

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E
PATOGENICA DE ISOLADOS ASSOCIADOS À FUSARIOSE EM
ABACAXIZEIRO NA REGIÃO NORTE FLUMINENSE

ANA CAROLINA MELO RIBEIRO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2022

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E
PATOGENICA DE ISOLADOS ASSOCIADOS À FUSARIOSE EM
ABACAXIZEIRO NA REGIÃO NORTE FLUMINENSE

ANA CAROLINA MELO RIBEIRO

Dissertação apresentada ao Centro de
Ciências e Tecnologias Agropecuárias da
Universidade Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro, como parte das exigências para
obtenção do título de Mestra em Genética e
Melhoramento de Plantas

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Vivas

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

R484

Ribeiro, Ana Carolina Melo.

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E PATOGÊNICA DE ISOLADOS ASSOCIADOS À FUSARIOSE EM ABACAXIZEIRO NA REGIÃO NORTE FLUMINENSE / Ana Carolina Melo Ribeiro. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

67 f. : il.

Bibliografia: 42 - 54.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2022.
Orientador: Marcelo Vivas.

1. *Ananas comosus*. 2. *Fusarium guttiforme*. 3. resistência genética. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E
PATOGENICA DE ISOLADOS ASSOCIADOS À FUSARIOSE EM
ABACAXIZEIRO NA REGIÃO NORTE FLUMINENSE

ANA CAROLINA MELO RIBEIRO

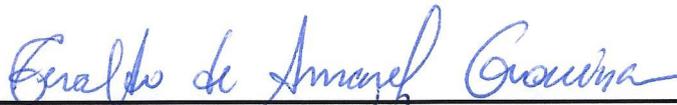
“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestra em Genética e Melhoramento de Plantas”

Aprovada em 23 de fevereiro de 2022

Comissão Examinadora:



Prof. Danilo Batista Pinho (D.Sc., Fitopatologia) - UnB



Prof. Geraldo de Amaral Gravina (D.Sc., Fitotecnia) - UENF



Prof. Almy Junior Cordeiro de Carvalho (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF



Prof. Marcelo Vivas (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) - UENF
(Orientador)

*A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.*

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Edmilson e Andréa, às minhas irmãs Ester Cristina e Priscila Kelly e aos meus sobrinhos Ricardo Asafe, Bella Sofia e Isadora Manuela.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder sabedoria, saúde e proteção em meio à pandemia e por ser meu refúgio em todos os momentos;

À minha família, aos meus pais Edmilson e Andréa, por acreditarem nos meus sonhos e investirem em meus estudos, e às minhas irmãs Ester e Priscila, por todo o apoio;

Ao meu orientador, Marcelo Vivas, pelo acolhimento, paciência, confiança e por não medir esforços para auxiliar em todas as etapas da pesquisa;

Às duas pessoas que foram fundamentais na elaboração deste trabalho, Kelly Ramos e Juliana Saltires, por todas as contribuições;

Ao Vicente Dias, técnico responsável pela Clínica Fitossanitária, pela gentileza;

Aos meus colegas e amigos do LEAG, em especial, Mayara, Helenilson, Luana, Lavínia, Rafael, Fernanda e Luciana, e ao Edu, por toda contribuição;

Às amigas Gabriela e Cleidiane, por tornarem a convivência distante da família mais leve, pelo cuidado, risadas e por todo amparo;

Ao Eduardo, pelo companheirismo, incentivo e por se fazer presente mesmo distante;

A todos os meus amigos pelo apoio, motivação e por sempre torcerem pelas minhas conquistas;

Aos colegas e amigos do PGGMP, Joameson, Débora, Rosi, Mariana, Lucas e Camila, pela ajuda e pelos momentos de descontração;

À banca de defesa de dissertação, pela disponibilidade de participação e pelas contribuições;

Agradeço à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e à Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade de realização deste curso;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pela concessão das bolsas de estudos e financiamento das pesquisas - Código de Financiamento 001;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela concessão da bolsa nota 10; e

Por fim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a conclusão desta etapa, toda a minha gratidão!

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Geral.....	3
2.2. Específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Origem, aspectos botânicos e propagação da espécie <i>Ananas comosus</i> L. Merril	4
3.2. Importância socioeconômica	5
3.3. Diversidade genética e o melhoramento de plantas	6
3.4. Fusariose do abacaxizeiro	8
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Avaliação da variabilidade dos isolados de <i>Fusarium</i>	13
4.1.1 Local do experimento.....	13
4.1.2 Coleta dos Isolados.....	13
4.1.3 Isolamento de <i>Fusarium</i> em frutos de abacaxizeiro.....	14
4.1.4 Caracterização morfológica dos isolados de <i>Fusarium</i>	15
4.1.4.1 Coloração das colônias.....	15
4.1.4.2 Crescimento micelial	15
4.1.4.3 Produção de conídios	15

4.2 Patogenicidade de isolados	16
4.2.1 Patogenicidade de isolados em frutos de abacaxizeiro	16
4.2.2 Patogenicidade de isolados em folhas D destacadas de abacaxizeiro	17
4.3 Análise estatística	18
4.4 Caracterização molecular	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Coleta dos isolados	25
5.2 Caracterização morfológica dos isolados	26
5.3 Patogenicidade dos isolados em frutos	32
5.4 Patogenicidade dos isolados em folhas D destacadas	34
5.4 Caracterização molecular	38
6. CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

RESUMO

RIBEIRO, Ana Carolina Melo, M. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, fevereiro de 2022. Caracterização morfológica, molecular e patogênica de isolados associados à fusariose em abacaxizeiro na região Norte Fluminense. Orientador: Prof. Marcelo Vivas.

O gênero *Fusarium* é conhecido por provocar doenças em culturas de importância agrícola, sendo a espécie *F. guttiforme* o agente causal da Fusariose do abacaxizeiro. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar isolados de *Fusarium* associados à Fusariose do abacaxizeiro, na região Norte Fluminense, por meio de análise morfológica, filogenética e patogênica. Para isto, foram isolados e identificados fungos presentes em lavouras de abacaxi da região Norte Fluminense, feitas a caracterização morfológica e molecular dos isolados e a avaliação patológica dos isolados em frutos e folhas de abacaxizeiro. Amostras de frutos com sintomas de *Fusarium* foram coletadas para o isolamento direto do patógeno. As características morfológicas avaliadas foram coloração da colônia, diâmetro de macroconídios e microconídios, produção de conídios e crescimento micelial. A caracterização molecular baseou-se em análises multigênicas (*tef-1 α* e β -tubulina) por meio de inferência bayesiana. Em condições controladas, a caracterização patológica dos isolados foi avaliada em frutos e folhas D destacadas de abacaxizeiro. Foram identificados 22 isolados de *Fusarium* em lavouras de abacaxi no Norte Fluminense. Houve diferenças nas variáveis morfológicas entre os isolados. Com base em análises moleculares, a espécie *F.*

guttiforme foi identificada infectando o abacaxi, assim como também a espécie *F. sp.*, sendo esta espécie ainda não relatada causando infecção no abacaxizeiro. Houve diferenças patológicas entre os isolados inoculados. Há variação de características morfológicas em isolados de *Fusarium*. Os isolados mais patogênicos nos frutos foram CF/UENF 511, CF/UENF 512, CF/UENF 514, CF/UENF 517, CF/UENF 518, CF/UENF 520, CF/UENF 521, CF/UENF 525, CF/UENF 528, CF/UENF 529 e CF/UENF 532. E nas folhas foram CF/UENF 512, CF/UENF 513, CF/UENF 518, CF/UENF 52 e CF/UENF 528. Tendo este estudo como referência os isolados CF/UENF 511, CF/UENF 512, CF/UENF 518, CF/UENF 525 e CF/UENF 528 são os mais indicados para serem utilizados em estudos de resistência genética.

Palavras-chave: *Ananas comosus*; *Fusarium guttiforme*; resistência genética.

ABSTRACT

RIBEIRO, Ana Carolina Melo, M. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, february de 2022. Morphological, molecular and pathogenic characterization of isolates associated with fusariosis in pineapple in the North Fluminense region. Advisor: Teacher Marcelo Vivas.

The genus *Fusarium* is known to cause diseases in crops of agricultural importance and the species *F. guttiforme* is the causal agent of *Fusarium* disease in pineapple. Thus, the objective of this work was to obtain and characterize *Fusarium* isolates associated with Pineapple *Fusarium* disease, in the North Fluminense region, through morphological, phylogenetic and pathogenic analysis. For this, fungi present in pineapple crops in the North Fluminense region were isolated and identified; the morphological and molecular characterization of the isolates was carried out; and the pathological evaluation of the isolates in pineapple fruits and leaves. Fruit samples with *Fusarium* symptoms were collected for direct isolation of the pathogen. The morphological characteristics evaluated were: colony color, diameter of macroconidia and microconidia, conidia production and mycelial growth. Molecular characterization was based on multigenic analyzes (*tef-1 α* and β -tubulin) using Bayesian inference. Under controlled conditions, the pathological characterization of the isolates was evaluated on detached pineapple fruits and D leaves. 22 *Fusarium* isolates were identified in pineapple plantations in Norte Fluminense. There were differences in the morphological variables among the isolates. Based on molecular analyses, the species *F. guttiforme* was identified

as infecting pineapple, as well as the species *F. sp.*, which has not yet been reported to cause infection in pineapple. There were pathological differences between the inoculated isolates. There is variation in morphological characteristics in *Fusarium* isolates; The most pathogenic isolates in fruits were: CF/UENF 511, CF/UENF 512, CF/UENF 514, CF/UENF 517, CF/UENF 518, CF/UENF 520, CF/UENF 521, CF/UENF 525, CF/ UENF 528, CF/UENF 529, CF/UENF 532; And on the sheets were: CF/UENF 512, CF/UENF 513, CF/UENF 518, CF/UENF 52, CF/UENF 528; From this study, the CF/UENF 511, CF/UENF 512, CF/UENF 518, CF/UENF 525 and CF/UENF 528 isolates are the most suitable for use in genetic resistance studies.

Keywords: *Ananas comosus*; *Fusarium guttiforme*; genetic resistance.

1. INTRODUÇÃO

Originário da América do Sul, o abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) pertence à família Bromeliaceae. É uma frutífera de clima tropical e subtropical muito apreciada mundialmente pela sua elevada importância social e econômica, além disso, o seu aroma e sabor são singulares, podendo ser utilizada tanto *in natura* quanto industrializada (França-Santos et al., 2009; Souza, 2011).

No Brasil, está entre as seis frutíferas mais cultivadas, com área plantada de 65.049 ha em 2020 (IBGE, 2022), tendo alta relevância econômica para o agronegócio brasileiro. A cultura apresenta ainda importância social pela geração de emprego e renda, contribuindo para a permanência do homem no campo, evitando, assim, o êxodo rural (Matos e Reinhardt, 2009). Contudo um dos problemas fitossanitários que mais interferem na produtividade são as doenças ocasionadas pela presença de microrganismos como os fungos, que atuam reduzindo o desenvolvimento e a qualidade dos frutos (Granada et al., 2004; Stepien et al., 2013; Berilli et al., 2014; Matos, 2019).

A doença mais importante do abacaxizeiro é a fusariose, também conhecida como gomose ou resinose, causada pelo agente etiológico *Fusarium guttiforme* Nirenberg e O'Donnell (Aquiye et al., 2010). Esse fungo pode infectar mudas e frutos durante as fases de inflorescência e crescimento, com perdas estimadas de 20% em mudas e de 30 a 40% nos frutos, acarretando redução na produtividade e na longevidade da cultura (Ventura e Costa, 2010). Os principais sintomas nos frutos incluem descoloração marrom clara a escura do fruto,

exsudação de goma, casca seca, podre ou afundada na parte infectada. Na planta, as folhas infectadas apresentam podridão seca, exsudação de goma, necrose, curvatura do caule e clorose (Rohrbach e Schmitt, 1998).

Para reduzir a fusariose, são feitas a integração de práticas culturais e o controle químico. A primeira etapa a ser feita é o uso de mudas saudáveis para instalação de novos plantios, inspeções periódicas, erradicação de plantas com sintomas e eliminação de restos culturais. Já o controle químico é feito por pulverizações iniciadas 40 dias após a indução floral, posteriormente a aplicação é feita a cada 15 dias após o fechamento total das flores (Sanchez e Matos, 2013). Mas tal ação encarece os custos de produção e reduz a qualidade que o mercado demanda em razão da presença de resíduos de produtos agroquímicos em frutos, colocando em risco a saúde dos consumidores. Por outro lado, o uso de cultivares resistentes obtidas via programas de melhoramento genético é uma estratégia de elevado potencial no controle da doença, principalmente por reduzir os custos de produção, obtenção de frutos livres de resíduos de fungicidas e não ocasionar danos ao meio ambiente (Matos e Cabral, 2005; Vilaplana et al., 2018).

Para o abacaxizeiro, essa estratégia é de fundamental importância em virtude da alta suscetibilidade das atuais variedades comerciais à fusariose. No entanto, antes de iniciar um programa de melhoramento, torna-se oportuno a mensuração da variabilidade dos patógenos que atuam nesse patossistema. Com isso, testes morfológicos e moleculares são utilizados para caracterizar a diversidade de isolados e identificar qual patógeno está infectando a cultura, haja vista que espécies de *Fusarium* podem apresentar variabilidade genética (Ranganathan e Balajee, 2000). Estes estudos são de suma importância para os programas de melhoramento visando à resistência a doenças e a determinar estratégias que definem fontes de resistência ao patógeno.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Obter e caracterizar isolados de *Fusarium* associados à fusariose do abacaxizeiro, na região Norte Fluminense, por meio de análise morfológica, filogenética e patogênica.

