

ALESSANDRO DOS SANTOS

**PLANTAS DANINHAS E PLANTAS CULTIVADAS COMO POSSÍVEIS
HOSPEDEIRAS DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense***

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

Orientador: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2020

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

T

S237p
2020 Santos, Alessandro dos, 1995-
Plantas daninhas e plantas cultivadas como possíveis
hospedeiras de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* / Alessandro
dos Santos. – Viçosa, MG, 2020.
43 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 37-43.

1. Banana - Doenças e pragas. 2. Mal-do-Panamá.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.
II. Título.

CDD 22. ed. 634.77294

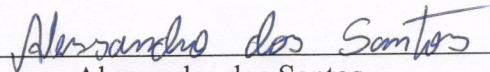
ALESSANDRO DOS SANTOS

**PLANTAS DANINHAS E PLANTAS CULTIVADAS COMO POSSÍVEIS
HOSPEDEIRAS DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense***

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

APROVADA: 20 de fevereiro de 2020.

Assentimento:



Alessandro dos Santos

Autor



Eduardo Seiti Gomide Mizubuti

Orientador

*Dedico este trabalho aos meus queridos
pais, por sempre me incentivarem a ir em
busca de novos caminhos e novos
conhecimentos.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela disponibilidade da estrutura e oportunidade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro;

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, por todos os conhecimentos compartilhados;

Ao meu orientador, o professor Eduardo Mizubuti, por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho, e por todos os ensinamentos e paciência durante todo o processo de execução;

Aos integrantes do laboratório de Biologia de Populações de Fitopatógenos (BioPop), por todos os aprendizados e momentos de descontração compartilhados durante estes dois anos. Em especial aos integrantes do patossistema Foc (Mariela, Izabel, Gabriel, Livia e Daniel), por toda a ajuda prestada;

Aos meus queridos amigos do Departamento de Fitopatologia, por terem me acolhido tão bem nesta cidade e no curso, em especial Adryelle, Joicy, Victória, Amarildo, Izabel, Hiago e Isadora, tornando esses dois anos ainda mais especiais.

Aos professores do Departamento de Fitotecnia, por nos fornecer todo um suporte para identificação das espécies de daninhas, assim como também as sementes de espécies cultivadas para execução deste trabalho;

Aos técnicos de laboratório do BioPop, por todos os serviços prestados e toda a ajuda no decorrer destes dois anos;

Aos meus amigos Francis e David, por me acolherem em Viçosa nos meus primeiros dias na cidade e pelos conselhos;

Ao meu amigo Thyago Rodrigues, por me incentivar a entrar na pós-graduação e por toda a ajuda e conselhos prestados;

Aos meus familiares mais próximos, que sempre me apoiaram e me dão forças para seguir em frente;

À Dr^a Camila Ferro e à Prof^a Thaís Santiago, pelas contribuições durante a defesa e a todos que de alguma forma tenham contribuído para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Alessandro dos Santos, nascido em 22 de julho de 1995 no pequeno e pacato município de Capoeiras, no interior do estado de Pernambuco. Filho de Luzia Leopoldina dos Santos e Aparecido Manuel dos Santos. Viveu toda sua infância e adolescência com seus pais na Zona Rural. Sempre estudou em escolas e colégios públicos, onde concluiu o ensino fundamental e médio, finalizando em dezembro de 2012.

Em março de 2013, iniciou o curso de graduação em Engenharia Agrônoma na Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns - UFRPE - UAG (Atual, Universidade Federal do Agreste de Pernambuco - UFAPE) no município de Garanhuns - PE. Durante o curso foi Bolsista de Iniciação Acadêmica (Bia), no Grupo de Pesquisas em Oleaginosas, onde acompanhou alguns trabalhos de pesquisa com soja (*Glycine max*), logo depois, foi bolsista de iniciação científica pelo CNPq (Pic/Pibic) por mais de dois anos seguidos, desenvolvendo trabalhos na área de fitotecnia com as culturas da soja e amendoim (*Arachis hypogaea*). Foi bolsista de extensão da UFRPE, onde trabalhou com a cultura do gergelim (*Sesamum indicum*). Realizou um estágio extracurricular na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, onde acompanhou alguns trabalhos na área de fitopatologia. E realizou seu estágio supervisionado obrigatório (ESO) em uma fazenda de grãos, no Sudeste do Pará, onde acompanhou a produção de soja. Formou-se em fevereiro de 2018.

Iniciou o curso de pós-graduação a nível de mestrado no programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa - UFV, no município de Viçosa - MG, em março de 2018. Onde desenvolveu trabalhos com o fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, no laboratório de Biologia de Populações de Fitopatógenos - BioPop. Defendeu em 20 de fevereiro de 2020.

RESUMO

SANTOS, Alessandro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Plantas daninhas e plantas cultivadas como possíveis hospedeiras de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense***. Orientador: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

A Murcha de Fusarium (MF) ou Mal-do-Panamá, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc), é uma das doenças mais destrutivas da bananeira. MF é de difícil manejo, e existem lacunas de conhecimento relacionadas à epidemiologia, que impedem a implantação de estratégias eficazes para o controle da doença. Uma dessas lacunas envolve as fases de sobrevivência e dispersão do patógeno. Portanto, o objetivo deste estudo foi identificar possíveis hospedeiros de Foc, com ênfase em plantas daninhas. Adicionalmente, a potencial gama de hospedeiros de Foc foi avaliada pelo método centrífugo-filogenético. As ervas daninhas foram coletadas em duas áreas de produção de banana em Teixeira - MG. No total, 124 plantas foram coletadas. Tentou-se o isolamento de Foc desses materiais e as colônias obtidas foram submetidas a uma pré-seleção morfológica, e posteriormente, a análises moleculares. Dois isolados morfológicamente semelhantes a Foc foram encontrados e inoculados em bananeiras para testar a patogenicidade. Das 35 espécies de plantas daninhas amostradas, foi possível isolar Foc apenas de *Commelina diffusa*. Os isolados desse hospedeiro foram confirmados como Foc por meio de PCR com primers específicos e testes de patogenicidade. Não foi possível identificar o grupo de compatibilidade vegetativa desses isolados. O patógeno foi isolado de 20 das 29 espécies testadas pelo método centrífugo-filogenético. *F. oxysporum* f.sp. *cubense* pode ser encontrado endofiticamente em plantas daninhas e outros hospedeiros comumente associados ou cultivados nas proximidades das plantações de banana. Foc pode ser patogênico para outras espécies de plantas. Para o manejo da MF deve ser considerado o potencial papel das plantas daninhas e outras plantas cultivadas como possíveis hospedeiras de Foc.

Palavras-chave: Banana. Centrífugo-filogenético. Mal-do-Panamá. Murcha-de-Fusarium.

ABSTRACT

SANTOS, Alessandro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Weeds and cultivated plants as possible alternative hosts of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*.** Adviser: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

Fusarium wilt (FW) or Panama disease, caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc), is one of the most destructive diseases of banana crops. Fusarium wilt is difficult to manage and there are knowledge gaps related to the epidemiology of FW that prevent the deployment of effective strategies to control the disease. One such gap involves the survival and dispersal stages of the life cycle of the pathogen. The objective of this study was to identify possible hosts of Foc, with focus on weeds. Additionally, the potential range of hosts of Foc was evaluated using the centrifugal-phylogenetic method. Weeds were collected from two banana production areas in Teixeiras - MG, the colonies obtained from the isolation of these materials underwent a morphological screening and then subjected to molecular analysis. Positive isolates were inoculated in banana plants to test its pathogenicity. A total of 29 additional plant species were tested using the centrifugal-phylogenetic method. Plants were inoculated with three Foc isolates. From the 35 species of weeds sampled, it was possible to isolate Foc from *Commelina diffusa*. Foc isolates from this host were confirmed by means of PCR with specific primers and pathogenicity tests. It was not possible to identify the vegetative compatibility group of these isolates. The pathogen was isolated from 20 of the 29 species tested by the centrifugal-phylogenetic method. *F. oxysporum* f.sp. *cubense* can be found endophytically in weeds and other hosts commonly found associated with or grown nearby banana plantations. Foc can be pathogenic to other plant species. Management of FW should consider the potential role played by plants that can harbor Foc.

Keywords: Banana. Centrifugal-phylogenetic. Panama disease. Fusarium wilt.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1 Coleta das plantas daninhas	14
2.2 Isolamento	14
2.3 Pré-seleção de colônias	15
2.4 Preservação	15
2.5 Extração de DNA e PCR	15
2.6 Teste de patogenicidade	16
2.6.1 Inoculação	17
2.6.2 Re-isolamento dos fungos	18
2.7 Determinação dos Grupos de Compatibilidade Vegetativa (VCG)	18
2.8 Sequenciamento e análises filogenéticas	19
2.9 Potencial gama de hospedeiros usando o método centrífugo-filogenético	20
3 RESULTADOS	24
3.1 Coleta de plantas daninhas	24
3.2 Isolamento e pré-seleção de colônias	25
3.3 Análise molecular	25
3.4 Teste de patogenicidade	26
3.5 Determinação dos Grupos de Compatibilidade Vegetativa (VCG)	27
3.6 Sequenciamento e filogenia dos isolados positivos	27
3.7 Potencial gama de hospedeiros usando o método centrífugo-filogenético	28
4 DISCUSSÃO	31
5 CONCLUSÕES	36
6 REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a banana é uma das frutas mais consumidas no mundo. Segundo a FAO (2020), a estimativa de exportação mundial da fruta para o ano de 2019 foi de 20,2 milhões de toneladas, sendo a América Latina e Caribe responsáveis por aproximadamente 74% destas exportações. Apesar de ser o 4º maior produtor mundial, o Brasil não se destaca na exportação. Das mais de 7,1 milhões de toneladas produzidas em 2019, foram exportadas apenas 80 mil toneladas, pois grande parte da produção é destinada ao mercado interno (CONAB, 2020; FAO, 2020; IBGE, 2020).

Dentre os fatores que podem afetar a produção de banana, estão os fitossanitários, como pragas e doenças. Uma das principais doenças que acomete a bananicultura é a Murcha de Fusarium (MF) ou Mal-do-Panamá, levando a grandes perdas na produtividade e qualidade da fruta (PÉREZ-VICENTE; DITA; MARTINEZ-DE LA PARTE, 2014). As plantas infectadas por esta doença apresentam sintomas como descoloração acastanhada ou avermelhada dos vasos do xilema (PÉREZ-VICENTE, 2004; STOVER, 1962), amarelecimento das folhas, iniciando pelas bordas das folhas mais velhas, e nas folhas mais jovens pode haver deformações e redução do limbo (STOVER, 1962). Além destes sintomas, rachaduras no pseudocaule e a quebra do pecíolo podem ocorrer, fazendo com que as folhas fiquem paralelas ao pseudocaule, deixando a planta com aparência de “guarda-chuva fechado” (PÉREZ-VICENTE, 2004; STOVER, 1962). Bananeiras infectadas geralmente não produzem cachos e quando acontece, somente alguns frutos se desenvolvem e apresentam tamanho reduzido, os frutos amadurecem irregularmente e a polpa é dura e ácida (THANGAVELU; MUSTAFF, 2012).

A MF foi primeiramente relatada na Austrália em 1876 por Bancroft (1876, *apud* DITA *et al.*, 2018). Com o passar do tempo, foi disseminada para outros países, sendo posteriormente considerada uma das doenças mais destrutivas da cultura da banana (DITA *et al.*, 2018; STOVER, 1962). Em 1890, foi relatada na América Central por Ashby, (1913, *apud* PÉREZ-VICENTE; DITA; MARTINEZ-DE LA PARTE, 2014), quando causou epidemia severa em plantações de banana com as cultivares do tipo Gros Michel (AAA). Estas cultivares são suscetíveis à MF e as plantações foram dizimadas, sendo necessário a substituição por cultivares do tipo Cavendish (AAA), que são resistentes à raça 1 do patógeno

(PLOETZ, 2006; STOVER, 1962). Segundo Su, Hwang e Ko (1986), as perdas na América Central e do Sul chegaram a aproximadamente 40.000 ha em 50 anos. No Brasil, o primeiro relato da doença foi em Piracicaba, no estado de São Paulo, em 1930. Nesta região, em grande parte das áreas se encontravam bananeiras das cultivares ‘Prata’ e ‘Maçã’, o que fez com que fossem perdidos cerca de um milhão de plantas em apenas quatro anos (BERGAMIN FILHO; AMORIM; REZENDE, 2011).

