrica dos dados utilizando o Kruskal-Wallis no Programa R (Figura 1).

Figura 1. Representação de experimentos de patogenicidade de *Fusarium* spp em abacaxizeiro Pérola e Imperial pelos métodos de inoculação: A - em pulverização de inflorescência; e B - disco micelial; C - palito contaminado em frutos destacados, UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021.

Outro teste de patogenicidade em frutos foi feito utilizando método de discos com micélio fúngico inseridos em furos de um lado e no lado oposto do fruto, conforme metodologia supracitada. Os frutos foram previamente perfurados com perfurador de metal esterilizado de 6,6mm de diâmetro. Como controle foi utilizado um disco apenas com meio de cultura BDA inserido em um dos furos. A seguir cada fruto foi coberto por um saco transparente e neste colocado um chumaço de algodão embebido em ADE e mantido em Câmara de crescimento a 24°C e 80% UR por 72 horas e aos seis DAI procedeu-se à avaliação da severidade de doença. O delineamento utilizado foi o DIC com 05 tratamentos (quatro isolados + 01 tratamento controle negativo com ADE) e quatro repetições por tratamento. Foi feita análise não paramétrica dos dados utilizando o Kruskal-Wallis no Programa R (Figura 4).

Para avaliação do teste de patogenicidade em inflorescências, foram atribuídas notas de acordo com a percentagem de frutinhos lesionados, segundo a escala adaptada de Rohrbach e Johnson (2003): zero = sem sintomas; 1 = 1 a 2% de necrose; 2 = necrose de 3 a 5%; 3 = necrose de 6 a 10%; 4 = necrose de 11 a 25%; 5 = necrose de 26 a 50%; 6 = necrose de 51 a 100%. Esses dados permitiram calcular o índice de doença interno/severidade de ataque por meio da fórmula de McKinney, como a seguir: $IDI = \frac{\sum [(grau\ da\ escala \times\ frequ\ência)]}{(N^\circ\ de\ plantas \times\ grau\ m\acute{a}ximo)} \times 100$ (McKINNEY, 1923) (Figura 2). Para completar os postulados de Koch, procedeu-se o ré-isolamento e cultivo do patógeno em meio de cultura BDA para avaliação das suas características morfológicas para confirmação do agente causal.

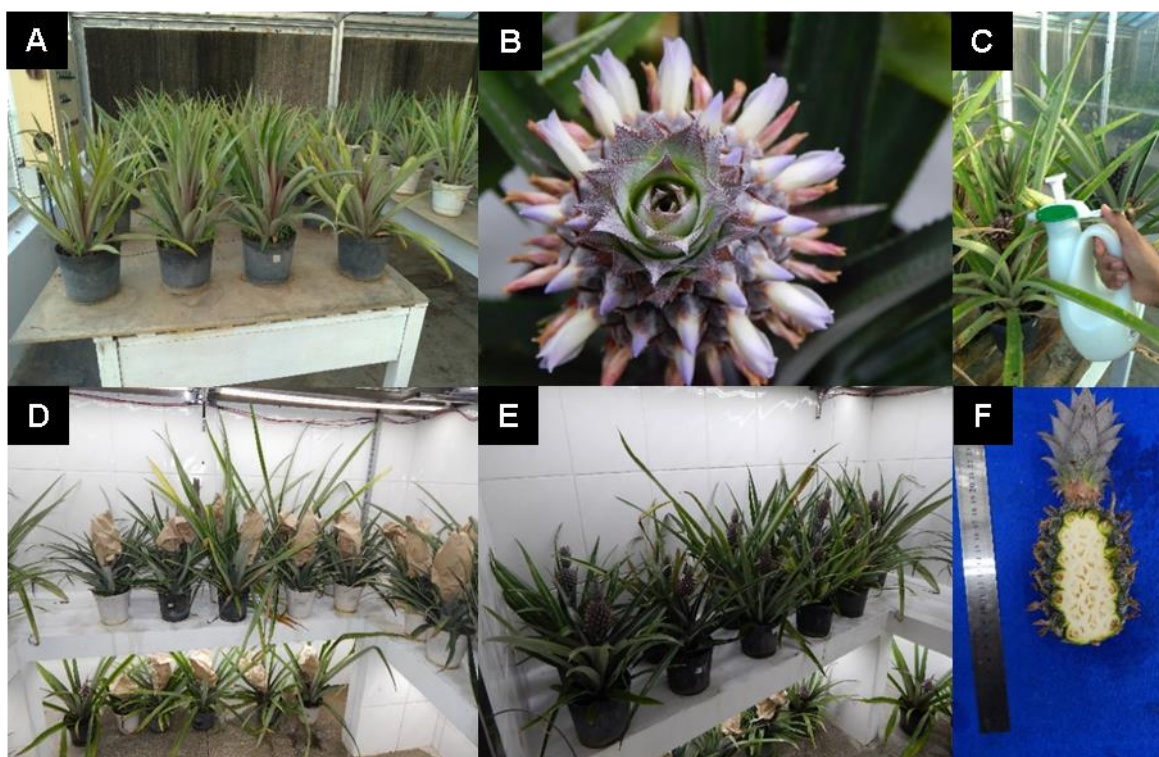


Figura 2. A-B Stand de plantas em estágio vegetativo e reprodutivo com flores abertas; C-Inoculação de *Fusarium* spp na inflorescência; D- Inflorescências protegidas; E-Plantas mantidas em Câmara a 24° e 80%UR; F-Avaliação da doença nos frutos. UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021

Para avaliação dos testes de patogenicidade com os frutos destacados foram realizadas medições diametralmente opostas da necrose no local da inoculação em cada tratamento e depois comparadas entre si. Os dados foram transformados e realizados testes de comparação múltipla não paramétricos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização morfológica de *Fusarium* spp.

De maneira geral, o fundo das placas dos isolados apresentou coloração branca leitosa a rosada ou alaranjada. A pigmentação do micélio aéreo branca a rosada (Figura 3). Os isolados apresentaram micélio aéreo cotonoso ou ralo, alguns com distribuição circular em espiral. Os isolados produziram, macroconídios curvados ou retos, paredes delgadas, células basais pouco desenvolvidas, microconídios ovalados, elípticos ou piriformes, hialinos com e sem septos geralmente poucos 0-1 septo formado na cabeça ou nas cadeias falsas e produziram ou não clamidósporos (Tabela 2). Os isolados CMF-0515, CMF-0535, CMF-0532 e CMF-0537 apresentaram taxas de crescimento micelial médio de 6,95mm.dia⁻¹; 7,35 m.dia⁻¹; 12,20mm.dia⁻¹ e 6,17mm.dia⁻¹, respectivamente. Esses critérios observados confirmam os isolados como sendo *F. oxysporum* (CMF-0515), *F. proliferatum* (CMF-0535), *F. incarnatum* (CMF-0532) e *F. guttiforme* (CMF-0537) conforme manual de identificação de espécies de *Fusarium* de Leslie e Summerell (2006). *F. incarnatum* foi o isolado que apresentou a maior taxa de crescimento micelial (sendo 1,98 vezes mais rápido do que *F. guttiforme* para ocupar toda a placa de Petri. Resultados idênticos obtiveram Stépien *et al*, 2013 concluindo pela máxima velocidade de crescimento micelial de *F. incarnatum* quando comparada a dez espécies encontradas em abacaxizeiro adquiridas em mercado local dentre elas *F. ananatum*, *F. guttiforme*, *F. proliferatum* e *F. oxysporum*.

Identificação molecular

As sequências parciais do gene do fator de alongação 1- α (TEF1), β tubulina e RPB2 geraram produtos da ordem de 600pb, 650pb, 800pb, respectivamente, para os isolados CMF-0515, CMF-0535, CMF-0532 e CMF-0537. Elas foram comparadas aos pares a outros sequencias depositadas no GenBank do NCBI usando BLASTN. A pesquisa mostrou uma identidade de 99,11%, 99,14%, 100% e 98,5%, de similaridade dessas sequências às sequências de *F. oxysporum* (**Fo**), *F. proliferatum* (**Fp**), *F. incarnatum* (**Fin**) e *F. guttiforme* (**Fgt**), respectivamente, disponíveis no GenBank (Tabela 2).

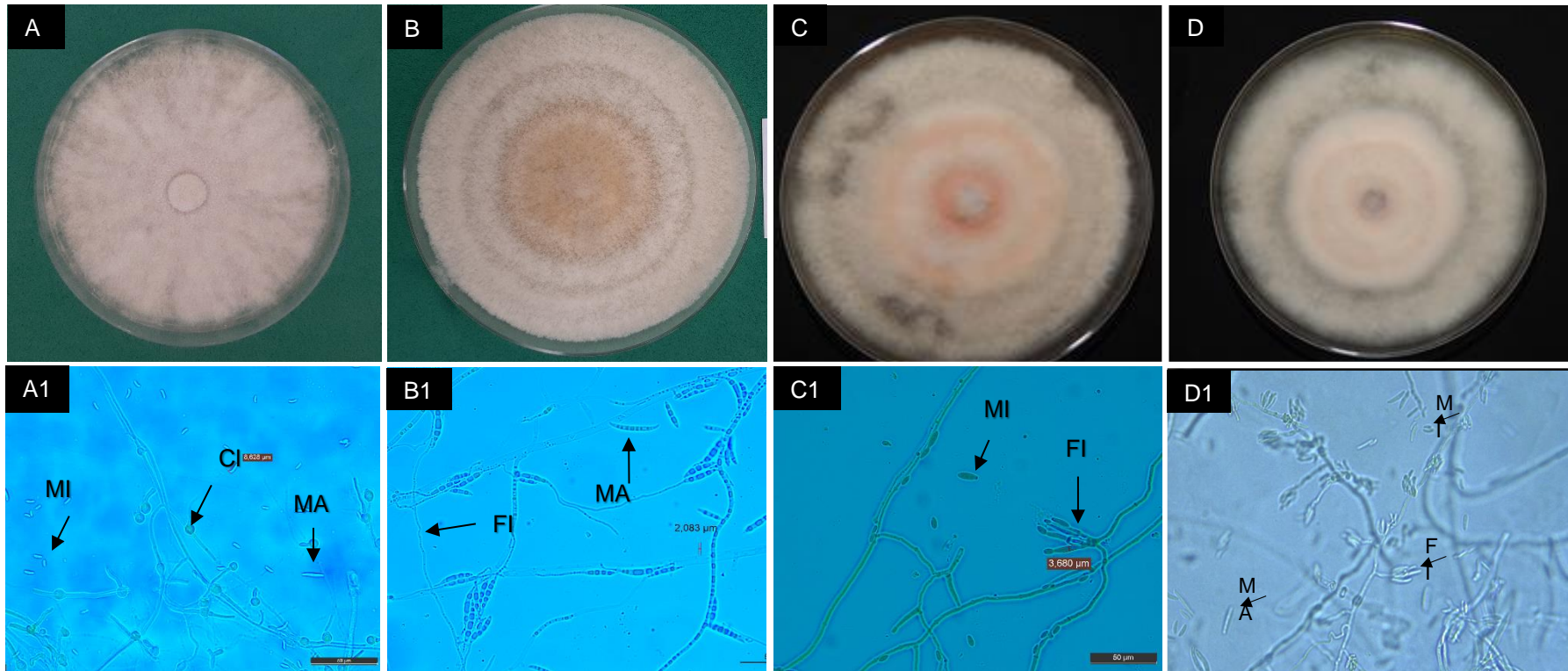


Figura 3. Características culturais e morfológicas de espécies de *Fusarium*. **A-A1:** Colônia e estruturas de *F. oxysporum* (clamidósporos, macro e microconídios); **B-B1:** Colônia e estruturas de *F. irregulare* com macroconídios septados e fiálises; **C-C1:** Colônia e estruturas de *F. proliferatum* (macroconídios e fiálises); **D-D1:** Colônia e estruturas de *F. guttiforme* (mono e poli-fiálides em falsas cabeças). Escala: 50 µm. UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021.

