



**NEILTON ANTONIO FIUSA ARAÚJO**

**RESISTÊNCIA DE NOVO GENÓTIPO DE  
BANANEIRA MAÇÃ AO *FUSARIUM*  
*OXYSPORUM* F. SP. *CUBENSE* E  
CARACTERIZAÇÃO MORFOFILOGENÉTICA**

**LAVRAS – MG  
2016**

**NEILTON ANTONIO FIUSA ARAÚJO**

**RESISTÊNCIA DE NOVO GENÓTIPO DE BANANEIRA MAÇÃ AO  
*FUSARIUM OXYSPOURUM* F. SP. *CUBENSE* E CARACTERIZAÇÃO  
MORFOFILOGENÉTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Moacir Pasqual

Orientador

Profa. Dra. Leila Aparecida Salles Pio

Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Araújo, Neilton Antonio Fiusa.

Resistência de novo genótipo de bananeira maçã ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* e caracterização morfofilogenética do fungo / Neilton Antonio Fiusa Araújo. – Lavras : UFLA, 2016.  
68 p.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Moacir Pasqual.

Bibliografia.

1. Agressividade. 2. Isolados. 3. Moderadamente Resistente. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**NEILTON ANTONIO FIUSA ARAÚJO**

**RESISTÊNCIA DE NOVO GENÓTIPO DE BANANEIRA MAÇÃ AO  
*FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *CUBENSE* E CARACTERIZAÇÃO  
MORFOFILOGENÉTICA**

**RESISTANCE OF A NEW GENOTYPE OF APPLE BANANA TO  
*FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *CUBENSE* AND  
MORPHOPHYLOGENETICS CHARACTERIZATION**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 04 de agosto de 2016.

Prof. Dr. Eduardo Alves UFLA

Profa. Dr<sup>a</sup>. Ester Alice Ferreira EPAMIG

Profa. Dr<sup>a</sup>. Leila Aparecida Salles Pio UFLA

Prof. Dr. Moacir Pasqual  
Orientador

**LAVRAS- MG  
2016**

*Ao meu Pai.  
À minha família.  
Dedico*

## AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Agricultura pela oportunidade concedida para realização do Mestrado;

Ao meu orientador Moacir Pasqual e à minha coorientadora Leila Pio, pela paciência, apoio e conhecimentos transmitidos durante esta jornada;

À Dalíhia pela paciência, amizade, ajuda e contribuições dadas ao meu trabalho;

À professora Beatriz Barguil, que sempre me incentivou a chegar até aqui desde a graduação, e cujo incentivo foi essencial para que hoje eu pudesse tornar esse sonho possível;

Aos meus colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos, Laboratório de Microscopia Eletrônica e Laboratório de Micologia da UFLA, por toda ajuda dada, ensinamentos compartilhados e pela amizade construída durante esses dois anos;

A Deus, por guiar meus passos e iluminar minha mente;

Aos mestres budistas que compartilharam seus conhecimentos e me ensinaram a aproveitar cada momento único dessa jornada;

Ao Vantuil e Claret, pela paciência, amizade, disponibilidade e ajuda que sempre me deram no decorrer dos experimentos;

Aos amigos que aqui fiz, por todos os momentos vividos e ensinamentos sobre a vida que compartilharam comigo fora dos prédios da UFLA;

À minha mãe, que mesmo de longe sempre esteve presente, torcendo e incentivando-me para que hoje eu pudesse chegar a esse momento;

Ao meu pai, que mesmo não estando presente em vida, contribuiu com a minha formação. Nossa ligação de amor me guia em cada passo que dou;

À minha família, que compreende minhas ausências e torcem para que as coisas sempre ocorram bem;

E aos seres do mundo espiritual que emanam boas vibrações para que conquistemos nossos objetivos com o coração cheio de esperança.

**MUITO OBRIGADO!**

## RESUMO GERAL

O Brasil produz mais de 20 espécies frutíferas de importância econômica e social. Algumas possuem forte expressão nos mercados regionais e outras no mercado nacional e internacional, dentre estas, a banana é uma das mais consumidas no Brasil, sendo também bastante requisitada no mercado externo. O mal-do-Panamá é uma doença fúngica da bananeira causada pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. O patógeno compromete a produtividade da cultura e seu controle é dificultado devido a sua capacidade de sobrevivência no solo. A cultivar Maçã é altamente susceptível ao mal-do-Panamá, no entanto, em 1990, surgiu na região de Goiás um acesso de bananeira supostamente resistente a doença e que vem sendo amplamente utilizado pelos produtores da região. Devido a falta de comprovações científicas sobre a resistência do novo genótipo, a Universidade Federal de Lavras (UFLA) e a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Goiás (Emater-Goiás) firmaram parceria para realizar estudos com esse genótipo de bananeira visando evidenciar a resistência. Dessa forma, objetivou-se com este trabalho avaliar a resistência do novo genótipo de bananeira Maçã ao *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc) e caracterizar por caracteres morfológicos e moleculares isolados do fungo. O primeiro experimento foi baseado no isolamento, caracterização filogenética e testes de agressividades de estirpes do patógeno provenientes de três estados brasileiros. O experimento resultou na obtenção de quatro isolados, todos pertencentes à espécie de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, raça 1, com níveis diferentes de agressividade e pertencentes a duas linhagens diferentes. Em um segundo experimento, a resistência do novo genótipo de bananeira maçã foi avaliada em comparação com outras variedades de bananeiras e a bananeira maçã tradicional, para isto, utilizou-se uma estirpe do patógeno previamente identificada e que apresentou alta agressividade. O resultado obtido demonstrou que o novo genótipo é moderadamente resistente a doença.

**Palavras-chave:** Caracterização Morfológica. Estirpe. Agressividade.



## ABSTRACT

The Brazil produces more than 20 fruits with economic and social importance. Some have high expression on regional markets and others in national and international, among these the banana is the most consumed in Brazil being very requested in foreign market. The Fusarium wilt is a fungal disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). The pathogen commits the crop productivity and its control is difficulted because the pathogen survival capacity on soil. The “apple” cultivar is highly susceptible to Fusarium wilt, however, in 1990, a new genotype of banana “apple” emerged in Goiás region, supposedly resistant to Fusarium wilt in which has been widely used by the region producers. Because a lack of scientific evidence about the cultivar resistance the Universidade Federal de Lavras (UFLA) and the Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Goiás (Emater-Goiás) signed partnership to make studies with this genotype aiming evidence its resistance. In this way, aimed with this essay evaluate the resistance of the new genotype of banana “apple” to Fusarium wilt and identify using morphological and molecular characters fungi isolates. The first essay was based on the isolation, phylogenetic identification and aggressiveness tests of strains of Foc from three Brazilian states. This essay resulted on obtainment of four isolates, all belonging to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* species, race 1, with different aggressiveness levels and belonging to two different lineages. In the second essay, the resistance of the new genotype was evaluated in comparison with other varieties of banana and the traditional banana “apple”, to this, a strain of Foc previously identified by the molecular and morphological methods and that showed high aggressiveness was used. The result showed that the new cultivar is moderately resistant to pathogen.

**Key words:** Morphological characterization. Strains. Aggressiveness.

## SUMÁRIO

### PRIMEIRA PARTE

1	INTRODUÇÃO GERAL .....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	13
2.1	A cultura da bananeira.....	13
2.2	Doenças fúngicas da bananeira.....	14
2.3	Mal-do-Panamá.....	15
3	REFERÊNCIAS.....	19

### SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

#### ARTIGO 1- Filogenia e agressividade de quatro isolados de

*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*.....23

1	INTRODUÇÃO.....	28
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	29
2.1	Obtenção dos isolados de Foc .....	29
2.2	Caracterização filogenica .....	30
2.3	Caracterização Molecular .....	31
2.4	Teste de agressividade dos isolado.....	33
2.5	Teste de raça dos isolados.....	35
3	RESULTADO E DISCUSSÃO .....	35
4	CONCLUSÃO.....	43
5	AGRADECIMENTOS .....	43
	REFERÊNCIAS.....	45

	<b>ARTIGO 2 - Novo genótipo de bananeira maçã moderadamente resistente ao mal-do-Panamá.....</b>	<b>51</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>58</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADO E DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>5</b>	<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>65</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui mais de 20 frutas de importância econômica e social. Algumas possuem forte expressão nos mercados regionais e outras no mercado nacional e internacional. O segmento vem obtendo produção superior a 40 milhões de toneladas desde 2004, conferindo ao país a posição de terceiro maior produtor de frutas no cenário mundial, ficando atrás apenas de China e da Índia. Entre os Estados, São Paulo se destaca como maior produtor de frutas frescas, respondendo por 39% do total nacional, seguido por Bahia, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (REETZ, 2015).

Dentre as frutas produzidas, a banana é uma das mais consumidas no Brasil e está entre as mais requisitadas no mercado externo. A produção anual brasileira gira em torno de 7 milhões de toneladas e 95% da produção é absorvida pelo mercado interno. Em 2014, a produção brasileira atingiu 12,398 milhões de toneladas, aumento de 7,3%, em relação a 2013. Além do mais, a bananicultura gera em torno de 2 milhões de empregos, sendo, portanto, importante para o fortalecimento da agricultura familiar (MAPA, 2015).

As principais cultivares produzidas para consumo interno são: Prata, Pacovã, Prata Anã, Maçã, Myrose, Terra e D'Angola. A cultivar Maçã cujo grupo genômico é AAB, possui casca fina, polpa branca, sabor doce e suave, que lembra uma maçã, sendo considerada pelos brasileiros uma banana mais nobre. Portanto, apresenta excelente aceitação pelo mercado consumidor e, conseqüentemente, a demanda pela cultivar Maçã é alta, alcançando preço de mercado 400% maior que da cultivar Prata, por exemplo.

No entanto, a cultivar Maçã é altamente suscetível ao mal-do-Panamá, doença vascular causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, também conhecida como fusariose ou murcha de fusário da Bananeira. Os sintomas externos da doença se caracterizam pelo amarelecimento progressivo

das folhas mais velhas para as mais novas, ocorrendo murcha com posterior quebra do pecíolo, junto ao pseudocaule, dando a aparência de guarda-chuva fechado. O patógeno compromete a produtividade da cultura e seu controle é dificultado devido a sua capacidade de sobrevivência no solo (CASTRO et al., 2008).