A MF da banana é causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc) [(E.F. Smith) W.C. Snyder e H.N. Hansen)], Ascomiceto habitante do solo e amplamente distribuído em várias regiões (SNYDER; HANSEN, 1940; LESLIE; SUMMERELL, 2006). As espécies que compõem o complexo *Fusarium oxysporum* são assexuadas, podendo ser saprófitas, antagonistas ou patógenos de plantas, animais ou humanos (PIETRO *et al.*, 2003; LESLIE; SUMMERELL, 2006). As espécies que afetam plantas foram divididas em diferentes *formae speciales* (f.sp.) de acordo com a especialização da patogenicidade a gêneros e famílias de plantas (SNYDER; HANSEN, 1940). Cada *forma specialis* afeta um único hospedeiro ou um conjunto de espécies estreitamente relacionados (PLOETZ, 2006a). São conhecidas mais de 150 *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* (BAAYEN *et al.*, 2000).

Fusarium oxysporum f.sp. *cubense* é dividido em três raças distintas, que são definidas de acordo com as variedades de banana que afetam (PLOETZ, 2006a). A raça 1 (R1) afeta variedades do tipo ‘Gros Michel’ (AAA), ‘Maçã’ (AAB), ‘Prata’ (AAB), ‘Maqueño’ (AAB) e ‘Pisang Awak’ (ABB). A raça 2 (R2) é patogênica a bananas do tipo Bluggoe (ABB) e a raça 4 (R4) afeta todas as cultivares atacadas pelas R1 e R2, e adicionalmente, as do tipo Cavendish (AAA) (STOVER; WAITE, 1960; SU; HWANG; KO, 1986). A R4 é dividida em subtropical (R4S) e tropical (R4T). A R4S afeta cultivares do subgrupo Cavendish em regiões subtropicais, enquanto a R4T é patogênica para Cavendish em regiões subtropicais assim como nas tropicais (BUDDENHAGEN, 2009). A raça 3 foi relatada por Waite (1963, *apud* PLOETZ, 2006a) como uma variante de Foc que pode afetar espécies de helicônia. Contudo, após estudos complementares, verificou-se não se tratar de Foc, mas de uma espécie distinta (PLOETZ, 2006b).

Foc também é dividido em oito linhagens filogenéticas. Essas linhagens estão distribuídas em dois clados, A e B, sendo as linhagens I, II, III, IV e V pertencentes ao clado

A, e as linhagens VI, VII e VIII ao clado B (FOURIE *et al.*, 2009). Recentemente, estudos desenvolvidos por Maryani *et al.*, (2019) propuseram a reclassificação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, originando 11 novas espécies, distribuídas em nove linhagens distintas para Foc e a criação de um novo clado no complexo de espécies *Fusarium oxysporum* (FOSC).

A morfologia de Foc se caracteriza por apresentar microconídios com tamanho de 5 - 16 x 2,4 - 3,5 µm, com uma ou duas células, formato oval ou reniforme, formando falsas cabeças. Os macroconídios medem 27 - 55 x 3,3 - 5,5 µm, possuem de quatro a oito células e aparência de foice com células basais em formato de pé. Os clamidósporos têm 7 - 11 µm de diâmetro, geralmente globosos e são formados isoladamente ou em pares, intercaladamente ou nas terminações das hifas (PLOETZ, 2000; LESLIE; SUMMERELL, 2006; PÉREZ-VICENTE; DITA; MARTINEZ-DE LA PARTE, 2014).

Por ser um patógeno de solo, a dispersão de Foc é limitada. A sua dispersão a longas distâncias depende de fatores antropogênicos, enquanto que a curtas distâncias, fatores naturais, como a água, movimento de animais e o movimento de partículas de solo com propágulos do patógeno também podem auxiliar no transporte do fungo, em adição às ações mediadas pelo homem (DITA *et al.*, 2018). O patógeno reconhece exsudados ou entra em contato direto com a raiz da planta suscetível para iniciar a penetração (STOVER, 1962; LI *et al.*, 2011), principalmente pelas raízes secundárias e terciárias sendo mais raramente pelas raízes principais ou diretamente no rizoma, a menos que haja um ferimento que facilite a entrada (LI *et al.*, 2011; PÉREZ-VICENTE; DITA; MARTINEZ-DE LA PARTE, 2014). O micélio adentra a epiderme e se move de maneira intracelular através do córtex até chegar ao xilema, onde produz estruturas reprodutivas e toxinas que se espalham para o restante da planta (PÉREZ-VICENTE; DITA; MARTINEZ-DE LA PARTE, 2014).

Fusarium oxysporum f.sp. *cubense* tem a capacidade de sobreviver por muitos anos, por meio dos clamidósporos e/ou associados a plantas daninhas (PÉREZ-VICENTE; DITA; MARTINEZ-DE LA PARTE, 2014). Segundo Stover (1972, *apud* PÉREZ-VICENTE; DITA; MARTINEZ-DE LA PARTE, 2014), os clamidósporos podem ficar viáveis por mais de 20 anos no solo, até encontrar novamente uma planta suscetível. Além da sobrevivência por meio de estruturas de resistência, Foc tem sido isolado a partir de plantas daninhas e hospedeiros

alternativos, sem que manifestem sintomas aparentes. Waite e Dunlap (1953), relataram na América Central a presença de Foc em *Paspalum fasciculatum*, *Panicum purpurascens*, *Ixophorus unisetus* e *Commelina diffusa*. Na Austrália foi relatada a presença de Foc em *Paspalum* spp., *Amaranthus* spp., *Chloris inflata*, *Euphorbia heterophylla*, *Cyanthillium cinereum* e *Tridax procumbens* (PITTAWAY; NASIR; PEGG, 1999; HENNESSY *et al.*, 2005).

A MF é uma doença de difícil manejo, sendo a resistência genética o método mais eficaz. Porém, o sucesso alcançado com esta prática foi comprometido com o aparecimento da R4T (DITA *et al.*, 2018). Evitar a introdução do patógeno em áreas indenes é de grande importância. Além do plantio de mudas certificadas, livres de Foc, não utilizar materiais e equipamentos vindos de áreas infestadas, a menos que sejam devidamente desinfestadas, são práticas que devem ser adotadas (PÉREZ-VICENTE, 2004). Apesar de várias medidas de erradicação já terem sido testadas, nenhuma conseguiu eliminar completamente o patógeno de uma área (DITA *et al.*, 2018).

Considerando que aproximadamente 74% das exportações de banana são oriundas da América Latina e Caribe (FAO, 2020), a introdução da R4T nesta região representa uma séria ameaça à economia de vários países. Infelizmente, em outubro de 2019, foi relatada a presença de R4T na Colômbia (GARCÍA-BASTIDAS *et al.*, 2019). Diversas ações foram implementadas visando à mitigação do risco associado à introdução ocorrida. Porém, deparou-se com importantes lacunas de conhecimento relativos à epidemiologia da MF que são cruciais para o desenvolvimento de estratégias de manejo efetivas.

A presença de Foc em plantas daninhas e hospedeiros alternativos implica diretamente no manejo da doença. Melhor conhecimento sobre este tópico permitirá a escolha de plantas para fazer consórcio, assim como para a rotação de cultura, além dos cuidados no manejo de plantas daninhas. Apesar de já terem estudos relatando a presença de Foc em plantas daninhas e hospedeiros alternativos, pouco se conhece sobre a possibilidade de indivíduos obtidos destes hospedeiros serem patogênicos a banana. No Brasil, nenhum estudo foi conduzido até o momento para avaliar quais espécies de plantas daninhas poderiam atuar como potenciais hospedeiras de Foc. O objetivo deste trabalho foi identificar possíveis hospedeiros de Foc fazendo o isolamento a partir de plantas daninhas presentes em áreas infestadas pelo

patógeno. Adicionalmente, avaliou-se a potencial gama de hospedeiros de Foc utilizando a abordagem do método centrífugo-filogenético de Wapshere (1974), em que foram selecionadas espécies relacionadas filogeneticamente com banana e alguns outros critérios como plantas usadas em consórcio, adubação verde ou que normalmente são cultivadas próximas a plantios de banana.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta das plantas daninhas

Dois campos de produção de banana localizados no município de Teixeira – MG, foram usados para a coleta das plantas daninhas: 1. Campo de banana da cultivar 'Prata', -20.63849° S e -42.83385° W, de aproximadamente 4,8 ha, contendo 3200 plantas, e 2. Campo de banana 'Maçã', -20.630674° S e -42.826468° W, de aproximadamente 0.50 ha, com 398 plantas. Nos dois campos havia relatos de ocorrência de MF em plantios antigos de bananeiras. O campo 1 foi implantado com mudas obtidas e formadas na propriedade. No campo 2 utilizaram-se mudas de bananeira micropropagadas da empresa MultiPlanta.

A coleta das plantas daninhas seguiu metodologia adaptada de Hennessy *et al.*, (2005). Resumidamente, foi realizado o levantamento das plantas invasoras que estavam crescendo em um raio de 1 metro das touceiras de banana infectadas. As plantas daninhas tiveram as raízes e a parte basal do caule cortadas para inspeção visual. Tanto a parte aérea quanto o sistema radicular foram colocados em sacos plásticos individuais, identificados, acondicionados em uma caixa de isopor e levadas para o laboratório. As espécies coletadas foram identificadas seguindo critérios morfológicos (KISSMANN, 1997; KISSMANN; GROTH, 1999; KISSMANN; GROTH, 2000; LORENZI, 2006; LORENZI, 2008; MOREIRA; BRAGANÇA, 2011).

2.2 Isolamento

Para o isolamento, as raízes foram primeiramente lavadas individualmente em água corrente para retirar as partículas de solo aderidas, e então cortadas em pequenos fragmentos de aproximadamente 5 mm. Os fragmentos foram desinfestados superficialmente com etanol 70% por 30 s, hipoclorito de sódio a 2% por 2 a 3 min e logo depois enxaguadas em água destilada esterilizada por 1 min (ALTINOK, 2013)

Os fragmentos de raízes foram colocados em placas de Petri (90 mm) contendo meio de cultura semi-seletivo para Foc, Komada (KOMADA, 1975; LESLIE; SUMMERELL, 2006), sendo distribuídos 5 fragmentos de raiz por placa e então acondicionadas em incubadora do tipo B.O.D. a 25 °C no escuro, até o crescimento das colônias. Nos casos em que houve o crescimento fúngico, as colônias foram repicadas para placas de Petri de 35 mm

contendo meio ágar-água, e então obtidas culturas puras, por meio do método de ponta de hifa (LESLIE; SUMMERELL, 2006). As colônias formadas foram observadas sob microscópio estereoscópico (OLYMPUS SZ61), para localizar uma única hifa individualizada na margem da colônia, a extremidade da hifa foi recortada com o auxílio de um bisturi, retirada com o auxílio de uma alça micológica e transferida para outra placa contendo meio de cultura BDA (200 g de batata, 20 g de dextrose, 20 g de ágar e 1.000 mL de água destilada).

2.3 Pré-seleção de colônias

Foi realizada a identificação morfológica para pré-seleção das colônias, antes de realizar as análises moleculares. Foram observadas as seguintes características: coloração da colônia crescida em meio de cultura BDA, formatos de macro e microconídios, presença de monofálides curtas e produção de clamidósporos (LESLIE; SUMMERELL, 2006). As colônias foram crescidas por 7 - 10 dias em meio BDA. Observou-se a coloração da parte inferior da placa e lâminas foram preparadas para examinar as estruturas fúngicas ao microscópio óptico (OLYMPUS CX31, 400X).

2.4 Preservação

Os isolados que apresentaram características morfológicas de Foc foram repicados para placas de Petri de 35 mm, contendo meio de cultura SNA (Spezieller Nährstoffarmer agar) (LESLIE; SUMMERELL, 2006; NIRENBERG, 1976). Com o crescimento das colônias, foram retirados discos de micélio de aproximadamente 5 mm de diâmetro, colocados em microtubos e armazenados em geladeira.

2.5 Extração de DNA e PCR

Para produção de micélio, os isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio BDA e crescidos por 8 dias a 25 °C em incubadora do tipo B.O.D. Após a incubação, o micélio foi raspado com o auxílio de palitos de dente esterilizados e deixado secar em papel filtro esterilizado, por 24 h. O micélio seco foi colocado em envelopes de papel alumínio e armazenado a -20 °C.