Tabela 2. Análise morfológica e confirmação molecular das *Fusarium* spp associadas ao abacaxizeiro, UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021

CMFa*	Colônia	microconídios			Fiálides	macroconídios			Falsas cabeças	clamidósporos	Identificação	
		C(μm)	L(μm)	S	C (μm)	C(μm)	L(μm)	S			Morfológica	Molecular
0515	Branco-violeta	5,6±1,02	2,1±0,2	0-1	43,6±32	13,1±2,5	2,8±0,4	1-6	+	Presentes	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i>
0535	Branco-rosado	Nd	Nd	Nd	30,66±10,7	16,1±4,2	3,4±1,1	3	+	Ausentes	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. proliferatum</i>
0532	bege-marrom	Raros	Raros	0-1	38,5±32,6	30,3±4,4	4,4±0,8	3-6	-	Ausentes	<i>F. incarnatum</i>	<i>F. incarnatum</i>
0537	Branco-rosado	7,8±1,2	3,7±0,6	0,0	90,6±0,5	20,2±2,5	3,7±0,7	1-2	+	Ausentes	<i>F. guttiforme</i>	<i>F. guttiforme</i>

CMFa-isolados da micoteca do Centro Nacional de Mandioca e Fruticultura obtidos de *Ananas comosus* var *comosus*; C – Comprimento; L – Largura; S-septo;

Testes de patogenicidade em frutos

Os sintomas de necrose puderam ser observados na casca e na polpa dos frutos aos 6 DAI para todos os isolados testados, em ambas as variedades estudadas e independentemente do método de inoculação experimentado. Todos os isolados testados foram patogênicos a ambas as variedades (Figura 4, 5, 6 e 7). Isolados de *Fusarium proliferatum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium sacchari* e *Fusarium* sp também foram patogênicos quando inoculados em frutos e folhas destacadas de abacaxi 'Josapine', 'Moris' e 'Gandul' pelo método de palito por Ibrahim *et al*, 2017 informando sobre a capacidade dessas espécies causarem podridão em frutos e manchas foliares em cultivos de abacaxi na Malásia Peninsular. Nos frutos de ambas as variedades inoculados com **Fgt** foi observada exsudação de substância gomosa ou resinosa no local da inoculação. Os mesmos sintomas foram observados na casca de frutos de abacaxi 'Pérola' quando inoculados com o **Fp** (Figuras 5 e 6). De maneira geral a extensão da necrose foi maior nos frutos da variedade 'Pérola', conforme esperado por ser variedade suscetível. A variedade 'Imperial' tida como resistente a fusariose, apresentou sintomas de necrose nos frutos para todos os isolados testados. Os frutos sob tratamento controle negativo não apresentaram sintoma de necrose. Os isolados patogênicos foram reisolados e cumpridos os postulados de Koch.

A severidade da necrose não diferiu significativamente ao nível de 1% entre os tratamentos em ambas as variedades estudadas quando foi utilizado o método de inoculação tipo Disco de micélio ($p\text{-valor} > 0,05$). Porém ficou evidente que o isolado **Fin** foi responsável por maior média de severidade de doença que todos os demais isolados na variedade Imperial, o mesmo acontecendo com **Fgt** na variedade Pérola, ou seja, esses isolados foram os mais agressivos nas respectivas variedades.

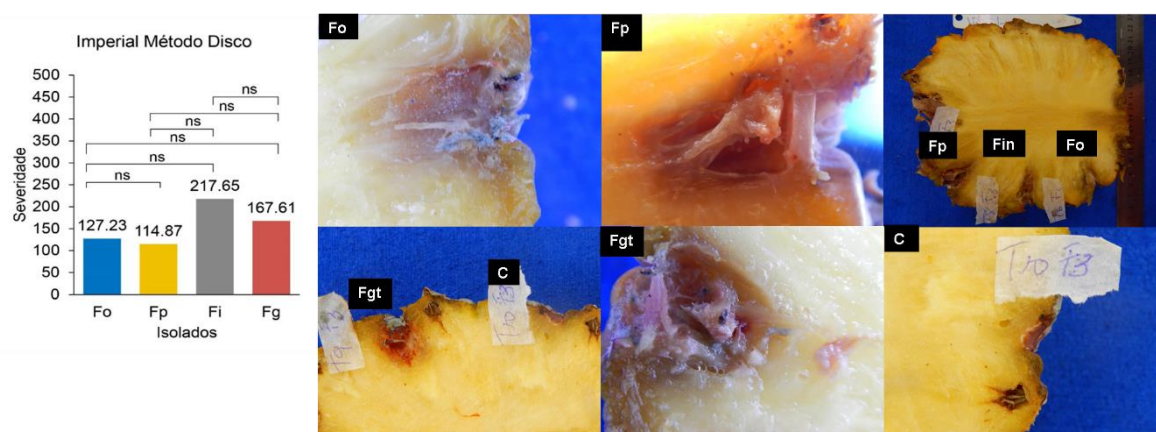


Figura 4. Teste de patogenicidade em frutos abacaxi 'Imperial' inoculados pelo método Disco de micélio. Kruskal-Wallis P-valor 0,17. **Fo**:*F. oxysporum*; **Fp**:*F. proliferatum*; **Fin**:*F. incarnatum*; **Fgt**:*F.guttiforme*; **C**:controle. UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021

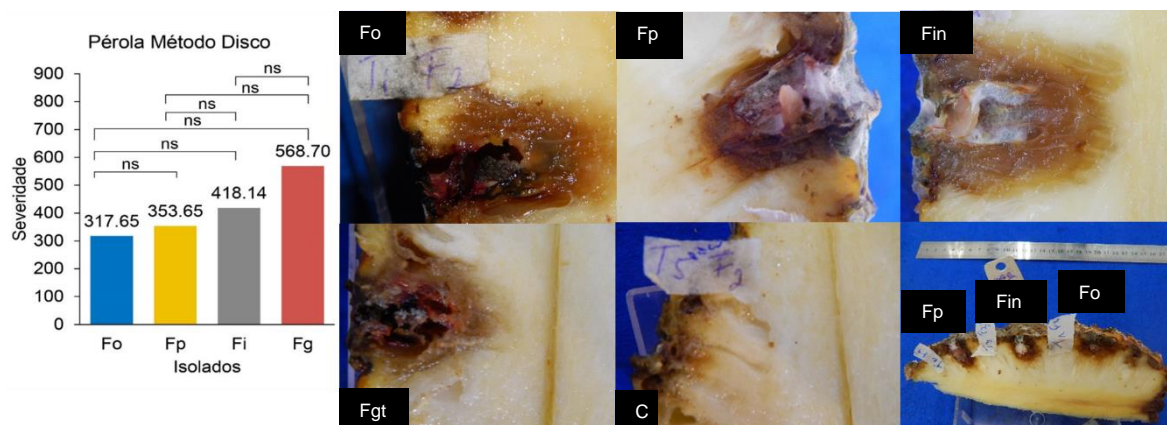


Figura 5. Teste de patogenicidade em frutos de abacaxi 'Pérola' inoculados pelo método Disco de micélio. Kruskal-Wallis P-valor 0,45. **Fo**:*F. oxysporum*; **Fp**:*F. proliferatum*; **Fin**:*F. incarnatum*; **Fgt**:*F.guttiforme*; **C**:controle. UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021

Recentemente **Fin** foi encontrado fazendo parte do microbioma de frutos de abacaxi 'Queen' sadios e doentes associados a outras espécies fúngicas patogênicas (VIGNASSA *et al*, 2021). Em Trindade, pesquisas de Ramdial *et al*, 2016, corroboram resultados desta pesquisa na medida em que **Fin** foi patogênico quando inoculados com suspensão a 10^5 conídios.ml⁻¹ em frutos de pimentão (*Capsicum annum* L) feridos ou sem ferimento. Também no Paquistão **Fin** foi

relatado causando podridão em campos de cultivo de pimentão com incidência de 24% e perdas de 11% e quando realizado teste de patogenicidade em frutos sem ferimento também foi capaz de causar apodrecimento (TARIQ *et al*, 2018). Hartman *et al*, (2019), constataram a produção da enzima Tricoteceno por isolados de **Fin** oriundos da Etiópia e Gana os quais também foram patogênicos causando podridão de raízes e 100% de inibição de germinação de sementes de soja (*Glicine max* L.). Além disso, **Fin** foi identificado como causa de podridão em frutos de melão e melancia na Malásia, na Geórgia e na China (SMAIL *et al*, 2021; LI *et al*, 2018; LI; JI, 2015).

O'donnell *et al* (2013) também confirmam a capacidade de **Fin** em produzir Tricotecenos, os quais são fundamentais no processo de patogênese de plantas pelo gênero *Fusarium* e atuam ainda como fator de virulência de doenças em plantas. A toxicidade dos tricotecenos depende da espécie de planta hospedeira e pode reduzir germinação, crescimento de raiz e causar ainda encurtamento de pecíolo, enrolamento foliar e nanismo (PERINCHERRY *et al*, 2019; MASUDA *et al*, 2007). Segundo pesquisas de Bardin *et al* (2018), utilizando isolados de variados substratos naturais e da agricultura houve uma correlação significativa entre taxa de crescimento micelial de *Botritis cinerea* e agressividade em tomateiro. Eles ainda sugerem que o elevado IVCM dos isolados favoreçam a sobrevivência da espécie em ambientes naturais sendo verdadeiras fontes de inóculo. Neste trabalho **Fin** apresentou elevada taxa de crescimento micelial e foi agressivo em frutos de abacaxi. Então **Fin** pode ser um isolado com maior capacidade de sobrevivência em hospedeiros alternativos na ausência de abacaxi além da sua aparente elevada agressividade (BARDIN *et al* 2018).

A severidade da doença não diferiu significativamente ao nível de 1% entre os tratamentos na variedade Imperial quando foi utilizado o método de inoculação tipo Palito. Contudo quando aplicado o mesmo método para inoculação de frutos da variedade Pérola, a severidade de doença provocada por **Fp** foi significativamente maior que a provocada pelos demais isolados **Fo**, **Fin** e **Fgt**. (p-valor < 0,05). Estes últimos provocaram necrose com severidade de doença semelhante entre si. Assim **Fp** se destacou como o mais agressivo entre todos os isolados. A severidade da doença não diferiu entre os isolados inoculados nos frutos da variedade imperial com o método do palito conforme se vê na figura 7.