2.2. Específicos

- Caracterizar as espécies de isolados de *Fusarium* associados à fusariose por meio de características morfológicas;
- Verificar a patogenicidade dos isolados em frutos e folhas D de abacaxizeiro; e
- Inferir as relações filogenéticas de isolados de *Fusarium* associados ao abacaxizeiro.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Origem, aspectos botânicos e propagação da espécie *Ananas comosus* L. Merrill

O abacaxizeiro é uma angiosperma monocotiledônea, herbácea, perene, que pode alcançar 1,5 m de altura (Ferreira et al., 2011), pertencente à família Bromeliaceae, compreendendo 56 gêneros e 3.000 espécies (Versieux e Wendt, 2007). A maioria das cultivares de abacaxizeiro pertence à espécie *Ananas comosus* L. Merrill, planta alógama, diploide, com $2n=2x=50$ cromossomos (Cotias-de-Oliveira et al., 2000). A planta caracteriza-se por ter caule grosso e curto, cujas folhas se desenvolvem ao redor em forma de calhas, nessa mesma haste saem raízes adventícias que configuram um sistema radicular fasciculado que pode chegar até 30 cm (Zamperlini, 2010).

O centro de origem global da cultura do abacaxi está localizado na América Tropical e Subtropical. O Brasil é um dos maiores centros de diversidade genética de abacaxi do mundo, podendo ser encontrado na forma silvestre ou cultivada. As cultivares mais utilizadas no país são Pérola, seguida por Smooth Cayenne, Jupi e MD-2 (Matos et al., 2009; Santos et al., 2014). Existe também um incremento na produção de híbridos resistentes à fusariose como a BRS Imperial e BRS Vitória (Cunha, 2007; Clement et al., 2010; Berilli et al., 2011).

As folhas do abacaxizeiro são denominadas conforme seu formato e posição, sendo classificadas da mais externa para interna como A, B, C, D, E e F,

entre elas, a folha D é essencial do ponto de vista de análise por ser a mais comprida e jovem dentro das adultas e fisiologicamente mais ativa na planta (Oliveira et al., 2011; Oliveira et al., 2015). Ademais, outra característica preponderante nesse gênero é a presença de frutos do tipo sincarpo, formado pela aderência de frutos individualmente unidos uns aos outros (Reinhardt, 2000). O fruto do abacaxizeiro é caracterizado por um aglomerado de pequenos frutos denominados gomos em volta de um eixo central, sendo cada “olho” da casca do abacaxi um fruto autêntico proveniente de uma flor, e essa fusão é chamada de infrutescência, no topo é formada a coroa (Sanches e Matos, 2013).

A propagação do abacaxizeiro pode ser feita de forma sexuada por sementes e assexuada por mudas, utilizando a coroa, filhote, rebentão, filhote rebentão. Também pode ser propagado principalmente pela destruição do meristema apical, seccionamento do caule, cultura de tecidos e tratamento químico durante a diferenciação floral (Moraes et al., 2007; Reinhardt et al., 2018). Contudo, comercialmente, a propagação sexual não é viável, pois as sementes geralmente são abortadas em razão de as variedades de abacaxi serem autoincompatíveis e/ou apresentarem baixa fertilidade (Cabral et al., 1999, 2003). De acordo com D'Eeckengrugge et al. (1993) e Leal (1995), a autoincompatibilidade no abacaxi se deve à inibição do crescimento do tubo polínico após a fecundação, que é determinada pelo sistema gametofítico, controlado pelo loco S com múltiplos alelos. Segundo esses autores, a ocorrência natural de formação de sementes em algumas variedades é decorrente da autocompatibilidade, sendo a polinização feita por aracnídeos, insetos ou pássaros.

3.2. Importância socioeconômica

O abacaxizeiro tem elevada importância econômica e social, é uma cultura plantada em mais de 60 países, os maiores produtores mundiais de abacaxi, em milhões de toneladas, são: Filipinas (2,70), Costa Rica (2,62), Brasil (2,45), Indonésia (2,44), China (2,22), Tailândia (1,53) e Nigéria (1,50). A produção do Brasil está distribuída em uma área colhida de 64.787 mil ha (FAO, 2022). Os maiores produtores brasileiros são Minas Gerais, Paraíba, Pará e Rio de Janeiro. A região Norte Fluminense responde por quase a totalidade da produção do

estado do Rio de Janeiro, destacando-se os municípios de São Francisco de Itabapoana, Campos dos Goytacazes e São João da Barra (IBGE, 2022).

Entre as várias cultivares de abacaxi, estima-se que 70% da produção mundial seja proveniente da variedade Smooth Cayenne. No Brasil, a variedade mais plantada é a Pérola, a mais consumida em virtude das suas características superiores de polpa e açúcares. Além da variedade Pérola, a variedade Smooth Cayenne também é plantada, essa cultivar atende o mercado externo, que tem preferência por polpa de cor mais intensa e sabor ácido (Cabral, 1999; Granada et al., 2004, Santos et al., 2014).

A agroindústria do abacaxi tem tido amplo avanço por ser consumido de diversas formas como *in natura*, cristalizada, congelada, enlatada, compotas, polpas, sorvetes, em picles, bolos, cremes, xarope, vinho, licor, vinagre e aguardente, além de servir de matéria-prima para extrair álcool e ração animal (Tsuji, 2012; Benitez et al., 2012).

O abacaxizeiro também tem grande importância por absorver mão de obra do meio rural, gerando fonte de renda e propiciando a permanência do homem no campo, evitando, dessa forma, o êxodo rural (Teixeira, 2001). Além disso, a cultura é responsável pela geração de empregos nas indústrias de beneficiamento do fruto (Souza e Souza, 2000; Reinhardt e Alves, 2003; Parente et al., 2014; Pereira et al., 2015).

3.3. Diversidade genética e o melhoramento de plantas

O melhoramento genético do abacaxizeiro no mundo tem como principais objetivos desenvolver cultivares mais produtivas e de qualidade superior de fruto. Brasil, os programas de melhoramento visam ao desenvolvimento de híbridos resistentes à fusariose, também com características físico-químicas e sensoriais de acordo com as necessidades dos consumidores (Viana et al., 2013).

Morfologicamente, buscam-se genótipos com crescimento acelerado, rebentão precoce fixado na base da planta, folhas com poucos espinhos ou ausência nas extremidades dos seus bordos, fruto cilíndrico, casca amarela, pouco fibrosa, alto teor de sólidos solúveis totais (brix maior que 16°), acidez moderada, elevado teor de ácido ascórbico e coloração mais atrativa, genótipos

com capacidade para uso ornamental e adaptável ao sistema de produção integrado (Cabral et al., 1999; Cunha, 2007; Viana et al., 2013; Berilli et al., 2014).

Além da fusariose, a cultura do abacaxi tem outras questões que devem ser objeto de estudo em programas de melhoramento, incluindo a murcha ligada à cochonilha (*Dysmicoccus brevipes*) e a identificação de genótipos tolerantes à floração natural, pois são impasses de interesse econômico (Cabral et al., 1999). Segundo Crestani et al. (2010), os primeiros trabalhos sobre o melhoramento genético do abacaxizeiro foram feitos na Flórida (EUA) a partir da década de 70, objetivando obter cultivares mais adaptadas às condições locais e melhorar a qualidade do fruto para industrialização. Posteriormente, outras pesquisas foram desenvolvidas no Havaí (EUA), Austrália, Taiwan, Filipinas, Malásia, África do Sul, Porto Rico, Brasil, Venezuela, Okinawa, Cuba, Costa do Marfim e Martinica (D'Eeckengrugge e Leal, 2003; Crestani et al., 2010).

No Brasil, o maior programa de melhoramento genético do abacaxizeiro é desenvolvido pela Empresa de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Mandioca e Fruticultura), situada em Cruz das Almas (BA), desde 1978 (Cabral et al., 1999; Crestani et al., 2010). A empresa mantém mais de 600 acessos no banco de germoplasma, divididos em espécies e variedades botânicas do gênero *Ananas*. Esse acervo tem potencial para identificar e gerar novas cultivares em razão da significativa variabilidade genética. Pesquisas sobre a variação podem auxiliar os programas de melhoramento com o objetivo produzir novos híbridos comestíveis e ornamentais (Souza et al., 2012).

Grande parte dos programas de melhoramento do abacaxizeiro faz cruzamentos entre grupos distintos e de interesse econômico para obtenção de híbridos viáveis, além de explorar a heterose. É comum uma grande produção de populações híbridas, cujos cruzamentos envolvem uma cultivar local e um parental que apresente característica de interesse a ser incorporada na cultivar local, para assim aumentar as chances de sucesso na seleção de genótipos promissores.

A seleção deve ser baseada em metodologias que possam reproduzir os sintomas da fusariose por meio de testes com inoculação controlada do patógeno no hospedeiro, para assimilar os aspectos fitopatogênicos dos fungos. Assim, a caracterização de genótipos com o objetivo de avaliar a variabilidade genética é a primeira etapa para definir qual estratégia será adotada para iniciar um programa

de melhoramento, que tem como objetivo desenvolver cultivares resistentes à fusariose e, com isso, reduzir perdas na produção (Castro et al., 2008).

3.4. Fusariose do abacaxizeiro

A fusariose, também conhecida como resinose fúngica ou gomose, ganha destaque por ser a doença mais importante e destrutiva do abacaxizeiro (Souza et al., 2016), provocando perdas de até 20% em mudas e de 30 a 40% nos frutos, podendo alcançar 100% da produção (Ventura et al., 2009; Matos et al., 2011). A doença foi relatada a nível mundial pela primeira vez na Argentina em 1954 (Rohrbach, 1994). No Brasil, foi encontrada em São Paulo, na variedade Smooth Cayenne, tendo sido associada à *Fusarium* sp., e se dispersou para todas as regiões produtoras por meio do material propagativo infectado. Adiante, o patógeno foi identificado como *Fusarium moniliforme* Sheld. var. *subglutinans* Wr. e Reink. (Pissarra et al., 1979).

Em 1983, após a observação das características fisiológicas e morfológicas, o agente etiológico do abacaxizeiro foi classificado como *Fusarium subglutinans* (Wollenw. e Reinking) P. E. Nelson, Toussoun e Marasas (Ploetz, 2001). Adiante, isolados de *F. subglutinans* de abacaxizeiro e de outros hospedeiros foram submetidos a testes de inoculação cruzada, tendo sido constatado que a população que causa essa doença no abacaxizeiro é específica, o que resultou em uma *forma specialis*, classificada como *F. subglutinans* f. sp. *ananas* Ventura, Zambolim e Gilbertson (Ventura et al., 1993).

Posteriormente, foram feitas análises de sequências de DNA de fragmentos dos genes que codificam a menor subunidade mitocondrial (mtSSU) do DNA ribossômico (rDNA), β -tubulina (*tub2*), calmodulina (*cmdA*) e fator de alongamento de tradução 1- α (*tef1*) e a subunidade 28S do rDNA, tendo sido constatado que o agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro pertence a uma única espécie, que foi chamada *Fusarium guttiforme* Nirenberg e O'Donnell (Nirenberg e O'Donnell, 1998). Jacobs et al. (2010) avaliaram isolados de *Fusarium* obtidos em frutos de abacaxizeiro do Brasil e da África do Sul, assim como também outras espécies do complexo *Gibberella fujikuroi* (GFSC). Após análises de relações filogenéticas e morfológicas, constatou-se que isolados africanos representam uma espécie diferente dos isolados brasileiros, tendo sido

classificada como *Fusarium ananatum* sp. nov. Os sintomas relacionados à *F. guttiforme* e *F. ananatum* eram semelhantes, porém menos severos em *F. ananatum*.

Yilmaz et al. (2021) redefiniram os limites das espécies pertencentes ao FFSC, tendo feito análises morfológicas e filogenéticas baseadas em fragmentos parciais dos genes *tub2*, *cmdA*, *tef1*, a maior subunidade da RNA polimerase (*rpb1*) e a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*rpb2*). Como resultados, identificaram três novas espécies, as quais foram delimitadas no FFSC. Duas dessas filoespécies foram agrupadas no clado africano e uma no clado americano. Epítomos também foram denominados para seis espécies de FFSC anteriormente descritas, abrangendo *F. proliferatum* e *F. verticillioides*, e um neótipo designado para *F. subglutinans*. Ademais, tanto *F. acutatum* e *F. ophioides*, publicados anteriormente de forma inválida, foram validados.

Embora ainda não haja conhecimento da sua fase teleomórfica, o *F. guttiforme* faz parte do complexo FFSC, o qual se refere a um conjunto particular de espécies de *Fusarium* que têm características morfológicas similares, o que dificulta sua diferenciação. O complexo é formado por 12 espécies biológicas com o teleomorfo descrito (Nirenberg e O'donnell, 1998; Jacobs et al., 2010; Hove et al., 2011; Scauflaire et al., 2011). De acordo com Ventura (2000), a espécie produz macroconídios hialinos, caracterizados por terem células basais e apicais diferenciadas, que são utilizadas na taxonomia das espécies. O gênero também tem microconídios, geralmente ovoides ou cilíndricos, porém as características principais deste patógeno são a produção de microconídios em polifiálides, sempre em falsas cabeças, e ausência de clamidósporo. Em meio nutritivo de batata-dextrose-ágar, *F. guttiforme* apresenta inicialmente um micélio branco, que passa a rosa alaranjado, alcançando, algumas vezes, coloração violeta.