A extração de DNA foi realizada com o Wizard® Genomic DNA Purification kit (PROMEGA CORPORATION), seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, a qualidade do DNA e possível degradação foram avaliadas por meio de eletroforese em gel

de agarose a 1%. A concentração e pureza do DNA foram estimadas com o auxílio do espectrofotômetro NanoDrop 2000 (THERMO SCIENTIFIC). A concentração foi ajustada para aproximadamente $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, para ser usado como solução de trabalho. Aliquotas com concentração padronizadas foram armazenadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Foram realizadas PCR's utilizando os primers Six1-2 (Tabela 1), desenvolvidos por Heck e Mizubuti (Dados não publicados), que são específicos para detecção de Foc. A reação foi feita com um volume total de $12,5 \mu\text{L}$, sendo $2,5 \mu\text{L}$ de tampão, $0,25 \mu\text{L}$ de dNTP, $0,15 \mu\text{L}$ de cada primer, $0,05 \mu\text{L}$ de Kapa polimerase (KAPA BIOSYSTEMS), $2,0 \mu\text{L}$ de DNA e $7,4 \mu\text{L}$ de água MilliQ esterilizada. As condições para PCR foram: 1 ciclo de $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min, 34 ciclos de $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 s, $63 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 s e um ciclo final de $72 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min, a reação foi realizada em um termociclador T-100 Thermal Cycler (BIO-RAD). Para visualização, foi feita eletroforese com gel de 1,2 % de agarose e o resultado foi observado em um fotodocumentador L-PIX EX (LOCCUS).

Tabela 1. Primers usados para PCR e sequenciamento.

ID	Produto genético	Tamanho (pb)	Primer		Referência
			Designação	Sequência (3' - 5')	
<i>Six1-2</i>		122	Six1-2F		Heck & Mizubuti Dados não publicados
			Six1-2R		
<i>EF-1α</i>	Translation elongation factor 1 α	639-683	EF1	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	O'Donnell <i>et al.</i> , (1998)
			EF2	GGARGTACCAGTSATCATG	
<i>Rpb1</i>	RNA polymerase largest subunit	1.607	Fa	CAYAARGARTCYATGATGGGWC	Hofstetter <i>et al.</i> , (2007)
			G2R	GTCATYTGDTGCDGGYTCDC	O'Donnell <i>et al.</i> , (2010)
<i>Rpb2</i>	RNA polymerase second largest subunit	1.700-1.742	5f2	GGGGWGAYCAGAAGAAGGC	Reeb <i>et al.</i> , (2004)
			7cr	CCCATRGCTTGYTTRCCCAT	Liu <i>et al.</i> , (1999)

2.6 Teste de patogenicidade

Dois ensaios foram conduzidos em casa de vegetação. Os ensaios foram montados em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Um vaso contendo uma planta da cultivar 'Maçã' foi considerado uma unidade experimental. A primeira execução do experimento transcorreu entre 07 de setembro a 25 de outubro de 2019. A segunda execução foi realizada entre 02 de novembro a 20 de dezembro de 2019.

Foram usados neste ensaio dois isolados, Weed 13 e Weed 21, que foram positivos após PCR com os primers Six1-2. Adicionalmente, outros 8 isolados negativos com os primers Six1-2, foram selecionados aleatoriamente (Weed 01, Weed 07, Weed 33, Weed 55, Weed 58, Weed 64, Weed 84 e Weed 95). O isolado Foc 217, padrão para testes de patogenicidade no Laboratório de Biologia de Populações de Fitopatógenos da UFV, foi usado como controle positivo. Plantas cujas raízes foram imersas em água destilada esterilizada foram usadas como controle negativo.

Os isolados foram repicados para placas de Petri (90 mm) contendo meio BDA, acondicionados em incubadora do tipo B.O.D. a 25 °C durante 7 dias, sendo feito uma duplicata por isolado. Após o crescimento das colônias, estas foram lavadas com água destilada esterilizada e coletaram-se macro e microconídios. Logo após a lavagem e preparo da suspensão, foi feita a contagem em câmara de Neubauer e a suspensão foi ajustada para concentração de 10^6 microconídios mL^{-1} com auxílio de um hemacitômetro (PÉREZ-VICENTE; DITA; MARTINEZ-DE LA PARTE, 2014).

2.6.1 Inoculação

Foram usadas mudas micropropagadas certificadas de banana 'Maçã', com 10 a 15 cm de altura (Multiplanta, Andradas - MG). Mudas crescidas em substrato agrícola foram plantadas em vasos contendo 0,5 L de substrato Horta-2 (MecPlant) e mantidas em casa de vegetação por 24 dias. A inoculação se deu conforme metodologia descrita anteriormente (PÉREZ-VICENTE; DITA; MARTINEZ-DE LA PARTE, 2014). Brevemente, removeu-se o substrato presente nas raízes por meio da lavagem em água de torneira. O excesso de raízes foi cortado e padronizado. As raízes foram imersas em suspensão a 10^6 microconídios mL^{-1} durante 60 min. Decorrido este tempo, as mudas foram plantadas em sistema de duplo vaso, contendo substrato esterilizado (PÉREZ-VICENTE; DITA; MARTINEZ-DE LA PARTE, 2014).

Para avaliação das plantas inoculadas, utilizou-se escala diagramática de notas de 1 a 5 (PÉREZ-VICENTE; DITA; MARTÍNEZ-DE LA PARTE, 2014): Para os sintomas externos, a nota 1 corresponde a plantas sem sintomas, 2 - para amarelecimento inicial, principalmente nas folhas mais baixas, 3 - amarelecimento de todas as folhas baixas com início de descoloração das folhas mais jovens, 4 - todas as folhas com intenso amarelecimento

e 5 - planta morta. Para os sintomas internos, 1 - sem sintomas, 2 - descoloração inicial do rizoma, 3 - pequena descoloração em todo o sistema vascular, 4 - rizoma com a maioria dos tecidos internos com necrose, 5 - rizoma totalmente necrosado. As plantas foram avaliadas quanto aos sintomas externos a cada 8 dias por 7 semanas, e a avaliação dos sintomas internos do rizoma foi realizada no último dia de avaliação.

2.6.2 Re-isolamento dos fungos

Para o re-isolamento dos fungos, foi usada metodologia de Altinok (2013). Fragmentos de tecidos supostamente infectados foram colocados em placas de Petri contendo meio Galactose Nitrato Ágar, que é seletivo para *Fusarium oxysporum* (DHINGRA; SINCLAIR, 1985), e incubado a 25 °C no escuro por 7 dias. Para confirmar a identidade das colônias, estas foram submetidas a PCR com primers Six1-2 como descrito acima.

2.7 Determinação dos Grupos de Compatibilidade Vegetativa (VCG)

Primeiramente, discos de micélio em BDA dos isolados Weed 13 e Weed 21 com micélio denso, foram repicados para placas de Petri de 60 mm de diâmetro, contendo meio mínimo (MM) + cloreto de potássio ($1.5 \pm 4.0\%$ KClO_3) e mantidos em BOD a 25°C por aproximadamente 1 semana, para selecionar os mutantes não dependentes de nitrato (Nit mutantes / resistentes ao clorato) (LESLIE; SUMMERELL, 2006; PUHALLA, 1985).

Após uma semana, pontas de hifas de colônias com crescimento rápido, foram transferidas para placas contendo MM, que contém nitrato, para comprovação de mutantes Nit (PÉREZ-VICENTE; DITA; MARTINEZ-DE LA PARTE, 2014; PUHALLA, 1985). As colônias que apresentaram crescimento ralo e espaçado foram consideradas mutantes Nit, pois demonstravam características de deficiência de nitrogênio, ou seja, não eram capazes de sintetizar o nitrato, além de terem crescido em meio clorato (PUHALLA, 1985). Foram gerados de três a cinco mutantes para cada isolado, para posteriormente serem pareados.

Para determinar o fenótipo dos mutantes gerados, foram transferidos discos de micélio dos mutantes Nit para diferentes meios de cultura, para então serem classificados em Nit 1, Nit 3 ou Nit M, de acordo com seu crescimento, seja ele denso ou ralo (PÉREZ-VICENTE; DITA; MARTINEZ-DE LA PARTE, 2014; CORRELL *et al.*, 1987). Os meios de cultura usados foram o meio nitrato (MM + NaNO_3 (2 g/L)), meio nitrito (MM + NaNO_2 (0.5 g/L)),

meio hipoxantina (MM + hipoxantina (0.2 g/L)) e meio amônio (MM + tartarato de amônio (1.6 g/L)) (PÉREZ-VICENTE; DITA; MARTINEZ-DE LA PARTE, 2014; CORRELL *et al.*, 1987).

O pareamento para determinação dos VCG's, foi feito com 17 testadores presentes na coleção do laboratório BioPop UFV: 0120, 0121, 0122, 0123, 0124, 0125, 0126, 0128, 0129, 01210, 01211, 01212, 01214, 01215, 01219, 01220 e 01222. Os pareamentos foram realizados em placas de Petri contendo meio nitrato, mantidas a 25°C e observado possível formação de heterocário a cada dois dias (PÉREZ-VICENTE; DITA; MARTINEZ-DE LA PARTE, 2014; LESLIE; SUMMERELL, 2006; CORRELL *et al.*, 1987).

2.8 Sequenciamento e análises filogenéticas

Os isolados de plantas daninhas, Weed 13 e Weed 21, e mais dois isolados da coleção de Foc do BioPop UFV (UFV-Foc 217 e UFV-Foc 581) foram submetidos ao sequenciamento e posterior análise filogenética. Sendo o UFV-Foc 581, isolado a partir de uma planta de banana de uma das áreas analisadas neste trabalho no município de Teixeira - MG (área de cultivar 'Prata').

Os isolados foram repicados em placas de Petri contendo meio BDA, crescidos por uma semana, a 25°C no escuro em incubadora do tipo B.O.D. Então, foram coletados os micélios de acordo com a metodologia descrita acima. Foram realizadas extrações de DNA utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification kit (PROMEGA CORPORATION), seguindo as recomendações do fabricante.

As sequências foram determinadas utilizando a maior subunidade da RNA polimerase II (*Rpb1*), com os primers RPB1-Fa e RPB1-G2R (O'DONNELL *et al.* 2010), a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*Rpb2*), usando os primers RPB2-5f2 e RPB2-7cr (O'DONNELL *et al.* 2010) e o fator de alongação 1-alfa (*EF-1 α*), usando os primers EF1 e EF2 (O'DONNELL *et al.* 1998) (Tabela 1). Os produtos das ampliações foram então purificados com o kit comercial ExoSAP-IT (USB), seguindo as recomendações do fabricante e enviadas para o sequenciamento (Macrogen Inc).

As sequências de DNA geradas com os primers *forward* e *reverse* foram usadas para obter sequências consenso usando MEGA v. 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). Um

conjunto de dados com sequências de isolados representativos de *Foc*, utilizando os primers *EF-1 α* , *Rpb1* e *Rpb2* usados em estudos anteriores (Tabela 2) (MARYANI *et al.*, 2019) foi preparado para fins de análises com isolados do presente trabalho. Os alinhamentos de múltiplas sequências foram gerados usando o MEGA v. 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). Realizaram-se análises de inferência bayesiana (IB) para os alinhamentos concatenados usando o CIPRES Science Gateway v. 3.3 (CIPRES, 2020). Utilizou-se o modelo de substituição de nucleotídeo GTR+I para as três regiões. *Fusarium fujikuroi* CBS 121864 foi utilizado como *outgroup*. A árvore foi editada no software Corel Draw®.

2.9 Potencial gama de hospedeiros usando o método centrífugo-filogenético

As plantas a serem testadas como hospedeiras foram selecionadas de acordo com o método centrífugo-filogenético (WAPSHERE, 1974), sendo escolhidas plantas representantes de espécies relacionadas filogeneticamente com a bananeira. Adicionalmente, plantas que podem ser usadas no sistema de consórcio ou de adubação verde na bananicultura foram incluídas no teste. No total, foram selecionadas 29 espécies a serem testadas. Dentre estas, três pertencem à família Musaceae e sete são de espécies filogeneticamente próximas ao gênero *Musa* (Tabela 3).

Para este ensaio foram usados três isolados da coleção BioPop de diferentes lugares e com características mais distintas, *Foc* 217 da Bahia, *Foc* 539 de Santa Catarina e *Foc* 581 de Minas Gerais. A suspensão de esporos foi preparada como descrito acima. Trinta e cinco placas de Petri de 90 mm de diâmetro foram preparadas para cada isolado. Dois litros de suspensão a 10^6 microconídios mL⁻¹ foram preparados a partir destes isolados. Posteriormente, as suspensões referentes aos três isolados foram misturadas em proporções iguais. A inoculação das plantas foi realizada como descrita anteriormente. As avaliações de sintomas externos foram feitas semanalmente. Ao final de sete semanas, foi avaliada a parte interna das plantas para observar possíveis descoloração do xilema.