No entanto, em 1990, surgiu na região de Goiás um acesso de bananeira supostamente tolerante ao mal-do-Panamá. No ano 2000, dez municípios já cultivavam esse material em 4.850 ha. Em 2013, mais sete municípios começaram a cultivá-lo, num total de 6.540 ha e com o envolvimento de aproximadamente 150 produtores. Sua produtividade média é aproximadamente a mesma da Maçã tradicional, cerca de 14 t.ha<sup>-1</sup> e por suportar vários anos de cultivo sem sucumbir ao patógeno, mostra evidências empíricas de resistência a doença.

Portanto, existe a necessidade de se investigar a resistência desta cultivar ao *Fusarium*, para que a mesma possa ser recomendada aos produtores rurais de inúmeros municípios que convivem com o problema. Afinal, a utilização de cultivares resistentes é um método eficiente, sustentável e prático para o controle de doenças.

Diante de tal demanda, a Universidade Federal de Lavras (UFLA) e a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Goiás (EMATER-Goiás) firmaram parceria para realizar estudos com esse genótipo de bananeira visando evidenciar a tolerância. Dessa forma, objetiva-se com este trabalho, avaliar a resistência da nova cultivar de bananeira Maçã ao *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* e caracterizar por meio de caracteres morfológicos e moleculares quatro isolados do fungo.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A cultura da bananeira

A banana é uma das frutas mais importantes do mundo, em muitos países, além de alimento possui grande importância social e econômica, por se caracterizar como fonte de renda para muitas famílias. A bananeira (*Musa* spp.) é uma planta monocotiledônea herbácea gigante, pertencente à família Musaceae, originadas a partir do cruzamento das espécies de *Musa acuminata* Colla (AA) x *Musa balbisiana* Colla (BB), que possui a Ásia como seu centro primário de origem. Quanto às características edáficas, a cultura demanda por terrenos planos a levemente ondulados, com solos profundos sem impedimentos, aerados e bem drenados (BUAINAIN et al., 2007; COELHO, 2012).

Com relação às características climáticas, a planta se desenvolve bem, em temperaturas em torno de 28 °C, tolerando temperaturas situadas entre 15 e 35 °C, onde, havendo o suprimento adequado de água e nutriente, induzirá o crescimento máximo da planta. Temperaturas abaixo de 15 °C provocam a paralisação da atividade da planta e compactação da roseta foliar. Temperaturas acima de 35 °C também inibem o desenvolvimento da planta devido a desidratação dos tecidos quando em condições de sequeiro (BORGES et al., 2004).

As variedades tradicionais produzidas no Brasil são Prata, Pacovan, Prata anã, Maçã, Myrose, Terra e D'angola, pertencentes ao grupo AAB e Nanica, Nanicão e Grande Naine, do grupo AAA. Outras variedades utilizadas no mercado interno são a Caipira, Thap Maeo, Pacovan Ken, Fhia-18, Prata Baby, Prata Graúda, Tropical, Preciosa e Maravilha (BUAINAIN et al., 2007).

O processamento da fruta torna possível a obtenção de produtos tais como purê, néctar, doce, farinha, chips, passa, dentre outros. O uso de produtos industrializados utilizando a banana como matéria prima é feito com o objetivo de aproveitamento da produção excedente e aumento de vida útil de prateleira, embora a maior parte do consumo dessa fruta ainda seja feita *in natura*. A fruta é uma boa fonte de potássio e vitaminas A, B, C e D, além de possuir qualidades medicinais onde todas as partes da planta possuem alguma aplicação dentro da indústria farmacêutica, podendo ser aplicada na formulação de fármacos que auxiliam na redução do risco de pressão arterial alta, redução do risco de derrame, restaurar a atividade normal do intestino, proteger contra doenças neurodegenerativas, diminuição do colesterol, dentre outras aplicações. (JESUS et al., 2005; BORGES et al., 2009; KUMAR et al., 2012)

Em 2013, o mercado mundial dessa fruta atingiu U\$ 9 bilhões de dólares. Cerca de dois terços da produção é exportada da América Latina e aproximadamente a mesma quantidade é destinada para Europa e Estados Unidos (FAO, 2014). Nesse mesmo ano, a produção brasileira foi superior a 6 milhões t/ha, sendo a Bahia o principal estado produtor, seguida pelos estados de São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina e Pará (IBGE, 2014). Entretanto, alguns fatores ainda têm dificultado a expansão do mercado da fruta no país, tais como a baixa qualidade fitossanitária das mudas, baixa produção de mudas comparada a demanda dos produtores, logística da cadeia produtiva e, de forma mais expressiva, o controle de pragas e doenças que comprometem a produção e podem causar grandes prejuízos (PESSOA et al., 2014).

## **2.2 Doenças fúngicas da bananeira**

Doenças de plantas podem ser definidas como alterações na estrutura e fisiologia decorrentes da interação entre patógeno, hospedeiro e ambiente. O

controle de grande parte das doenças de plantas envolve métodos de manejo que permitam mantê-las sobre níveis toleráveis, onde se classificam como métodos reguladores, culturais, genéticos, biológicos, químicos e físicos. A utilização de plantas resistentes consiste como método genético e é a forma mais barata de controle utilizada (WARUBY et al, 2004).

Entre os micro-organismos que podem causar doenças em plantas estão os vírus, bactérias, nematoides e fungos. Fungos são organismos eucariontes, aclorofilados, heterotróficos, que possuem estruturas somáticas filamentosas e ramificadas, podendo se reproduzir de maneira sexuada e assexuada. Estes podem ser saprófitas ou parasitas dependendo da sua forma de alimentação, sendo em sua maioria constituídos por espécies saprófitas, embora existam mais de 8000 espécies de fungos que podem causar doenças em plantas (AGRIOS, 2004).

Entre as principais doenças causadas por fungos que atingem a cultura da bananeira e que podem comprometer a produção estão a Sigatoka amarela (*Mycosphaerella musicola* Leach), Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) e mal-do-Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Foc.). A maioria das cultivares utilizadas pelos agricultores, apresentam suscetibilidade a essas doenças, fato que conduz a muitas perdas na produção (PESSOA et al., 2014; CORDEIRO et al., 1997).

### **2.2.1 Mal-do-Panamá**

O mal-do-Panamá é uma doença fúngica da bananeira, causada pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. O fungo é um parasita facultativo veiculado pelo solo, o qual causa doença em mais de 100 espécies de plantas, incluindo outras culturas de importância agrônômica. Esse patógeno é dividido em grupos



especializados de acordo com o hospedeiro que ele ataca, e em raças, de acordo com a suscetibilidade de cultivares específicas (SUTHERLAND et al., 2013).

Os sintomas na parte externa da planta se caracterizam por um amarelecimento das folhas mais velhas para as mais novas, iniciando dos bordos indo para a nervura principal. Com o progresso, ocorre murcha e quebra do pecíolo, dando aspecto de guarda-chuva fechado à planta. Também se observa estreitamento do limbo nas folhas mais jovens, engrossamento das nervuras secundárias e necrose do cartucho. Internamente observa-se pontuações pardo-avermelhadas no sistema vascular da planta. O estabelecimento do patógeno ocorre via sistema radicular, principalmente via raízes secundárias, e a doença pode ser disseminada de diversas formas (LI et al., 2013; CORDEIRO et al. 1993).

*O Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* não pode ser diferenciado de forma confiável na cultura de outras *formae speciales* (f. sp.). A f. sp. designada cubense é aplicada somente em evidência de testes de patogenicidade, onde demonstrem sintomas em situação de campo nos hospedeiros de *Musa* e *Heliconia*. As raças patogênicas do patógeno são designadas baseadas nas espécies que são capazes de atacar. Existem quatro raças reconhecidas, e a raça 1 consegue infectar plantas de *Musa textilis*, dos grupos ‘Gros michel’ (genoma AAA), ‘Magüeño’ (genoma AAB), ‘Silk’ (Genoma AAB), ‘Pome’ (Genoma AAB), Pisang Awak (Genoma ABB) e ‘I.C.2’ (genoma híbrido AAAA); a raça 2 ataca os grupos ‘Bluggoe’ (Genoma ABB) e os híbridos AAAA; a raça 3 consegue causar doenças em plantas de *Heliconia spp.*, e a raça 4, que consegue quebrar a resistência de bananeiras do grupo Cavendish, tal como a bananeira Grand naine (PLOETZ et al., 1988; MOORE et al., 1995; PLOETZ et al., 2000).

Ferramentas moleculares tem sido usadas para analisar a variabilidade genética entre e dentro das populações de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. Os estudos filogenéticos de multi-genes já mostraram a existência de pelo menos

oito linhagens filogenéticas distintas do patógeno, podendo ocorrer diferentes raças em membros de uma mesma linhagem (KOENIG et al., 1997; PLOETZ et al., 2000; FOURIE et al., 2011).

Esse patógeno foi epidêmico primeiramente no Panamá, em 1890, e a partir de então se espalhou pelo mundo. A primeira constatação da doença no Brasil ocorreu em plantas da cultivar ‘Maçã’ no município de Piracicaba, estado de São Paulo, e atualmente é endêmica em todo território nacional. Até 2009 não havia relatos de ocorrência da raça 4 no Brasil (FURTADO et al., 2009; CORDEIRO et al., 1997). Entretanto, em trabalhos atuais, relata-se a ocorrência de isolados pertencentes a essa raça, obtidos a partir de bananeiras pertencentes ao grupo Cavendish nos estados do Pará, Minas Gerais, Amazonas e Santa Catarina (DIAS et al., 2014; CUNHA et al., 2015).



## REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. Plant diseases caused by fungi. In: AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2004. 948 p.
- BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. **O cultivo da bananeira**. Cruz das almas: Embrapa mandioca e fruticultura, p. 45-58, 2004.
- BORGES, A. M.; PEREIRA, J.; LUCENA, E. M. P. Caracterização da farinha de banana verde. **Ciência e tecnologia de alimentos**, Campinas, v. 29, p. 333-339, 2009.
- BUAINAIN, A. M.; BATALHA, M. O. Cadeia produtiva de frutas. **Agronegócios**, IICA/ MAPA/SPA, Brasília, v 7, 102 p, 2007.
- CASTRO, N. R. et al. Ocorrência, métodos de inoculação e agressividade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* em *Heliconia* spp. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 2, p. 127-130, 2008.
- COELHO, E. F. **Irrigação da bananeira**, Embrapa, Brasília-DF, 2012. 280 p.
- CORDEIRO, Z. J. M.; SHEPHERD, K.; SOARES FILHO, W. S.; DANTAS, J. L. L. Avaliação de resistência ao Mal-do-Panamá em híbridos tetraploides de bananeira. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 4, p. 478-483, 1993.
- CORDEIRO, Z. J. M., KIMATI, H., Doenças da Bananeira, In: KIMATI, H., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L. E. A., REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia**, CERES, São Paulo, SP, v. 2, p.113-135, 1997.