A fusariose é uma das doenças mais graves do abacaxizeiro, pois ela ocorre em todos os estádios de desenvolvimento, infectando mudas e principalmente os frutos, podendo também afetar toda a planta. Em estágio de desenvolvimento vegetativo, os sintomas caracterizam-se por lesões no terço inferior do caule e nas folhas dessa área com infecção restrita na parte basal não clorofilada. Os tecidos da região clorofilada tornam-se mais resistentes quando atingem a maturidade. Após o desenvolvimento da lesão no caule, acontece uma redução no fluxo da seiva, resultando em clorose, murcha, enfezamento e morte

de planta. Ademais, a planta infectada consegue expressar também sintomas como redução no comprimento das folhas, morte do meristema apical, encurtamento e curvatura do caule, afunilamento da planta e morte (Ventura e Zambolim, 2002; Joy e Sindhu, 2012).

No material propagativo, os sintomas mais comuns são lesão no caule, infecção na parte aclorofilada e exsudação de goma. No fruto, incluem descoloração marrom claro a escuro, casca seca, apodrecimento na região infectada e exsudação da goma (Jacobs et al., 2010). O período crítico para infecção acontece após a indução floral até o final da antese. A associação de temperaturas abaixo de 23°C com elevadas precipitações pluviais durante a indução floral até a colheita propicia a incidência da doença (Ventura e Zambolim, 2002; Matos e Reinhardt, 2009; Joy e Sindhu, 2012).

Semelhante ao que foi observado na África do Sul, distintas espécies de *Fusarium* podem estar ligadas à fusariose do abacaxizeiro no Brasil em razão da elevada diversidade e de diferentes linhagens filogenéticas detectadas pelos genes *tef1*, *tub2* e *cmdA* em populações brasileiras (Soares, 2011; Tsuji, 2012). Todavia, estes estudos não foram finalizados, dessa forma, o *F. guttiforme* é o patógeno da fusariose do abacaxizeiro no Brasil, mas não absolutamente o único.

3.5 Caracterização Molecular

Os fungos fitopatogênicos são caracterizados por pertencerem a um grupo no qual os organismos têm morfologia e posicionamento filogenético diversificado (Massola Júnior e Krugner, 2018). Com isso, a caracterização molecular foi utilizada para suprir os obstáculos encontrados nas análises taxonômicas com o uso de métodos tradicionais (Marin-Felix et al., 2017; Marin-Felix et al., 2019).

Para a caracterização molecular de espécies de *Fusarium*, são comumente usadas a impressão digital genética (Klittich et al., 1997; Savelkoul et al., 2001) e técnicas de sequenciamento de DNA (Schilling et al., 1996; Kristensen et al., 2005) para identificação de espécies. Ambas as técnicas são baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) (Guarro et al., 1999) para determinar a variação entre as espécies e fornecer as informações sobre relações genéticas, taxonomia, estrutura populacional, epidemiologia e identidade de espécies, forma *specialis*, raças e cepas (Donaldson et al., 1995).

A impressão digital de DNA é comumente empregada para investigar a variabilidade genética dentro da população fúngica, especialmente quando associada a doenças. A maioria das técnicas comuns de impressão digital de DNA são DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) (Guarro et al., 1999), comprimento do fragmento amplificado polimorfismo (AFLP) (Savelkoul et al., 1999; Groenewald et al., 2006) e combinação de comprimento de fragmento de restrição análises de polimorfismo (RFLP) e PCR (RFLP-PCR) (Guarro et al., 1999; Taylor et al., 1999).

As espécies dentro de um complexo podem ser distinguidas com base em informações de sequência de DNA e análise filogenética (Kvas et al., 2009). A análise filogenética é usada para estudar a taxonomia de muitos fungos ou a relação de um grupo de fungos, de ancestral a seu descendente. A relação evolutiva entre os grupos de fungos pode ser prevista a partir da árvore filogenética (Leslie e Summerell, 2006).

A análise filogenética possibilita a taxonomia através do arranjo de dois ou mais genes que tenham sinal filogenético. Este conjunto de dados pode ser empregado para inferências filogenéticas e/ou estudos de populações. A análise filogenética provou ser bastante útil para delimitar com precisão espécies do gênero *Fusarium*, assim, o conceito de espécie filogenética revolucionou a taxonomia de fungos (O'Donnell et al., 2010).

Para identificação e a relação filogenética de espécies de *Fusarium*, a similaridade de sequência de um ou mais loci é importante para distinguir as espécies (Leslie et al., 2007). Genes e regiões comuns são utilizados para fazer essa distinção, entre eles, a região do espaçador interno transcrito (ITS), β -tubulina, *tef-1 α* , região espaçadora intergênica (IGS), tipos de acasalamento (MAT-1, MAT-2), calmodulina e histona H3 (Hennequin et al., 1999; Rakeman et al., 2005).

O complexo de espécies de *Fusarium fujikuroi* (FFSC) inclui mais de 60 espécies filogenéticas (filoespécies) com importância fitopatológica e clínica. Devido à sua relevância econômica, uma taxonomia e nomenclatura estáveis são cruciais para as espécies no FFSC. No entanto várias espécies filogeneticamente distintas dentro deste complexo ainda não foram oficialmente nomeadas (Yilmaz et al., 2021).

O estudo filogenético baseado em múltiplos genes tem sido amplamente utilizado, especialmente para determinar as espécies em FFSC (O'Donnell et al., 1998; O'Donnell et al., 2000). O'Donnell et al. (1998) utilizaram sequências de β -tubulina, região ITS2 e mtSSU rDNA, para analisar 45 espécies dentro deste complexo de espécies. Análise filogenética de combinação conjuntos de dados revelou que 26 foram resolvidos como novas espécies filogenéticas. Por sequenciamento do gene *tef-1 α* , *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. cf. bullatum*, *F. thapsinum* e dois isolados foram identificados como novas espécies de *Fusarium* (Rahjoo et al., 2008). Sequências de ITS, região IGS e β -tubulina têm sido utilizadas para estudar relação filogenética de *F. poae*, *F. sporotrichioides* e *F. langsethiae*.

Espécies do complexo FFSC e culturas representativas de várias espécies foram examinadas combinando análises morfológicas e filogenéticas com base em fragmentos parciais de genes do *tef-1 α* , β -tubulina, calmodulina (*cmdA*), RNA a maior subunidade da polimerase (*rpb1*) e a segunda maior subunidade da RNA polimerase (*rpb2*). Com base nesses resultados, três novas espécies foram delimitadas no FFSC (Yilmaz et al., 2021).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Avaliação da variabilidade dos isolados de *Fusarium*

4.1.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido na Clínica Fitossanitária da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, localizada em Campos dos Goytacazes – Rio de Janeiro.

4.1.2 Coleta dos Isolados

Frutos de abacaxizeiro com sintomas de fusariose, dos quais foram obtidos os isolados, foram coletadas em algumas localidades produtoras de abacaxi nos municípios de Campos dos Goytacazes e São Francisco de Itabapoana (Tabela 1). Os frutos com sintomas característicos da doença foram coletados aleatoriamente entre os meses de maio e junho de 2020, identificados e acondicionados até o momento do isolamento monospórico.

Tabela 1. Origem dos isolados obtidos de frutos de abacaxizeiro.

Isolado	Local de coleta
CF/UENF 511 - F1	Imburi de Campos - São Francisco de Itabapoana
CF/UENF 512 - F2	Imburi de Campos - São Francisco de Itabapoana
CF/UENF 513 - F3	Imburi de Campos - São Francisco de Itabapoana
CF/UENF 514 - F4	Alegria dos Anjos - São Francisco de Itabapoana
CF/UENF 515 - F5	São Paulinho - São Francisco de Itabapoana
CF/UENF 516 - F6	Santa Rita - São Francisco de Itabapoana
CF/UENF 517 - F7	Faxina (Local I) - São Francisco de Itabapoana
CF/UENF 518 - F8	Faxina (Local II) - São Francisco de Itabapoana
CF/UENF 519 - F9	Bom Jardim (Local I) - São Francisco de Itabapoana
CF/UENF 520- F10	Bom Jardim (Local II) - São Francisco de Itabapoana
CF/UENF 521 - F11	Travessão de Barra - São Francisco de Itabapoana
CF/UENF 522 - F12	Volta Redonda - São Francisco de Itabapoana
CF/UENF 523 - F13	Barra de Itabapoana (Local I) - São Francisco de Itabapoana
CF/UENF 524 - F14	Barra de Itabapoana (Local II) - São Francisco de Itabapoana
CF/UENF 525 - F15	Valão Seco - São Francisco de Itabapoana
CF/UENF 526 - F16	Quatro Bocas - São Francisco de Itabapoana
CF/UENF 527 - F17	Retiro (Local I) - São Francisco de Itabapoana
CF/UENF 528 - F18	Retiro (Local II) - São Francisco de Itabapoana
CF/UENF 529 - F19	Assentamento Zumbi V (Local I) - Campos dos Goytacazes
CF/UENF 530 - F20	Assentamento Zumbi V (Local II) - Campos dos Goytacazes
CF/UENF 531 - F21	Assentamento Zumbi V- Campos dos Goytacazes
CF/UENF 532 - F22	Assentamento Zumbi V- Campos dos Goytacazes

4.1.3 Isolamento de *Fusarium* em frutos de abacaxizeiro

Para o isolamento do fungo, os segmentos de frutos lesionados foram inicialmente desinfestados superficialmente por imersão em álcool 70% por um minuto, solução de hipoclorito de sódio a 1%, água destilada esterilizada. Posteriormente, os fragmentos foram secos em papel filtro e transferidos para meio BDA (batata dextrose e ágar), onde permaneceram por sete dias, a temperatura de 25 °C. Após este período, foi feita a identificação do agente causal por observação microscópica. Uma vez identificado o agente causal, foram obtidas as culturas monospóricas dos isolados, com o intuito de purificar a estipe. As culturas monospóricas obtidas dos isolados foram armazenadas em tubos de ensaio com meio de BDA em refrigerador (10 °C).

4.1.4 Caracterização morfológica dos isolados de *Fusarium*

Os isolados foram caracterizados morfológicamente quanto à coloração, crescimento micelial e produção de conídios, utilizando o meio nutritivo Batata Dextrose Ágar - BDA (200 g de batata, 20 g dextrose, 20 g de ágar e 1000 ml de água destilada). O experimento foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizados (DIC), com três placas, sendo cada repetição composta por uma placa contendo meio BDA e um disco do fungo de seis mm de diâmetro de cultura. O diâmetro dos conídios foi avaliado em meio nutritivo sintético agarizado - SNA (1 g de KH_2PO_4 ; 1 g de KNO_3 ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g de KCl ; 0,2 g de glicose; 0,2 g de sacarose; 20 g de ágar; e 1000 ml de água destilada). As placas permaneceram incubadas em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).

Para a caracterização morfológica, foram avaliados:

4.1.4.1 Coloração das colônias

Os isolados foram cultivados em meio nutritivo BDA, e a avaliação da coloração das colônias foi feita após nove dias de crescimento, observando a frente e o reverso das colônias.

4.1.4.2 Crescimento micelial

O crescimento micelial dos isolados foi mensurado com paquímetro digital, através da média de mensurações do diâmetro da colônia em dois eixos ortogonais, aos nove dias de crescimento, quando o primeiro isolado atingiu o diâmetro total da placa de Petri. Esses isolados foram cultivados em BDA, em temperatura ambiente de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Foram avaliadas, para cada isolado, três placas com colônias do fungo. Cada placa de Petri foi considerada uma repetição.

4.1.4.3 Produção de conídios

A avaliação da produção de conídios dos isolados foi feita sobre o meio de cultura BDA. A análise da produção de conídios foi feita pela contagem de microconídios em câmara de Neubauer ao final de cada avaliação do crescimento micelial. Foram retirados quatro discos de micélio de seis milímetros de diâmetro das bordas das colônias de cada repetição e transferidos para tubos de ensaio

contendo 20 ml de água destilada estéril, agitados para promover o desprendimento dos conídios.

4.1.4.4 Tamanho dos conídios

O tamanho dos conídios foi avaliado nos isolados crescidos em meio nutritivo SNA. Foram mensurados o comprimento e a largura de 25 macroconídios e 25 microconídios, de cada isolado, em lâminas de microscopia coradas com azul de bromofenol. O comprimento e a largura dos conídios foram mensurados utilizando ocular micrométrica tipo Bresser®, acoplada ao microscópio óptico Opton® na objetiva de 20x2x.

4.2 Patogenicidade de isolados

4.2.1 Patogenicidade de isolados em frutos de abacaxizeiro

Frutos sadios de abacaxizeiro foram adquiridos no mercado local para inoculação dos isolados. Os frutos foram desinfetados com hipoclorito de sódio a 1% por três minutos, enxaguados com água destilada esterilizada e secos em temperatura ambiente 25 ± 2 °C.

A inoculação foi feita pelo método de fermento com palito contaminado, tendo três palitos estéreis sido colocados em placas de BDA com um disco do isolado de seis milímetros de diâmetro. As placas foram incubadas a 25 ± 2 °C por sete dias no laboratório até que os palitos estivessem totalmente colonizados por micélios.

Para cada isolado, foram utilizados dois frutos em que foram inseridos três palitos por fruto, obtendo, assim, seis repetições de cada isolado. A inoculação foi feita por um ferimento dos frutos com um palito estéril, com distância de três centímetros para cada ferimento. Em seguida, os palitos colonizados com o micélio foram inseridos na área ferida e deixados intactos até o final do experimento. O controle foi feito com os mesmos frutos que foram inoculados, mas foi utilizado um palito esterilizado, sem inóculo.

Para manter a umidade do local, foram colocados recipientes no ambiente com chumaço de algodão umedecido. Os frutos inoculados foram transferidos para câmara de crescimento a 27 °C, com umidade de 70 a 80%. Duas semanas

após a inoculação, os frutos foram cortados verticalmente e lesões marrons ao redor das áreas inoculadas foram observadas e avaliadas. A avaliação das lesões nos frutos foi baseada na medição do diâmetro da lesão (mm), em dois eixos ortogonais, com o auxílio de paquímetro digital. No final do período de observação, foi feito o reisolamento de *Fusarium* dos frutos infectados para confirmar os postulados de Koch.