Após a avaliação, as partes basais das plantas foram lavadas em água corrente e colocadas em sacos plásticos individuais e levadas para o laboratório. Com a mesma metodologia já citada anteriormente, foram realizados o re-isolamento do fungo, posteriormente, feito uma seleção de colônias de acordo com as características morfológicas e

Tabela 2. Isolados usados nas análises filogenéticas. (MARYANI *et al.*, 2019)

Nome da espécie	f. sp.	Número de acesso 1	Identificação 2	País	Hospedeiro	Acesso GenBank/ENA 3		
						Rpb1	Rpb2	EF-1a
<i>Fusarium cigenangense</i>	<i>cubense</i>	InaCC F983	L7	Indonésia	<i>Musa sp.</i> var. Pisang Kepok	LS479559	LS479307	LS479756
	<i>vasinfectum</i>	NRRL 25433	L7		<i>Gossypium sp.</i>	LS479462	LS479202	LS479648
<i>F. diospyratum</i>	<i>cubense</i>	InaCC F828	L5	Indonésia	<i>Musa sp.</i> var. Pisang Rastali	LS479520	LS479266	LS479715
	<i>cubense</i>	NRRL 36115	L5	Malásia	<i>M. acuminata</i> var. Pisang Ambon	LS479475	LS479218	LS479666
<i>F. grosnicheltii</i>	<i>cubense</i>	InaCC F832	L4	Indonésia	<i>Musa sp.</i> var. Pisang Awak	LS479542	LS479289	LS479738
	<i>cubense</i>	NRRL 36120	L4	Tailândia		LS479478	LS479222	LS479670
<i>F. odoratissimum</i>	<i>cubense</i>	FocII5-NRRL 54006	L1	Indonésia	<i>M. acuminata</i> var. Pisang Manurung	LS479459	LS479198	LS479644
	<i>cubense</i>	Phi2.6C	L1	Filipinas	<i>M. acuminata</i> var. GCTCV218	LS479480	LS479224	LS479672
	<i>cubense</i>	JV11	L1	Jordânia	<i>M. acuminata</i> var. Cavendish	LS479465	LS479205	LS479651
	<i>cubense</i>	NRRL 36102	L1	China	<i>M. acuminata</i> var. Cavendish	LS479468	LS479209	LS479655
<i>F. oxysporum</i>	<i>cubense</i>	FocCNPMF-R1	FOSC Clado 4	Brasil	<i>Musa sp.</i> var. Silk	LS479457	LS479196	LS479642
	<i>lycopersici</i>	NRRL 34936	FOSC Clado 3		<i>Solanum lycopersicum</i>	LS479460	LS479200	LS479646
	<i>melonis</i>	NRRL 26406	FOSC Clado 3		<i>Cucumis melo</i>	LS479461	LS479201	LS479647
<i>F. kalimantanense</i>		InaCC F917	FOSC Clado 5 Nov.	Indonésia	<i>M. acuminata</i> var. Pisang Ambon	LS479497	LS479241	LS479690
		InaCC F918	FOSC Clado 5 Nov.	Indonésia	<i>M. acuminata</i> var. Pisang Ambon	LS479242	LS479242	LS479691
		InaCC F922	FOSC Clado 5 Nov.	Indonésia	<i>M. acuminata</i> var. Pisang Ambon	LS479246	LS479246	LS479695
<i>F. phialophorum</i>	<i>cubense</i>	FocIndo25	L3	Indonésia	<i>M. acuminata</i> var. Pisang Ambon	LS479464	LS479204	LS479650
	<i>cubense</i>	FocST4.98	L3	Espanha	<i>M. acuminata</i> var. Dwarf Cavendish	LS479484	LS479227	LS479676
	<i>cubense</i>	InaCC F826	L3	Indonésia	<i>Musa sp.</i> var. Pisang Wak	LS479505	LS479251	LS479700
	<i>cubense</i>	NRRL 36109	L3	Austrália	<i>Musa sp.</i> var. SH 3142	LS479471	LS479214	LS479661
<i>F. purpurascens</i>	<i>cubense</i>	InaCC F914	L2	Indonésia	<i>Musa sp.</i> var. Pisang Kepok	LS479493	LS479237	LS479686
	<i>cubense</i>	InaCC F966	L2	Indonésia	<i>Musa sp.</i> var. Pisang Kepok	LS479539	LS479286	LS479735
	<i>cubense</i>	InaCC F967	L2	Indonésia	<i>Musa sp.</i> var. Pisang Kepok	LS479540	LS479287	LS479736
<i>F. sangayamense</i>	<i>cubense</i>	InaCC F960	FOSC Clado 5 Nov.	Indonésia	<i>Musa sp.</i> var. Pisang Kepok	LS479537	LS479283	LS479732
	<i>cubense</i>	InaCC F961	FOSC Clado 5 Nov.	Indonésia	<i>Musa sp.</i> var. Pisang Kepok	LS479284	LS479284	LS479733
<i>F. tarichlamydosporum</i>	<i>cubense</i>	FocCNPMF-R2	L6	Brasil	<i>Musa sp.</i> var. Monthan	LS479458	LS479197	LS479643
	<i>cubense</i>	InaCC F956	L6	Indonésia	<i>M. acuminata</i> var. Pisang Barangan	LS479532	LS479278	LS479727
	<i>cubense</i>	NRRL 36105	L6	Honduras	<i>Musa sp.</i> var. Bluggoe	LS479470	LS479211	LS479657

Tabela 2. (Continuação)

Nome da espécie	f. sp.	Número de acesso 1	Identificação 2	País	Hospedeiro	Acesso GenBank/ENA 3		
						Rpb1	Rpb2	EF-1a
<i>F. tardicrescens</i>	<i>cubense</i>	NRRL 36113	L9	Malawi	<i>Musa sp.</i> var. Harare	LS479474	LS479217	LS479665
	<i>pisi</i>	NRRL 37622	L9		<i>Cicer sp.</i>	LS479463	LS479203	LS479649
	<i>raphani</i>	NRRL 54005	L9		<i>Raphanus sp.</i>	LS479482	LS479226	LS479674
	<i>conglutinans</i>	NRRL 54008	L9		<i>Raphanus sp.</i>	LS479481	LS479225	LS479673
<i>F. figituroi</i>		CBS 121864					KU604258	KR071743

1 InaCC: Indonesian Culture Collection, Research Center for Biology, Indonesian Institute of Sciences (LIPI) Cibinong, Indonesia; ATCC: American Type Culture Collection, U.S.A.; CAV: Forestry Agricultural Biotechnology Institute (FABI), University of Pretoria South Africa; CBS: The Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands; Indo: Collection of N. Maryani at Wagenmgen Plant Research, Wageningen University, The Netherlands; NRRL: Agricultural Research Service Culture Collection, USA; UMAF: Microbiology and Plant Pathology Laboratory Collection, University of Malaga, Spain.

2 Foc linhagem / FOSC clado/ Complexo de espécies de *Fusarium* (FOSC).

3 *Rpb1*: Maior subunidade da RNA polimerase II; *Rpb2*: Segunda maior subunidade da RNA polimerase II; *EF-1a*: Fator de elongação 1-alfa.

então obtidas colônias puras destes isolados, logo depois foi feita extração de DNA e realizados testes de PCR com os primers específicos Six1-2 (Tabela 1), para comprovar a presença de Foc.

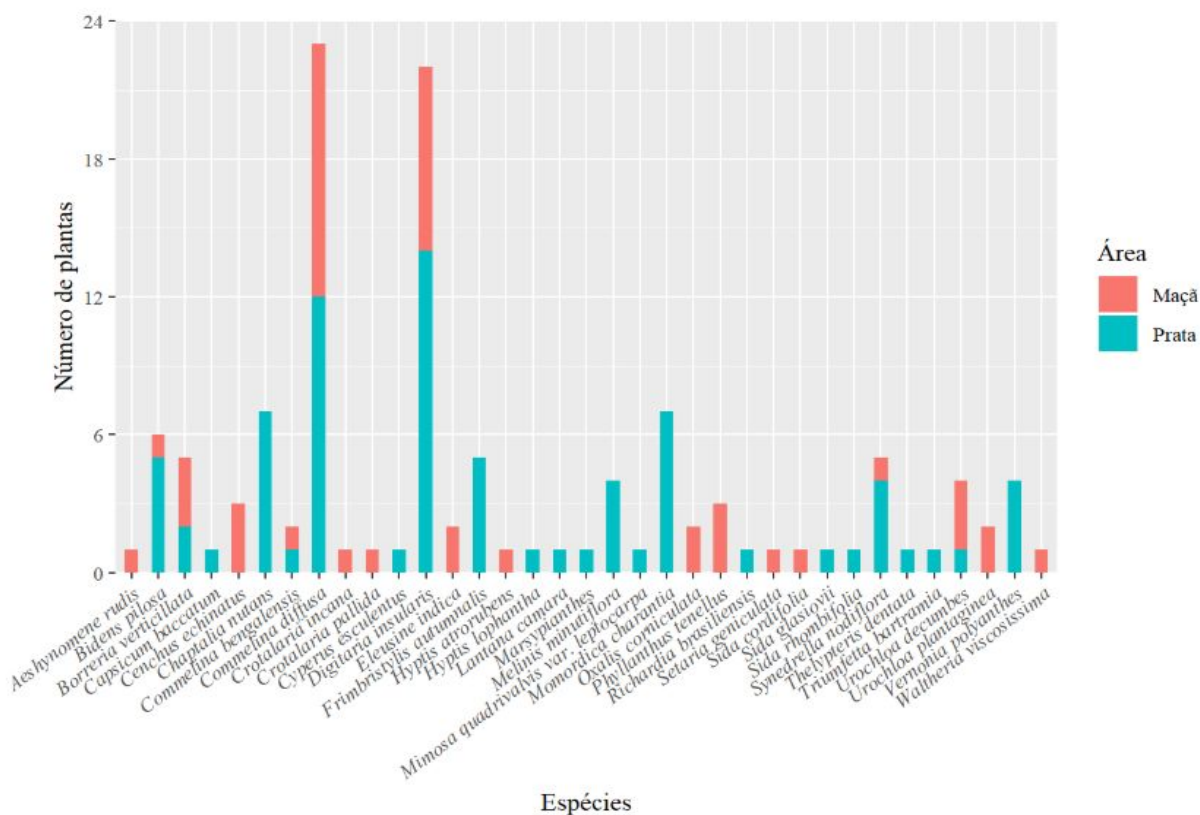
Os ensaios foram montados em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, para cada espécie de planta, sendo uma planta considerada uma unidade experimental. Plantas de banana da cultivar 'Maçã' foram usadas como controle positivo. Duas execuções do experimento foram realizadas: a primeira transcorreu de 06 de dezembro de 2019 a 24 de janeiro de 2020; e a segunda de 12 de dezembro de 2019 a 30 de janeiro de 2020.