CUNHA, C. M. S.; HINZ, R. H.; PEREIRA, A.; TEACENCO, F. A.; STADNIK, M.J. Agressiveness nad genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* from Santa Catarina, southern Brazil. **Tropical plant pathology**, v. 40, n. 5, p. 326-334, 2015.

DIAS, J. S. A.; ABREU, M. S.; RESENDE, M. L. V. Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) quanto à compatibilidade vegetativa e à patogenicidade em cultivares de bananeira diferenciadoras de raças no Brasil. **Biota Amazônia**, Macapá, v. 4, n. 4, p. 60-65, 2014.

FAO. **Food and agriculture organization of the United Nations**. Rome, 2014, disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/019/i3627e/i3627e.pdf>>. Acesso em: 02 de agosto de 2015.

FOURIE, G; STEENKAMP, E. T.; PLOETZ, R. C.; GORDON, T. R.; VILJOEN, A. Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis *cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex. **Infection. Genetics and Evolution**, v.11, n. 3, p. 533-542, 2011.

FURTADO, E.L.; BUENO, C.J.; OLIVEIRA, A.L.; M. MENTEN, J.O.M.; ALAVOLTA, E. Relações entre ocorrência do Mal-do-Panamá em bananeira da cv. Nanicão e nutrientes no solo e nas folhas. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 4, p. 211-215, 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção brasileira de banana em 2013**. Disponível em: <[https://www.embrapa.br/documents/1355135/0/Banana\\_Brasil\\_2013/9027a417-ae4f-40d4-b088-cc79350568c1](https://www.embrapa.br/documents/1355135/0/Banana_Brasil_2013/9027a417-ae4f-40d4-b088-cc79350568c1)>. Acesso em: 07 de agosto de 2015.

JESUS; S. C.; MATSUURA, F. C. A. U.; FOLEGATTI, M. I. S.; CARDOSO, R. L. Avaliação de banana-passa obtida de frutos de diferentes genótipos de bananeira. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 40, n. 6, p. 573-579, 2005.

KOENIG, R. L.; PLOETZ, R. C.; KISTLER, H. C., *Fusarium Oxysporum* F.Sp. *Cubense* Consists Of A Small Number Of Divergent And Globally Distributed Clonal Lineages. **Phytopathology**, v. 87, n. 9, p. 915-923, 1997.

KUMAR, K. P. S.; BHOWMIK, D.; DURAIVEL, S.; UMADEVI, M. Traditional and Medicinal Uses of Banana. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, India, v. 1, n. 3, 2012.

LI, X.; BAI, T.; LI, Y.; RUAN, X.; LI, H. Proteomic analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4-inoculated response to Fusarium wilts in the banana root cells, **Proteome Science**, v. 11, n. 1, p. 1, 2013.

MAPA. **Ministério da Agricultura e Pecuária, 2015**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2015/04/ministra-recebe-demandas-do-setor-produtivo-da-banana>>. Acesso em: 24 jul. 2015.

MOORE, N. Y.; BENTLEY, S.; PEGG, K. G.; JONES, D. R. Fusarium Wilt of Banana. *Musa*. **Disease Fact Sheet**, v. 5. Montpellier, France: INIBAP, 1995.

PESSOA, W.R.L.S.; ARAÚJO, N. A. F.; VIEIRA, J. D. M.; MOURA, M. R. **Avaliação fitossanitária e controle em pós-colheita de banana no município de Picos, Piauí**. In: GRANGEIRO, D.C.; AZAR, G.S.; PESSOA, W.R.L.S. Pesquisas no semiárido piauiense, 1. ed, Curitiba, PR: CRV, 2014.

PLOETZ, R. C.; CORRELL, J. C. Vegetative compatibility among races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. **Plant Disease**, v. 72, n. 4, p. 325-328, 1988.

PLOETZ, R. C.; PEGG, K. G. **Fusarium wilt**. In: Diseases of Banana, Abacá and Enset. Wallingford, UK: CABI Publishing, p. 143-159, 2000.

REETZ, E. R.; KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; CARVALHO, C.; DRUM, M. **Anuário brasileiro da fruticultura 2014**. Santa Cruz: Gazeta, 2015.

SUTHERLAND, R.; VILJOEN, A.; MYBURG, A.A.; VAN DEN BERG, N. Pathogenicity associated genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4, **South African Journal of Science**, v 109, n. 5-6, p. 1-10, 2013.

WARUMBY, J. F.; COELHO, R. S. B.; LINS, S. R. O. **Principais doenças e pragas em flores tropicais no Estado de Pernambuco**. Recife: SEBRAE, 2004.

## SEGUNDA PARTE

### Artigo 1

#### **Filogenia e agressividade de quatro isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense***

Autores: Neilton Antonio Fiusa Araújo, Moacir Pasqual, Leila Aparecida Salles Pio, Eduardo Alves, Sarah da Silva Costa Guimarães, Nevenka de Matos Moura.

Elaborado de acordo com a NBR 6023





## RESUMO

*Fusarium* é um gênero de fungos muito estudado por causar doenças e proporcionar perdas em várias culturas. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) é de grande importância para cultura da bananeira, causando a doença conhecida como mal-do-Panamá. Neste trabalho, estudos morfológicos e moleculares foram feitos, além do estudo da agressividade de quatro estirpes de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Os patógenos foram isolados a partir de rizomas de bananeiras da variedade Maçã que apresentavam sintomas característicos de mal-do-Panamá, proveniente dos estados de Minas Gerais (FOC GO2), Goiás (FOC GO1 e FOC GO2A) e Bahia (FOC 807). A caracterização morfológica foi feita a partir da incubação do isolado em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), para características referentes a crescimento e pigmentação da colônia e meio Synthetic-Nutrient-low-Ágar (SNA) para características referentes as macro e microestruturas. A análise filogenética foi realizada pela amplificação do fator de  $1\alpha$  (TEF- $1\alpha$ ) e do gene mtSSU e comparação com a base de dados do GenBank – NCBI e com a base de dados *Fusarium-ID*. A agressividade foi estudada por escala de notas referentes aos sintomas exibidos na parte aérea, rizoma e vasos condutores em bananeira da variedade Maçã. Os resultados mostram que todos os isolados são pertencentes a espécie *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, raça 1, divididos em duas linhas diferentes, sendo dois isolados pertencentes à linhagem VIII e os demais pertencentes a uma linhagem ainda não descrita. Com relação a agressividade, o isolado FOC GO2A apresentou maior agressividade que os demais.

**Palavras-chaves:** Mal-do-Panamá. Patógeno. Raça.



## ABSTRACT

*Fusarium* is a genus of fungus extensively studied because cause diseases and provides losses in a wide range of crops. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) has a great importance to banana plants, causing a disease known as Fusarium wilt. In this essay was made morphological and molecular studies, and studies of aggressiveness in four strains of Foc. The pathogens were isolated from rhizome of banana “apple” that exhibited symptoms of Fusarium wilt, from states of Minas Gerais (FOC GO2), Goiás (FOC GO1 e FOC GO2A) and Bahia (FOC 807). The morphological characterization was made in Potato-Dextrose-Ágar media (PDA), to characteristics related to colonies growth and pigmentation and on Synthetic-Nutrient-low-Ágar (SNA) media to characteristics relates to macro and micro structures. The phylogenetic analysis was made by amplification of 1 $\alpha$  factor (TEF-1 $\alpha$ ) and mtSSU gene and comparison with GenBank data base – NCBI and with the Fusarium-ID data base. The aggressiveness was studied using note scale related to the symptoms shown in the shoot, rhizome and vascular system in plants of banana “apple”. The results showed that all the isolates are of the Foc specie, race 1, belonging to two diferentes lineages, being two from lineage VIII and the others two from a new lineage not described yet. The isolate FOC GO2A showed more aggressiveness than the others.

**Key words:** Fusarium wil. Pathogen. Race.

## 1 INTRODUÇÃO

*Fusarium* é um gênero de fungos bastante estudado por causar doenças e proporcionar perdas nas mais variadas culturas. Está amplamente distribuído no mundo e seus danos são expressivos à produção em regiões tropicais. Além de danos a produção, algumas espécies produzem micotoxinas que interferem na qualidade dos produtos alimentícios, causando problemas à saúde tanto do homem quanto dos animais (WATANABE et al., 2011). Duas espécies do gênero *Fusarium* foram listadas ocupando a quarta e quinta posição entre os 10 fungos que afetam plantas de importância científica e econômica, dentre elas encontra-se o *Fusarium oxysporum* (DEAN et al., 2012).

Para caracterização, atributos morfológicos do patógeno como formato, tamanho e presença de estruturas específicas, tais como macro e microconídios são levadas em consideração. Além disso, características secundárias como crescimento e pigmentação de colônias do patógeno em meios específicos também contribuem para diferenciação das espécies (WINDELS, 1991; NELSON et al., 1994).

Além de métodos morfológicos, técnicas moleculares são amplamente utilizadas para auxiliar na separação filogenética de indivíduos do gênero e melhoram a precisão na identificação das diferentes espécies. Vários estudos vêm sendo conduzidos para o aprimoramento das técnicas moleculares já existentes, e desenvolvimentos de novas técnicas eficientes na correta identificação e acompanhamento da evolução genética do patógeno (LI et al., 2011; LI et al., 2014; PENG et al., 2014).

O *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) é o patógeno associado à doença conhecida como murcha de *Fusarium* ou mal-do-Panamá. É endêmica em regiões produtoras de banana, a qual ataca o sistema vascular das plantas e é considerada uma das doenças mais importantes da cultura. O patógeno é

dividido em raças de acordo com a patogenicidade em cultivares específicas, e em linhagens conforme filogenia genética. A correta identificação das **espécies** do patógeno permite melhor seleção de variedades de bananeira resistentes, contribuindo com programas de melhoramento da espécie. O uso de cultivares resistentes ainda é a melhor forma de controle do Foc, pois é um patógeno do solo e consegue sobreviver longos períodos na área de plantio sem a bananeira (KUMAR et al., 2006; PLOETZ, 2006; DA SILVA et al., 2010).