4.2.2 Patogenicidade de isolados em folhas D destacadas de abacaxizeiro

Folhas D foram destacadas de plantas sadias de abacaxizeiro para inoculação dos isolados. As folhas foram desinfetadas com hipoclorito de sódio a 1% por três minutos, enxaguadas com água destilada esterilizada e secas em temperatura ambiente 25 ± 2 °C.

A inoculação foi feita pelo método do ferimento com palito contaminado, tendo três palitos estéreis sido colocados em placas de BDA com um disco do isolado de seis milímetros de diâmetro. As placas foram incubadas a 25 ± 2 °C por sete dias no laboratório até que os palitos estivessem totalmente colonizados pelos micélios.

Para cada isolado, foram utilizadas duas folhas em que foram inseridos três palitos por folha, obtendo, assim, seis repetições de cada isolado. A inoculação foi feita pelo ferimento das folhas com um palito estéril, com distância de três centímetros para cada ferimento. Em seguida, os palitos colonizados com o micélio foram inseridos na área ferida e deixados intactos até o final do experimento. O controle foi feito com os mesmos frutos que foram inoculados, mas foi utilizado um palito esterilizado sem inóculo.

Para manter a umidade do local, foram colocados chumaços de algodão umedecido no interior do plástico. As folhas inoculadas foram transferidas para câmara de crescimento a 27 °C, com umidade de 70 a 80%. Duas semanas após a inoculação, foram observadas e avaliadas lesões marrons ao redor das áreas inoculadas. A avaliação das lesões nas folhas foi baseada na medição do diâmetro da lesão (mm), em dois eixos ortogonais, com o auxílio de um paquímetro digital. No final do período de observação, foi feito o reisolamento de *Fusarium* das folhas infectados para confirmar os postulados de Koch.

4.3 Análise estatística

Para produção de conídios e patogenicidade dos isolados, foi testada a normalidade dos resíduos pelo teste Shapiro-Wilk a 5% de significância. Atendendo o pressuposto, foi feita a análise de variância a 5% de significância para o teste F e, quando constatada diferença, foi aplicado o agrupamento de médias pela metodologia do teste de Scott-knott, também a 5% de significância, utilizando o programa R (R Core Team, 2014).

Os dados de crescimento micelial foram analisados utilizando o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, e a comparação de médias foi feita utilizando o teste de Nemenyi a 5% de probabilidade, para tal foi utilizado o programa R (R Core Team, 2014).

4.4 Caracterização molecular

4.4.1 Extração de DNA e Sequenciamento

O DNA genômico dos fungos foi obtido de acordo com o protocolo de extração descrito por Pinho et al. (2013), utilizando o kit comercial da Promega (WizardGenomic DNA Purification Kit). A quantificação ocorreu utilizando fluorimetria (Qubit®), segundo recomendações do fabricante. Após a extração e quantificação, o DNA permaneceu armazenado a -18 °C até sua utilização.

A PCR (*polymerase chain reaction*) das regiões, fator de alongamento de tradução 1- α (*tef1*) e β -tubulina (*tub2*) foram amplificadas usando *primer* e condições estabelecidas por Ibrahim et al. (2017).

O gene *tef1* e *tub2* foram os genes selecionados. Os *primers* usados para região de *tef1* foram Ef-1 (5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') e Ef-2 (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') (O'Donnell et al., 1998). O termociclador foi programado para desnaturação inicial por três minutos a 95 °C; 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C - desnaturação, 30 segundos a 55 °C - anelamento; um minuto a 72 °C - extensão; e a extensão final por um período de 10 minutos a 72 °C.

Para a região *tub2*, foram utilizados os *primers* T1 (5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3') e T2 (5'-TAGTGACCCTTGCCCGAGTTG-3') (O'Donnell et al., 2000), nas condições: desnaturação inicial por dois minutos a 96 °C; 30 ciclos de um minuto a 94 °C – desnaturação, um minuto a 52 °C –

anelamento, 45 segundos a 72 °C – extensão; e a extensão final por período de dez minutos a 72 °C.

Os fragmentos de DNA foram amplificados no termociclador (Veriti® Thermal Cycler). Cada reação continha 50 ng de DNA, tampão PCR 1x, 1.0 U de Taq polimerase, 0,2 µM de *primers*, 0.2 mM de cada dNTP, 1.0 mM de MgCl₂, com o volume final de 25 µl. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados em gel de agarose 1% (p/v) com o marcador de massa Kasvi DNA Ladder, RTU modelo K9-100 L.

Os produtos da PCR ficaram incubados em um termobloco por duas horas a 60 °C até a completa secagem e encaminhados para a empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil), a qual fez a purificação e o sequenciamento.

As sequências de nucleotídeos foram editadas e corrigidas manualmente quando necessário com o auxílio do software DNA Dragon (Hepperle, 2011). O arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas também foi corrigido utilizando as sequências dos *primers* no sentido 5'–3' e 3'–5'. Para a identificação dos isolados, foram obtidas sequências das regiões de *tef1* e *tub2*, oriundas de artigos científicos e depositadas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As análises conduzidas foram baseadas em trabalhos anteriores para o gênero *Fusarium* (Tabela 2).

Tabela 2: Números de acesso do GenBank de sequências de DNA de *Fusarium*.

Espécie	Isolado	<i>tef1</i>	<i>tub2</i>	Hospedeiro	Referências
<i>F. agapanthi</i>	CBS 100193	MW401959	MW402160	<i>Agapanthus praecox</i>	Yilmaz et al., (2021)
	NRRL 54463 ^T	KU900630	KU900635	<i>Agapanthus sp.</i>	Edwards et al. (2016)
<i>F. andiyazi</i>	CBS 119856	MN533989	MN534081	<i>Sorghum grain</i>	Yilmaz et al., (2021)
	CBS 119857 ^T	MN193854	LT996113	<i>Sorghum bicolor soil debris</i>	Laraba et al. (2020)
<i>F. anthophilum</i>	CBS 108.92	MW401965	MW402166	<i>Hippeastrum leaf</i>	Yilmaz et al.,(2021)
	CBS 222.76 ^{ET}	MW402114	MW402312	<i>Euphorbia pulcherrima stem</i>	Yilmaz et al., (2021)
<i>F. awaxy</i>	CBS 119831	MN534056	MN534108	<i>Environmental</i>	Yilmaz et al., (2021)
	LGMF 1930 ^T	MG839004	MG839013	<i>Rotten stalks of Zea mays</i>	Crous et al. (2019)
<i>F. bactridioides</i>	CBS 100057 ^T	MN533993	MN534112	<i>Cronartium conigenum</i>	Yilmaz et al., (2021)
	NRRL 20476	AF160290	U34434	<i>Cronartium conigenum</i>	O'Donnell e Cigelnik (1997),
<i>F. bulbicola</i>	CBS 220.76 ^T	KF466415	KF466437	<i>Nerine bowdenii bulb</i>	Proctor et al. (2013), Yilmaz et al., (2021)
	NRRL 13618	AF160294	U61546	<i>Desconhecido</i>	O'Donnell (1999)
<i>F. circinatum</i>	CBS 405.97 ^T	MN533997	MN534097	<i>Pinus radiata</i>	Yilmaz et al., (2021)
	CBS 100197	MW401960	MW402161	<i>Pinus taeda</i>	Yilmaz et al., (2021)
<i>F. denticulatum</i>	CBS 406.97	MN533999	MN534067	<i>Ipomoea batatas</i>	Yilmaz et al., (2021)
	CBS 407.97 ^T	MN534000	MN534068	<i>Ipomoea batatas</i>	Yilmaz et al., (2021)
<i>F. dlamirii</i>	CBS 175.88	MN534002	MN534138	<i>Zea mays</i>	Yilmaz et al., (2021)
	CBS 119860 ^T	MW401995	MW402195	<i>Vegetação</i>	Yilmaz et al., (2021)
<i>F. fredkrugeri</i>	CBS 408.97	MW402126	MW402324	<i>Solo</i>	Yilmaz et al., (2021)
	CBS 144209 ^T	LT996097	LT996118	<i>Metania acuminada rhizosphere</i>	Sandoval-Denis et al. (2018)
<i>F. guttiforme</i>	CBS 409.97 ^T	MT010999	MT011048	<i>Ananas comosus</i>	Yilmaz et al., (2021)
	NRRL 22945	AF160297	U34420	<i>Ananas comosus</i>	O'Donnell e Cigelnik (1997),
<i>F. konzum</i>	CBS 119847	MW401990	MW402190	<i>desconhecido</i>	Yilmaz et al., (2021)
	CBS 119849 ^T	LT996098	MN534095	<i>Sorghastrum nuttans</i>	Yilmaz et al., (2021)

Tabela 2 – Cont.

Espécie	Isolado	<i>tef1</i>	<i>tub2</i>	Hospedeiro	Referências
<i>F. lactis</i>	CBS 411.97 ^{ET}	MN193862	MN534077	<i>Ficus carica</i>	Yilmaz et al., (2021)
	CBS 420.97	MN534015	MN534078	<i>Ficus carica</i>	Yilmaz et al., (2021)
<i>F. madaense</i>	CBS 146648	MW402095	MW402294	<i>Arachis hypogaea</i>	Yilmaz et al., (2021)
	CBS 146669 ^T	MW402098	MW402297	<i>Arachis hypogaea</i>	Yilmaz et al., (2021)
<i>F. mexicanum</i>	NRRL 47473	GU737416	GU737308	<i>Mangifera indica inflorescence</i>	Otero-Colina et al. (2010)
	NRRL 53147 ^T	GU737282	GU737494	<i>Mangifera indica</i>	Otero-Colina et al. (2010)
<i>F. musae</i>	CBS 624.87 ^T	FN552086	FN545368	<i>Sapientum fruit</i>	Van Hove et al. (2011), Yilmaz et al., (2021)
	CBS 115315	MW401974	MW402174	<i>Man, Tinea corporis</i>	Yilmaz et al., (2021)
<i>F. napiforme</i>	CBS 674.94	MW402145	MW402345	<i>desconhecido</i>	Yilmaz et al., (2021)
	CBS 748.97 ^T	MN193863	MN534085	<i>Pennisetum typhoides</i>	Yilmaz et al., (2021)
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 744.97	AF160312	U34424	<i>desconhecido</i>	O'Donnell e Cigelnik (1997),
<i>F. nygamai</i>	CBS 140.95	MW402075	MW402274	<i>Human immunocompromised blood</i>	Yilmaz et al., (2021)
	CBS 749.97 ^T	MW402151	MW402352	<i>Sorghum bicolor necrotic root</i>	Yilmaz et al., (2021)
<i>F. ophioides</i>	CBS 118510	MN534020	MN534121	<i>Panicum maximum</i>	Yilmaz et al., (2021)
	CBS 118512 ^T	MN534022	MN534118	<i>Panicum maximum</i>	Yilmaz et al., (2021)
<i>F. pilosicola</i>	NRRL 29123	MN534054	MN534098	<i>Bidens pilosa</i>	Yilmaz et al., (2021)
	NRRL 29124 ^T	MN534055	MN534099	<i>Bidens pilosa</i>	Yilmaz et al., (2021)
<i>F. proliferatum</i>	CBS 480.96 ^{ET}	MN534059	MN534129	<i>Papua New</i>	Yilmaz et al., (2021)
	CBS 414.97 ^T	MW402128	MW402326	<i>Zimbabwe</i>	Yilmaz et al., (2021)
<i>F. pseudocircinatum</i>	CBS 449.97 ^T	AF160271	MN534069	<i>Ghana</i>	Yilmaz et al., (2021)
	CBS 455.97	MN534029	MN534070	<i>Papua New</i>	Yilmaz et al., (2021)
<i>F. ramigenum</i>	CBS 418.97 ^T	KF466423	MN534145	<i>Ficus carica</i>	Yilmaz et al., (2021)
	CBS 526.97	MN534032	MN534086	<i>Ficus carica</i>	Yilmaz et al., (2021)

Tabela 2 – Cont.

Espécie	Isolado	<i>tef1</i>	<i>tub2</i>	Hospedeiro	Referências
<i>F. sterilihyposum</i>	NRRL 25623 ^T	MN193869	AF160316	<i>Mango</i>	O'Donnell et al. (2000),
	NRRL 53991	GU737413	GU737305	<i>Mangifera indica</i>	Otero-Colina et al. (2010)
<i>F. subglutinans</i>	CBS 215.76	MN534061	MN534109	<i>Zea mays</i>	Yilmaz et al., (2021)
	CBS 747.97 ^{NT}	MW402150	MW402351	<i>Zea mays</i>	Yilmaz et al., (2021)
<i>F. succisae</i>	CBS 187.34	MW402109	MW402307	<i>Zostera marina</i>	Yilmaz et al., (2021)
	CBS 219.76 ^{ET}	AF160291	U34419	<i>Succisa pratensis flower</i>	O'Donnell e Cigelnik (1997),
<i>F. sudanense</i>	CBS 454.97 ^T	MN534037	MN534073	<i>Striga hermonthica</i>	Yilmaz et al., (2021)
	CBS 675.94	MN534038	MN534074	<i>Striga hermonthica</i>	Yilmaz et al., (2021)
<i>F. temperatum</i>	CBS 135538	MN534039	MN534111	<i>Pulmonary infection (Human)</i>	Yilmaz et al., (2021)
	NRRL 25622	AF160301	AF160317	<i>Zea mays</i>	O'Donnell et al. (2000),
<i>F. terricola</i>	CBS 483.94 ^T	MN534042	MN534076	<i>Soil</i>	Yilmaz et al., (2021)
	CBS 119850	MN534041	MN534075	<i>Soil</i>	Yilmaz et al., (2021)
<i>F. thapsinum</i>	CBS 776.96 ^T	MN534044	MN534080	<i>desconhecido</i>	Yilmaz et al., (2021)
	CBS 100312	MW401961	MW402162	<i>desconhecido</i>	Yilmaz et al., (2021)
<i>F. tupiense</i>	CML345	DQ452861	DQ445783	<i>Mangifera indica</i>	Lima et al. (2012)
	NRRL 53984 ^T	GU737404	GU737296	<i>Mangifera indica</i>	Otero-Colina et al. (2010)
<i>F. verticillioides</i>	CBS 117.28	MW401977	MW402177	<i>Desconhecido</i>	Yilmaz et al., (2021)
	CBS 218.76 ^{ET}	MW402113	MW402311	<i>Zea mays stem</i>	Yilmaz et al., (2021)
<i>F. incarnatum</i>	NRRL 31160	GQ915510	GQ915444	<i>Pulmão humano</i>	Proctor et al (2013)
	CF/UENF 511			<i>Ananas comosus</i>	Este estudo
	CF/UENF 512			<i>Ananas comosus</i>	Este estudo
	CF/UENF 513			<i>Ananas comosus</i>	Este estudo
	CF/UENF 514			<i>Ananas comosus</i>	Este estudo
	CF/UENF 515			<i>Ananas comosus</i>	Este estudo

Tabela 2 – Cont.