3 RESULTADOS

3.1 Coleta de plantas daninhas

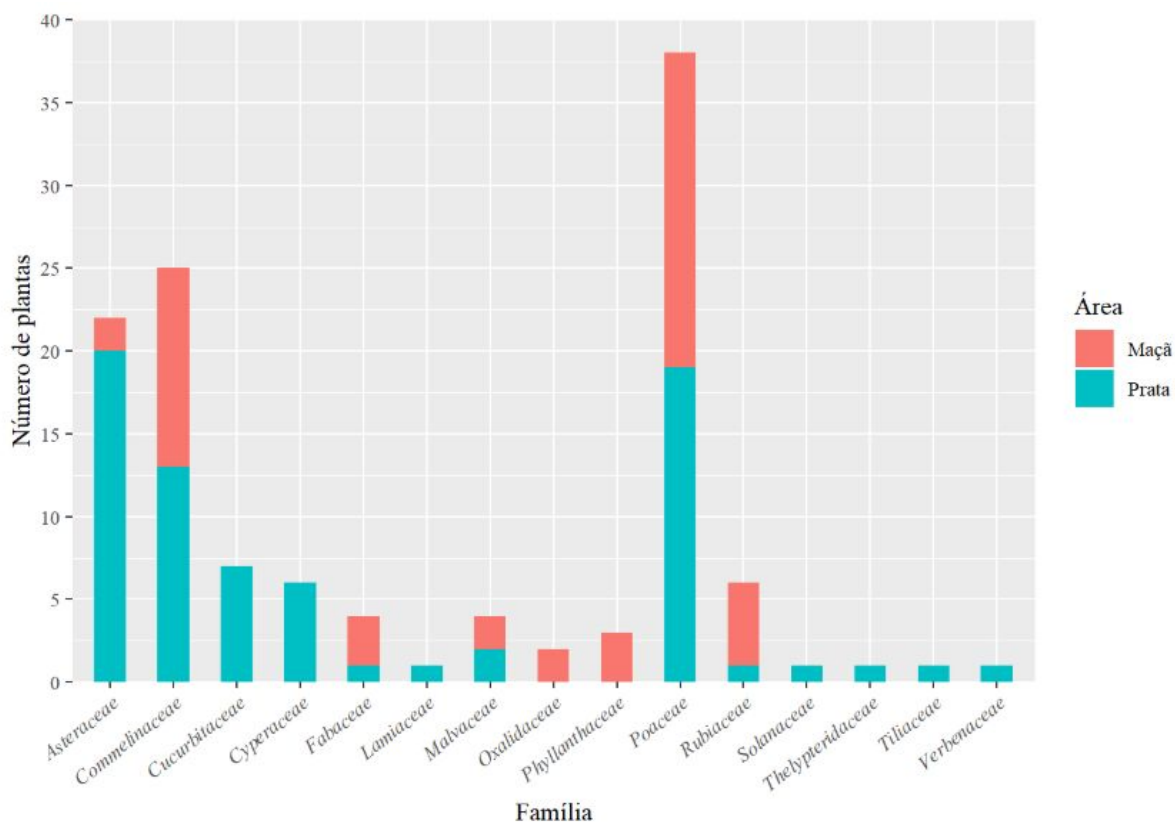
Nos dois campos avaliados foram coletadas 124 plantas daninhas de 35 espécies diferentes e 15 famílias botânicas. Na área de banana 'Maçã' foram coletadas 47 plantas daninhas ao redor de 11 touceiras de banana sintomáticas. As plantas foram classificadas em 19 espécies (Figura 1) e 8 famílias botânicas (Figura 2). A quantidade de plantas coletadas por espécie variou de 1 a 11. A espécie prevalente foi *Commelina diffusa* Burm. f., sendo encontrada em todas as touceiras de banana amostradas. A segunda espécie mais abundante foi *Digitaria insularis* (L.) Fedde, encontrada associada a oito touceiras sintomáticas.

Figura 1. Número de plantas daninhas coletadas nos campos de banana 'Maçã' e 'Prata'.



Das 24 touceiras sintomáticas amostradas na área de banana 'Prata', foram coletadas 23 espécies de plantas daninhas (Figura 1), de 13 famílias botânicas, sendo as mais frequentes as pertencentes a *Poaceae* e *Asteraceae* (Figura 2). Um total de 77 plantas foram coletadas, variando de 1 a 14 por espécie. *D. insularis* e *C. diffusa* foram as mais prevalentes com 14 e 12 plantas, respectivamente.

Figura 2. Número de famílias de plantas daninhas coletadas nos campos de banana 'Maçã' e 'Prata'.



3.2 Isolamento e pré-seleção de colônias

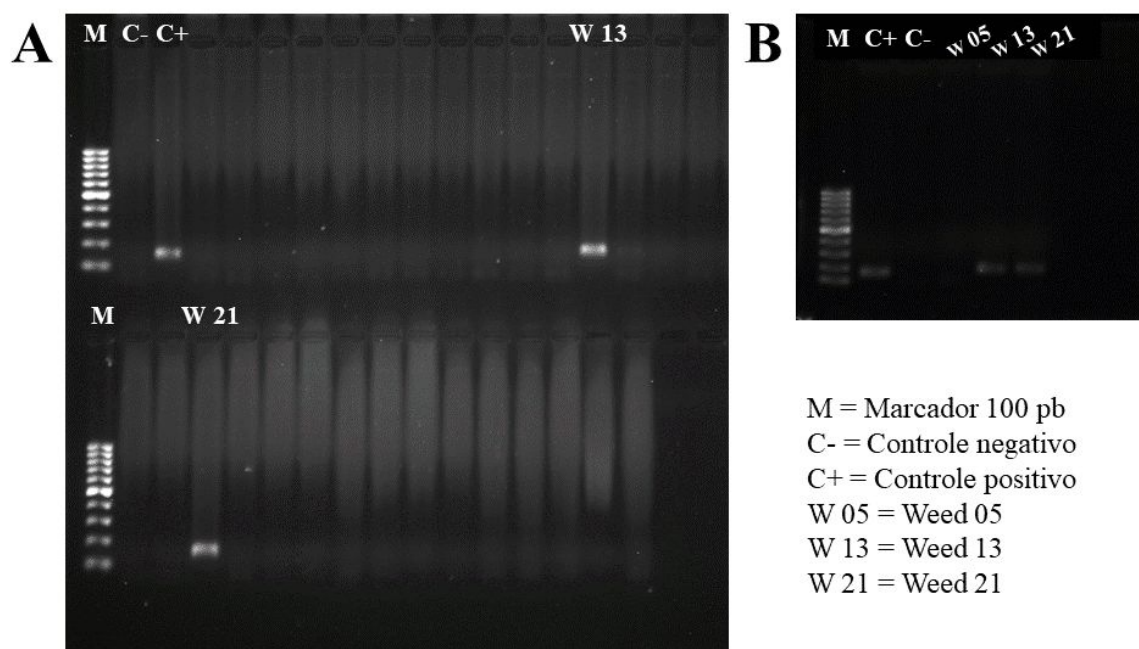
No total, foram preparadas 124 placas, uma para cada planta daninha coletada. Em 44 placas não houve crescimento fúngico ou colônias com características morfológicas discrepantes às de Foc, como colônias escuras ou amarelas. Das 80 placas restantes foram obtidas 205 colônias que tiveram as características morfológicas mais detalhadamente avaliadas sob microscópio óptico. Cento e seis colônias apresentaram coloração branca ou violeta e estruturas semelhantes a Foc. A maioria apresentou microconídios e monofiáides curtas. Contudo, não foram observados macroconídios e clamidósporos em todas as colônias.

3.3 Análise molecular

Dos 106 isolados submetidos a PCR com os primers Six1-2, apenas os isolados Weed 13 e Weed 21 tiveram fragmento amplificado de 122 pb (Figura 3A). Os dois isolados foram provenientes de duas plantas de *C. diffusa*, coletadas na área de banana 'Maçã'. Uma PCR adicional (réplica biológica) foi realizada a partir de uma nova extração de DNA dos isolados

Weed 13, Weed 21 e com o isolado Weed 05, escolhido ao acaso, para verificar a consistência dos resultados. Obtiveram-se os mesmos resultados da primeira PCR realizada (Figura 3B).

Figura 3. (A) Identificação molecular de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cupense* a partir de PCR com primers específicos Six1-2. Isolados Weed 13 e Weed 21 provenientes de *Commelina diffusa*. (B) Repetição da PCR.



3.4 Teste de patogenicidade

Os isolados Weed 13 e Weed 21, que foram positivos para PCR com os primers Six1-2, foram patogênicos nos dois testes realizados e foram armazenados na coleção de Foc do BioPop UFV com os códigos UFV-Foc 810 e UFV-Foc 811, respectivamente. Oito isolados com resultado negativo para a PCR com os primers Six1-2, Weed 01, Weed 07, Weed 33, Weed 55, Weed 58, Weed 64, Weed 84 e Weed 95, foram selecionados aleatoriamente para serem incluídos em teste de patogenicidade. Nenhum foi patogênico.

No primeiro ensaio, a partir da segunda semana, as plantas inoculadas com os isolados Weed 13 e Weed 21 apresentaram amarelecimento das folhas. A partir da quarta semana, uma planta inoculada com cada um dos isolados Weed 13 e Weed 21, morreu. Na quinta semana após a inoculação, as plantas das cinco repetições estavam mortas. Após seis semanas de inoculação, observou-se morte de três das cinco plantas inoculadas com o isolado UFV-Foc 217 usado como controle positivo (Foc 217).

No segundo experimento, as plantas apresentaram sintomas a partir da segunda semana, mas não avançaram tão rápido como no primeiro. Das plantas inoculadas com o isolado Weed 13, duas morreram, sendo que as demais também apresentaram sintomas. Para o isolado Weed 21, somente uma planta morreu.

Foi realizado o re-isolamento do fungo a partir das plantas sintomáticas e recuperaram-se os isolados Weed 13 e Weed 21. Os isolados foram positivos para PCR com os primers Six1-2. Dos demais isolados testados, Weed 58 e Weed 84 foram recuperados, porém, não foram positivos na PCR.

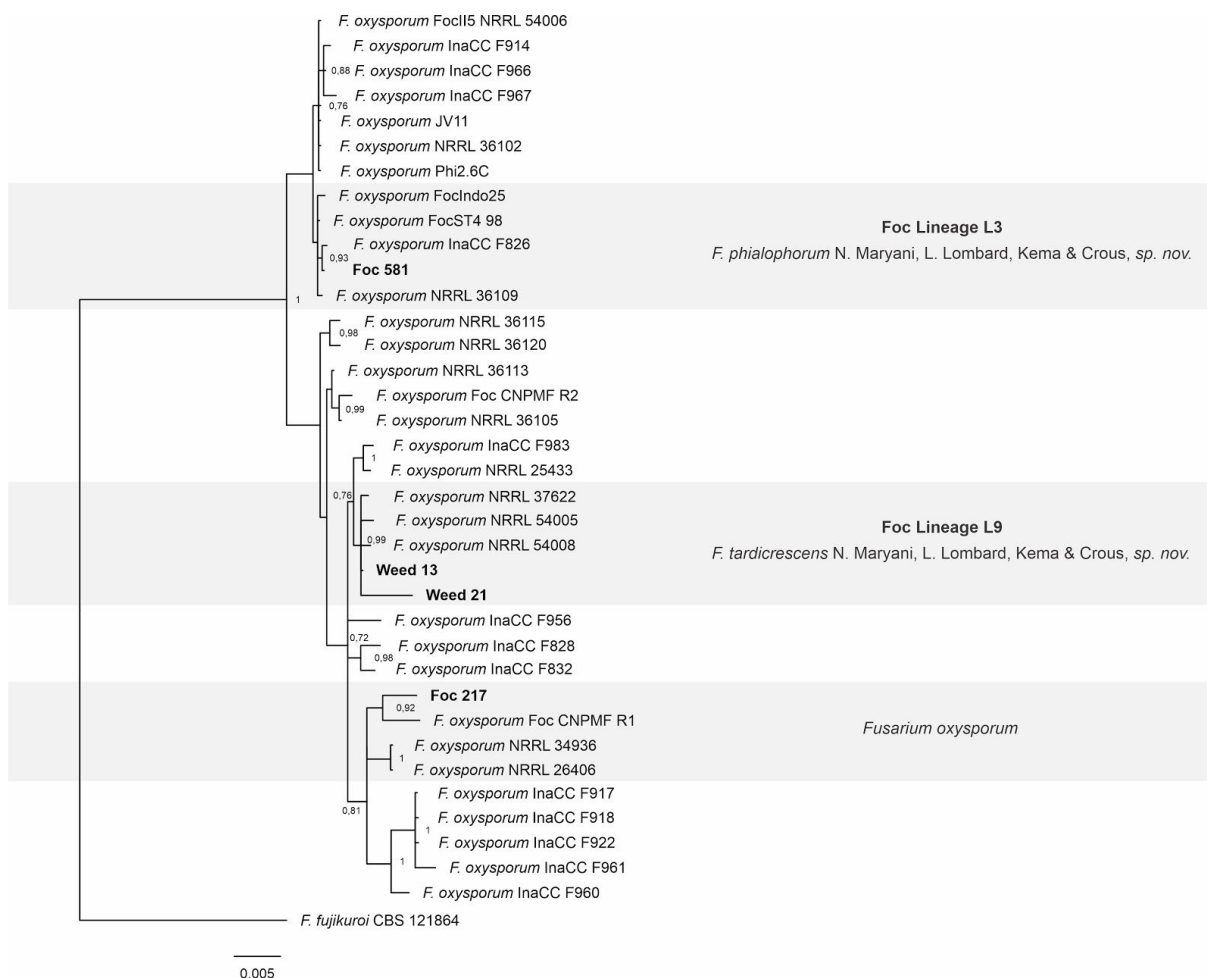
3.5 Determinação dos Grupos de Compatibilidade Vegetativa (VCG)

Dos 17 VCG's testados, nenhum foi compatível com os isolados Weed 13 e Weed 21, não sendo possível observar a formação de heterocário entre os isolados e identificar o VCG ao qual pertencem.