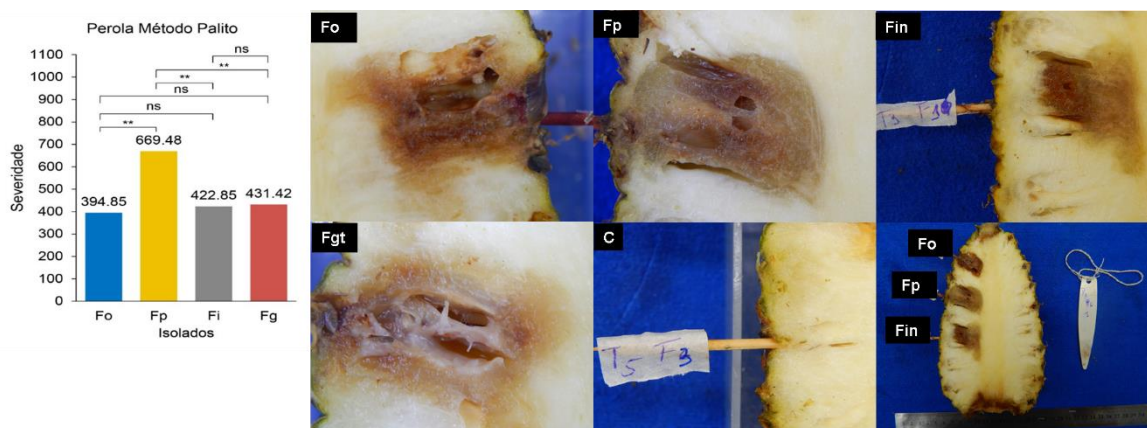


Figura 6. Teste de patogenicidade em frutos de abacaxi Pérola inoculados pelo método palito contaminado. Kruskal-Wallis P=0,06. **Fo**:*F. oxysporum*; **Fp**:*F. proliferatum*; **Fin**: *F. incarnatum*; **Fgt**:*F.guttiforme*; **C**:controle. UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021

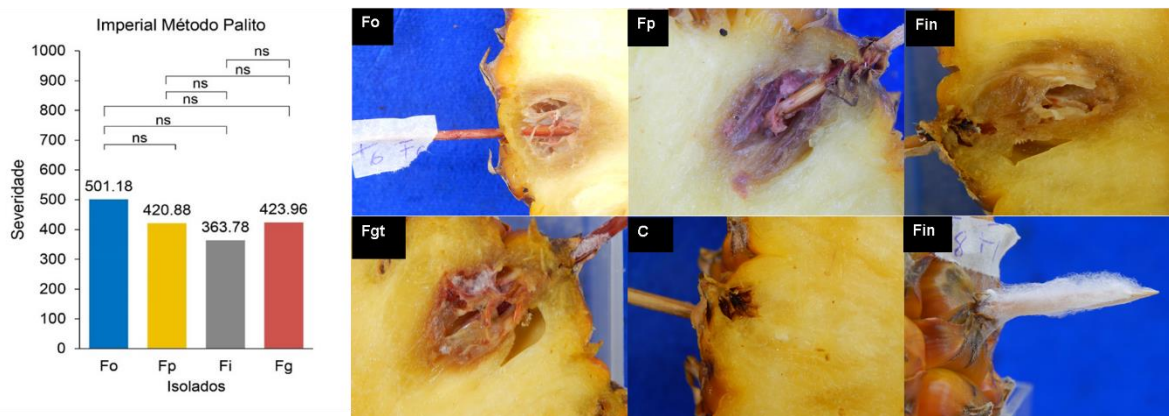


Figura 7. Teste de patogenicidade em de abacaxi 'Imperial ' inoculados pelo método palito contaminado. Kruskal-Wallis P-valor 0,63. **Fo**:*F. oxysporum*; **Fp**:*F. proliferatum*; **Fin**: *F. incarnatum*; **Fgt**:*F.guttiforme*; **C**:controle. UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021

De acordo com Stépien *et al*, (2013), **Fp** é capaz de produzir muitas das toxinas produzidas pelos membros do gênero *Fusarium* pelo menos três tipos de micotoxinas em frutos de abacaxi: fumonisinas B1-B3 (FUM), beauvericina (BEA) e moniliformina (MON). Essas micotoxinas atuam no processo de patogênese através do rompimento da membrana plasmática, alteração do apoptose, interrupção de sinalização celular, inibição do crescimento de plantas, indução de fragmentação do DNA e outros (PERINCHERRY *et al*, 2019; MALLEBRERA *et al*, 2018). As perdas que essas micotoxinas produzidas por espécies do gênero

Fusarium podem provocar em banana e abacaxi podem chegar a 50% (PERINCHERRY *et al*, 2019). **Fp** é considerado o principal agente causal da fusariose do abacaxizeiro na Malásia Penisular. Além disso, é fato que este patógeno está presente em muitos patossistemas inclusive humano (SUN, *et al*, 2018).

Estes resultados são corroborados pelos trabalhos de Garcia *et al*, (2015) que ao testarem métodos de inoculação em folhas tipo D destacadas de abacaxizeiro concluíram que o uso de palito infestado com micélio foi mais eficaz para causar necrose do que os métodos de disco de micélio com fermento e disco de micélio sem fermento da folha. Portanto pode-se inferir que o método de inoculação de *Fusarium* spp. em abacaxizeiros pode ter influência direta sobre a mensuração dos sintomas de necrose.

Mais de uma espécie de fungos foi identificada por Barral *et al*, (2020) em frutos de abacaxi doentes coletados nos campos de cultivo nas Ilhas Reunion. Dentre 151 isolados obtidos, 79% eram de *F. ananatum*, *F. oxysporum* e *F. proliferatum* e 21% de *Talaromyces stollii*, com prevalência de 91% dos isolados com *F. ananatum*. Stépien *et al*, (2013) identificou em frutos de abacaxizeiro de diversas localidades, incluindo Cuba, Equador, espécies tais como, *F. ananatum*, *F. concentricum*, *F. fujikuroi*, *F. guttiforme*, *F. incarnatum*, *F. oxysporum*, *F. polyphialidicum*, *F. proliferatum*, *F. temperatum* e *F. verticillioides* produzindo micotoxinas como Fumonisinias, Beauvericinas e moniliforminas. Ressalte-se que Fo e Fp tem ampla distribuição mundial e que o primeiro é patógeno em variadas espécies vegetais, em humanos e animais (SUMMERELL, 2019)

Vignassa *et al* (2021), trabalhando com microbioma de frutinhos de abacaxi infectados nas Ilhas Reunion concluíram que a podridão de frutinhos causada por *Fusarium ananatum* é na verdade uma doença de causa multipartite provocada pelas espécies pertencentes aos complexos de espécies *Fusarium fujikuroi* e *T. purpureogenus*: *F. proliferatum*, *F. sachari*, *F. oxysporum*, *Thalaromyces stollii* e *T. amistolkiaina*. Quando inoculados em frutos, essas espécies foram capazes de provocar sintomas semelhantes àqueles provocados *F. ananatum*. Ainda segundo os autores da pesquisa, a resposta de suscetibilidade do abacaxi poderia estar sendo modulada em função de estratégias de colonização do tecido da hospedeira por esse conjunto de espécies. Eles ainda relatam a prevalência de **Fp** dentre as

espécies amostradas dos frutos. Os autores ainda sugerem que haja outros complexos de espécies envolvidos na doença. Ibrahim *et al.*(2017), identificaram as espécies *F.proliferatum*, *F. sacchari*, *F. verticillioides* e *Fusarium sp.* associadas a podridão de frutos e mancha foliar em abacaxizeiro com destaque para a prevalência de *F. proliferatum* na Malásia.

De acordo com Leslie e Summerell (2006), **Fo** e **Fin** habitam o solo e são capazes de produzir estruturas de sobrevivência como clamidósporos, portanto essa informação implica em modificações no manejo integrado da doença, haja visto que as estratégias de manejo não previam um patógeno com essa capacidade de se manter no patossistema. Este é o primeiro relato de **Fo**, **Fin** e **Fp** como agentes causais da fusariose do abacaxizeiro no Brasil.

Esse poderia ser mais um caso de patogenicidade cruzada de espécie patogênica. López-Orona (2019), atestou a patogenicidade cruzada de **Fo** causando perdas econômicas significativas em cultivos de Pimenta (*Capsicum annum*) no México. Segundo Fones *et al*, (2020), há cromossomos nas espécies de *Fusarium* capazes de serem transmitidos por transferência horizontal entre espécies e provocar a troca de genes de virulência facilitando a infecção de novos hospedeiros. Ma *et al*, (2010) foi capaz de fazer transferência horizontal de um cromossomo de patogenicidade de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) para um isolado não patogênico e torná-lo patogênico ao tomate. Li *et al*, (2020) provocou transferência horizontal de cromossomo de patogenicidade parcial de **Fol** para um isolado não patogênico tornando-o patogênico e mais virulento ao tomate do que aquele com o cromossomo completo. Sugere-se que mudanças climáticas em todo o mundo também estejam interferindo na dinâmica de microrganismos de maneira a favorecer a transferência horizontal de cromossomos de patogenicidade principalmente em espécies cosmopolitas e polífagas como algumas espécies de *Fusarium* (OSBORNE; STEIN, 2007; DITA *et al* 2018; VAN DER DOES *et al*, 2019) o que poderia beneficiar sua expansão de gama de hospedeiros (FONES *et al*, 2020).

Testes de patogenicidade em Inflorescências

A avaliação ocorreu no estágio inicial de “abertura da malha” dos frutos. Apenas os isolados identificados como **Fo** (CMF-0515), **Fp** (CMF-0535) e **Fgt** (CMF-0537) foram utilizados para teste de patogenicidade. **Fgt** foi utilizado como controle positivo. 50 dias antes da avaliação do experimento alguns frutos já apresentavam sintomas de exsudação de goma na casca e cobertura por micélio rosado. **Fgt** foi portanto patogênico às plantas causando necrose, murcha, paralisia de desenvolvimento, encarquilhamento e seca de todos os frutos, recebendo sempre a nota máxima da escala de doença, foi portanto o tratamento que diferiu significativamente dos demais, exceto o controle negativo (Tabela 4). Internamente toda a polpa foi tomada por lesões marrons escuras (Figura 8). O tratamento controle negativo não provocou lesão nos frutos. Os demais isolados não causaram sintomas da doença. O Isolado patogênico foi reisolado e cumpridos os postulados de Koch.