Espécie	Isolado	<i>tef1</i>	<i>tub2</i>	Hospedeiro	Referências
	CF/UENF 516			<i>Ananas comosus</i>	Este estudo
	CF/UENF 517			<i>Ananas comosus</i>	Este estudo
	CF/UENF 518			<i>Ananas comosus</i>	Este estudo
	CF/UENF 519			<i>Ananas comosus</i>	Este estudo
	CF/UENF 520			<i>Ananas comosus</i>	Este estudo
	CF/UENF 521			<i>Ananas comosus</i>	Este estudo
	CF/UENF 522			<i>Ananas comosus</i>	Este estudo
	CF/UENF 523			<i>Ananas comosus</i>	Este estudo
	CF/UENF 524			<i>Ananas comosus</i>	Este estudo
	CF/UENF 525			<i>Ananas comosus</i>	Este estudo
	CF/UENF 526			<i>Ananas comosus</i>	Este estudo
	CF/UENF 527			<i>Ananas comosus</i>	Este estudo
	CF/UENF 528			<i>Ananas comosus</i>	Este estudo
	CF/UENF 529			<i>Ananas comosus</i>	Este estudo
	CF/UENF 530			<i>Ananas comosus</i>	Este estudo
	CF/UENF 531			<i>Ananas comosus</i>	Este estudo
	CF/UENF 532			<i>Ananas comosus</i>	Este estudo

tef1 = fator de alongamento de tradução 1- α ; *tub2* = β -tubulina. Isolados obtidos neste estudo estão destacados em negrito.

4.4.2 Filogenia molecular

As sequências consenso dos isolados foram comparadas com as obtidas no banco de dados do GenBank. Posteriormente, foram adicionadas ao conjunto de sequências obtidas no Genbank e exportadas para o software MEGA v. 7 (Nei e Kumar, 2000), onde foram alinhadas pela ferramenta MUSCLE® (Edgar, 2004).

Os modelos de substituição nucleotídica para a análise filogenética foram calculados independentemente para cada região e também para a concatenada (tef1 + tub2), usando o MrModeltest (Posada e Buckley, 2004), e selecionados de acordo com Akaike Information Criterion (AIC), implementado no PAUP v. 4.0b10.

A análise filogenética para cada gene e a concatenada foram geradas pela inferência bayesiana, usando o método de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC). Duas análises simultâneas, cada uma composta por quatro cadeias MCMC, foram conduzidas iniciando as árvores aleatoriamente até 10^7 de gerações. As árvores foram amostradas a cada 1000 gerações, resultando em 10.000 árvores, tendo sido descartadas da análise as primeiras 2500. O valor de probabilidade a posteriori (Rannala e Yang, 1996) da árvore consenso foi calculado com base nas 7500 árvores restantes.

A convergência dos logs de verossimilhança foi analisada com o software TRACER v. 1.4.1 (Rambaut e Drummond 2013). A árvore foi visualizada no software FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2009) e exportada para um programa editor de imagem. A espécie *Fusarium incarnatum* HE647907 foi utilizada como grupo externo (outgroup) nas análises. A análise final concatenada da inferência bayesiana para o gênero *Fusarium* foi gerada na plataforma CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta dos isolados

Nas áreas produtoras, a presença de sintomas no fruto foi mais comum do que nas folhas. Os frutos obtidos estavam com a casca seca, podre e afundada na parte externa, já na parte interna, os sintomas encontrados foram lesões com coloração marrom clara a escura e algumas áreas rosadas. Os isolados foram obtidos pela lesão interna do fruto (Figura 1).

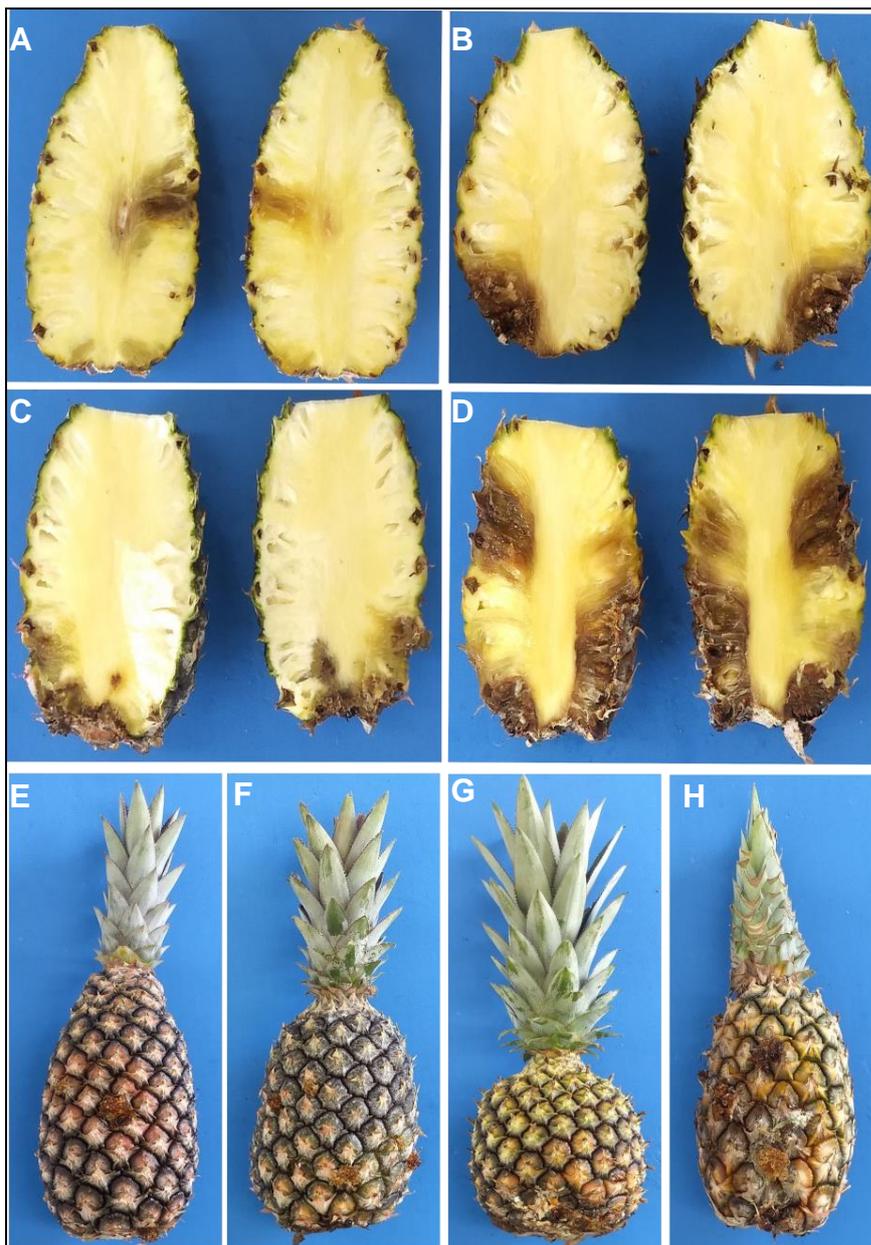


Figura 1. Sintomas da fusariose em frutos de abacaxizeiro. (A, B, C, D) Sintomas internos da fusariose em frutos de abacaxi. (E, F, G, H) Sintomas externos da fusariose em frutos de abacaxi.

5.2 Caracterização morfológica dos isolados

No presente estudo, foi possível observar diferenças entre os isolados de *Fusarium* em aspectos associados à colônia, esporulação, forma dos conídios e à patogenicidade. Entre os 22 isolados avaliados, foram observados padrões semelhantes de coloração na frente e no verso das colônias (Tabela 3).

Tabela 3. Coloração das colônias, diâmetro de macroconídios e microconídios de 22 isolados de *Fusarium*.

Código Isolados	Coloração das colônias		Microconídio			Macroconídio		
	Verso	Reverso	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Septo	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Septo
F1	Rosa	Rosa	5,02 – 12,01	1,05 – 4,06	1	17,09 – 35,05	2,02 – 6,02	1 – 4
F2	Rosa+Branco	Rosa	5,06 – 9,08	1,13 – 4,08	1	14,02 – 37,02	2,05 – 5,06	1 – 7
F3	Rosa	Rosa	6,09 – 10,83	1,51 – 3,85	1	13,01 – 34,83	2,39 – 6,43	1 – 4
F4	Rosa	Rosa	5,26 – 12,15	1,59 – 4,68	1 - 2	17,96 – 35,57	2,25 – 6,23	3 – 6
F5	Rosa	Violeta	6,37 – 11,51	1,26 – 4,86	1 - 2	15,57 – 34,79	2,32 – 5,09	1 – 5
F6	Rosa	Violeta	5,03 – 10,90	2,14 – 3,98	1	14,43 – 42,45	2,39 – 4,47	1 – 3
F7	Branco	Creme	7,13 – 11,44	1,28 – 3,35	1- 2	14,29 – 44,08	1,42 – 4,45	1 – 3
F8	Rosa	Rosa	6,55 – 11,84	2,52 – 4,68	1- 2	14,39 – 23,71	2,95 – 6,21	1 – 4
F9	Rosa	Rosa	5,01 – 11,22	1,36 – 4,56	1	14,11 – 26,34	2,32 – 5,82	1 – 6
F10	Rosa	Rosa	5,54 – 11,71	1,61 – 4,81	1 - 2	15,12 – 39,04	2,94 – 5,97	1 – 5
F11	Rosa	Rosa	6,38 – 10,26	1,51 – 4,54	1- 2	14,08 – 25,21	2,17 – 6,78	1 – 4
F12	Branco	Creme	3,38 – 6,36	1,26 – 3,27	1 - 2	11,39 – 24,24	1,69 – 3,56	2 – 7
F13	Branco	Violeta	4,71 – 9,37	2,03 – 4,78	2	15,37 - 46,26	2,87 – 6,09	1- 5
F14	Rosa	Rosa	6,19 -10,16	1,47 – 4,19	1- 2.	14,08 - 22,45	2,82 – 5,63	1 – 4
F15	Rosa	Rosa	6,36 – 10,15	1,53 – 5,19	1	12,50 – 20,18	2,63 – 5,41	1 – 3
F16	Branco	Violeta	6,22 – 10,44	2,25 – 4,30	1	13,21 – 12,78	2,72 – 5,88	1 – 5
F17	Rosa	Rosa	6,22 – 10,28	2,03 – 4,56	1 - 2	12,47 – 21,25	2,48 - 5.39	1 – 3
F18	Violeta	Violeta	3,78 – 9,93	2,03 – 5,51	1	12,56 – 41,18	2,43 – 4,81	1 – 7
F19	Branco	Violeta	5,07-11,89	1,69 – 4,64	1 - 2	12,31 – 27,50	2,38 – 4,71	1 – 4
F20	Rosa	Rosa	5,88 – 9,81	1,97 – 4,40	1	12,30 – 21,43	1,97 – 5,88	1 – 3
F21	Branco	Violeta	6,32 – 10,88	2,03 – 5,04	1	14,78 – 44,84	2,52 – 6,07	1 – 8
F22	Rosa+Branco	Rosa+Branco	6,37 – 9,56	2,08 – 4,54	1	12,44 – 21,09	2,17 – 5,34	1 – 3

A pigmentação das colônias no verso ficou entre rosa, violeta, branco + rosa e branco, enquanto no reverso das colônias as cores que prevaleceram foram rosa, creme, violeta e branco + rosa (Figura 2). Uma mistura das cores rosa + branco foi encontrada nos isolados F2 e F22 (Tabela 3). A coloração dos isolados F1, F4, F8, F13 e F18 diferenciou-se entre as repetições, o que indica que, para esses isolados, talvez a coloração pode não ser um bom marcador morfológico.