3.6 Sequenciamento e filogenia dos isolados positivos

A árvore gerada com os resultados da Inferência Bayesiana está representada na Figura 4. Os isolados Weed 13 e Weed 21 agruparam em linhagens diferentes dos outros dois isolados oriundos de bananeira, Foc 217 e Foc 581. Weed 13 e Weed 21 agruparam com isolados da linhagem L9, o isolado Foc 217 na linhagem L3 de Foc, e o isolado Foc 581 não agrupou com isolados de linhagens definidas (Figura 4).

Figura 4. Árvore filogenética de Inferência Bayesiana a partir do conjunto de dados combinados de sequências dos genes *Rpb1*, *Rpb2* e *EF-1 α* de 37 isolados de *Fusarium*.



3.7 Potencial gama de hospedeiros usando o método centrífugo-filogenético

No primeiro e no segundo experimentos, foram observados amarelecimento das folhas e murcha. Algumas plantas morreram, principalmente as do gênero *Musa*. Além das plantas de banana (C+), plantas de *Musa acuminata* subsp. *zebrina*, *M. coccinea*, *M. velutina*, *Heliconia orthotricha*, *Phaseolus vulgaris*, *Cucumis melo*, *Eruca vesicaria* subsp. *sativa*, *Allium cepa*, *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, *Citrullus lanatus*, demonstraram sintomas externos. *H. orthotricha* apresentou sintomas apenas no primeiro experimento. No primeiro ensaio, das quatro plantas (repetições) de cada espécie de planta mencionada acima, morreram um de banana, um de *M. coccinea*, três de *Cucumis melo*, três de *H. orthotricha* e quatro de *M. velutina*. No segundo ensaio, morreram, um de *B. vulgaris* subsp. *vulgaris*, dois de *E.*

vesicaria subsp. *sativa*, dois de *C. lanatus*, três de *Allium cepa*, três de *P. vulgaris*, três de *M. velutina* e quatro de *M. coccinea*.

Nos dois ensaios realizados, verificou-se descoloração dos vasos em plantas de banana usadas como controle positivo e em algumas plantas filogeneticamente próximas à bananeira, como *Musa acuminata* subsp. *zebrina*, *M. coccinea*, *M. velutina*, *Heliconia brasiliensis*, *H. episcopalis*, *H. orthotricha*, *Alpinia purpurata* e algumas outras espécies mais distantes como *Cajanus cajan*, *Glycine max*, *Vigna unguiculata*, *Gossypium hirsutum*, *Passiflora edulis*, *E. vesicaria* subsp. *sativa*, *B. vulgaris* subsp. *vulgaris* e *Daucus carota* subsp. *sativus*. Algumas plantas apresentaram necrose intensa como por exemplo *P. vulgaris*, *C. melo* e *C. lanatus*.

Realizou-se PCR com os primers Six1-2 apenas para os fungos re-isolados do primeiro experimento. Das 29 espécies de plantas avaliadas (Tabela 3), em 20 foram confirmadas a presença de Foc por meio de PCR: *M. coccinea*, *M. velutina*, *H. brasiliensis*, *H. episcopalis*, *H. orthotricha*, *A. purpurata*, *C. cajan*, *G. max*, *V. unguiculata*, *P. vulgaris*, *G. hirsutum*, *P. edulis* e *D. carota* subsp. *sativus*. Destas 20 espécies, Foc foi re-isolado de sete espécies que não apresentavam sintomas aparentes: *Spinacia oleracea*, *Ricinus communis*, *Zea mays*, *Solanum lycopersicum*, *Canavalia ensiformis*, *Costus spicatus* e *Ctenanthe oppenheimiana*. Apesar da *M. acuminata* subsp. *zebrina* apresentar sintomas internos e externos, não foi possível re-isolar Foc a partir dos tecidos.

Tabela 3. Reação de 29 espécies de plantas a isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. Plantas foram inspecionadas quanto à presença de sintomas após 7 semanas de inoculação.

Família	Espécie		Reação a Foc	
	Nome científico	Nome comum	Exp.1	Exp.2
<i>Musaceae</i>	<i>Musa</i> spp.	Banana	+*	+
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>	Acelga	-	+
	<i>Spinacia oleracea</i>	Espinafre	+*	-
<i>Amaryllidaceae</i>	<i>Allium cepa</i>	Cebola	-	-
<i>Apiaceae</i>	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i>	Cenoura	+*	+
<i>Brassicaceae</i>	<i>Eruca vesicaria</i> subsp. <i>sativa</i>	Rúcula	-	+
<i>Cannaceae</i>	<i>Canna indica</i>	Cana da Índia	-	-
<i>Costaceae</i>	<i>Costus spicatus</i>	Costus branco	+*	-
<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Citrullus lanatus</i>	Melancia	-	+
	<i>Cucumis melo</i>	Melão	-	x
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Ricinus communis</i>	Mamona	+*	-
<i>Fabaceae</i>	<i>Cajanus cajan</i>	Guandú	+*	-
	<i>Canavalia ensiformis</i>	Feijão de porco	+*	-
	<i>Glycine max</i>	Soja	+*	-
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Feijão comum	+*	+
<i>Heliconiaceae</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	Feijão caupi	+*	+
	<i>Heliconia brasiliensis</i>	Pássaro de fogo	+*	+
	<i>Heliconia episcopalis</i>	Heliconia	+*	+
	<i>Heliconia orthotricha</i>	Heliconia Eden Pink	+*	+
<i>Malvaceae</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Algodão	+*	+
<i>Marantaceae</i>	<i>Ctenanthe oppenheimiana</i>	Maranta tricolor	+*	x
<i>Musaceae</i>	<i>Musa acuminata</i> subsp. <i>zebrina</i>	Musa sumatra	+*	+
	<i>Musa coccinea</i>	Banana vermelha	+*	+
	<i>Musa velutina</i>	Banana rosa	+*	+
<i>Passifloraceae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Maracujá	+*	-
<i>Poaceae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Arroz	-	-
	<i>Zea mays</i>	Milho	+*	-
<i>Solanaceae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tomate	+*	-
<i>Zingiberaceae</i>	<i>Alpinia purpurata</i>	Alpínia ou Gengibre vermelho	+*	x
	<i>Hedychium coccineum</i>	Gengibre-branco	-	-

(+) Sintomas de murcha de Fusarium; (-) Ausência de sintomas de murcha de Fusarium; (+*) Positivo para Foc quando avaliado por PCR com primers específicos; e (x) Espécie não avaliada no ensaio.

4 DISCUSSÃO

A confirmação de *C. diffusa* como sendo hospedeira de Foc corrobora os estudos de Waite e Dunlap (1953), que isolaram Foc desta planta em áreas de banana da América Central. O fato de o fungo ser encontrado de forma endofítica e continuar patogênico em banana implica diretamente na dispersão e sobrevivência de Foc. *C. diffusa* foi descrita na Índia por Burman (1768) e seu provável centro de origem é a região dos trópicos da Ásia e África (HASSEMER, 2018). Esta planta foi usada como cobertura vegetal para proteção contra voçorocas (EDMUNDS, 1971) o que ajudou na sua disseminação. *C. diffusa* pode ser encontrada em culturas de importância econômica, como café (MATA-PACHECO, 1990), soja (DHINGRA; SILVA, 1978), arroz (SMITH, 1994) e banana (HAMMERTON, 1981; ISAAC *et al.*, 2007). Além de competir por água e nutrientes, *C. diffusa* já foi relatada como sendo hospedeira de outros patógenos de importância para a bananicultura. Especificamente, há relatos de *C. diffusa* como hospedeira de *Rotylenchulus reniformis* (ROBINSON *et al.*, 1997), *Pratylenchus goodeyi*, *Radopholus similis* (QUÉNÉHERVÉ *et al.*, 2006) e do *Cucumber mosaic virus* (CMV) (SHANMUGASUNDARAM, *et al.*, 1969).

Apesar de terem sido amostradas 38 plantas de 7 espécies diferentes da família *Poaceae* (Figura 2), não foram obtidos isolados de Foc a partir destes materiais. Várias espécies de plantas daninhas citadas como hospedeiras de Foc pertencem à família *Poaceae*, por exemplo: *Paspalum fasciculatum*, *Panicum purpurascens*, *Ixophorus unisetus* (WAITE; DUNLAP, 1953) e *Chloris inflata* (HENNESSY *et al.*, 2005). No presente estudo, não foram amostradas plantas das espécies mencionadas acima. Porém, é notável que espécies desta família sejam relatadas como hospedeiras de Foc.

São conhecidos 24 grupos de compatibilidade vegetativa (VCG) de Foc, sendo o VCG 01213 característico de Foc R4T (PÉREZ-VICENTE; DITA; MARTINEZ-DE LA PARTE, 2014). Dos 24 VCGs, foram testados 17, e não foi possível determinar a qual(is) VCG's os isolados de *C. diffusa* (Weed 13 e Weed 21) pertencem, podendo ser de algum VCG para o qual não dispomos de testador ou pertencer a um novo VCG. As análises filogenéticas baseadas em sequências parciais de *EF-1 α* agruparam Weed 13 e Weed 21 com a nova espécie *Fusarium tardicrescens*, proposta por Maryani *et al.* (2019), pertencente à linhagem 9. De acordo com os mesmos autores, em seu trabalho, não foi possível determinar os

hospedeiros, a distribuição e nem a patogenicidade dessa espécie. O isolado Foc 581 agrupou na linhagem 3, sendo identificado como *Fusarium phialophorum*, nova espécie sugerida por Maryani *et al.* (2019). *Fusarium phialophorum* foi classificado como R1 por ser patogênico para planta de banana do tipo Gros Michel, e não serem patogênicos para Cavendish (MARYANI *et al.*, 2019). O isolado Foc 217 não agrupou em nenhuma linhagem específica. Infelizmente, não é possível comparar os resultados obtidos no presente trabalho com informações relativas às linhagens ou espécies, uma vez que é a primeira análise dessa natureza no Brasil.

Plantas daninhas são relatadas como sendo hospedeiras de fungos e outros patógenos em diversos estudos (SHANMUGASUNDARAM, *et al.*, 1969; HAMMERTON, 1981; HELBIG *et al.*, 1984; DHINGRA; COELHO NETTO, 2001; DUBLIN; PAYNTER, 2003; HENNESSY *et al.*, 2005; BANDYOPADHYAY *et al.*, 2007; POSTIC *et al.*, 2012; JUNIOR *et al.*, 2012; ALTINOK, 2013; OCIMATI *et al.*, 2018; SUPRONIENE *et al.*, 2019). Entretanto, pouca atenção tem sido dada à potencial importância destas plantas como fonte de inóculo inicial e como reservatórios que possibilitam a sobrevivência de patógenos. Hospedeiros alternativos, tem ganhado mais importância em casos como o das ferrugens, em que o patógeno necessita do hospedeiro alternativo para completar seu ciclo. O controle do bérberis (*Berberis* sp.), tem sido feito como parte do manejo da ferrugem do colmo (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) na cultura do trigo, assim como o controle de *Ribes* spp. no manejo da ferrugem do pinheiro (*Cronartium ribicola*) (WISLER; NORRIS, 2005).

Plantas de importância agrônômica podem ser utilizadas em rotação de culturas e contribuir para epidemias de MF em banana ou para a manutenção da população do patógeno. A rotação de cultura e o consórcio muitas vezes consideram as características agrônômicas das plantas a serem usadas e desconsideram o fato de serem hospedeiras de patógenos (DHINGRA; COELHO NETTO, 2001). Não considerar a possibilidade de plantas de interesse econômico serem hospedeiras de patógenos que supostamente são específicos, como por exemplo as *formae speciales* de *Fusarium oxysporum*, pode ter consequências epidemiológicas importantes. No ensaio centrífugo-filogenético, em que as plantas foram inoculadas de maneira artificial, constatou-se a presença de Foc em plantas de milho (*Zea mays*), feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), feijão caupi (*Vigna unguiculata*), soja (*Glycine max*), mamona (*Ricinus communis*) e algodão (*Gossypium hirsutum*). Algumas destas culturas

podem ser usadas em consórcio com banana. Em um trabalho semelhante, Santos *et al.* (2016) obtiveram os mesmos resultados com *P. vulgaris*, re-isolando Foc a partir de tecidos de plantas que foram inoculadas artificialmente e apresentavam sintomas de fusariose. No mesmo trabalho, os autores testando *V. unguiculata* e *G. hirsutum* como potenciais hospedeiros alternativos de Foc, não conseguiram observar sintomas aparentes. No presente estudo, não se observaram sintomas externos, mas verificou-se descoloração dos tecidos internos de algumas das plantas. Após obter isolados destas plantas, confirmou-se a presença de Foc por PCR nas duas espécies de plantas. Ainda não foi feita a inoculação dos isolados obtidos das plantas utilizadas no teste centrífugo-filogenético em bananeira. Contudo, os resultados já alertam para a possibilidade de estas plantas serem reservatório de inóculo para epidemias da MF.