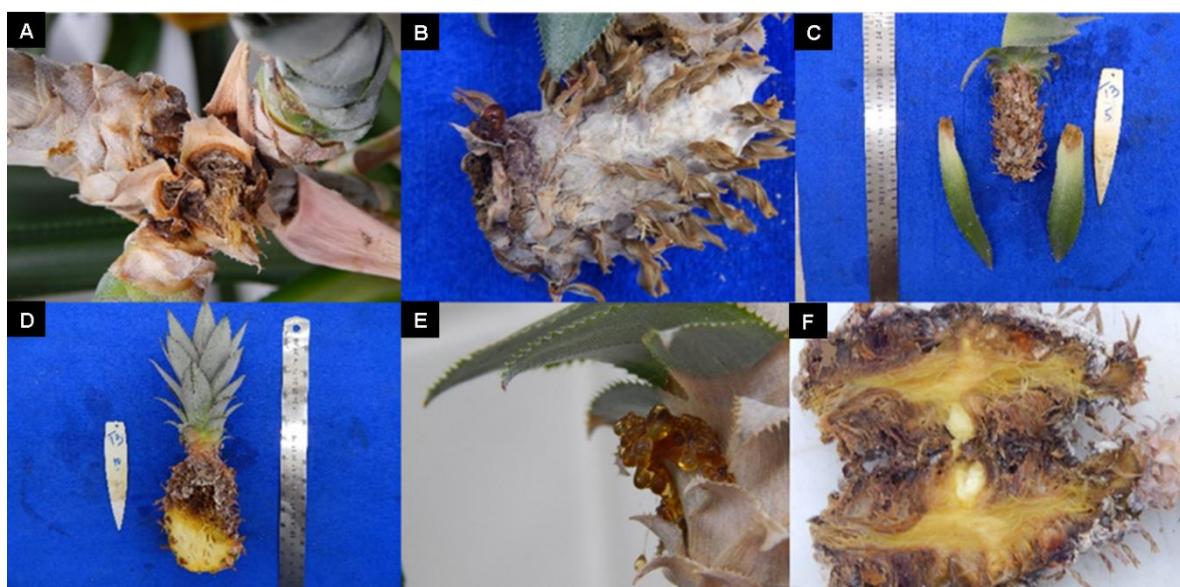


Figura 8. Frutos de Pérola inoculados na inflorescência. A. Goma na base fruto B. Superfície do Fruto com micélio; C. necrose fruto e coroa; D. Polpa nerosada; E. Goma; F. Polpa necrosada. UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021

Tabela 4. Severidade de *Fusarium* spp. sobre plantas de abacaxi 'Pérola'. UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021

Tratamentos	Médias
Fo	0.0 a1
Fp	0.0 a1
Fg	6.0 a2
C	0.0 a1

Os canal estilar e dutos nectários durante a antese do abacaxizeiro são a principal porta de entrada de **Fgt** (BOLKAN *et al*, 1979), e os danos nos frutos demonstram sua elevada especificidade em relação à hospedeira (VENTURA, 1993) e parece estar mais adaptado a hospedeira na medida que infecta mudas, flores e frutos. Outra característica específica desta doença no Brasil seria a formação de exsudados em várias partes da planta. De acordo com Matos *et al* (2012), o fungo é patogênico apenas ao abacaxizeiro e apresenta um elevado grau de especificidade. Pesquisas comprovam ainda que, para alguns agentes patogênicos tais como, como *Fusarium oxysporum* e *Fusarium subglutinans*, desenvolveu-se um nível considerável de especificidade hospedeiro-patógeno (LIEVENS *et al*. 2007; SUTHERLAND; PEGG, 1992).

Fo e **Fp** não foram capazes de causar podridão por este método de inoculação. Este resultado pode ser explicado porque **Fo** é um fungo habitante do solo que inicialmente penetra seu hospedeiro pelas raízes e provoca a obstrução de vasos impedindo a translocação de água e nutrientes e conclui por causar a murcha da planta (MA *et al*. 2013). Desta forma, **Fo** já foi constatado na Costa Rica penetrando pelas raízes, colonizando os vasos xilemáticos da planta, bloqueando a translocação de água e nutrientes para a parte aérea e causando seca, murcha e morte da planta no campo (VÁSQUEZ-JIMÉNEZ; MATA-GRANADOS, 2014). **Fp** também foi constatado na Malásia e Ilhas Reunion como principal agente causal da podridão em frutos de abacaxi (IBRAHIM *et al*, 2017; VIGNASSA *et al*, 2021). Entende-se que este seja o primeiro teste de patogenicidade realizado pela inoculação de inflorescências de abacaxizeiro para os isolados **Fo** e **Fp**.

CONCLUSÃO

1. A fusariose do abacaxizeiro é causada por mais de uma espécie de *Fusarium*
2. **Fo, Fp, Fin e Fgt** são patogênicos ao abacaxizeiro
3. Este é o primeiro relato de **Fo, Fp e Fin** causando fusariose em abacaxizeiro no Brasil
4. **Fo e Fp** não são capazes de infectar plantas de abacaxi 'Pérola' quando inoculados em inflorescências
5. **Fp** é um patógeno muito agressivo ao abacaxizeiro 'Pérola'
6. As atuais medidas de controle da doença não estão adequadas às espécies identificadas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRAL, B.; CHILLET, M.; DOIZY, A.; GRASSI, M.; RAGOT, L.; LÉCHAUDEL, M.; DURAND, N.; ROSE, L.J.; VILJOEN, A.; SCHORR-GALINDO, S. Diversity and Toxigenicity of Fungi that Cause Pineapple Fruitlet Core Rot. **Toxins**, n.12, 339, 2020.

BARDIN, M.; LEYRONAS, C.; TROULET, C.; MORRIS, C.E.; STRIKING SIMILARITIES BETWEEN *Botrytis cinerea* from non-agricultural and from agricultural habitats. **Frontiers in Plant Science**, v.5; n.9, p.1820, 2018. doi: 10.3389/fpls.2018.01820.

BOLKAN, H.A.; DIANESE, J.C.; CUPERTINO, F.P.. A flor do abacaxi como sítio de infecção por *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 4, n.1, 1979

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v.24, p.270-276, 1939

DITA, M.; BARQUERO, M.; HECK, D.; MIZUBUTI, E.S.G.; STAVER, C.P. Fusarium Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. **Frontiers in Plant Science**, v.9, n.1468, 2018.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

FAOSTAT: Agricultural Statistic Database. Rome: world agriculture information centre, 2019. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em 27 de abril. 2021.

FONES, H.N.; BEBBER, D.P.; CHALONER, T. M.; KAY, W.T.; STEINBERG, G.; GURR, S. J. T.M. Threats to global food security from emerging fungal and oomycete crop pathogens. **Nat Food**, v.1, 332–342, 2020. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0075-0>

GARCIA, W. M. *et al.* Comportamento in vitro do agente etiológico da fusariose e avaliação de métodos de inoculação em abacaxizeiro. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 3, p.263-268, 2015.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95–98, 1999

HARTMAN, G. L; MCCORMICK, S. P.; O'DONNELL, K.; Trichothecene-Producing *Fusarium* Species Isolated from Soybean Roots in Ethiopia and Ghana and their Pathogenicity on Soybean. **Plant Disease**, v.103, n.8, 2019

IBRAHIM, N. F; MOHD, M. H; , IZHAM, N. M.; ZAKARIA, M. N. L. Characterization of *Fusarium* spp. associated with pineapple fruit rot and leaf spot in Peninsular Malaysia. **Journal of Phytopathology**, p.1–9, 2017.

ISMAIL, S. I.; NOOR ASHA, N. A.; ZULPER, D. First Report of *Fusarium incarnatum-equiseti* Species Complex Causing Leaf Spot on Rockmelon (*Cucumis melo*) in Malaysia. **Plant Disease**, n.105, n.4, P.1197, 2021 <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1380-PDN>

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Culturas temporárias e permanentes. Produção Agrícola Municipal, 2019. Disponível em:< <http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 27 abril. 2021.

JACOBS, A.; VAN, W.Y.K P.S.; MARASAS, W. F.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J.; COUTINHO, T.A. *Fusarium ananatum* sp. nov. in the *Gibberella fujikuroi* species complex from pineapples with fruit rot in South Africa. **Fungal Biology**, v.114, n.7, p.515-27, 2010 doi: 10.1016/j.funbio.2010.03.013.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. *Fusarium* laboratory manual. Malden: Blackwell. 2006. 388p.

LI, J.; FOKKENS, C.; CONNEELY, L. J.; REP, M.; Partial pathogenicity chromosomes in *Fusarium oxysporum* are sufficient to cause disease and can be horizontally transferred. **Environmental Microbiology**, v.22, n. 12, p.4985-5004, 2020.

LI, Y.G.; JI, P.; SONG, X. L.; WANG, X. Q.; ZHANG, H.; TIAN, S. First Report of Fruit Rot of Watermelon Caused by *Fusarium equiseti* in China. **Plant Disease**, v.102, n.9, p.1852, 2018

LI, Y.; JI, P. First Report of Fruit Rot of Watermelon Caused by *Fusarium equiseti* in Georgia in the United States, **Plant Disease**, v.99, n.9, p.1272, 2015

LIEVENS, B.; CLAES, L; VAKALOUNAKIS, D.J.; VANACHTER, A.C.R.C.; THOMMA, B.P.H.J.; A robust identification and detection assay to discriminate the cucumber pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and f. sp. *radicis-cucumerinum*. **Environmental Microbiology**, n. 9, p.2145–2161, 2007.

LÓPEZ-ORONA, C.A.; HERNÁNDEZ-VERDUGO, S.; VELARDE-FÉLIX, S. *et al.* Patogenicidade cruzada de *Fusarium oxysporum* isolado de pimentas. **European Journal of Plant Pathology**, v.154, p.1111-1123, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01732-z>

MA, L.J.; GEISER, D.M.; PROCTOR, R.H.; ROONEY, A.P.; O'DONNELL, K.; TRAIL, F.; GARDINER, D.M.; MANNERS, J.M.; KAZAN, K. *Fusarium* pathogenomics. **Annual Review Microbiology**, n.67, p.399-416, 2013. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650>

MA, L.-J. , VAN DER DOES, HC , BORKOVICH, KA , COLEMAN, JJ , DABOUSSI, M.-J. , DI PIETRO, A. , *et al.* Comparative genomics reveals chromosomes of mobile pathogenicity in *Fusarium*. **Nature**, v.464 : p.367 – 373, 2010.

MALLEBRERA, B.; PROSPERINI, A.; FONT, G.; RUIZ, M.J. In vitro mechanisms of Beauvericin toxicity. A review. **Food Chemical Toxicology**, v.111, p.537–545, 2018. doi: 10.1016 / j.fct.2017.11.019

MASUDA, D.; ISHIDA, M.; YAMAGUCHI, K.; YAMAGUCHI, I.; KIMURA, M.; NISHIUCHI, T. Phytotoxic effects of trichothecenes on the growth and morphology of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v.58,p.1617-1626, 2007. doi: 10.1093/jxb/erl298

MATOS, A. P. de; CORDEIRO, Z. J. M; HADDAD, F. XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura. *Fusarium* em fruteiras. Bento Gonçalves, R.S. 22 a 26/10/2012.