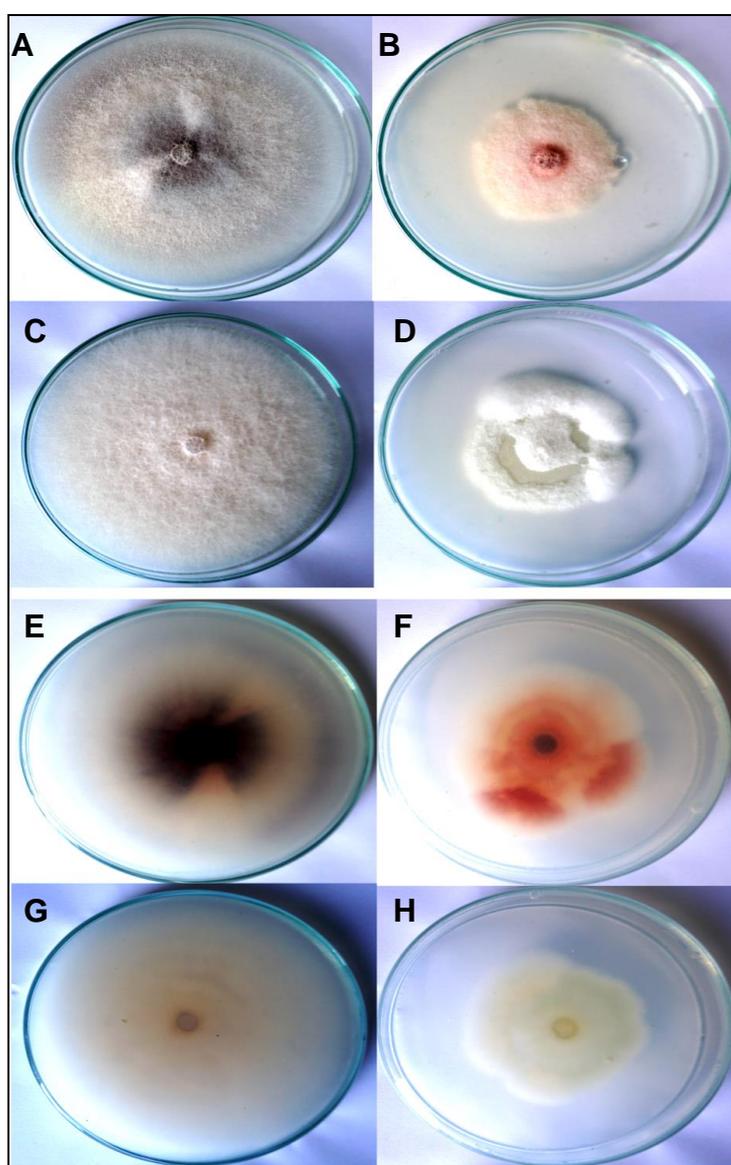


Figura 2. Variação encontrada na coloração das colônias dos 22 isolados de *Fusarium* crescidos em BDA. Verso: (A) violeta; (B) rosa; (C) rosa+branco; (D) branco. Reverso: E) violeta; F) rosa; G) rosa+branco; H) creme.

Todos os isolados formaram macroconídios e microconídios em meio SNA (Tabela 3). Os microconídios mensurados nos isolados tiveram a forma cilíndrica, com um septo na sua maioria, ocorrendo ocasionalmente em alguns isolados a presença de dois septos, exceto para o isolado F7, que teve microconídios com forma levemente curvada (Tabela 3). O tamanho dos microconídios, na maioria dos isolados, variou de 5,02 a 10,90 μm de comprimento. Os isolados F1, F4, F5, F7, F8, F9, F10 e F19 apresentaram uma grande variação no comprimento dos microconídios, com mensuração máxima entre 11-12 μm . Todos os isolados tiveram a largura com uma variação similar entre 1,05 a 5,15 μm .

A forma característica dos macroconídios variou de levemente curvado a quase reto (Figura 3). O número de septos encontrados foi entre um e oito, sendo mais frequente macroconídios com três septos. (Tabela 3). De forma geral, nos 22 isolados, o comprimento e a largura dos macroconídios variaram de 11,39-46,24 μm e 1,42-6,78 μm , respectivamente. Os isolados F6, F7, F13, F18, F21 destacaram-se por exibir macroconídios com tamanho acima de 40 μm de comprimento. Neste estudo, não foi observada produção de clamidósporos entre os isolados avaliados.

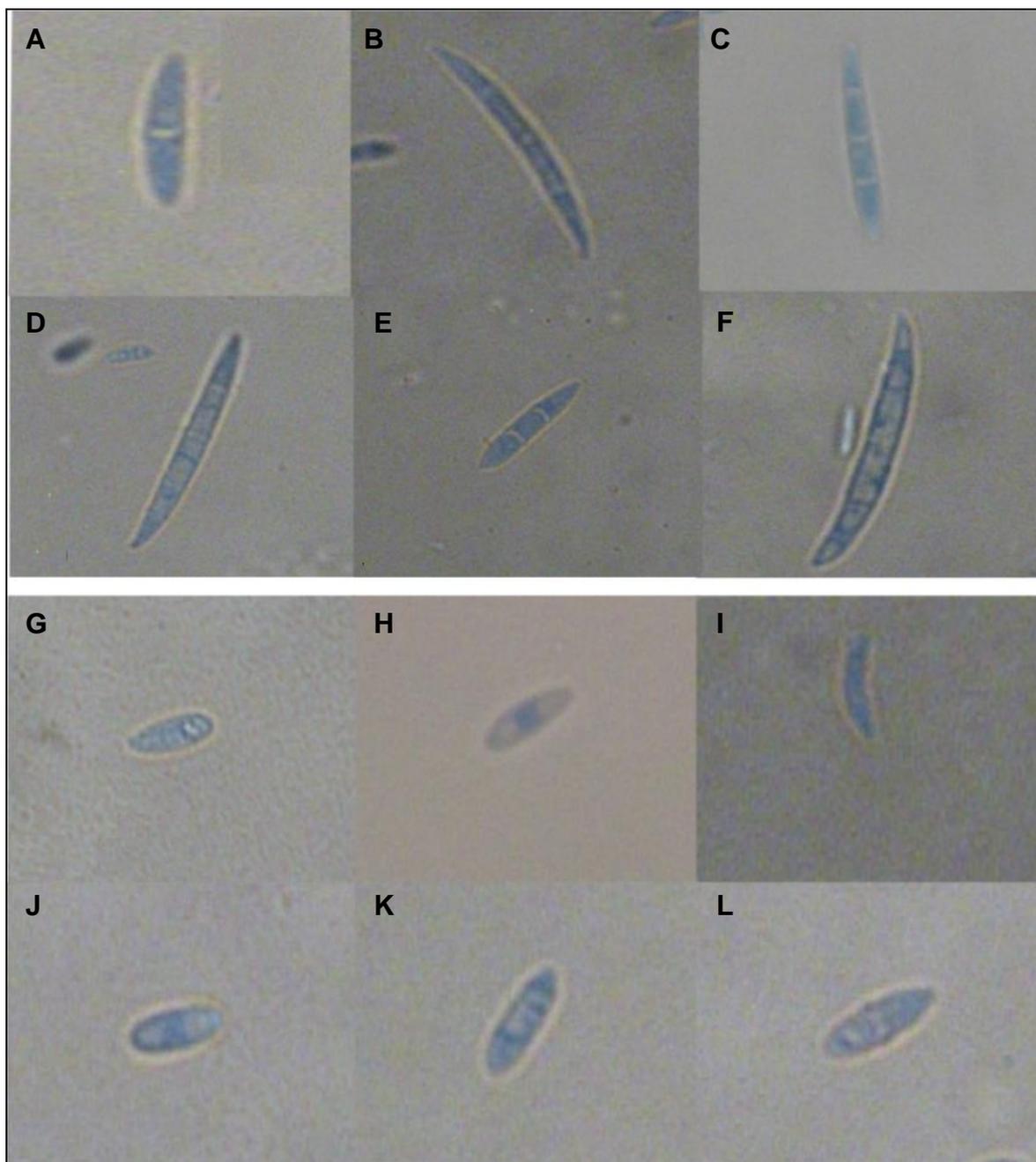


Figura 3. Estrutura reprodutiva (macroconídios e microconídios) dos 22 isolados de *Fusarium* formados em meio SNA. Variação de macroconídios: (A) F3; (B) F5; (C) F6; (D) F10; (E) F11; (F) F21. Variação de microconídios: (G) F2; (H) F4; (I) F7; (J) F15; (K) F19; (L) F22.

De acordo com os resultados de crescimento micelial, verificou-se que, após nove dias de crescimento, o diâmetro das colônias variou de 37,12 a 90 mm. Entre os isolados avaliados, observou-se que 10 tiveram o mesmo padrão de crescimento micelial, tendo os isolados F2, F3, F5, F6, F10, F14, F15, F19, F20 e

F21 atingido o crescimento limite da placa com 90 mm no final do período de avaliação (Figura 4).

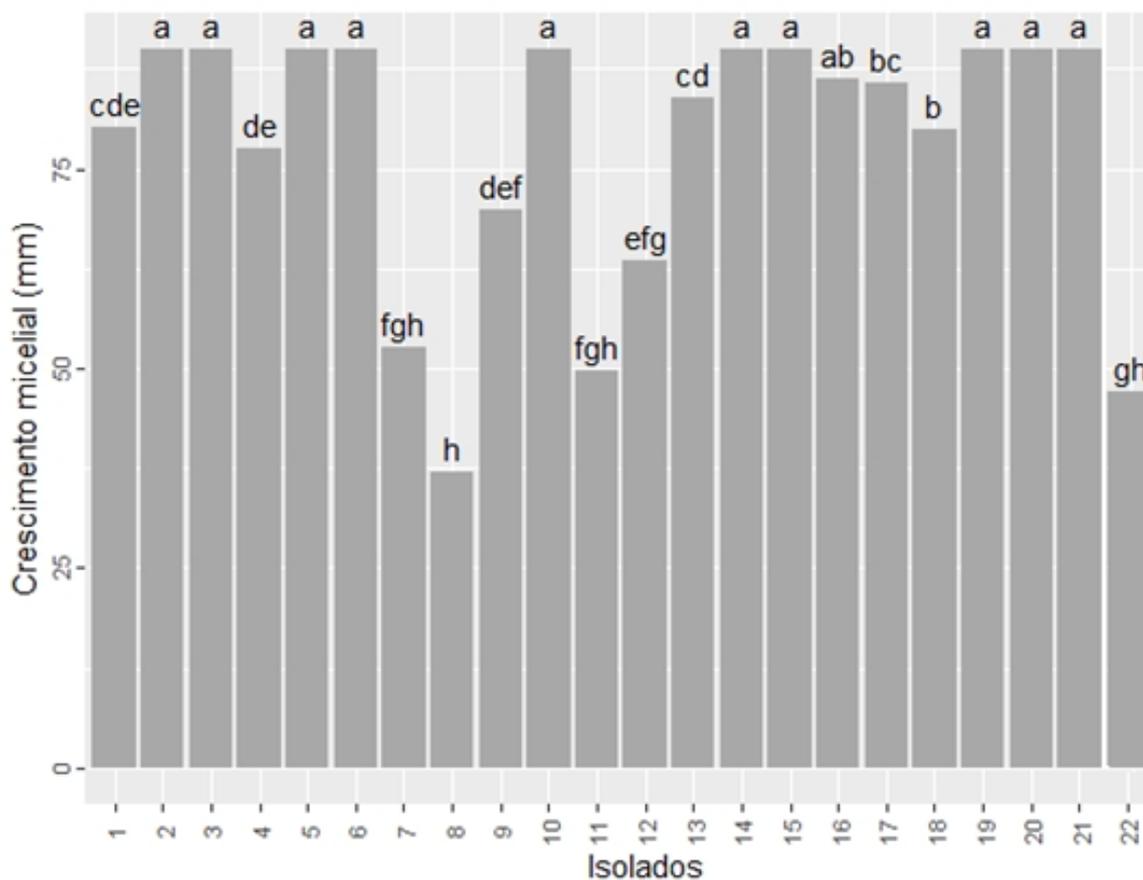


Figura 4. Crescimento micelial (mm) dos 22 isolados de *Fusarium* com nove dias de crescimento, em meio de batata dextrose ágar (BDA). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Nemenyi ao nível de 5% de probabilidade.

Os isolados avaliados tiveram uma grande variação em relação à produção de conídios. É importante salientar que a condição nutricional do meio de cultura e a espécie dos isolados influenciam diretamente na esporulação dos fungos, ou seja, no desenvolvimento de conídios. Considerando o meio nutritivo BDA e o gênero *Fusarium*, o isolado F2 obteve a maior produção de conídios, seguido dos isolados F1, F16, F3, F5, F15, e F18 (Figura 5).

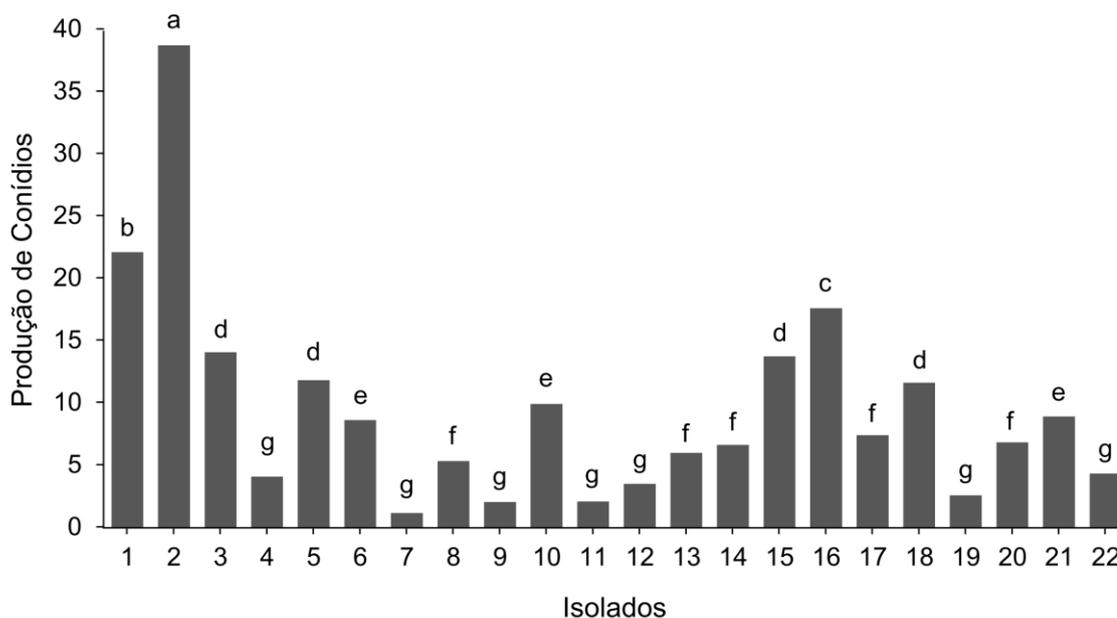


Figura 5. Produção de conídios (10^4 mL^{-1}) dos 22 isolados de *Fusarium*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação às diferenças de coloração das colônias, no estudo feito por Souza et al. (2017) também foram identificadas variações de cores nas colônias de *Fusarium*, as quais variaram de branco para tons de violeta. Segundo Ventura (2000), a variação desta característica é encontrada em estudos deste gênero.