Esse trabalho teve como objetivo caracterizar a filogenia genética e a agressividade de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* obtidos nos estados de Minas Gerais, Goiás e Bahia.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### a) obtenção dos isolados de Foc;

Estirpes do patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* obtidos a partir de pseudocaules de bananeiras variedade Maçã apresentando sintomas de mal-do-Panamá foram usadas. A identificação e origem dos isolados está descrita na Tabela 1:

Tabela 1 - Identificação e origem do material vegetal utilizado para obtenção dos isolados

<b>Isolado</b>	<b>Planta</b>	<b>Cidade</b>	<b>Estado</b>
FOC GO2	Banana Maçã tradicional	Lavras	MG
FOC GO1	Banana Maçã tradicional	Itaguaru	GO
FOC GO2A	Banana Maçã novo genótipo	Buriti Alegre	GO
FOC 807	Banana Maçã tradicional	Cruz das Almas	BA

Primeiramente procedeu-se o isolamento e a caracterização morfológica dos quatro isolados, os quais foram conduzidos no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de

Lavras. Para o isolamento os pseudocaules foram lavados e seccionados. As partes do sistema vascular que apresentavam lesões características do patógeno foram cortadas em fragmentos menores e submetidas à assepsia por imersão em álcool a 70% por 1 minuto, em seguida imersão em hipoclorito de sódio a 1% por 2 minutos, seguida de tríplice lavagem em água destilada esterilizada e por fim secagem em papel filtro.

Após esse procedimento, os fragmentos foram colocados em placas de Petri contendo o meio BDA (Batata – Dextrose - Ágar). As colônias fúngicas que cresceram foram isoladas e utilizadas para identificação dos patógenos. Os fungos cujo crescimento miscelial apresentaram características semelhantes aos do gênero *Fusarium*, de coloração violeta e miscélio aéreo branco, foram submetidos à caracterização filogenética por avaliações morfológicas e moleculares, e testes de agressividade dos isolados.

b) caracterização filogênica;

A caracterização morfológica foi realizada em cultura monospórica, obtida através do isolamento de um único esporo de cada isolado de Foc. Os isolados obtidos foram repicados e inoculados em placas de Petri contendo meio BDA. Foram utilizadas 5 placas para cada isolado de Foc, conduzindo-se o experimento em delineamento inteiramente casualizado (DIC).

Posteriormente, as colônias foram colocadas para incubação em três diferentes ambientes: 1) estufa incubadora tipo BOD a 25 °C, no escuro. Após 3 dias foi avaliado o crescimento micelial, o qual foi mensurado em duas direções distintas, com auxílio de um paquímetro digital, sendo calculado o diâmetro médio da colônia a partir dessas medidas. 2) incubadora tipo BOD a 20 °C, com fotoperíodo de 12 h de luz branca e 12 h de luz negra, onde, após 10 dias de crescimento, foram avaliadas a coloração superior (verso) e inferior (reverso)

das colônias de Foc, bem como presença e características do micélio aéreo. 3) incubadora do tipo BOD a 20 °C, em fotoperíodo de 12 h de luz branca e 12 h de luz negra em meio Synthetic-Nutrient-low-Ágar (SNA). Neste ambiente, após incubação por 10 dias, características como a presença de falsas cabeças, presença e coloração de esporodóquio, formato de microconídios, quantidade de septos dos macroconídios, dimensões de macro e microconídios e formação do esporodóquio foram avaliadas. Foram feitas 30 repetições das medições de cada estrutura em cada isolado.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e para os que apresentaram diferenças significativas, realizou-se teste de comparação múltiplas de médias pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5%, utilizando o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (FERREIRA et al., 2014).

c) caracterização molecular;

A caracterização molecular foi realizada no Laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. Os isolados foram cultivados em meio malte 2% líquido (Leslie et al., 2006), incubados em um agitador a 100 rpm, por três dias, à temperatura ambiente (25°C a 28°C). O micélio foi filtrado, macerado em nitrogênio líquido e então realizou-se a extração de DNA por meio do kit Wizard® Genomic DNA purification (Promega do Brasil, São Paulo SP, Brasil), de acordo com as especificações do fabricante. Estimou-se quantitativamente as concentrações de DNA por NanoDrop 2000 e visualmente, em gel de agarose 1,2%, por comparação da intensidade de banda com um marcador de tamanho de fragmentos de 1 Kb (Invitrogen).

Para a amplificação de fragmentos do gene fator de alongação 1 $\alpha$  (TEF-1 $\alpha$ ) foram utilizados os iniciadores Ef-1 (forward; 5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') e Ef-2 (reverse; 5'-



GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') (O'DONNELL et al., 1998), e os iniciadores MS1 (forward; 5' CAGCAGTCAAGAATATTAGTCAATG-3') e MS21 (reverse; 5'- CTCTCCTCCTCAAGTACTGC -3') (O'DONNELL; CIGELNIK, 1997; WHITE et al.,1990) para a amplificação do fragmento da menor subunidade mitocondrial (MtSSU).

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador My Cycler™ (BIO-RAD). A amplificação do iniciador TEF-1 $\alpha$  e MtSSU: 94°C, por 1 minuto; 35 ciclos: 94°C, por 45 segundos; 60°C (TEF), 53°C (MtSSU), por 45 segundos; 72°C, por 90 segundos e 72°C, por 5 minutos (F). Para MtSSU serão: 94 °C, por 90 segundos; 40 ciclos: 94 °C, por 30 segundos; 55 °C, por 90 segundos; 68 °C, por 2 minutos e 68 °C, por 5 minutos (O'DONNELL et al., 2008). Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% corados com GelRed (Biotium®). Posteriormente foram visualizados em fotodocumentador MiniBis Pro (Uniscience). Em seguida realizou-se a purificação dos fragmentos amplificados utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega do Brasil, São Paulo SP, Brasil).

Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente por meio do programa SeqAssem (HEPPERLE, 2004) e as sequências editadas foram comparadas com a base de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information – NCBI, por meio do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>) e com a base de dados Fusarium-ID v. 1.0, específica para o gênero *Fusarium* (GEISER et al., 2004).

Nas análises filogenéticas sequências de referência do Foc correspondentes ao TEF -1 $\alpha$  e MtSSU, previamente depositadas no GenBank, foram acrescentadas as análises. Realizou-se as análises filogenéticas de forma individual e combinadas. Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos foram gerados utilizando-se a ferramenta CLUSTALW

(THOMPSON et al., 1994), implementado pelo programa MEGA 5 e foram corrigidas manualmente. A análise filogenética foi realizada pelo método de máxima parcimônia (*maximum parsimony* - MP) por meio do programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011).

d) teste de agressividade dos isolado;

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no pomar do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A suspensão contendo inóculos do patógeno foi preparada a partir da cultura monospórica, os quais foram repicados para meio BDA e ficaram em incubação por 7 dias a 25 °C, em fotoperíodo de 12 horas, sendo então feita a suspensão de esporos em água-destilada-esterelizada (ADE), ajustando a concentração para 10<sup>6</sup> conídios/ mL.

Os isolados foram testados em plantas de bananeira, variedade Maçã, obtidas a partir de cultura *in vitro*. A inoculação foi feita através de imersão das raízes das plantas na suspensão contendo os inóculos dos patógenos por 5 segundos, sendo em seguida plantadas em sacos plásticos com capacidade para 1 L, contendo substrato preparado com de terra, areia e adubo orgânico na proporção de 1:1:1. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com 6 repetições e quatro tratamentos, sendo estes constituídos de cada isolado fúngico (FOC GO1, FOC GO2, FOC GO2A e FOC 807).

A severidade dos isolados foi avaliada aos 8, 16, 24, 32 e 40 dias por escala de notas referentes aos sintomas observados na parte aérea (Tabela 2). Também avaliou-se os sintomas apresentados no rizoma (Tabela 3) e sistema vascular (Tabela 4) (MOHAMED et al., 1999), aos 40 dias após a inoculação.

Tabela 2 - Escala de notas para avaliação de sintomas de mal-do-Panamá na parte aérea de plantas de bananeira.

<b>Notas</b>	<b>Descrição</b>
1	Planta sem sintomas
2	Folhas parcialmente amareladas e sem necrose
3	Amarelecimento intenso das folhas com necrose moderada
4	Amarelecimento intenso das folhas com necrose intensa e folhas deformadas
5	Planta morta

Tabela 3 - Escala de notas para avaliação de sintomas de mal-do-Panamá no rizoma de plantas de bananeira.

<b>Notas</b>	<b>Descrição</b>
1	Ausência de escurecimento no rizoma
2	Região central sem escurecimento, mas presente na junção da raiz com rizoma
3	Região central do rizoma com até 5% de escurecimento
4	Região central do rizoma com 6% a 20% de escurecimento
5	Região central do rizoma com 21% a 49% de escurecimento
6	Região central do rizoma com mais de 50% de escurecimento
7	Planta morta

Tabela 4 - Escala de notas para avaliação de sintomas de mal-do-Panamá no sistema vascular de plantas de bananeira.

<b>Notas</b>	<b>Descrição</b>
1	Vasos sem escurecimento
2	Pontos isolados de descoloração
3	Descoloração de até 1/3 do câmbio
4	Descoloração entre 1/3 e 2/3 do câmbio
5	Descoloração superior a 2/3 do câmbio
6	Descoloração total do cambio vascular

Os dados obtidos nos demais tratamentos foram submetidos a análise de variância sendo aplicado o teste de Skott-Knott a 5% para comparação múltipla de médias entre aqueles que apresentaram diferença significativas nas

variâncias, utilizando o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (Ferreira et al., 2014).

e) teste de raça dos isolados.

Os isolados foram inoculados em plantas de diferentes variedades de bananeira pertencentes à diferentes grupos genômicos, sendo estas as cultivares de bananeira Maçã tradicional, Platina, Prata Gorotuba, Prata, Prata Anã, Grande Naine e PA94-01.

A metodologia de preparação e inoculação dos patógenos foi a mesma utilizada no teste de agressividade. A avaliação foi realizada por meio da capacidade patogênica dos isolados, pela manifestação dos sintomas de mal-do-Panamá considerando-se apenas patogenicidade positiva (presença de sintomas) e negativa (ausência de sintomas). A raça foi definida de acordo com o grupo genômico que manifestou suscetibilidade ao patógeno.

### **3 RESULTADO E DISCUSSÃO**

Na caracterização filogenética, no que diz respeito às características morfológicas, observou-se que as colônias apresentam coloração superior (verso) variando entre violeta claro (isolados FOC GO1 e FOC GO2) a violeta escuro (FOC GO2A e FOC 807). A coloração inferior (reverso) apresenta tonalidades entre laranja e vermelho escuro, com micélio aéreo cotonoso e pigmentação branca para todos os isolados. Todos os isolados apresentaram presença de esporodóquio, de coloração laranja, falsas cabeças, microconídeos de formato oval e macroconídeos com 3 a 5 septos em média.

O crescimento médio das colônias variou de 10,37 a 13,35 mm.dia<sup>-1</sup>. Os isolados FOC GO2, FOC GO2A e FOC 807 apresentaram maior diâmetro de colônia que o isolado FOC GO1 (Tabela 5).