MATOS, A. P. Pathological aspect of the pineapple crop with emphasis on the fusariosis. **Revista de la Facultad de Agronomia**. Universidad Central de Venezuela (Maracay), v.21, p.176–197, 1995.

MATOS, A. P.; MOURICHON, X.; PINON, A. Occurrence of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* on pineapple in Bolivia. **Fruits**, v. 47, n. 1, p. 33, 1992.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. A. Fungos fitopatogênicos. Recife, UFRPE, Imprensa Universitária. 1993. 277p.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum*

annanum L.). 1991. 111 f. **Dissertação** (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

O'DONNELL, K. *et al.*, Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. **Fungal Genetics and Biology**, v. 52, p. 20-31, 2013.

OSBORNE, L.E.; STEIN, J.M. Epidemiology of Fusarium Head Blight on Small-Grain Cereals. **Int. J. Food Microbiology**, v.119, p.103–108, 2007.

PERINCHERRY L.; LALAK-KAŃCZUGOWSKA J.; STĘPIEŃ Ł. Fusarium-Produced Mycotoxins in Plant-Pathogen Interactions. **Toxins**, v.11, n.11, p.664, 2019. doi: 10.3390 / toxins11110664

PISSARRA, T. B.; CHAVES, G. M.; VENTURA, J. A. A sintomatologia da fusariose (*F. moniliforme* J. Sheld var *Subglutinans* Wollenw e Reinking) do abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 4, p.255-263, 1979.

PLOETZ, R. C. *Fusarium*-induced diseases of tropical, perennial crops. **Phytopathology**. Sant Paul, v.96. n.6, p.648-52, jun.,2006.

STĘPIEŃ, Ł; KOCZYK, G; WAŚKIEWICZ, A. Diversity of *Fusarium* species and mycotoxins contaminating pineapple. **Journal of Applied Genetics**, v. 58, n.3, p.367-380, 2013.

TARIQ, A.; NAZ, F.; ALTAF, R.; PROPRIETÁRIOS, Z.; RAUF, C.A.; IRSHAD, G.; RAJA, M.U.; SHAHEEN, F.A.; SULTANA, T.; ASLAM, M.; BENNETT, J,W;; ZHANG, E. N. First Report of Fruit Rot of Bell Pepper Caused by *Fusarium incarnatum* in Pakistan. **Plant Disease**, v.102, n.12, 2018.

RAMDIAL, H.; HOSEIN, F.; RAMPERSAD, S.N. First Report of *Fusarium incarnatum* Associated With Fruit Disease of Bell Peppers in Trinidad. **Plant Disease**, v.100, n.2, 2016

ROHRBACH, K. G.; JOHNSON, M. W. Pests, diseases and weeds. In: BARTHOLOMEW, D. P.; PAULL, R. E.; ROHRBACH, K. G. **The pineapple: botany, production and uses**. Wallingford: CABI Publishing, 2003, p. 203-251.

SANTOS, B. A. *et al.* Severidade de isolados de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* sensíveis e resistentes ao benomyl, em abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.27, n.1, p.101-103, 2002.

SUN, S.; LUI, Q.; HAN, L.; MA, Q.; HE, S.; LI, X.; ZHANG, H.; ZHANG, J.; LIU, X.; WANG, L. Identification and Characterization of *Fusarium proliferatum*, a New Species of Fungi that Cause Fungal Keratitis. **Scientific Reports**, v. 8, n.4859, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23255-z>

SUTHERLAND, M.L.; PEGG, G.F.; The basis of host recognition in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Physiological Molecular Plant Pathology**, n.40, p.423–436, 1992.

VAN DER DOES, H.C.; CONSTANTIN, M.E.; HOUTERMAN, P.M.; TAKKEN, F.L.W.; CORNELISSEN, B.J.C.; HARING, M.A.; VAN DEN BURG, H.A.; REP, M. *Fusarium oxysporum* Colonizes the Stem of Resistant Tomato Plants, the Extent Varying with the R-Gene Present. **European Journal of Plant Pathology**, n.154, p.55–65, 2019,

VÁSQUEZ-JIMÉNEZ, J.; MATA-GRANADOS, X. Diagnosis of *Fusarium oxysporum* in the cultivation of pineapple *Ananas comosus* (L) Merr. **National Journal of Agricultural Science**, v.2, n.3, p.107-112, 2014.

VENTURA, J.A; GOES, A de. Doenças do abacaxizeiro In: Amorim, L; Bergamim Filho, A; Camargo, LEA; Rezende, JAM. (Org.). **Manual de Fitopatologia**, 2, 5. ed. Ouro Fino-MG: Ceres, 2016. p. 9-21.

VENTURA, J.A., ZAMBOLIM, L. & GILBERTSON, R.L. Proposição de nova forma *specialis* em *Fusarium subglutinans* no abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.18,n.280, 1993

VIGNASSA, M.; MEILE, J. C.; CHIROLEU, F.; SORIA, C.; LENEVEU-JENVRIN, C.; SCHORR-GALINDO, S.; CHILLET, M. Pineapple Mycobiome Related to Fruitlet Core Rot Occurrence and the Influence of Fungal Species Dispersion Patterns. **Journal of Fungi** (Basel), v.7,n.3, 175, 2021. doi: 10.3390/jof7030175.

ARTIGO 3

FILOGENIA DE *Fusarium* spp DE DIFERENTES REGIÕES PRODUTORAS DE *Ananas comosus* var *comosus* DO BRASIL

¹Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Plant Pathology em versão na língua inglesa

FILOGENIA DE *Fusarium* spp. DE DIFERENTES REGIÕES PRODUTORAS DE *Ananas comosus* var *comosus* DO BRASIL

Autor: César Marques Borges Querino

Orientador: Carlos Augusto Dórea Bragança

Resumo: A fusariose é a doença mais destrutiva e ameaçadora ao cultivo do abacaxizeiro no mundo. *Fusarium guttiforme*, o seu agente causal no Brasil, faz parte do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. No entanto, há relatos científicos sobre a associação de outras espécies de *Fusarium* com a fusariose do abacaxizeiro em outros países. Identificar as espécies associadas à doença e estudar sua filogenia pode ser muito importante para subsidiar programas de melhoramento e desenvolvimento de materiais resistentes. Além disso, o seu estudo possibilita antever a eficácia e a durabilidade da resistência da planta. Este trabalho identificou, por meio de filogenia, as espécies de *Fusarium* associadas a fusariose do abacaxizeiro como subsídio ao programa de melhoramento genético do abacaxizeiro desenvolvido na Embrapa Mandioca e Fruticultura. O gene TEF-1 α têm sido adequado para identificar sequências do gênero *Fusarium*. Foram amplificados fragmentos dos gene fator de alongação de 128 isolados. A maioria dos isolados obtidos nesse estudo agrupou com espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* (*F. proliferatum*, *F. circinatum* e *Fusarium* sp.). Além disso, alguns isolados foram agrupados com o complexo *Fusarium irregulare* (complexo *F. incarnatum-equisetum*), *F. inflexum* (complexo *F. oxysporum*). Este é o primeiro relato dessas espécies causando fusariose no Brasil.

Palavras chave: fusariose, *F. irregulare*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. circinatum*

PHILOGENY OF *Fusarium* spp. FROM DIFFERENT *Ananas comosus* var *comosus* PRODUCING REGIONS FROM BRAZIL

Author: César Marques Borges Querino

Advisor: Carlos Augusto Dórea Bragança

Abstract. Fusariosis is the most destructive and threatening disease to pineapple cultivation in the world. *Fusarium guttiforme*, causal agent of the pineapple fusariosis in Brazil, is part of the *Fusarium fujikuroi* species complex. However, there are scientific reports on the association of other *Fusarium* species with pineapple fusariosis in other countries. Identifying species associated with the disease and studying their phylogeny can be very important to support improvement programs and development of resistant materials. In addition, its study makes it possible to predict the effectiveness and durability of the plant's resistance. Through phylogeny studies, it was possible to identify the *Fusarium* species associated with pineapple fusariosis in Brazil. as a subsidy to the pineapple genetic improvement program developed at Embrapa Cassava and Fruits. The TEF-1 α gene has been suitable to identify sequences from the *Fusarium* genus. Fragments of the elongation factor gene from 128 isolates were amplified. Most of the isolates obtained in this study grouped with species of the *Fusarium fujikuroi* complex (*F. proliferatum*, *F. circinatum* and *Fusarium* sp.). In addition, some isolates were grouped with the *Fusarium irregulare* complex (*F. incarnatum-equisetum* complex), *F. inflexum* (*F. oxysporum* complex). This is the first report of these species causing fusariosis in pineapple in Brazil.

Keywords: fusariosis, *F. irregulare*, *F. proliferatum* *F. oxysporum*, *F. circinatum*

INTRODUÇÃO

O abacaxizeiro (*Ananas comosus var comosus* ((L.) Merrill) Coppens & Leal)) é planta cultivada comercialmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo o Brasil o terceiro maior produtor da fruta (FAO, 2019). Neste, a sua produção é constantemente ameaçada pela fusariose, doença que causa as maiores perdas de produção de abacaxi no mundo (PLOETZ, 2006). Em todo o mundo a fusariose é causada por variadas *Fusarium* spp, tais como *F. proliferatum*, *F. ananatum* e *F. oxysporum* *F. guttiforme* (**Fgt**). No Brasil **Fgt** é o seu agente causal, faz parte do complexo grupo de espécies *Fusarium fujikuroi* – FFSC e ainda não tem seu estágio morfo sexuado conhecido em condições de campo (BARRAL *et al*, 2020; STEPIEŃ; KOCZYK; WAŚKIEWICZ, 2013; KVAS *et al.*, 2009; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

O gênero *Fusarium* compreende um grupo de espécies fúngicas filamentosas cosmopolitas, amplamente distribuídas em quase todos os ecossistemas, com uma vasta gama de hospedeiros e capazes de produzir toxinas que são específicas para auxílio nas infecções de plantas, animais e humanos (MA, *et al*, 2013). Em vegetais, são responsáveis por perdas significativas nos campos de cultivo com ênfase para as espécies de importância econômica. As espécies de *Fusarium* estão entre as dez mais importantes pesquisadas entre os patologistas (PERINCHERRY *et al*, 2019; MALLEBRERA *et al*, 2018).