Valores de diâmetro de macroconídios, microconídios e número de septos, assim também de produção de conídios foram semelhantes ao estudo de Stepien et al. (2013). O crescimento micelial *in vitro* em espécies de *Fusarium* é muito variável, devido à influência das condições do ambiente de cultivo.

Os isolados que exibiram maior crescimento micelial em meio BDA não necessariamente foram os mesmos que tiveram maior produção de conídios, com a exceção dos isolados F2, F3, F5 e F15, os quais obtiveram maiores médias de crescimento micelial e produção de conídios, os demais isolados não tiveram esta relação.

5.3 Patogenicidade dos isolados em frutos

Após a inoculação, observou-se que todos os isolados foram patogênicos, causando diferentes diâmetros de lesões de coloração marrom no tecido interno

do fruto, encontradas entre os isolados inoculados (Figura 7). Não foi possível observar sintomas nos tecidos externos dos frutos, embora os isolados tenham sido obtidos de frutos com sintomas de exsudação de resina no tecido externo. O controle utilizado no experimento não apresentou lesões características de *Fusarium*.

Os isolados formaram dois grupos distintos quanto à patogenicidade demonstrada pela quantificação da área lesionada em frutos de abacaxi (Figura 6).

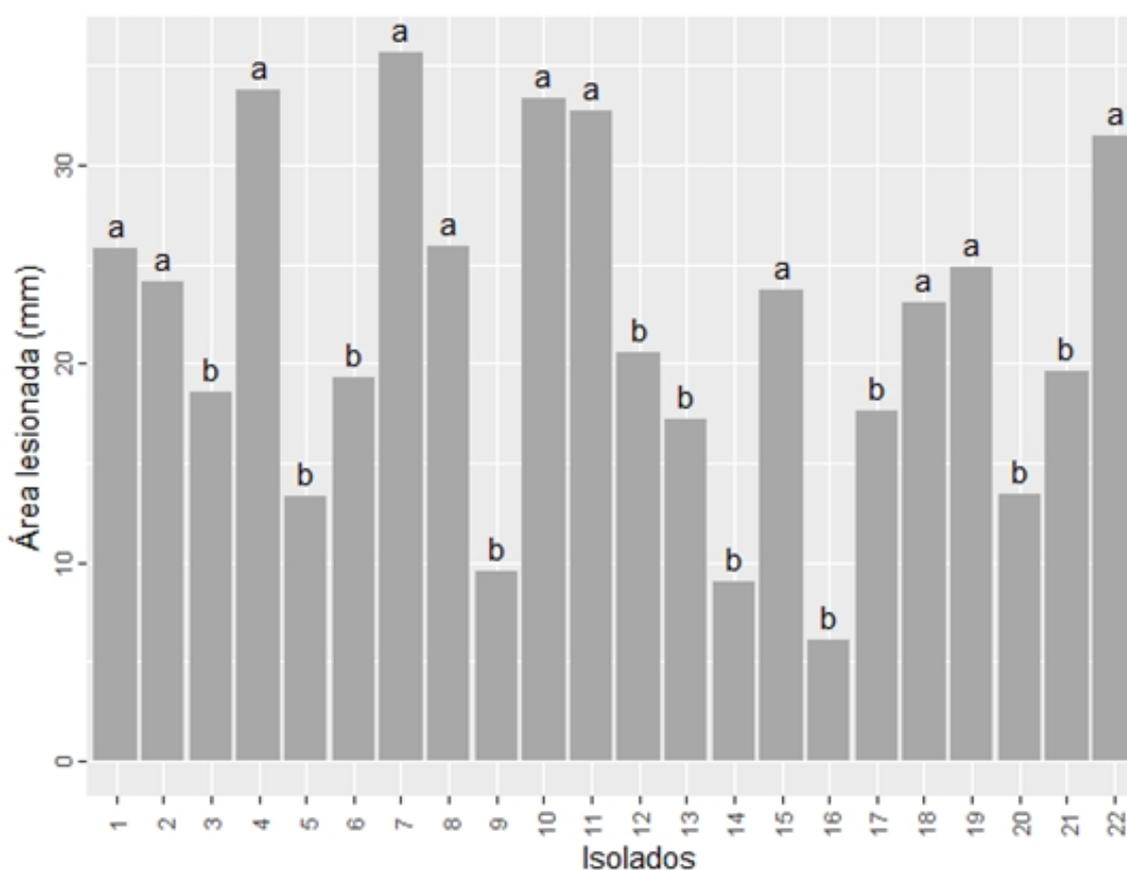


Figura 6. Área lesionada causada por 22 isolados de *Fusarium* em frutos de abacaxi). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

As lesões nos frutos variaram de 6,09 mm, com a menor média para o isolado F16, até isolados considerados os mais agressivos, com média acima de 24,00 mm. Os isolados F1, F2, F4, F7, F8, F10, F11, F15, F18, F19 e F22 mostraram-se mais agressivos, uma vez que tiveram frutos com maior diâmetro

de lesão. Já os isolados F3, F5, F6, F9, F12, F13, F14, F16, F17, F20 e F21 tiveram sintomas no fruto com menor diâmetro da lesão, indicando menor agressividade.

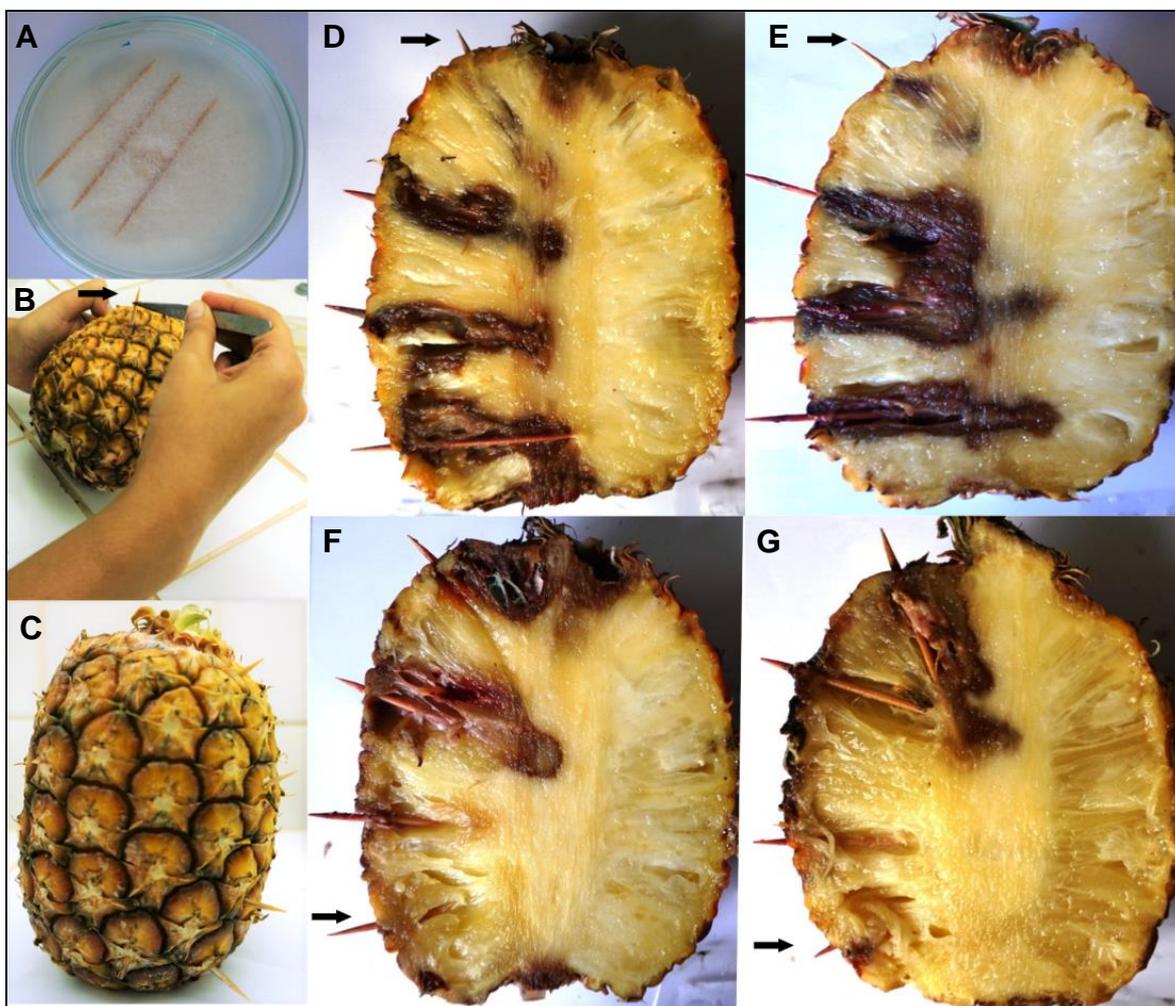


Figura 7. Inoculação em fruto de abacaxi e lesão causada por isolados de *Fusarium*. (A) Placa de Petri com palitos inoculados por *Fusarium*; (B) Inoculação com palito contaminado; (C) Fruto de abacaxi inoculado por palito com *Fusarium*; (D) F4; (E) F19; (F) F5; (G) F16. Diferentes diâmetros de lesões encontradas entre os isolados inoculados. As setas nas figuras indicam o local de inoculação do palito controle

5.4 Patogenicidade dos isolados em folhas D destacadas

Todos os isolados avaliados foram patogênicos, tendo sido observados diferentes níveis de agressividade em folhas com lesões de coloração marrom,

além disso, houve exsudação de resina (Figura 9). O controle utilizado no experimento não apresentou lesões características de *Fusarium*.

Os isolados formaram grupos distintos quanto à patogenicidade demonstrada pela quantificação da área lesionada em folhas D destacadas de abacaxizeiro (Figura 8).

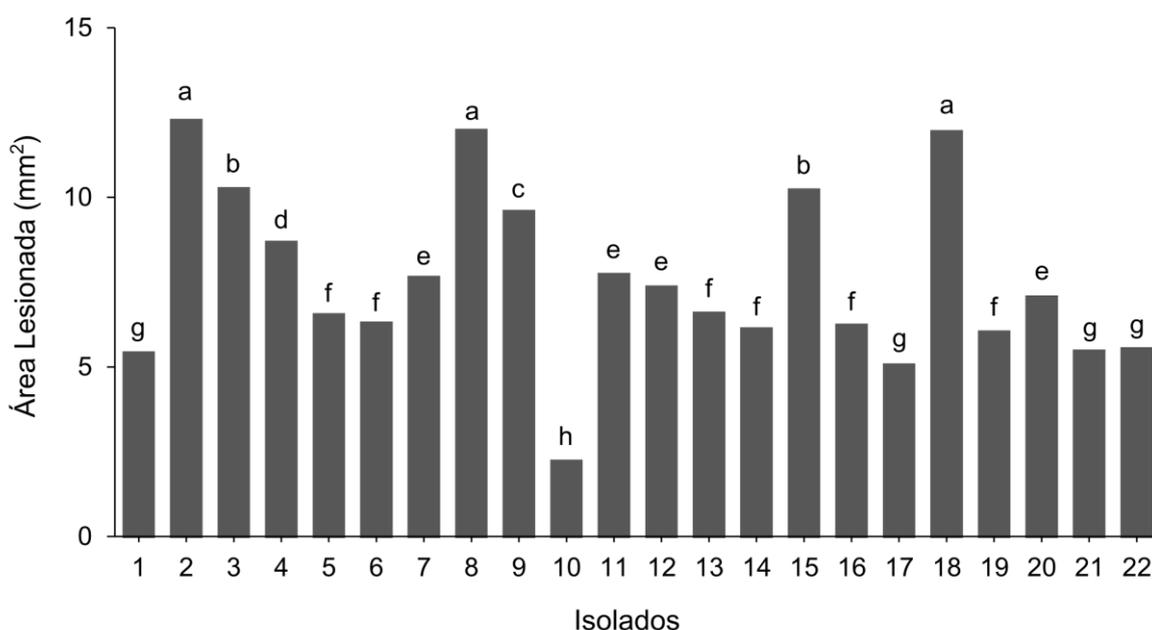


Figura 8. Área lesionada causada por 22 isolados de *Fusarium* em folhas D destacadas de abacaxizeiro. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

As lesões nas folhas variaram de 2,25 mm, com a menor média para o isolado F10, até isolados considerados os mais agressivos, com média acima de 12,00 mm. Os isolados F2, F8, F18, seguidos de F3, F15, foram mais agressivos, uma vez que tiveram maior diâmetro de lesão. Já os isolados F9, F4, F5, F6, F7, F11, F12, F13, F14, F16, F17, F19, F20, F21 e F22 apresentaram sintomas nas folhas com menor diâmetro de lesão, indicando menor agressividade.