Tabela 5 - Comportamento do crescimento micelial de colônias de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, após 3 dias de incubação no escuro a 25 °C, quanto a comprimento e largura.

Isolado	Diâmetro (mm)
FOC GO 1	31,13 b*
FOC GO 2	39,57 a
FOC GO 2 <sup>a</sup>	39,51 a
FOC 807	40,05 a
CV	7,47

\* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5%

O comprimento dos macroconídeos variou de 23,37 a 35,25 µm e a largura de 3,50 a 5,43 µm, enquanto que o comprimento dos microconídeos variou de 6,96 a 13,50 µm e a largura de 2,56 a 3,54 µm. Particularidade foi observada para o isolado FOC GO1, pois, apresentou maior comprimento e largura tanto para macro quanto microconídeos, em relação aos demais isolados (Tabela 6).

Tabela 6 - Comportamento de macroconídeos e microconídeos de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, quanto a comprimento e largura.

Isolado	Macroconídeos		Microconídeos	
	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Comprimento (µm)	Largura (µm)
FOC GO 1	35,25 a*	5,43 a	13,50 a	3,54 a
FOC GO 2	23,37 c	3,98 b	8,33 b	2,85 b
FOC GO 2A	19,38 d	3,50 c	6,96 c	2,56 b
FOC 807	29,16 b	4,29 b	7,02 c	2,69 b
CV (%)	18,70	20,86	22,04	20,10

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5%

De acordo com LESLIE et al. (2006), as características morfológicas dos isolados de Foc podem variar entre os diferentes meios existentes, mesmo assim, o meio SNA, em relação aos demais, traz como vantagem o fato de impedir a degeneração da cultura, promovendo boa esporulação e bom desenvolvimento dos conídios. Entretanto, devido à limitada formação dos esporodóquios, a morfologia dos macroconídios pode não ser uniforme, porém, oferece condições para formação de ampla variedade de formatos diferentes de microconídios. Dessa forma, ficam evidenciadas as diferenças encontradas nos tamanhos dos macros e microconídeos entre os isolados estudados.

Com relação ao meio BDA, LESLIE et al. (2006) afirmam que embora os conídios formados nesse meio de cultura não possuam formatos e tamanhos tão consistentes quanto os formados no meio SNA, morfologia da colônia, pigmentação e taxa de crescimento da cultura da maioria das espécies de *Fusarium* são razoavelmente consistentes. Tal fato torna o meio bastante eficiente para ser usado em estudos morfológicos, já que essas são características secundárias que auxiliam na identificação das espécies do gênero.

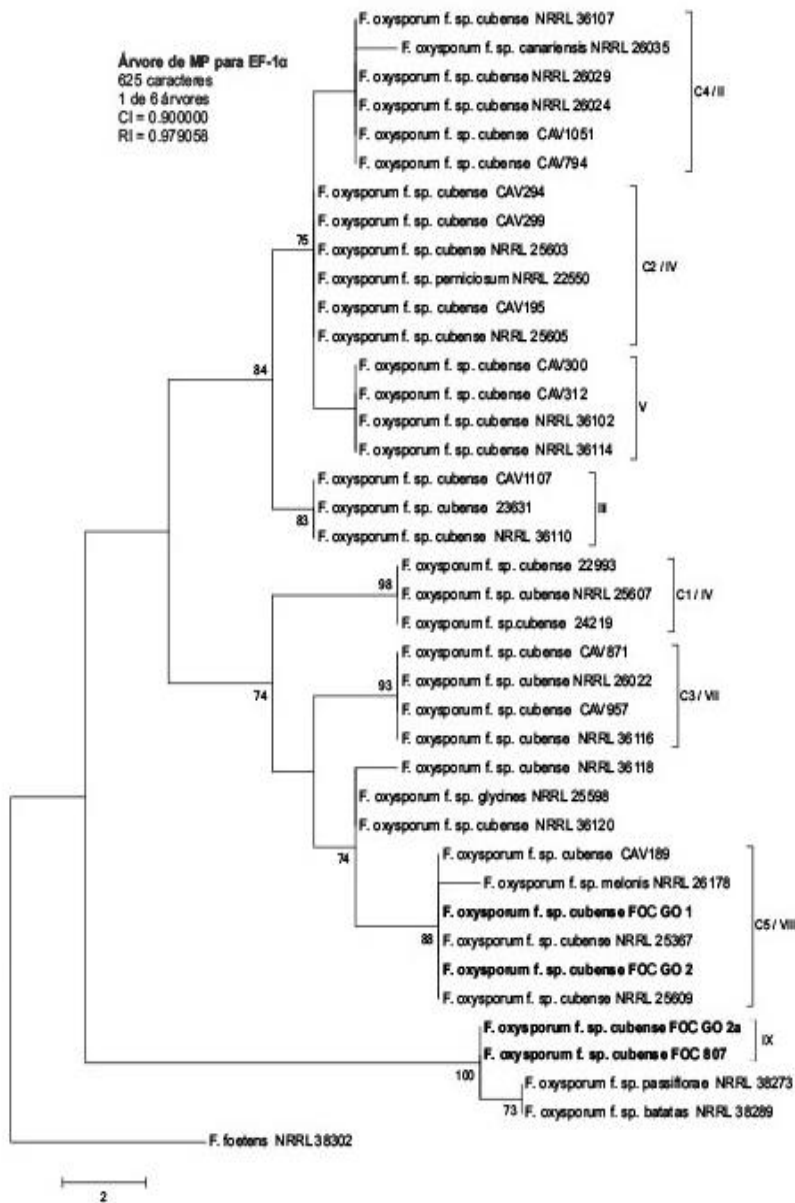
Em trabalhos de identificação morfológica em meio BDA, colônias de isolados de *Fusarium oxysporum* apresentaram coloração variando de salmão claro a violeta, sugerindo um comportamento semelhante da espécie nesse meio de cultura. Outros trabalhos com estudos morfológicos em isolados do gênero apresentaram colorações variadas, como o caso do *Fusarium graminearum* que apresentam pigmentação variando de vermelho carmim a marrom claro, e de *Fusarium circinatum* que exhibe micélio aéreo variando de branco a rosa claro, com pigmentação salmão da colônia (ANGELOTTI et al., 2006; CUNHA et al., 2015; PFENNING et al., 2016).

Considerando ainda a caracterização filogenética, mas quanto as análises moleculares, observou-se que, como demonstrado no filograma da Figura 1, todos os isolados são pertencentes à espécie de *Fusarium oxysporum* f.sp.

*cubense*. O filograma identificou duas linhagens diferentes entre os quatro isolados estudados, de forma que os isolados FOC GO1 e FOC GO2 pertencem a linhagem VIII, enquanto que os isolados FOC GO2A e FOC 807 pertencem provavelmente a uma nova linhagem ainda não descrita.

O'Donnell et al. (1998) utilizaram o gene do fator de enlogação  $1\alpha$  (EF- $1\alpha$ ) associados com o DNA do fragmento da menor subunidade mitocondrial (mtSSU) para estudo das semelhanças genéticas entre estirpes do complexo de *F. oxysporum*. Os autores observaram que o gene EF- $1\alpha$  possui 50% mais informação filogenética que o rDNA da mtSSU, caracterizando 5 linhagens independentes (C1 a C5). As linhagens descritas pelos autores estão marcadas no filograma da figura 1, onde os isolados FOC GO1 e FOC GO2, possuem características semelhantes aos pertencentes à linhagem C5, permanecendo os demais isolados fora da caracterização descrita, reforçando a ideia de que possam constituir uma nova linhagem.

Figura 1- Filograma da máxima parsimônica com as linhagens obtidas através da análise molecular a partir do sequenciamento do fator de alongação (EF-1 $\alpha$ ) dos isolados FOC GO1, FOC GO2, FOC GO2A e FOC 807 comparados com outros isolados de fungos do gênero *Fusarium*.





Em outros estudos envolvendo o uso do gene EF-1 $\alpha$  e o mtSSU, Fourier et al. (2009) descreveram a existência de outras linhagens diferentes além das encontradas por O'Donnell et al. (1998). Fourier et al. (2009) caracterizaram três novas linhagens classificando-as em linhagens diferentes de I a VIII. Os autores afirmam a possibilidade de existência de novas linhagens ainda não descritas, devido a ampla variedade de estirpes do gênero *Fusarium* espalhadas pelas mais diversas regiões e dado a facilidade desses indivíduos em trocar genes dentro da espécie. Fourier et al. (2009) relatam ainda, que a amplificação da região de separação intergênica (IGS), além das outras duas utilizadas comumente, pode permitir a separação em linhagens que correspondem à mesma encontrada pelas ampliações do EF-1 $\alpha$  e o mtSSU, auxiliando assim, a classificação taxonômica do patógeno.

Apesar da classificação morfológica permitir a identificação de espécies do gênero *Fusarium* e de estudos filogenéticos serem possíveis através das análises moleculares, algumas *formae speciales* (f. sp.) de *Fusarium spp.* só podem ser definidas através de testes de patogenicidade em hospedeiros específicos. Dessa forma, isolados que atacam a mesma cultura podem ser inclusos na mesma *formae speciales*, já que a maioria deles afetam apenas uma única cultura. Embora já existam relatos de algumas f. sp. sendo patogênicas à mais de um hospedeiro e outras que não apresentam capacidade fitopatogênica (CAFRI et al., 2005; FOURIER et al., 2011). No caso dos isolados utilizados nesse estudo, todos foram isolados de plantas de bananeira infectadas e foram capazes de causar sintomas característicos em variedades de bananeira, comprovando a *formae specialis cubense*.

Com relação às raças, quatro raças de Foc já foram descritas e é possível identificá-las através dos hospedeiros que afetam. A raça 1 é capaz de afetar cultivares do grupo Gros Michel, Manguêño, Silk e Pome, a raça 2 ataca os

grupos Bloggøe e alguns plátanos (ABB), a raça 3 não afeta bananeiras, apenas plantas de helicônias e a raça 4 é capaz de quebrar a resistência de plantas do grupo Cavendish, incluindo a resistência de cultivares de bananeira Grande Naine, as quais apresentam resistência ao patógeno de outras raças (MOORE et al., 1993; FOURIER et al., 2011).

De acordo com esses dados, o teste de raça para os isolados avaliados, evidenciou que todos os fungos foram patogênicos apenas para as variedades de bananeira Maçã (genoma AAB), a qual apresenta alta suscetibilidade e as do grupo Prata (genoma AAB) que são de suscetibilidade moderada, não afetando as bananeiras dos outros grupos, evidenciando assim que estes são pertencentes a raça 1.