Por outro lado, a identificação das espécies, há anos é causa de divergências entre os taxonomistas de fungo. Isto porque muitas espécies não podem ser diferenciadas apenas por suas características morfológicas e além disso suas sequências são muito semelhantes (90%) (BRANKOVICS *et al*, 2020; SUMMERELL, 2019). O advento das técnicas moleculares e sua aplicação na taxonomia de fungos, aumentou a capacidade de separação entre espécies do gênero morfológicamente pouco distintas mediante o sequenciamento de DNA. A conclusão é de que o número de espécies, até então descritas nesse gênero, estava subestimado (KVAS *et al.*, 2009) e atualmente o gênero compreende cerca

de 300 espécies filogeneticamente distintas distribuídas entre 23 complexos de espécies (O'DONNELL *et al.*, 2020)

Plantas procuram evoluir para evitar a superação de suas defesas pelo patógeno, e este por sua vez evoluem para suplantam os sistemas de defesa da planta, o que desencadeia uma modelagem de variação genômica e populacional de plantas hospedeiras e patógenos (MÖLLER; STUKENBROCK, 2017). Em sistemas agrícolas, essa seleção de genótipos da planta é artificial e em cada estação de cultivo, novos genótipos podem ser estabelecidos para desfavorecer ao patógeno. Contudo, a substituição completa dos genótipos em confrontação com fatores de resistência do patógeno poderá provocar o surgimento de novos genótipos virulentos por causa da pressão de seleção exercida (KANZAKI *et al.*, 2012; DODDS *et al.*, 2006; BARRETT *et al.*, 2009; BERGELSON *et al.*, 2001). Então são necessários estudos que busquem compreender a relação entre a estrutura genética da população e a dinâmica de doenças ou fatores que influenciam na coevolução planta-patógeno (BURDON; THRALL, 2008).

Entre os muitos marcadores moleculares codificadores de proteínas utilizados para reconstrução da filogenia, a segunda maior subunidade da RNA polimerase II nuclear (RPB2), o fator de alongação e tradução 1 α (Tef-1 α) e β -Tubulina se apresentam como sendo os mais usados em estudos taxonômicos de fungos, especialmente do FFSC, bem como em outros membros de *Fusarium* (KASHYAP *et al.*, 2019; STIELOW *et al.*, 2015; RAJA *et al.*, 2017)

O estudo filogenético tem possibilitado a reconstrução filogenética de organismos com representantes de diferentes áreas geográficas, bem como a investigação da história evolutiva das espécies que estão em constantes interações simbióticas, ou em interações entre patógeno e hospedeiro, e de coevolução (SCHNEIDER, 2003). Com o crescente desenvolvimento de técnicas moleculares como o sequenciamento, o uso de certos fragmentos de DNA tornou-se uma importante fonte de caracteres para a análise filogenética (EVERHART *et al.*, 2020).

Nos estudos em filogenia é relevante uma amostragem geográfica ampla e uma escolha criteriosa dos marcadores moleculares adequados a cada espécie. Além disso, o clima e o hospedeiro podem ser excelentes parâmetros para informar sobre a origem de muitas espécies de *Fusarium*. (SUMMERELL *et al.*, 2010; KARIM *et al.*, 2016).

Este trabalho objetivou Identificar, por meio de filogenia, as espécies de *Fusarium* associadas a fusariose do abacaxizeiro como subsídio ao programa de melhoramento do abacaxizeiro desenvolvido no Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura da Embrapa.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem de plantas, isolamento, cultivo e preservação de isolados

Foram coletadas aleatoriamente folhas, frutos e plantas inteiras de abacaxizeiro com sintomas de fusariose em diversas áreas da produção nacional. Coletou-se pelo menos três plantas sintomáticas da fusariose por área de produção nacional com georreferenciamento. Fragmentos de tecidos de folhas, frutos, coroa e filhote sintomáticos foram desinfestados em álcool 70%, hipoclorito 0,5%, a seguir lavados três vezes em água destilada esterilizada – ADE e transferidos para placas contendo meio de cultura batata, dextrose e ágar - BDA e mantidas em BOD à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas visando ao isolamento do patógeno (MENEZES; OLIVEIRA, 1993).

Os isolados foram repicados para placas de Petri com meio de cultura BDA e mantidos durante dez dias à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas visando sua purificação. As culturas com características típicas de *Fusarium* foram transferidas para meio ágar-água para obtenção de culturas monospóricas. Essas culturas foram preservadas pelos métodos de Castellani (CASTELLANI, 1939) e tiras de papel-filtro esterilizadas e foram mantidos na micoteca do Laboratório de Fitopatologia do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura da Embrapa.

Foi realizada a caracterização morfológica dos isolados a partir dos atributos macro e micromorfológicos das culturas puras isoladas (NIREMBERG; O'DONNELL, 1998). Os indivíduos identificados como *Fusarium* sp. foram submetidos ao teste de patogenicidade de acordo com método estabelecido por Santos *et al.* (2002) e caracterizados por meio do sequenciamento parcial dos genes TEF-1 α .

Extração de DNA

Os Isolados monospóricos de Fgt foram cultivados em placa de Petri contendo meio BDA e incubados em BOD durante 10 dias. O micélio foi raspado e posto a secar sobre papel filtro esterilizado em Capela de exaustão por 24 horas. Cerca de 100 mg de micélio de cada isolado foi posto em microtubo de 1500 µl e macerado em nitrogênio líquido. A extração de DNA genômico foi realizada pelo método de Doyle e Doyle modificado (1990). Quando necessário, a concentração de DNA das amostras foi diluída para 5 ng/µL e usado para as reações posteriores. As concentrações de DNA foram avaliadas mediante eletroforese em gel de agarose a 1%.

Obtenção de sequências

Para análise dos caracteres moleculares dos isolados, o DNA extraído foi usado para amplificar por meio de PCR as regiões dos genes TEF-1 α . Foram utilizados os pares de Primers e condições de amplificações conforme tabela 1. A amplificação do DNA foi realizada com 25 µl de aliquota de mistura contendo, 1 U de Taq DNA polimerase (Takara Ex Taq, Japan), 20 ng of genomic DNA/µl, 1X tampão Taq, 0,2 mM de dNTP e 0,2 uM de cada primer. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e as bandas estimadas quanto ao seu peso molecular e concentração por comparação com o marcador 1kb ladder (invitrogen). Os produtos de PCR purificados com o kit Genenlute™ PCR Clean up da Sigma foram enviados para a ACTGenes análises moleculares – Rio Grande do Sul para sequenciamento.

As sequencias diretas e reversas foram alinhadas com auxílio do software BioEdit v.7.1.9 (HALL, 1999) para obtenção das sequencias consenso de cada isolado. A fim de confirmar o gênero e a região amplificada, todas as sequencias obtidas foram alinhadas por meio da ferramenta BLAST (ALTSCHUL *et al*, 1990) com sequencias depositadas no GenBank.

Tabela 1. Primers e condições de amplificação utilizadas neste estudo. UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021

Gene	Primer	Sequência 5' 3'	Condições térmicas	TA
EF	EF1	5' ATGGGTAAGGAGGACAAGAC 3'	Temperatura de anelamento 94 °C por 2 min seguidos por 30 ciclos em 94 °C por 1 min, 54 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, e uma extensão final de 72 °C por 5 min e resfriamento a 4°C.	600
	EF2	5' GGAGGTACCAGTGATCATGTT 3'		

TA – tamanho de amplicons

Análises filogenéticas

O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado com auxílio do programa MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018) e editado manualmente. No conjunto de dados, foram alinhadas 128 sequencias parciais do TEF-1 α de 600pb obtidas nesse estudo e 61 sequencias, incluindo o outgroup *Fusarium sublunatum*, de espécies de *Fusarium* de diferentes complexos.

Os modelos de evolução foram estimados com auxílio do MrModeltest v.3.7 (HUELSENBECK;RONQUIST, 2003) e por meio do critério de informação Akaike. Para reconstrução da filogenia, a análise bayesiana foi conduzida no programa MrBayes v.3.2 (RONQUIST *et al.*, 2012) usando o algoritmo de Monte Carlo via cadeias markov (MCMC) para obtenção das probabilidades *a posteriori* de Bayes (PPB). Na análise foram utilizadas 4 cadeias MCMC com for 1×10^7 gerações. As amostras foram obtidas a cada 1000 gerações. Foram descartadas 25% das árvores.

Tabela 2. Complexos e espécies de *Fusarium* de isolados obtidos neste estudo e número Genbank de sequências parciais do gene TEF-1 α de isolados tipos incluídas na filogenia, UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021

Complexo	Espécie	Código isolado	Origem	N° Genbank
<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	<i>F. irregulare</i>	NRRL32175	----- Conceição do Araguaia-PA	GQ505609
	<i>F. irregulare</i>	CMF-0532		
	<i>F. sciripi</i>	NRRL13402	-----	GQ505592
<i>Fusarium babinda</i>	<i>F. sp.</i>	NRRL25533	-----	JF740765
<i>Fusarium buharicum</i>	<i>F. sublunatum</i>	NRRL 20897	-----	KX302919
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i>	NRRL 25387	-----	HM347117
	<i>F. foetens</i>	NRRL 38302	-----	GU170559
	<i>F. inflexum</i>	NRRL 20433	-----	AF008479
<i>Fusarium fujikuroi</i>	<i>F. inflexum</i>	CMF-0611	São Félix-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0515	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0534	C. Araguaia-PA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0585	Marataízes-ES	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0599	São Félix-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0634	Ourolândia-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0635	Ourolândia-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0639	Ourolândia-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0680	Turiaçu-MA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0681	Chapadinha-MA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0686	São Luiz-MA	-----
	<i>F. agapanthi</i>	NRRL 54463	-----	KU900630
	<i>F. ananatum</i>	CBS 118516	-----	LT996091

Tabela 2. Complexos e espécies de *Fusarium* de isolados obtidos neste estudo e número Genbank de sequências parciais do gene TEF-1 α de isolados tipos incluídas na filogenia (continuação), UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021

Complexo	Espécie	Código isolado	Origem	Nº Genbank
	<i>F. andiyazi</i>	CBS 119857	-----	LT996092
	<i>F. anthophilum</i>	CBS 737.97	-----	LT996093
	<i>F. bactridioides</i>	NRRL 20476	-----	AF160290
	<i>F. begoniae</i>	CBS 403.97	-----	AF160293
	<i>F. bulbicola</i>	CBS 220.76	-----	KF466415
	<i>F. circinatum</i>	CBS40597	-----	KM231943
	<i>F. circinatum</i>	CMF-0582	Marataízes-ES	-----
	<i>F. coicis</i>	RBG5368	-----	KP083251
	<i>F. concentricum</i>	CBS 450.97	-----	AF160282
	<i>F. denticulatum</i>	CBS 735.97	-----	AF160269
	<i>F. dlaminii</i>	CBS 119860	-----	AF160277
	<i>F. fracticaudum</i>	CMW25245	-----	KJ541059
	<i>F. fredkrugeri</i>	CBS 144209	-----	LT996097
	<i>F. fujikuroi</i>	NRRL 13566	-----	AF160279
	<i>F. fujikuroi</i>	CBS257.52	-----	KU711678
	<i>F. globosum</i>	CBS 428.97	-----	KF466417
	<i>F. guttiforme</i>	CBS40997	-----	KC514066
	<i>F. mangiferae</i>	NRRL25226	-----	AF160281
	<i>F. napiforme</i>	CBS 748.97	-----	AF160266
	<i>F. nygamai</i>	CBS 749.97	-----	AF160273
	<i>F. parvisorum</i>	CMW25267	-----	KJ541060
	<i>F. phyllophilum</i>	CBS 216.76	-----	KF466421
	<i>F. proliferatum</i>	CBS138981	-----	KT716210
	<i>F. proliferatum</i>	NRRL22944	-----	AF160280
	<i>F. proliferatum</i>	CMF-0533	C. Araguaia-PA	-----
<i>Fusarium fujikuroi</i>	<i>F. proliferatum</i>	CMF-0535	C. Araguaia-PA	-----
	<i>F. proliferatum</i>	CMF-0617	S. Felix-BA	-----
	<i>F. proliferatum</i>	CMF-0688	-----	-----
	<i>F. pseudocircinatum</i>	CBS 449.97	-----	AF160271
	<i>F. pseudonygamai</i>	NRRL13592	-----	AF160263
	<i>F. ramigenum</i>	CBS 418.98	-----	KF466423
	<i>F. sacchari</i>	CBS136482	-----	KU711671
	<i>F. sororula</i>	CMW40578	-----	KJ541067
	<i>F. sterilihyposum</i>	NRRL 25623	-----	AF160300
	<i>F. subglutinans</i>	CBS136481	-----	KU711692

Tabela 2. Complexos e espécies de *Fusarium* de isolados obtidos neste estudo e número Genbank de sequências parciais do gene TEF-1 α de isolados tipos incluídas na filogenia (continuação), UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021.