Plantas utilizadas para cobertura vegetal e adubação verde podem ser uma ameaça para culturas agrônômicas de interesse. Espécies de leguminosas (*Fabaceae*) podem ser usadas na bananicultura como cobertura vegetal, por serem fixadoras de nitrogênio, protegerem o solo e incorporarem nutrientes para a cultura de interesse (BORGES, 2006; RIBEIRO, 2012; FLORI, 2016). Assim como na escolha de espécies para rotação de cultura ou consórcio, a questão de hospedeiros alternativos é pouco levada em consideração na escolha destas plantas. Algumas espécies, como o feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) e o guandu (*Cajanus cajan*), são exemplos de leguminosas usadas como cobertura verde em banana, principalmente em cultivos orgânicos (BORGES, 2006). Nestas duas espécies foi possível isolar Foc. Em *C. ensiformis* não foram observados sintomas, o que pode fazer com que plantas afetadas não sejam percebidas no campo.

Plantas como a cenoura (*Daucus carota* subsp. *sativus*), espinafre (*Spinacia oleracea*), maracujá (*Passiflora edulis*) e tomate (*Solanum lycopersicum*), são espécies de plantas que são afetadas por outras *formae speciales* de Foc (ARMSTRONG; ARMSTRONG, 1976; BORRERO *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2015; FISCHER; REZENDE, 2008; HAN *et al.*, 2012; SIGILLO, 2014). Nos testes realizados, as espécies mencionadas foram consideradas como hospedeiras de Foc com base no isolamento e PCR com primers específicos. Plantas de *P. edulis* e *S. lycopersicum* em trabalhos semelhantes desenvolvidos por Santos *et al.* (2016),

apresentaram sintomas externos, mas os autores não conseguiram re-isolar Foc a partir desses materiais.

Das 11 espécies da ordem *Zingiberales* testadas no presente trabalho, nove foram positivas como hospedeiras de Foc. As duas negativas foram *Hedychium coccineum* e *Canna indica*, a primeira da família *Zingiberaceae* e a segunda da família *Cannaceae*. Por serem filogeneticamente mais próximas das bananeiras comerciais, plantas da família *Musaceae* junto com outras sete famílias botânicas fazem parte da ordem *Zingiberales* (KRESS *et al.*, 2001) e, provavelmente, têm uma maior chance de serem afetadas pelas mesmas doenças que acometem a cultura da banana. Várias espécies de *Zingiberales* são usadas como ornamentais, por exemplo, as helicônias, a cana da Índia, strelitzia, hedychium, algumas espécies do gênero *Musa*, dentre outras. Algumas helicônias são relatadas como hospedeiras do Moko da bananeira, bacteriose causada por *Ralstonia solanacearum* (ALBUQUERQUE *et al.* 2014; SEQUEIRA; AVERRE, 1961; ZOCCOLI; TOMITA; UESUGI, 2009) e da Sigatoka negra (GASPAROTTO *et al.*, 2005; VÁZQUEZ-EUÁN *et al.*, 2019). *Musa coccinea*, uma bananeira ornamental, também foi relatada como hospedeira de *R. solanacearum* (ZOCCOLI; TOMITA; UESUGI, 2009). *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*, agente etiológico da Murcha de Xanthomonas, foi isolada de plantas de *Canna* spp. (OCIMATI *et al.*, 2018). Há relatos desta bactéria fitopatogênica também infectando plantas de *Ensete ventricosum* (JONES, 2002), uma espécie da família *Musaceae*.

Canna indica e *Hedychium coronarium* são relatadas como possíveis hospedeiras de Foc (Waman *et al.*, 2013), resultados que divergem dos obtidos no presente trabalho com o método centrífugo-filogenético. Avaliaram-se plantas de *C. indica* e de uma outra espécie de *Hedychium*, *H. coccineum*. Em ambas as execuções do experimento, estas espécies não apresentaram sintomas de MF, nem foi possível isolar Foc de seus tecidos. É possível que a metodologia empregada em nosso trabalho tenha interferido na capacidade de recuperação do patógeno. No estudo de Waman *et al.* (2013), foram realizados ensaios de patogenicidade pelo método de folhas destacadas ao invés de plantas intactas. Estes mesmos autores testaram duas espécies de Alpinias (*Alpinia zerumbet* e *A. purpurea*) e duas espécies de helicônias, *H. indica* e *H. psittacorum*, não obtendo resultados positivos como hospedeiras de Foc. Resultado que diverge do obtido no presente trabalho, em que avaliou-se *Alpinia purpurata* e três helicônias, *H. brasiliensis*, *H. episcopalis* e *H. orthotricha*, e em todas espécies foram

observados sintomas de descoloração dos vasos, o patógeno foi isolado e confirmada a presença de Foc por PCR com primers específicos.

Por serem do mesmo gênero, as três espécies de *Musa*, *M. acuminata* subsp. *zebrina*, *M. coccinea* e *M. velutina*, ainda mais próximas da banana, apresentaram sintomas evidentes de MF. Constatou-se o amarelecimento das folhas, murcha, e descoloração do rizoma e dos vasos. Algumas plantas apresentaram fendilhamento do pseudocaule. Outras espécies da ordem *Zingiberales*, *Ctenanthe oppenheimiana* e *Costus spicatus*, foram avaliadas, mas não apresentaram sintomas, porém foi possível isolar e confirmar a presença de Foc. Possivelmente, Foc pode estar associado a estas plantas de maneira endofítica, sem causar sintomas. Se tal fenômeno for comprovado, a gama de hospedeiros poderá ser ampliada e as consequências para o manejo da MF deverão ser revisadas. Ademais, abre-se a discussão sobre a pertinência da categoria *formae speciales*. Por se tratar de complexo de espécies, regiões genômicas linhagem-específica podem ser horizontalmente adquiridas por membros de *F. oxysporum* (MA *et al.* 2010), o que torna a referida categoria pouco estável.

O comércio de plantas ornamentais é uma preocupação para epidemias de MF. Espécies ornamentais são comercializadas e transportadas de um país para outro ou de uma região para outra, com certa facilidade. A forma de propagação, na maioria das vezes, vegetativa, as tornam ótimas dispersoras de patógenos (JONES; DIEKMANN, 2000). Mudanças de helicônias importadas do Havaí para a Austrália estavam infectadas com *R. solanacearum* raça 2, patógeno até então inexistente no país (Akiew e Hyde, 1993). Casos como esse reforçam a importância de boas práticas de exclusão como a quarentena, e mais atenção para certificação dos produtos vegetais importados e exportados (JONES, 2002). No caso de áreas de produção de banana, faz-se necessário atentar para o papel das plantas potencialmente hospedeiras de Foc. Medidas quarentenárias e de indexação devem ser prescritas no caso de plantas comprovadamente hospedeiras. Outros princípios e medidas de controle devem ser cuidadosamente adotados visando ao manejo eficaz da MF.

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho, demonstra que *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* pode afetar outras espécies, não sendo específico a plantas de banana. *C. diffusa*, uma planta daninha comumente encontrada em cultivos comerciais, pode servir como hospedeira de Foc, sem apresentar sintomas aparentes e o fungo continuar patogênico para plantas de banana, tornando assim *C. diffusa* como um possível reservatório do patógeno. Plantas cultivadas comumente usadas em rotação de cultura, consórcio ou adubação verde na bananicultura, assim como, plantas filogeneticamente próximas a banana podem ser hospedeiras de Foc, podendo ser de forma endofítica ou patogênica.

6 REFERÊNCIAS

ALTINOK, H. H. *Fusarium* species isolated from common weeds in eggplant fields and symptomless hosts of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* in Turkey. **Journal of Phytopathology**, v. 161, n. 5, p. 335–340, 2013.

ARMSTRONG, G. M.; ARMSTRONG, J. K. Common hosts for *Fusarium oxysporum formae speciales spinaciae* and *betae*. **Phytopathology**, v. 66, n. 5, p. 542–545, 1976.

BAAYEN, R. P.; O'DONNELL, K.; BONANTS, P. J.; CIGELNIK, E.; KROON, L. P.; ROEBROECK, E. J.; WAALWIJK, C. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic *formae speciales* causing wilt and rot disease. **Phytopathology**, v. 90, n. 8, p. 891–900, 2000.

BANCROFT, J. Report of the board appointed to inquire into the cause of disease affecting livestock and plants. **Votes and Proceedings**, v. 3, p. 1011–1038, 1876.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. v. 1. 704 p.

BORGES, A. L.; SOUZA, L. S.; MACIEL, Z. J. Cultivo orgânico da bananeira. In: Circular técnica, 2006, Cruz das Almas. **Circular Técnica**. Cruz das Almas: Embrapa. 2006. 10 p. Disponível em: <https://ciorganicos.com.br/wp-content/uploads/2012/10/CULTIVO-ORGÂNICO-DE-BANANEIRA.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2020.

BORRERO, C.; TRILLAS, M. I.; ORDOVÁS, J.; TELLO, J. C.; AVILÉS, M. Predictive factors for the suppression of fusarium wilt of tomato in plant growth media. **Phytopathology**, v. 94, n. 10, p. 1094–1101, 2004.

BUDDENHAGEN, I. Understanding strain diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and history of introduction of “tropical race 4” to better manage banana production. **Acta Horticulturae**, v. 828, p. 193–204, 2009.

CIPRES - Cyber infrastructure for phylogenetic research. Disponível em: <http://www.phylo.org>. Acesso em: 15 de fev. 2020.

CONAB. Boletim hortigranjeiro: Janeiro 2020. Brasília: **Companhia nacional de abastecimento**. 2020. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/hortigranjeiros-prohort/boletim-hortigranjeiro>. Acesso em: 29 jan. 2020.

CORRELL, J. C.; KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. **Phytopathology**, v. 77, n. 12, p. 1640-1646, 1987.

DANIELLS, J.; JENNY, C.; KARAMURA, D.; TOMKPE, K. **Musalogue: a catalogue of *Musa germplasm***. Diversity in the genus *Musa*. Montpellier, France: Inibap. 2001. 207 p.

DHINGRA, O. D.; COELHO NETTO, R. A. Reservoir and non-reservoir hosts of bean-wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Journal of Phytopathology**, v. 149, n. 7–8, p. 463–467, 2001.

DHINGRA, O. D.; SILVA, J. F. Effect of weed control on the internally seed borne fungi in soybean seeds. **Plant Disease Reporter**, v. 62, n. 6, p. 513-516, 1978.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. Ohio: CRC Press. 1985. 355 p.

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, p. 1–21, 2018.

FAO. Banana market review: Preliminary results 2019. Rome: **Food and Agriculture Organizations of the United Nations**. 2020. Disponível em: <http://www.fao.org/publications/card/en/c/CA7567EN/>. Acesso em: 27 jan. 2020.

FERREIRA, R. B.; RODRIGUES, A. A. C.; MORAES, F. H. R.; SILVA, E. K. C.; NASCIMENTO, I. O. Resíduos orgânicos no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* em maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Acta Biológica Colombiana**, v. 20, n. 3, p. 111–120, 2015.

FISCHER, I. H.; REZENDE, J. A. M. Diseases of passion flower (*Passiflora* spp.). **Pest Technology**, v. 2, n. 1, p. 1–19, 2008.

FLORI, J. E.; RESENDE, G. M. Soil chemical attributes and leaf nutrients of “Pacovan” banana under two cover crops. **Revista Caatinga**, v. 29, n. 2, p. 290–295, 2016.

FOURNET, J.; HAMMERTON, J. L. **Weeds of the lesser antilles**. Institute of National Research Agronomy, Paris: INRA, 1991. 214 p.

GARCÍA-BASTIDAS, F. A.; QUINTERO-VARGAS, J. C.; AYALA-VASQUEZ, M.; SCHERMER, T.; SEIDL, M. F.; SANTOS-PAIVA, M.; NOGUERA, A. M.; AGUILERA-GALVEZ, C.; WITTENBERG, A.; HOFSTEDE, R.; SØRENSEN, A.; KEMA, G. H. J. First report of Fusarium wilt tropical race 4 in Cavendish bananas caused by *Fusarium odoratissimum* in Colombia. **Plant Disease**, v. 104, n. 3, p. 194-194, 2019.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R.; URBEN, A. F.; HANADA, R. E.; PEREIRA, M. C. N. *Heliconia psittacorum*: hospedeira de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da Sigatoka-negra da bananeira. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 423–425, 2005.