Ploetz et al. (1993) observaram em seus estudos, predominância da raça 1 de Foc infectando plantas no Brasil. Outros estudos mostram que já foram encontradas evidências da raça 4 desse patógeno, o qual é capaz de quebrar a resistência de plantas do grupo Cavendish, que são consideradas resistentes às demais raças, nos estados do Pará, Minas Gerais, Amazonas e Santa Catarina (DIAS et al., 2014; CUNHA et al, 2015)

Estudos sugerem que a variação genética ocorrida entre os isolados encontrados pelo mundo, representantes das raças 1, 2 e 4, isolados a partir de bananeiras que exibiam sintomas de mal-do-Panamá, teria ocorrido de forma conjunta com as bananeiras comestíveis e seus progenitores (BENTLEY et al., 1995). A identificação rápida das raças existentes das espécies do patógeno permite melhor monitoramento e auxilia no controle da doença. Alguns estudos já vêm sendo conduzidos com intuito de desenvolver técnicas eficientes para auxílio na identificação de algumas raças de Foc. Peng et al. (2014) estudaram técnicas de fluorescência em tempo real, mediada pelo circuito de amplificação isotérmica para detecção da raça 4 desse patógeno no solo. Os autores obtiveram resultados positivos, mostrando que a técnica pode ser usada para ajudar na

detecção e monitoramento do patógeno, avaliando assim, sua distribuição e ocorrência.

Com relação a agressividade (Tabela 7), os isolados FOC GO2A e FOC GO2 foram mais agressivos em cultivares de bananeira ‘Maçã’ que os demais isolados. O grau de agressividade foi igualitário dos sintomas exibidos no sistema vascular e rizomas das plantas. Quanto aos sintomas exibidos na parte aérea das plantas, o isolado FOC GO2A mostrou-se mais agressivo que os demais, pois conseguiu levar maior número de plantas à morte.

Em trabalhos em que se avaliou a agressividade de isolados de Foc obtidos a partir de cultivares de banana dos grupos Pome e Cavendish, em bananeiras das variedades Prata anã e Grande Naine, observou-se que os isolados provenientes do grupo pome foram patogênicos às plantas de Prata anã, com agressividade variando entre moderada e agressiva. Já os isolados a partir do grupo Cavendish foram capazes de afetar as cultivares de bananeiras Grande Naine, variando sua agressividade entre pouco agressiva, moderadamente agressiva e agressiva (CUNHA et al, 2015). Dessa forma, ficam evidentes os diferentes graus de agressividade existentes entre os patógenos de mesma raça e mesma linhagem, o que pode explicar as diferenças de agressividade encontrada entre os isolados do presente estudo.

Tabela 7 - Severidade dos sintomas causados por isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense na parte aérea, rizoma e sistema vascular de bananeira maçã, avaliada através de escala de notas 40 dias após a inoculação.

<b>Isolado</b>	<b>Parte Aérea</b>	<b>Rizoma</b>	<b>Sistema Vascular</b>
FOC GO 1	3,4 b*	2,7 b	3,8 b
FOC GO 2	2,9 b	5,5 a	5,2 a
FOC GO 2A	4,5 a	6,5 a	6,4 a
FOC 807	3,4 b	3,7 b	3,8 b
CV (%)	26,00	26,13	21,08

\* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5%;

Todos os isolados estão depositados na Coleção Micológica de Lavras (CML) da Universidade Federal de Lavras, com os seguintes códigos: Isolado GO1, CML nº 3488, Isolado GO2, CML nº 3489, Isolado GO2A, CML nº 3490, Isolado 807, CML nº 3487.

#### **4 CONCLUSÃO**

Os quatro isolados identificados pertencem a espécie *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Os isolados FOC GO1 e FOC GO2 pertencem a linhagem VIII e os isolados FOC GO2A e FOC 807 não se enquadram em nenhuma linhagem já descrita, pertencendo a uma nova linhagem. Todos os isolados pertencem a raça 1, e o isolado FOC GO2A apresenta maior agressividade que os demais.

#### **5 AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à FAPEMIG, CAPES e CNPQ pela concessão de auxílio financeiro e bolsa de estudos. À EMATER de Goiás pelo material cedido para realização do presente estudo, e ao LME por ter cedido os equipamentos para a realização das análises.



## REFERÊNCIAS

ANGELOTTI, F.; TESSMANN, D. J.; ALVES, T. C. A.; VIDA, J. B.; FILHO, D. S. J.; HARAKAVA, R. Caracterização morfológica e identificação molecular de isolados de *Fusarium graminearum* associados à giberela do trigo e triticale no sul do Brasil. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 2, p. 177-179, 2006.

BENTLEY, S.; PEGG, K.G.; DALE, J. L. Genetic variation among a world-wide collection of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* analysed by RAPD-PCR fingerprinting. **Mycological Research**, v. 99, n. 11, p. 1378-1384, 1995.

CAFRI, D.; KATAN, J.; KATAN, T., Cross-pathogenicity between formae formae specialis of *Fusarium oxysporum*, the pathogens of cucumber and melon. **Journal of Phytopathology**, v. 153, n. 10, p. 615-622, 2005.

CUNHA, C. M. S.; HINZ, R. H.; PEREIRA, A.; TEACENCO, F. A.; STADNIK, M. J. Agressiveness and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* from Santa Catarina, southern Brazil. **Tropical plant pathology**, v. 40, n. 5, p. 326-334, 2015.

DA SILVA, C. M.; HINZ, R. H.; STADNIK, M. J.; PEREIRA, A.; TEACENCO, F. A. Diversidade genética por marcadores moleculares em *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* no Estado de Santa Catarina. **Ciência Rural**, v.40, n.12, 2010.

DEAN, R.; VANKAN, J. A. L.; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK; K. E.; PIETRO, A.; SPANU, P. D.; RUDD, J. J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G. D. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology, **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414-430, 2012.

DIAS, J. S. A.; ABREU, M. S.; RESENDE, M. L. V. Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (Foc) quanto à compatibilidade vegetativa e à patogenicidade em cultivares de bananeira diferenciadoras de raças no Brasil. **Biota Amazônia**, Macapá, v. 4, n. 4, p. 60-65, 2014.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons, **Ciência agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FOURIER, G.; STEENKAMP, E. T.; GORDON, T. R.; VILJOEN, A. Evolutionary relationship among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* vegetative compatibility groups, **Applied and environmental Microbiology**, v. 75, n. 14, p. 4770-4781, 2009.

FOURIE, G.; STEENKAMP, E. T.; PLOETZ, R. C.; GORDON, T. R.; VILJOEN, A. Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* *formae specialis* *ubense* within *Fusarium oxysporum* complex, **Infection, genetic and evolution**, v. 11, n. 3, p. 533-542, 2011.

GEISER, D. M. et al. FUSARIUM-I, D. A DNA sequence database for identifying **Fusarium**, **European Journal of Plant Pathology**, v.110, n. 5-6, 2004.

HEPPERLE, D. SeqAssem<sup>®</sup>: *A sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences*. Win32-Version. 2004. Distributed by the author. Disponível em: < <http://www.sequentix.de>>. Acesso em: 12 out. 2015.

KUMAR, B. H.; SHANKAR, U. A.; KINI, R. K.; PRAKASH, H. S.; SHETTY, S. H. Genetic variation in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* isolates based on random amplified polymorphic DNA and intergenic spacer. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 39, n. 2, p. 151-160, 2006.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. The *Fusarium* laboratory manual. **Blackwell Publishers**, Malden MA, USA, v. 2, n. 10, 420 p, 2006.

LI, M. H.; XIE, X. L.; LIN, X. F.; SHI, J. X.; DING, Z. J.; LING, J. F.; JIANG, Z. D. Functional characterization of the gene FoOCH1 encoding a putative  $\alpha$ -1, 6-mannosyltransferase in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 65, p. 1-13, 2014.

LI, C.; CHEN, S.; ZUO, C.; SUN, Q.; YE, Q.; YI, G.; HUANG, B. The use of GFP-transformed isolates to study infection of banana with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. **European Journal of Plant Pathology**, v. 131, n 2, p. 327-340. 2011.

MOHAMED, A. A.; MAK, C.; LIEW, K.W.; H. O, Y.W. Early evaluation of banana plants at nursery stage for Fusarium wilt tolerance. In: Molina, A.B.; MASDEK, N.K.; LIEW, K.W. Banana Fusarium wilt management: towards sustainable cultivation. Getting Highlands Resort Malasia. Proc. Int. Workshop of the Banana Fusarium wilt disease, 1999.

MOORE, N. Y.; PEGG, K. G.; ALLEN, R. N.; IRWIN, J. A. G. Vegetative compatibility and distribution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* by production of volatiles, **Australian journal of experimental agriculture**, Australia, v. 33, n. 6, p 797-802, 1993.

NELSON, P.E.; DIGNANI, M. C.; ANAISSIE, E. J. Taxonomy, biology, and clinical aspects of Fusarium species. **Clinical microbiology reviews**, v. 7, n. 4, p. 479-504, 1994.

O'DONNELL, K., AND CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular. Phylogenetic Evolution**, v.7, n. 1, p. 103-116, 1997.

O'DONNELL, K.; KISTLER, H.C.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R. C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, v. 95, n. 5, p. 2044-2049, 1998.



O'DONNELL, K., KISTLER, H. C., CIGELNIK, E., PLOETZ, R. C., 2008. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from the nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 5, p. 2044-2049, 2008.

PENG, J.; ZHANG, H.; CHEN, F.; ZHANG, X.; XIE, Y.; HOU, X.; LI, G. PU, J. Rapid and quantitative detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4 in soil by real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n 6, p. 1740-1749, 2014.

PFENNING, L. H.; COSTA, S. S.; MELO, M. P.; COSTA, H.; VENTURA, J. A.; AUER, C. G.; SANTOS, A.F. First report and characterization of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 3, p. 210-216, 2014.

PLOETZ, R. C. Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. **Phytopathology**, v. 96, n. 6, p. 653-656, 2006.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, 1994.

WATANABE, M.; YONEZAWA, T.; LEE, K.; KUMAGAI, S.; SUGITA-KONISHI, Y.; GOTO, K.; HARA-KUDO, Y. Evaluation of genetic markers for identifying isolates of the species of the genus *Fusarium*, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.9 1, n. 13, p. 2500-2504, 2011.

WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., AND TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNES, M.A.; GELFAND, D. H., SNINSKY, J. J., WHITE, T. J. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications., eds. **Academic Press**, San Diego, CA, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

WINDELS, C. E. Current status of Fusarium taxonomy. **Phytopathology**, v. 81, 1991.