Complexo	Espécie	Código isolado	Origem	N° Genbank
	<i>F. subglutinans</i>	NRRL22016	-----	AF160289
	<i>F. succisae</i>	CBS 219.76	-----	AF160291
	<i>F. sudanense</i>	CBS 454.97	-----	KU711697
	<i>F. terricola</i>	CBS 483.94	-----	KU711698
	<i>F. thapsinum</i>	CBS113963	-----	KU711718
	<i>F. thapsinum</i>	NRRL22045	-----	AF160270
	<i>F. tjaetaba</i>	RBG5361	-----	KP083263
	<i>F. tupiense</i>	NRRL 53984	-----	GU737404
	<i>F. udum</i>	CBS 178.32	-----	AF160275
	<i>F. verticillioides</i>	NRRL22172	-----	AF160262
	<i>F. xylarioides</i>	NRRL 25486	-----	AY707136
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0508	Sapé-PB	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0517	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0518	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0522	Stª Terezinha-PB	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0524	C. Araguaia-PA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0525	C. Araguaia-PA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0537	Lencóis-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0538	Lencóis-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0540	Lencóis-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0541	Lencóis-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0542	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0543	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0544	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0546	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0548	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0549	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0550	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0551	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0552	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0554	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0555	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0556	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0557	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0558	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0559	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0560	CNPMF-BA	-----
<i>Fusarium fujikuroi</i>	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0561	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0562	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF0563	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0564	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0565	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0566	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0568	Itaberaba-BA	-----

Tabela 2. Complexos e espécies de *Fusarium* de isolados obtidos neste estudo e número Genbank sequências parciais do gene TEF-1 α de isolados tipos incluídas na filogenia (continuação), UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021

Complexo	Espécie	Código isolado	Origem	N° Genbank
<i>Fusarium fujikuroi</i>	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0569	Itaberaba-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0570	Itaberaba-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0571	Frutal-MG	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0572	Itaberaba-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0573	Frutal-MG	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0575	Itaberaba-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0578	CNPMF-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0579	Marataízes-ES	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0580	Marataízes-ES	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0588	Marataízes-ES	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0589	Frutal-MG	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0590	Frutal-MG	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0591	Frutal-MG	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0592	Itaberaba-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0593	Itaberaba-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0594	Itaberaba-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0595	Itaberaba-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0596	Itaberaba-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0598	Itaberaba-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0600	Itaberaba-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0603	T. Neves-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0604	T. Neves-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0605	T. Neves-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF -0606	T. Neves-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0607	T. Neves-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0608	S. Felix-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0609	S. Felix-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0612	S. Felix-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0614	S. Felix-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0615	S. Felix-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0616	S. Felix-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0618	S. Felix-BA	-----
<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0619	S. Felix-BA	-----	
<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0620	S. Felix-BA	-----	
<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0621	S. Felix-BA	-----	
<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0622	S. Felix-BA	-----	
<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0623	T. Neves-BA	-----	
<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0626	S. Felix-BA	-----	
<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0627	Ourolândia-BA	-----	

Tabela 2. Complexos e espécies de *Fusarium* de isolados obtidos neste estudo e número Genbank de sequências parciais do gene TEF-1 α de isolados tipos incluídas na filogenia (conclusão), UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021

Complexo	Espécie	Código isolado	Origem	N° Genbank
<i>Fusarium fujikuroi</i>	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0628	Ourolândia-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0630	Ourolândia-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0632	Ourolândia-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0633	Ourolândia-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0636	Ourolândia-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0637	Ourolândia-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0638	Ourolândia-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0641	Ourolândia-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0645	Ourolândia-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0646	Ourolândia-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0647	Ourolândia-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0650	Umburanas-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0651	Umburanas-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0655	Itapororoca-PB	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0656	Itapororoca-PB	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0658	Itapororoca-PB	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0660	Itapororoca-PB	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0661	Itapororoca-PB	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0664	Eunápolis-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0669	Umburanas-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0670	Umburanas-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0671	Ourolândia-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0672	Ourolândia-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0673	Ourolândia-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0677	Ourolândia-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0679	Umburanas-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0690	Eunápolis-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0694	Ourolândia-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0696	Eunápolis-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0697	Itapororoca-PB	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0700	Eunápolis-BA	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0705	St ^a Terezinha-PB	-----
	<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0706	St ^a Terezinha-PB	-----
<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0707	Piratininga-SP	-----	
<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0708	Piratininga-SP	-----	
<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0710	Piratininga-SP	-----	
<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0711	Piratininga-SP	-----	
<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0713	Piratininga-SP	-----	
<i>Fusarium sp.</i>	CMF-0716	Ourolândia-BA	-----	

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada a formação de quatro clados distintos e a maioria dos isolados obtidos nesse estudo agrupou com espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* (*Fusarium* sp). Devido à proximidade de algumas espécies desse complexo e por se basear apenas com sequências do TEF-1 α , os isolados identificados como *Fusarium* sp. não separaram das demais espécies (Figura 1). Além disso, alguns isolados foram agrupados *Fusarium irregulare* (complexo *F. incarnatum-equisetum*), *F. inflexum* (complexo *F. oxysporum*), *F. circinatum*, *F. proliferatum* (complexo *F. fujikuroi*) (Tabela 2). O alinhamento obtido consistiu em um conjunto de 189 sequências (incluindo um *outgroup*), com 814 caracteres. Destes caracteres, 303 foram parcimônio informativo e 140 foram únicos. O modelo evolutivo selecionado foi GTR + G (*General time reversible* + Gama). Os clados obtidos foram bem suportados com valores de probabilidade na maioria acima de 0,8. A caracterização morfológica confirma os resultados das análises filogenéticas para os isolados em estudo. O gene TEF-1 α tem sido utilizado para inferir relações filogenéticas entre espécies de *Fusarium* filogeneticamente muito próximas com sucesso (BARRAL *et al*, 2020; IBRAHIM *et al*, 2017; STÉPIEN *et al*, 2013. Este é o primeiro relato de *F. proliferatum* (CMF-0535), *F. circinatum* (CMF-0582), *F. inflexum* (CMF-0611) e *F. irregulare* (CMF-0532) como agentes causais da fusariose no Brasil.

Estes resultados são corroborados com as identificações morfológica e molecular através do gene TEF-1 α de *F. sachari*, *F. verticilloides* e *F. proliferatum* associados a fusariose em frutos e folhas de abacaxizeiro, com prevalência para o último, na Malásia por Ibrahim *et al*, 2017 e de *F. ananatum*, *F. oxysporum* e *F. proliferatum* em frutos de abacaxi feitas por Barral *et al*, 2020 e Vignassa *et al*, 2021 nas Ilhas Reunião. *F. incarnatum* (Complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equisetum*) foi isolado de amostras de frutos de abacaxi juntamente com outras nove espécies de *Fusarium*, porém não houve teste de patogenicidade para comprovar o agente causal (STÉPIEN *et al*, 2013).

Talvez o principal aspecto a ser observado como consequência dessas espécies nesse patossistema seja a necessidade de estudos e adequações de medidas de controle da doença. É sabido que essas espécies são capazes de

sobreviver no solo mediante estruturas de sobrevivência tais como clamidósporos e micélio por anos. Outra medida importante seria identificar fontes de inóculo em reservas de plantas cultivadas ou mesmo naturais próximas às áreas de cultivo de abacaxi. Bardin *et al*, 2018, identificou e comprovou patogenicidade de *B. cinerea* de reservas naturais sobre tomateiro. Também não menos importante pesquisar como essas espécies interagem nos sítios de infecção modulando respostas da planta. Essas respostas poderão direcionar as melhores estratégias de manejo da doença. Vignassa *et al*. 2021, concluíram mediante análises de componentes principais a fusariose em abacaxizeiros nas Ilhas Reunão têm causa multipartite e não como se esperava por conta de *F. ananatum* e que essas espécies atuam modulando as repostas da plantas durante a infecção.