GHAG, S. B.; SHEKHAWAT, U. K. S.; GANAPATHI, T. R. Fusarium wilt of banana: biology, epidemiology and management. **International Journal of Pest Management**, v. 61, n. 3, p. 250–263, 2015.

HAMMERTON, J. L. Weed problems and weed control in the commonwealth Caribbean. **Tropical Pest Management**, v. 27, n. 3, p. 379–387, 1981.

HAN, Y. K.; HAN, K. S.; LEE, S. C.; KIM, S. First report of Fusarium wilt of carrot in Korea. **Plant Pathology Journal**, v. 28, n. 2, p. 216-216, 2012.

HELBIG, J. B.; CARROLL, R. B. Dicotyledonous weeds as a source of *Fusarium oxysporum* pathogenic on soybean. **Plant Disease**, v. 68, n. 8, p. 694–696, 1984.

HENNESSY, C.; WALDUCK, G.; DALY, A.; PADOVAN, A. Weed hosts of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 in Northern Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 34, n. 1, p. 115–117, 2005.

IBGE - Levantamento sistemático da produção agrícola: fevereiro 2020. Brasil: **Instituto brasileiro de geografia e estatística**. 2020. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>. Acesso em: 15 fev. 2020.

JONES D. R. Risk of spread of banana diseases in international trade and germplasm exchange. *In*: PROCEEDINGS OF THE 15TH INTERNATIONAL MEETING OF ACORBAT, 2002, Medellín. **Acorbat: Memorias XV Reunión**. Medellín: AUGURA, 2002, p. 105-113.

SALES JÚNIOR, R.; OLIVEIRA, O. F.; MEDEIROS, É. V.; GUIMARÃES, I. M.; CORREIA, K. C.; MICHEREFF, S. J. Ervas daninhas como hospedeiras alternativas de patógenos causadores do colapso do meloeiro. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 1, p. 195–198, 2012.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. Tomo II. 2. ed. São Paulo: BASF, 1999. 978 p.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. Tomo III. 2.ed. São Paulo: BASF, 2000. 726 p.

KISSMANN, K. G. **Plantas infestantes e nocivas**. Tomo I. 2.ed. São Paulo: BASF, 1997. 825 p.

KOMADA, H. Development of selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. **Review of Plant Protection Research**, v.8, p. 114-125, 1975.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium Laboratory Manual**. Ames, Iowa: Blackwell Professional, 2006. 388 p.

LI, C. Y.; YI, G. J.; HUANG, B. Z.; WEI, Y. R. Early events in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* - musa interaction using green fluorescent protein-tagged race 4. In: V INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BANANA: ISHS-PROMUSA SYMPOSIUM ON GLOBAL PERSPECTIVES ON ASIAN CHALLENGES, 2011, Guangzhou. V **International Symposium on Banana**. Guangzhou: Acta Horticulturae p. 305-311, 2011. Disponível em: <https://www.actahort.org/books/897/index.htm>. Acesso em: 30 set. 2020.

LORENZI, H. **Manual de identificação e de controle de plantas daninhas**. 6. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006. 338 p.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. 4.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 640 p.

MARYANI, N.; LOMBARD, L.; POERBA, Y. S.; SUBANDIYAH, S.; CROUS, P. W.; KEMA, G. H. J. Phylogeny and genetic diversity of the banana *Fusarium* wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. **Studies in Mycology**, v. 92, p. 155–194, 2019.

MATA-PACHECO, H. Identificación y estudio poblacional de malezas asociadas al cultivo del café en Costa Rica. In: XIII SIMPOSIO SOBRE CAFICULTURA LATINOAMERICANA, 1990, San José. **XIII Simposio Sobre Caficultura Latinoamericana**. San José: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 1990. p. 193-193.

MELDRUM, R. A.; FRASER-SMITH, S.; TRAN-NGUYEN, L. T. T.; DALY, A. M.; AITKEN, E. A. B. Presence of putative pathogenicity genes in isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* from Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 41, n. 5, p. 551–557, 2012.

MOREIRA, H. J. C.; BRAGANÇA, H. B. N. **Manual de identificação de plantas infestantes: Hortifrúti**. Campinas: FMC Agricultural Products, 2011. 1017 p.

MYINT, A. **Common weeds of Guyana**. Guyana: National Agricultural Research Institute, 1994. 271 p.

NIRENBERG, H. I. **Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der Fusarium-Sektion Liseola**. Berlin: Parey, 1976. 117 p.

OCIMATI, W.; WERE, E.; GROOT, J. C. J.; TITTONELL, P.; NAKATO, G. V.; BLOMME, G. Risks posed by intercrops and weeds as alternative hosts to *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* in banana fields. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 1471, p. 1–15, 2018.

O'DONNELL, K.; SUTTON, D. A.; RINALDI, M. G.; SARVER, B. A. J.; BALAJEE, S. A.; SCHROERS, H. J.; SUMMERBELL, R. C.; ROBERT, V. A. R.G.; CROUS, P. W.; ZHANG,

N.; AOKI, T.; JUNG, K.; PARK, J.; LEE, Y. H.; KANG, S.; PARK, B.; GEISER, D. M. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 10, p. 3708–3718, 2010.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 5, p. 2044–2049, 1998.

PÉREZ-VICENTE, L.; DITA, M. A.; MARTINEZ-DE LA PARTE, E. Technical manual prevention and diagnostic of *Fusarium* wilt (Panama disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4(TR4). **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, v. 4, p. 1–74, 2014.

PÉREZ-VICENTE, L. Marchitamiento por *Fusarium* (Mal de Panamá) del conocimiento presente sobre su agente causal. **Fitosanidad**, v. 8, n. 4, p. 27–38, 2004.

PIETRO, A.; MADRID, M. P.; CARACUEL, Z.; DELGADO-JARANA, J.; RONCERO, M. I. G. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 5, p. 315–325, 2003.

PITTAWAY, P.; NASIR, N.; PEGG, K. G. Soil receptivity and host-pathogen dynamics in soils naturally infested with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, the cause of Panama disease in bananas. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 50, n. 4, p. 623–628, 1999.

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

PLOETZ, R. C. Panama disease, an old nemesis rears its ugly head: Part 2, the Cavendish era and beyond. **Plant Health Progress**, v. 7, n. 1, p. 1–19, 2006b.

PLOETZ, R. C. Panama disease: A classic and destructive disease of banana. **Plant Health Management**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2000.

POSTIC, J.; COSIC, J.; VRANDECIC, K.; JURKOVIC, D.; SALEH, A. A.; LESLIE, J. F. Diversity of *Fusarium* species isolated from weeds and plant debris in Croatia. **Journal of Phytopathology**, v. 160, n. 2, p. 76–81, 2012.

PUHALLA J. E. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. **Canadian Journal of Botany**, v. 63, n. 2, p. 179–183, 1985.

QUÉNÉHERVÉ, P.; CHABRIER, C.; AUWERKERKEN, A.; TOPART, P.; MARTINY, B.; MARIE-LUCE, S. Status of weeds as reservoirs of plant parasitic nematodes in banana fields in Martinique. **Crop Protection**, v. 25, n. 8, p. 860–867, 2006.

- RIBEIRO, L. R.; OLIVEIRA, L. M.; SILVA, S. O.; BORGES, A. L. Caracterização física e química de bananas produzidas em sistemas de cultivo convencional e orgânico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 3, p. 774–782, 2012.
- ROBINSON, A. F.; INSERRA, R. N.; CASWELL-CHEN, E. P.; VOVLAS, N.; TROCCOLI, A. *Rotylenchulus* species: Identification, distribution, host ranges and crop plant resistance. **Nematropica**, v. 27, n. 2, p. 127–180, 1997.
- SANTOS, V. O.; RIBEIRO, L. R.; FERREIRA, M. S.; OLIVEIRA, S. A. S.; AMORIM, E. P.; HADDAD, F. Potenciais hospedeiros alternativos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, agente causal do Mal-do-Panamá. In: 10ª JORNADA CIENTÍFICA – EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA, 2016, Cruz das Almas. **Anais eletrônicos**. Cruz das Almas: Embrapa, 2016. p. 79-79. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1061609/traduzindo-ciencia-para-o-mundo--resumos>. Acesso em: 10 jan. 2020.
- SEQUEIRA, L.; AVERRE, C. Distribution and pathogenicity of strains of *Pseudomonas solanacearum* from virgin soils in Costa Rica. **Plant Disease Reporter**, v. 45, n. 6, p. 435–440, 1961.
- SIGILLO, L.; SENAPE, V.; SERRATORE, G.; INFANTINO, A. Occurrence of Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* on spinach (*Spinacia oleracea*) in Southern Italy. **Plant Disease**, v. 98, n. 7, p. 1003-1003, 2014.
- SNYDER, W. C.; HANSEN, H. N. The species concept in *Fusarium*. **American Journal of Botany**, v. 27, n. 2, p. 64–67, 1940.
- STOVER, R. H.; WAITE, B. H. Studies on Fusarium wilt of bananas: V. Pathogenicity and distribution of *Fusarium oxysporum* f. *cubense* races 1 and 2. **Canadian Journal of Botany**, v. 38, n. 1, p. 51–61, 1960.
- STOVER, R. H. **Fusarium wilt (Panama disease) of bananas and other *Musa* species**. United Kingdom: Commonwealth Mycological Institute, 1962. 177 p.
- SU, H-J.; HWANG, S-C.; KO, W-H. Fusarial wilt of Cavendish bananas in Taiwan. **Plant Disease**, v. 70, n. 9, p. 814–818, 1986.
- SUPRONIENE, S.; KADZIENE, G.; IRZYKOWSKI, W.; SNEIDERIS, D.; IVANAUSKAS, A.; SAKALAIUSKAS, S.; SERBIAK, P.; SVEGZDA, P.; AUSKALNIENE, O.; JEDRYCZKA, M. Weed species within cereal crop rotations can serve as alternative hosts for *Fusarium graminearum* causing Fusarium head blight of wheat. **Fungal Ecology**, v. 37, n. 50, p. 30–37, 2019.
- THANGAVELU, R.; MUSTAFF, M. M. **Current advances in the Fusarium wilt disease management in banana with emphasis on biological control**. India: Intechopen, 2012. 273–298 p. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/plant-pathology/current-advances-in-the-fusarium-wilt-disease-management-in-banana-with-emphasis-on-biological-contr>. Acesso em: 15 jan. 2020.

VÁZQUEZ-EUÁN, R.; CHI-MANZANERO, B.; HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ, I.; TZEC-SIMÁ, M.; ISLAS-FLORES, I.; MARTÍNEZ-BOLAÑOS, L.; GARRIDO-RAMÍREZ, E. R.; CANTO-CANCHÉ, B. Identification of new hosts of *Pseudocercospora fijiensis* suggests innovative pest management programs for Black sigatoka disease in banana plantations. **Agronomy**, v. 9, n. 10, p. 1–11, 2019.

WAITE, B. H.; DUNLAP, V. C. Preliminary host range studies with *Fusarium oxysporum* f. *cubense*. **Plant Disease Reporter**, v. 37, n. 2, p. 79–80, 1953.

WAMAN, A. A.; BOHRA, P.; SATHYANARAYANA, B. N.; CHANDRASHEKAR, S. C.; RANI, R. T. Are bananas (*Musa* spp.) really safe from their aesthetic relatives? Screening potential alternative hosts of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 88, n. 5, p. 559–562, 2013.

WAPSHERE, A. J. A strategy for evaluating the safety of organisms for biological weed control. **Annals of Applied Biology**, v. 77, n. 2, p. 201–211, 1974.

WILSON, A. K. Commelinaceae - A review of the distribution, biology and control of the important weeds belonging to this family. **Tropical Pest Management**, v. 27, n. 3, p. 405–418, 1981.

WISLER, G. C.; NORRIS, R. F. Interactions between weeds and cultivated plants as related to management of plant pathogens. **Weed Science**, v. 53, n. 6, p. 914–917, 2005.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, v. 7, n. 1–2, p. 203–214, 2000.

ZOCCOLI, D. M.; TOMITA, C. K.; UESUGI, C. H. Ocorrência de murcha bacteriana em helicônias e musácea ornamental no Distrito Federal. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 1, p. 45–46, 2009.