**Artigo 2**

**Novo genótipo de bananeira Maçã moderadamente resistente ao mal-do-Panamá**

Autores: Neilton Antonio Fiusa Araújo, Moacir Pasqual, Leila Aparecida Salles Pio, Eduardo Alves, Dalíhia Nazaré dos Santos.

Elaborado de acordo com a NBR 6023



## RESUMO

A cultura da bananeira possui importância econômica e social para muitos países, inclusive para o Brasil, que ocupa a posição de terceiro maior produtor dessa fruta. O mal-do-Panamá é uma doença vascular, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), para o qual as cultivares de bananeira Maçã são altamente suscetíveis. Este trabalho teve como objetivo avaliar a resistência de um novo genótipo de bananeira Maçã ao mal-do-Panamá. O experimento foi conduzido em casa de vegetação no pomar do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizados sete variedades de bananeiras visando comparar a resistência do novo genótipo à resistência das demais, sendo o grupo controle constituído da variedade de bananeira Maçã tradicional. A suspensão de inóculos do patógeno foi adicionada ao substrato de cultivo. A suscetibilidade das plantas foi avaliada por meio de notas referentes aos sintomas observados na parte aérea, sistema radicular, rizoma e sistema vascular. Os resultados do trabalho evidenciaram que o novo genótipo apresenta suscetibilidade moderada ao Foc. Portanto, o genótipo pode ser recomendado para plantio como forma de controle do Foc, bem como pode ser utilizado em programa de melhoramento, visando incrementar a variabilidade e o ganho em cultivares de bananeiras resistentes ao Foc.

**Palavras-chave:** Rizoma. Doença vascular. Moderadamente resistente.



## ABSTRACT

The banana crop has a great economic and social importance to many countries, including Brazil, that is the third place in mundial banana production. The Fusarium wilt is a vascular disease, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), in which the cultivars of banana “apple” are highly susceptible. This work aimed evaluate the resistance to Fusarium wilt by the “new genotype” of banana “apple”. The essay was conducted in greenhouse of Agriculture Department of Universidade Federal de Lavras (UFLA). It were used seven banana varieties to compare the resistance of the “new genotype” with the others. The control group was formed by the traditional banana “apple”. The suspension of pathogen inoculum was added to the cultivation substrate. The susceptibility of bananas was evaluated by note scale related to the symptoms on the shoot, roots, rhizome and vascular system. The results shown that the new genotype of banana “apple” is moderately resistant to Foc. This way, the cultivar can be recomendad as a mean of Foc control and can be used in banana breeding program to increase the variability and gain in banana crops resistants to Foc.

**Key words:** Rhizome. Vascular disease. Moderately susceptible.





## 1 INTRODUÇÃO

Uma planta de bananeira ‘Maçã’ surgiu em meio a um bananal no estado de Goiás, com aparente resistência ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). Em virtude desta importante característica, esta planta foi multiplicada e distribuída para um número significativo de produtores da região. A cultura da bananeira possui importância econômica e social para muitos países, ocupando a posição de quarto alimento mais produzido e comercializado no mundo. O Brasil ocupa a posição de terceiro maior entre os países produtores da fruta, alcançando em torno de 7 milhões de toneladas produzidas no ano de 2013 (FIORAVAÇO, 2003; EMBRAPA, 2014).

A banana é uma fruta cultivada em todo o território nacional, com grande aceitação no mercado interno e grande importância para a agricultura familiar. Entre as principais cultivares produzidas no país estão a Prata, Pacovã, Prata Anã, Maçã, Mysore, Terra e D’Angola. A cultivar Maçã é considerada uma banana nobre, apresenta excelente aceitação pelos consumidores e possui alto valor no mercado.

A maioria das cultivares de bananeira apresenta suscetibilidade aos patógenos que atacam a cultura afetando o rendimento e a produtividade e podendo levar as plantas à morte. O mal-do-Panamá é uma doença vascular, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), é considerada uma das doenças mais importantes que afetam a cultura, ocorre de forma endêmica em todo o território nacional e atinge quase todas áreas de cultivo da fruta (CORDEIRO et al, 1997; SUTHERLAND et al., 2013).

As cultivares de bananeira Maçã, embora tenham uma grande aceitação pelo mercado consumidor, são altamente suscetíveis ao ataque do Foc. Por se tratar de fungo de solo, as medidas de controle são difíceis, se limitam a práticas culturais e uso de variedades resistentes ou tolerantes. Devido a isso, cultivares

Maçã têm sido substituídas por variedades do grupo Cavendish que apresentam resistência à doença (CORDEIRO et al, 1997; SILVA et al., 2002). Porém, surgiu no estado de Goiás um acesso de bananeira Maçã que apresenta aparente resistência ao Foc e vem sendo cultivado por produtores da região.

A avaliação de genótipos quanto a resistência ao ataque do patógeno permite a seleção de plantas com características de interesse. Estas podem vir a ser utilizadas em programas de melhoramento visando o desenvolvimento de cultivares resistentes à doença. Tal fato, permite a diminuição das perdas ocasionadas pelo patógeno. Este trabalho teve como objetivo avaliar a resistência de um novo genótipo de bananeira Maçã ao patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no pomar do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em delineamento inteiramente casualizado. Foram utilizados sete tratamentos, constituídos por cultivares de bananeira: 1 - Maçã (tradicional - testemunha), 2 - Platina, 3 - Prata Gorotuba, 4 - Prata, 5 - Grande Naine, 6 - PA94-01 e 7 - Novo genótipo de bananeira maçã. A resistência deste novo genótipo foi comparada com a resistência das demais cultivares. Foram utilizadas cinco plantas de cada cultivar, sendo cada planta considerada uma unidade experimental.

Para a inoculação das plantas com o patógeno foi utilizada uma estirpe de Foc, previamente identificada por caracteres morfológicos e moleculares. Para o preparo da suspensão de inoculação utilizou-se dois Elerm Meyers contendo 250 mL de meio líquido batata-dextrose (BD) aos quais adicionou-se três discos de meio batata-dextrose-ágar (BDA) de 2 mm de diâmetro, contendo

o crescimento miscelial de colônias com 5 dias, sendo então, colocado para incubação em mesa agitadora sob 25 °C, a 200 rpm, por 6 dias, de acordo com a metodologia descrita por Li et al. (2015). O ajuste da concentração da suspensão de inóculos foi feito para 10<sup>6</sup> conídios/ mL.

As plantas a serem inoculadas com o Foc foram cultivadas em vasos com capacidade para 1 L de substrato, preenchidos com terra, areia e adubo orgânico na proporção de 1:1:1. A inoculação foi feita pela adição de 2 mL da suspensão de inoculação em 5 furos distribuídos ao redor de cada planta.

Durante 60 dias a susceptibilidade das plantas foi avaliada a cada 2 dias por meio de escala de notas referentes aos sintomas observados na parte aérea (Tabela 1). Ao final de 60 dias, avaliou-se também os sintomas apresentados no sistema radicular (Tabela 2), rizoma (Tabela 3) e sistema vascular (Tabela 4) (MOHAMED et al., 1999).

Tabela 1 - Escala de notas para avaliação de sintomas de mal-do-Panamá na parte aérea de plantas de bananeira.

<b>Notas</b>	<b>Descrição</b>
1	Planta sem sintomas
2	Folhas parcialmente amareladas e sem necrose
3	Amarelecimento intenso das folhas com necrose moderada
4	Amarelecimento intenso das folhas com necrose intensa e folhas deformadas
5	Planta morta

Tabela 2 - Escala de notas para avaliação de sintomas de mal-do-Panamá no sistema radicular de plantas de bananeira.

<b>Notas</b>	<b>Descrição</b>
1	Raízes assintomáticas
2	Raízes com necrose
3	Raízes com necrose intensa
4	Necrose na raiz principal e raízes novas sem infecção
5	Necrose na raiz principal e raízes novas com infecção
6	Raízes Mortas

Tabela 3 - Escala de notas para avaliação de sintomas de mal-do-Panamá no rizoma de plantas de bananeira.

<b>Notas</b>	<b>Descrição</b>
1	Ausência de escurecimento no rizoma
2	Região central sem escurecimento, mas presente na junção da raiz com rizoma
3	Região central do rizoma com até 5% de escurecimento
4	Região central do rizoma com 6% a 20% de escurecimento
5	Região central do rizoma com 21% a 49% de escurecimento
6	Região central do rizoma com mais de 50% de escurecimento
7	Planta morta

Tabela 4 - Escala de notas para avaliação de sintomas de mal-do-Panamá no sistema vascular de plantas de bananeira.

<b>Notas</b>	<b>Descrição</b>
1	Vasos sem escurecimento
2	Pontos isolados de descoloração
3	Descoloração de até 1/3 do câmbio
4	Descoloração entre 1/3 e 2/3 do câmbio
5	Descoloração superior a 2/3 do câmbio
6	Descoloração total do cambio vascular

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância aplicando-se o teste de Skott-Knott a 5% para comparação múltipla de médias. Além disso, para comparação da resistência entre o novo genótipo de bananeira Maçã e a

bananeira Maçã tradicional foi feita análise de regressão para obtenção da Curva de Progresso da Doença (CPD), a partir dos dados dos sintomas na parte aérea e calculada a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD). Para obtenção dos dados estatísticos foi utilizado o programa Sisvar versão 5.6 (FERREIRA et al., 2014)

### 3 RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com relação aos sintomas na parte aérea, rizoma, sistema vascular e raízes estão descritos na Tabela 5. De acordo com as avaliações dos sintomas exibidos na parte aérea, aos 60 dias após a inoculação do patógeno, o novo genótipo de bananeira Maçã apresentou sintomas de mal-do Panamá, embora com menor intensidade que a bananeira Maçã tradicional, ficando com sintomas em estágio intermediário entre esta e as demais variedades.

Tabela 5 - Resistência de cultivares de bananeira à isolado de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, avaliada por sintomas exibidos na parte aérea das plantas, rizoma e pseudocaule, sistema vascular e raízes, 60 dias após a inoculação do patógeno, de acordo com escala de notas.