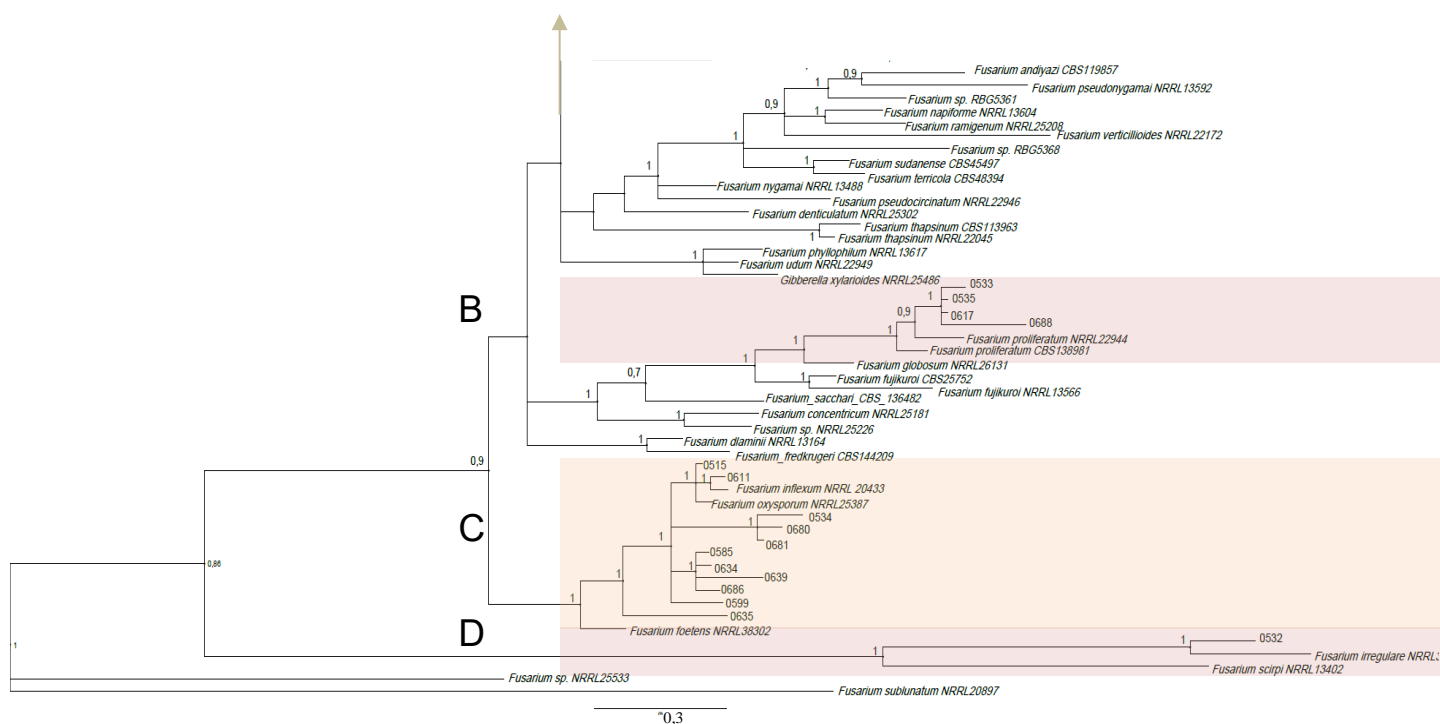


Figura 1. Árvore filogenética reconstruída por meio de inferência Bayesiana com sequências da região *EF1-a* de 128 isolados de *Fusarium* de *Ananas comosus* var *comosus*. Os isolados foram agrupados com sequências de isolados tipo de espécies dos complexos *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium incarnatum-equisetum*. Os valores acima dos ramos indicam a probabilidade a posteriori acima de 0,7. A árvore foi enraizada com *Fusarium sublinatum* (NRRL20897). **A:** Isolados identificados como *Fusarium guttiforme*; **B:** Isolados identificados como *Fusarium proliferatum*; **C:** Isolados identificados como pertencentes ao complexo *Fusarium oxysporum*; **D:** Isolados identificados como *Fusarium irregulare*. UFRB, Cruz das Almas, BA, 2021

CONCLUSÕES

1. No Brasil a fusariose está associada aos complexos *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium incarnatum-equisetum*
2. *Fusarium* sp. é predominante nos plantios de *Ananas comosus* var *comosus*
3. As atuais estratégias de manejo da fusariose não estão adequadas às espécies de *Fusarium* identificadas
4. Este é o primeiro relato de *F. irregulare*, *F. circinatum*, *F. proliferatum* e *F. inflexum* como agentes causais da fusariose em abacaxizeiro no Brasil

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. "Basic local alignment search tool." **Journal Molecular Biology**, v.215, p.403-410, 1990

BARDIN, M.; LEYRONAS, C.; TROULET, C.; MORRIS, C.E.; STRIKING SIMILARITIES BETWEEN *Botrytis cinerea* from non-agricultural and from agricultural habitats. **Frontiers in Plant Science**, v.5; n.9, p.1820, 2018. doi: 10.3389/fpls.2018.01820.

BARRAL, B.; CHILLET, M.; DOIZY, A.; GRASSI, M.; RAGOT, L.; LÉCHAUDEL, M.; DURAND, N.; ROSE, L.J.; VILJOEN, A.; SCHORR-GALINDO, S. Diversity and Toxigenicity of Fungi that Cause Pineapple Fruitlet Core Rot. **Toxins**, n.12, 339, 2020.

BARRETT, L. G. *et al.* Diversity and evolution of effector loci in natural populations of the plant pathogen *Melampsora lini*. **Molecular Biology Evolution**, n.26, p.2499–2513, 2009.

BERGELSON, J.; KREITMAN, M.; STAHL, E. A.; TIAN, D. Evolutionary dynamics of plant R-genes. **Science** n.292, p.2281–2285, 2001.

BRANKOVICS, B.; VAN DIEPENINGEN, A. D.; D. E HOOG G. S.; VAN DER LEE TAJ AND WAALWIJK C. Detecting Introgression Between Members of the *Fusarium fujikuroi* and *F. oxysporum* Species Complexes by Comparative Mitogenomics. **Journal Frontiers in Microbiology**, n.11, 2020. doi: 10.3389/fmicb.2020.01092

BURDON, J.J.; THRALL, P.H.; Pathogen evolution across the agro-ecological interface: implications for disease management. **Evolutionary Applications**, v.11, p.57-65, 2008. doi: 10.1111/j.1752-4571.2007.00005.x.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v.24, p.270-276, 1939

DODDS, P. N. *et al.* Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.103, p.8888–8893, 2006.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

EVERHART, S.; GAMBHIR, N.; STAM, R. Population Genomics of Filamentous Plant Pathogens—A Brief Overview of Research Questions, Approaches, and Pitfalls. **Phytopathology**, v.11, p.12-22, 2021. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-20-0527-FI>

FAOSTAT: Agricultural Statistic Database. Rome: world agriculture information centre, 2019. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em 27 de abril. 2021.

FONES, H.N.; BEBBER, D.P.; CHALONER, T. M.; KAY, W.T.; STEINBERG, G.; GURR, S. J. T.M. Threats to global food security from emerging fungal and oomycete crop pathogens. **Nature Food**, v.1, 332–342, 2020. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0075-0>

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95–98, 1999

JAMES, T., KAUFF, F., SCHOCH, C. *et al.* Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. **Nature**, v. 443, n.818-822, 2006. <https://doi.org/10.1038/nature05110>

KANZAKI, H. *et al.* Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae* AVR-Pik and rice Pik genes driven by their physical interactions. **The Plant Journal**, n.72, p.894–907, 2012

KARIM N.F.; MOHD M.; NOR N.M.; ZAKARIA L. Saprophytic and Potentially Pathogenic *Fusarium* Species from Peat Soil in Perak and Pahang. **Tropical Life Science Research**, v.27, n.1, p.1–20, 2016.

KASHYAP, P.LAL; KUMAR,S.; TRIPATHI,R.; KUMAR,R. S.; JASROTIA, P.; SINGH,D. PAL;SINGH,G. P. Phylogeography and Population Structure Analysis Reveal Diversity by Gene Flow and Mutation in *Ustilago segetum* (Pers.) Roussel tritici Causing Loose Smut of Wheat . **Journal Frontiers in Microbiology**, v.10, p.1072, 2019

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, p.1547-1549, 2018

KVAS, M.; MARASAS, W.F.O.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J.; STEENKAMP, E.T. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. **Fungal diversity**, v. 34, p.1-21, 2009.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. *Fusarium* laboratory manual. Malden: Blackwell. 2006. 388p

MA, LI-JUN; GEISER, DAVID M.; PROCTOR, R. H.; ROONEY, A. P.; O'DONNELL, K.; TRAIL, F.; GARDINER, D. M.; MANNERS, J. M.; KAZAN, K. *Fusarium* Pathogenomics. **Annual Review of Microbiology**, v.67, n.1, p.399-416, 2013

MALLEBRERA, B.; PROSPERINI, A.; FONT, G.; RUIZ, M.J. In vitro mechanisms of Beauvericin toxicity. A review. **Food Chemical Toxicology**, v.111, p.537–545, 2018. doi: 10.1016 / j.fct.2017.11.019

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. A. Fungos fitopatogênicos. Recife, UFRPE, Imprensa Universitária. 1993. 277p.

MÖLLER, M; STUKENBROCK, E. H. Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, p.1-16. 2017/08/07/online.

NIRENBERG, H.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* species and combinations within the *Giberella fujikuroi* species complex. **Micologia**, v.90, p.434-458, 1998.

O'DONNELL K, *et al.* No to Neocosmospora: phylogenomic and practical reasons for continued inclusion of the *Fusarium solani* species complex in the genus *Fusarium*. **Sphere**, v.5, p.810-20, 2020. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00810-20>

PERINCHERRY L.; LALAK-KAŃCZUGOWSKA J.; STĘPIEŃ Ł. Fusarium-Produced Mycotoxins in Plant-Pathogen Interactions. **Toxins**, v.11, n.11, p.664, 2019. doi: 10.3390/toxins11110664

PLOETZ, R. C. *Fusarium*-induced diseases of tropical, perennial crops. **Phytopathology**. Sant Paul, v.96. n.6, p.648-52, jun.,2006.

RAJA, H. A.; MILLER, A. N.; PEARCE, C. J.; OBERLIES, N. H.. Fungal Identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. **Journal of Natural Products**, n.80, p.756–770, 2017. doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b01085

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D.L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539-42, 2012.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572-1574, 2003.

SCHNEIDER, H. Métodos de análise filogenética: um guia prático. **Holos**, 2003

STĘPIEŃ, Ł; KOCZYK, G; WAŚKIEWICZ, A. Diversity of *Fusarium* species and mycotoxins contaminating pineapple. **Journal of Applied Genetics**, v. 58, n.3, p.367-380, 2013.

STIELOW, J. B.; LÉVESQUE, C. A.; SEIFERT, K. A.; MEYER, W.; IRINY, L.; SMITS, D. *et al.* One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. **Persoonia**, n.35, p.242–263, 2015. doi: 10.3767/003158515X689135

SUMMERELL, B. A. Resolving *Fusarium*: Current Status of the Genus. **Annual Review of Phytopathology**, v.57, n.1, p.323-339, 2019.

SUMMERELL, B. A., LAURENCE, M. H., Liew, E. C. Y., & Leslie, J. F. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. **Fungal Diversity**, v.44, n.1, p.3–13, 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A interação planta patógeno é complexa pois quase sempre envolve mais de um microrganismo que competem inter e intraespécies por sítios de infecção e modulam a resposta da planta hospedeira. Pode ser que essas espécies de *Fusarium* causando podridão em abacaxi atuem isoladamente ou numa comunidade de microrganismos na hospedeira. Mais pesquisas deverão ser implementadas sobre o processo de patogênese considerando esse conjunto de espécies no intuito de conhecer e entender a estrutura e diversidade populacional dessas espécies. Recomenda-se também pesquisas em patogenicidade cruzada dessas *Fusarium* spp. Recomenda-se o desenvolvimento de novas variedades considerando a diversidade das espécies associadas à fusariose do abacaxizeiro

Medidas de manejo da fusariose deverão ser adequadas, haja visto que algumas dessas espécies podem sobreviver por anos no solo mediante estruturas como clamidósporos. *F. guttiforme* prevaleceu entre os isolados e os resultados da pesquisa mostram que ele é mais adaptado ao abacaxizeiro sendo capaz de penetrar até pelas flores. Como produtores de micotoxinas, *F. oxysporum*, *F. incarnatum* e *F. proliferatum* têm variadas opções de ataque e destruição de tecido e portanto representam perigo para plantas, animais e humanos imunocomprometidos. Além disso, essas toxinas podem ser fonte de contaminação quando o fruto é consumido. Nesse contexto, cabe aos pesquisadores estudar sobre os diversos aspectos da patogênese nesse patossistema.