Cultivar	Parte Aérea	Rizoma	Sistema Vascular	Raízes
Maçã Tradicional	4,75 c*	5,75 c	4,60 c	5,00 c
Novo genótipo	2,00 b	2,00 b	1,90 b	2,25 b
Platina	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a
Prata Gorotuba	1,20 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a
Prata	1,25 a	1,25 a	1,15 a	1,50 a
PA 94-01	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a
Grande Naine	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a
CV	15,59	21,98	23,81	23,20

\* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5%

De forma semelhante, a intensidade dos sintomas exibidos no rizoma e pseudocaule do novo genótipo apresentou-se de forma intermediária em relação às demais variedades comparadas e a bananeira Maçã tradicional, que apresentou sintomas de escurecimento intenso no corte transversal. O novo genótipo apresentou alguns pontos escurecidos entre a junção das raízes e rizomas sem sinais de evolução e também teve a presença de exudados, fato que não ocorreu na variedade tradicional, sugerindo que possa existir uma forma de resistência diferenciada para o novo genótipo em relação as demais.

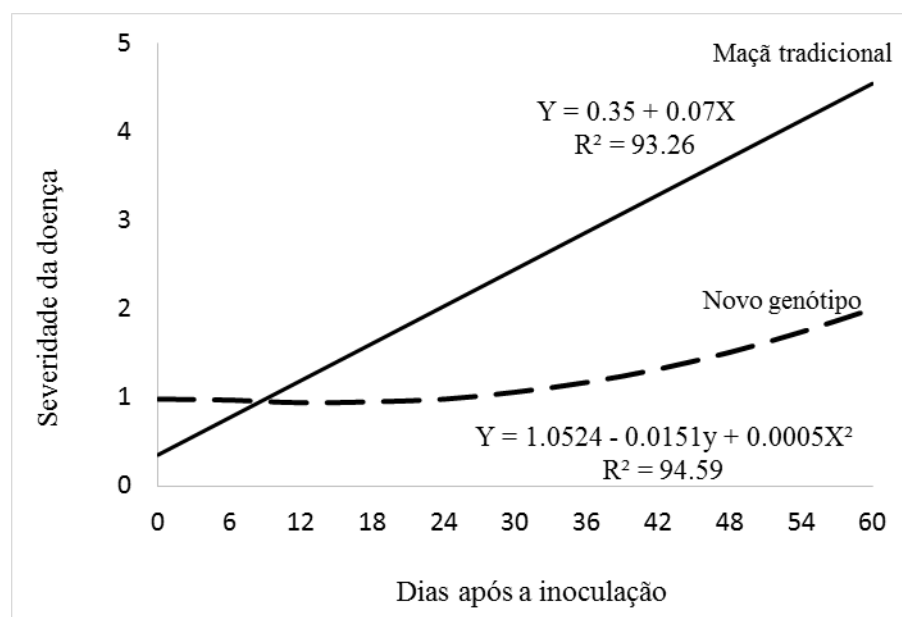
O mesmo comportamento foi observado quando avaliados o sistema vascular e as raízes. A bananeira Maçã tradicional apresentou intensa descoloração (2/3) do câmbio vascular, raízes principais necrosadas e infecção nas raízes novas. O novo genótipo apresentou ausência ou poucos pontos de descoloração no sistema vascular e poucas raízes com sinais de necrose. As demais variedades não apresentaram sinais em ambos as análises citadas, com exceção da variedade Prata, que apresentou alguns pontos de descoloração e poucas raízes necrosadas ao final do experimento.

A formação de exudados é uma reação das plantas ao ataque de patógenos vasculares, as quais produzem géis que ajudam no combate ao desenvolvimento do micro-organismo em seus vasos condutores. Segundo VanderMolen et al. (1977), os géis ajudam na prevenção da rápida disseminação das estruturas do patógeno, promovendo atraso na germinação dos esporos e desenvolvimento das hifas, no caso de fungos. Além do mais, serve para identificar a localização do fungo, permitindo assim, que outros sistemas de defesa entrem em ação.

A análise da curva de progresso da doença (Figura 1), comparando a evolução dos sintomas entre a cultivar de banana Maçã tradicional e o novo genótipo, evidencia a diferença de resistência existente entre ambas. O desenvolvimento da doença teve tendência linear para a cultivar tradicional

durante os 60 dias de análise. O aparecimento dos primeiros sintomas ocorreu aos 24 dias após a inoculação e atingiu valores máximos de agressividade ao final das análises. O novo genótipo permaneceu com poucos sintomas da doença. Os primeiros sinais do patógeno foram evidenciados somente a partir dos 42 dias após a inoculação e permaneceram com pouco desenvolvimento até o final do experimento. Tal comportamento evidencia resistência moderada desse novo genótipo ao Foc.

Figura 1 - Curva de Progresso da Doença causada pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* no período de 60 dias em cultivares de bananeira Maçã tradicional e novo genótipo de bananeira Maçã.



Em trabalhos de avaliação de genótipos para resistência ao Foc, cultivares de bananeira diploides e tetraploides apresentaram resistência ao mal-do-Panamá, quando comparados a cultivar tradicional de bananeira Maçã, evidenciando a alta suscetibilidade desta com relação as demais variedades (MATOS et al., 2011).



A área abaixo da curva da doença (AACPD) (Tabela 6) reforça os dados apresentados pela Curva de Progresso da Doença. A análise mostra que as cultivares tradicionais de bananeira Maçã possuem elevada suscetibilidade ao mal-do-Panamá. A área de desenvolvimento da curva no novo genótipo não se diferenciou das demais cultivares que apresentam diferentes níveis de resistência, sugerindo assim, que a nova cultivar apresenta comportamento semelhante às cultivares resistentes e moderadamente suscetíveis.

Tabela 6 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) a partir dos dados de severidade na parte aérea.

<b>Cultivar</b>	<b>AACPD</b>
Maçã Tradicional	149,25 b*
Novo genótipo	73,50 a
Platina	60,00 a
Prata Gorotuba	60,00 a
Prata	60,75 a
PA 94-01	60,00 a
Grande Naine	60,00 a

\* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5%; CV (%) = 11,23

Devido a grande aceitação da banana Maçã no mercado e a alta suscetibilidade dessa cultivar ao mal-do-Panamá, estudos vem sendo conduzidos com o intuito de encontrar tratamentos que possam induzir a resistência das plantas ou diminuir a incidência do patógeno. Um exemplo é o uso de fungos micorrízias arbusculares, que podem ajudar na redução da doença em cultivares de bananeira Maçã, devido a competição por sítios de colonização, por ação de mecanismos de antagonismo entre os micro-organismos, ou pelo uso de indutores de resistência como o ácido DL-b-amino-n-butírico (BABA) (QUERINO et al., 2005; BORGES et al., 2007; WEBER et al., 2007).

Em vista disso, o novo genótipo de bananeira Maçã apresenta características de sabor e aceitação no mercado, semelhantes a bananeira Maçã tradicional. Trabalhos têm sido conduzidos com a finalidade de avaliar

diferentes genótipos de bananeiras observando-se a resistência ao mal-do-Panamá, visando encontrar cultivares que conciliem a resistência com outras características de interesse (SILVA et al., 2011). Os autores observaram ampla variação entre a suscetibilidade e resistência das cultivares estudadas, o que sugere uma grande diversidade genética entre as variedades utilizadas comercialmente. Tal fato vai de encontro com os resultados observados no presente trabalho, sugerindo a utilização do novo genótipo para cultivo e estudos em programas de melhoramento visando resistência ao patógeno Foc.

#### **4 CONCLUSÃO**

O novo genótipo comporta-se como moderadamente resistente ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

#### **5 AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à FAPEMIG, CAPES e CNPQ pela concessão de auxílio financeiro e bolsa de estudos. À EMATER de Goiás pelo material cedido para a realização do presente estudo, e ao LME por ter cedido os equipamentos para realização das análises.



## REFERÊNCIAS

BORGES, A. J. S.; TRINDADE, A. V.; MATOS, A. P.; PEIXOTO, M. F. S. Redução do mal-do-Panamá em bananeira-maçã por inoculação de fungo micorrízico arbuscular, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 1, p. 35-47, 2007.

CORDEIRO, Z. J. M.; KIMATI, H. **Doenças da bananeira**. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1997. v. 2. p 113-135.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, **Dados de produção de banana no Brasil**, 2014.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FIORAVAÇO, J. C. Mercado mundial da banana: Produção, comércio e participação brasileira. **Informações econômica**, São Paulo, SP, v. 33, n. 10, p. 15, 2003.

MATOS, A. P.; CORDEIRO, Z. J. M.; SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; FERREIRA, D. M. V. Reaction of diploid (AA) and Tetraploid (AAAB) banana hybrids to Fusarium wilt under field conditions. **Acta Hort.**, v. 897, p. 387-390, 2011.

MOHAMED, A. A.; MAK, C.; LIEW, K. W.; HO, Y. W. **Early evaluation of banana planta at nursery stage for Fusarium wilt tolerance**. In: Molina, A. B.; MASDEK, N.K.; LIEW, K.W. Banana Fusarium wilt management: towards sustainable cultivation. Geting Highlands Resort Malasia. Proc. Int. Workshop of the Banana Fusarium wilt disease, 1999.

QUERINO, C. M. B.; LARANJEIRA, D.; COELHO, R. S. B.; MATOS, A. P. Efeito de dois indutores de resistência sobre a severidade do Mal-do-Panamá, **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 239-243, 2005.

SILVA, S. O.; ALVES, E. J.; LIMA, M. B.; SILVEIRA, J. R. S. Bananeira. In: BRUCKNER, C. H. **Melhoramento de fruteiras tropicais**, Viçosa, MG, 2002.

SILVA, S. O.; MATOS, A. P.; CORDEIRO, Z. J. M.; LIMA, M. J. C.; AMORIM, E. P. Avaliação de genótipos tetraploides de bananeira cultivados em área infestada pelo agente causal do mal-do-panamá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 33, n. 1, p. 137-143, 2011.

SUTHERLAND, R.; VILJOEN, A.; MYBURG, A. A.; VAN DEN BERG, N. Pathogenicity associated genes. In: *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4, South. **African Journal of Science**, v. 109, n. 5-6, p. 1-10, 2013.

VANDERMOLEN, G. E.; BECKMAN, C. H.; RODEHORST, R. Vascular gelation: a general response phenomenon following infection. **Physiological Plant Pathology**, v. 11, n. 1, p. 95, 1977.

VANDERMOLEN, G. E.; BECKMAN, C. H.; RODEHORST, R. The ultrastructure of tylose formation in resistant banana following inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. **Physiological and molecular Plant Pathology**, v. 31, n. 2, p. 185-200, 1987.

WEBER, O. B.; MUNIZ, C. R.; VITOR, A. O.; FREIRE, F. C. O., OLIVEIRA, V. M. Interaction of endophytic diazotrophic bacteria and *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* on plantlets of banana “Maça”, **Plant and Soil**, v. 298, n. 1-2, p. 47-56, 2007.