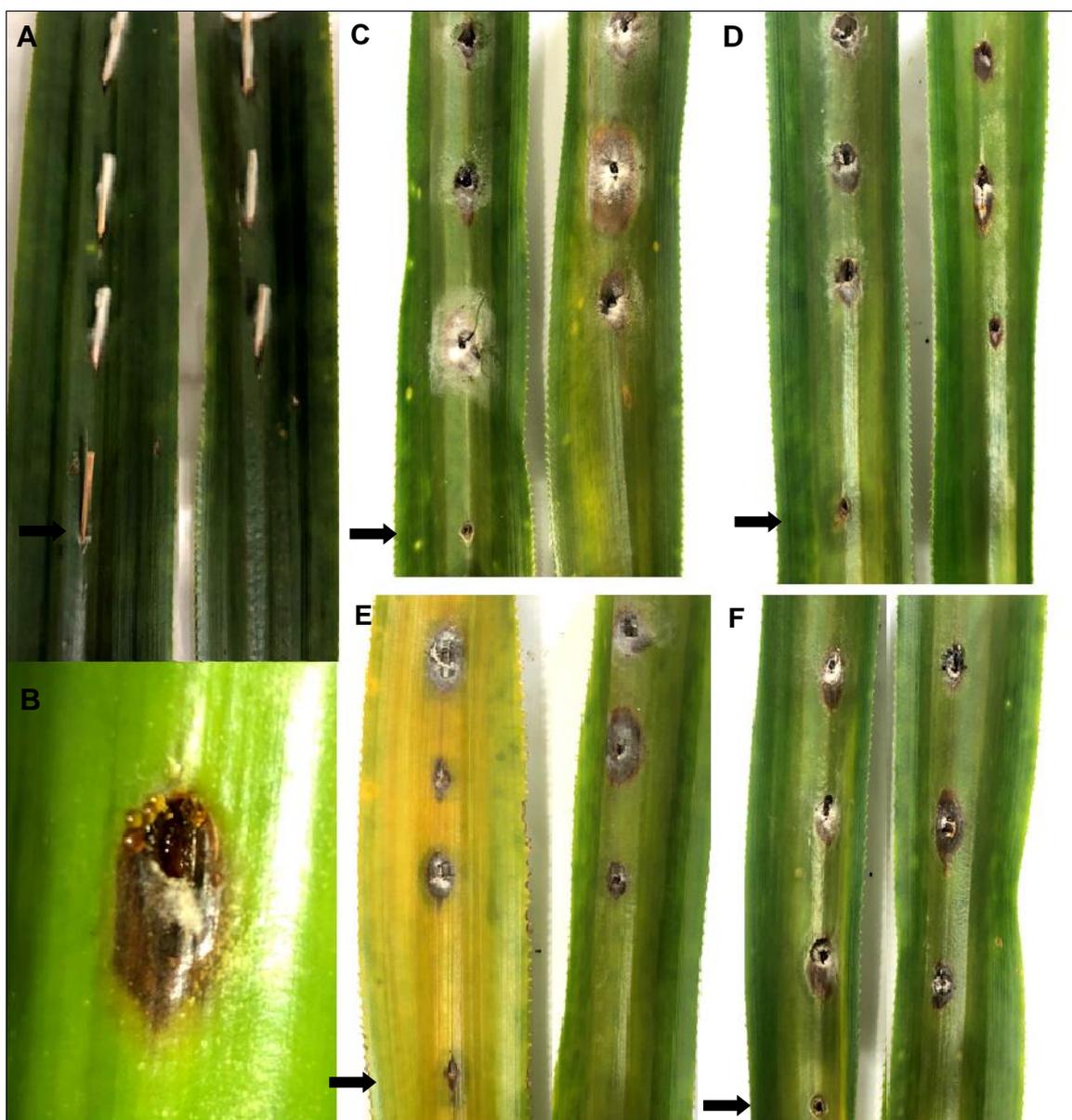


Figura 9. Inoculação em folhas D destacadas de abacaxizeiro e lesão causada por isolados de *Fusarium*. (A) Inoculação por palito contaminado; (B) Lesão marrom escura e exsudação de resina, F3. Diferentes diâmetros de lesões encontradas entre os isolados inoculados: (C) F18; (D) F14; (E) F2; (F) F11. As setas nas figuras indicam o local de inoculação do palito controle.

Pelas avaliações patogênicas, foi possível constatar a eficácia do método de inoculação em frutos e folhas destacadas, usando palito infestado com estruturas do patógeno, método também evidenciado por Oliveira et al. (2011) e Garcia et al. (2015).

A variação da severidade da doença pode indicar capacidade variável de isolados de *Fusarium* para colonizar o hospedeiro e estabelecer a doença, assim como evidenciar diferentes suscetibilidade e resistência à fusariose do

abacaxizeiro. Até este momento, a fusariose é atribuída a três espécies pertencentes ao FFSC, ou seja, *F. subglutinans*, *F. guttiforme* e *F. ananatum* (Nirenberg; O'Donnell, 1998; Ventura, 1994; Jacobs et al., 2010).

Os sintomas de fusariose nos frutos foram semelhantes aos observados nos trabalhos de Rohrbach e Schmitt (1998) e Ibrahim et al. (2017), em que os frutos infectados com isolados de *Fusarium* tiveram lesões marrom clara a escura, e as áreas infectadas ficaram um pouco afundadas. Além disso, observaram a presença de micélios na superfície das lesões. Já os sintomas nas folhas foram lesão marrom ao redor das áreas inoculadas, com o sintoma característico de fusariose - produção de exsudação de resina (Jacobs et al., 2010). Os frutos avaliados não tiveram presença de resina, divergindo de Ploetz (2001), em que todas as partes da planta podem ser atacadas pelo *Fusarium*, contudo os sintomas mais evidentes são identificados nos frutos.

Ao analisar os resultados de produção de conídios e área lesionada, foi possível observar que os isolados F1, F2, F15 e F18 tiveram maior agressividade e esporulação, possivelmente para esses isolados de *Fusarium* o meio nutritivo BDA favoreceu a produção de conídios e, conseqüentemente, resultou em maior diâmetro de lesão para esses isolados. Todos os isolados foram reisolados das lesões necróticas avaliadas, e a identificação dos fungos foi confirmada por meio da morfologia.

A caracterização morfológica somada à avaliação de patogenicidade possibilitou identificar, isolados de *Fusarium* com diferentes padrões morfológicos e de agressividade em frutos e folhas de abacaxizeiro. Apesar disso, os contrastes morfológicos não permitiram a diferenciação em nível de espécie, pois a variabilidade das características morfológicas pode ser confundida, com isso é indicado o uso de análises moleculares para distingui-las (Nirenberg; O'Donnell, 1998; Yilmaz et al., 2021).

Os marcadores morfológicos não são atributos conservadores e confiáveis para diferenciar espécies de *Fusarium*, haja vista que não há marcadores suficientes para fazer essa distinção (Kvas et al., 2009). Dessa forma, é necessário o uso conjunto de ferramentas morfológicas e moleculares, o que permitirá selecionar os isolados mais agressivos, para conduzir etapas de

avaliação de genótipos, bem como alternativas de manejo, visando à resistência à fusariose de abacaxizeiro.

5.4 Caracterização molecular

A análise filogenética concatenada das regiões de *tef1* e *tub2* foi gerada com um total 88 táxons, dos quais, 22 foram gerados neste estudo. O alinhamento das sequências da região de *tef 1- α* teve um total de 552 caracteres, sendo que a maioria, 63%, foi de sítios conservados, 33% foram variáveis e 24% foram sítios indicativos para parcimônia. O alinhamento das sequências da região de β -tubulina, por sua vez, gerou um total de 524 caracteres, 67% desses caracteres foram sítios conservados, 30% variáveis e 19% foram informativos para parcimônia (Tabela 4).

Tabela 4. Propriedade do alinhamento das sequências de DNA para o gênero *Fusarium* e modelo de substituição nucleotídica por região do gene (*tef 1- α* e β -tubulina) e para o concatenado (*tef 1- α + β -tubulina*).

	tef 1-α	β-tubulina	tef 1-α+β-tubulina
Número de caracteres	552	524	1076
monofSítios conservados	348	354	702
Sítios variáveis	186	160	342
Sítios informativos de parcimônia	132	102	234
Modelos de substituição nucleotídica	SYM+I+G	HKY+G	GTR+I+G

tef 1- α = fator de alongamento de tradução; β -tubulina = beta tubulina.

Pela análise filogenética, foi possível identificar duas espécies infectando o abacaxizeiro (Figura 10): *F. guttiforme*, que ficou agrupada junto com a espécie-tipo *F. guttiforme* CBS 409.97 e a espécie *F. guttiforme*_NRRL_22945. Esta espécie já foi relatada infectando o abacaxizeiro no Brasil e também na África do Sul (Jacobs et al., 2010). A espécie *Fusarium* sp. (CF/UENF 518 e CF/UENF 525) é outra espécie ainda não relatada infectando o abacaxi. A referida espécie ficou agrupada em um clado bem distinto, com um valor de probabilidade posterior (pp=0,99).

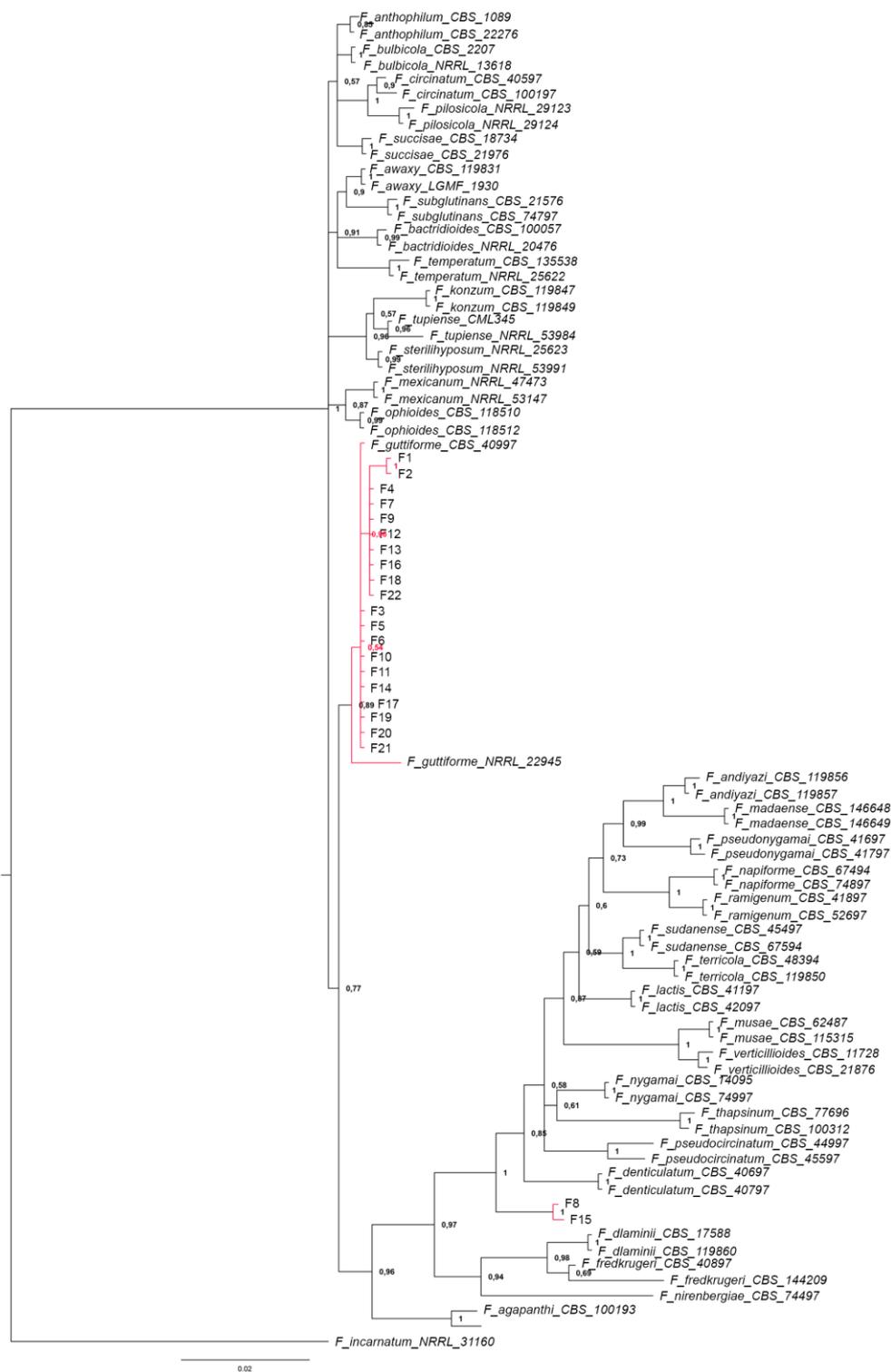


Figura 10. Filograma multilocus baseado na inferência bayesiana oriunda da combinação das sequências dos genes *tef* 1- α e β -tubulina de isolados de *Fusarium* em abacaxi. Valores de probabilidade posterior (pp) bayesiana estão indicados acima dos nós. A árvore está enraizada com *F. incarnatum* (NRRL 31160).

*Espécie tipo. Barras de escala = 20 μ m.

Na pesquisa feita por Yilmaz et al. (2021) por meio de ferramentas moleculares, foram redefinidos os limites do complexo da espécie *Fusarium fujikuroi* (FFSC). Dentro do complexo, as espécies ficaram agrupadas dentro do clado americano, outras dentro do clado africano. A espécie *F. guttiforme* está agrupada dentro do clado americano, junto com outras espécies, como, por exemplo, *F. ophioides*, *F. mexicanum*, *F. temperatum*, entre outras espécies. Resultados semelhantes foram encontrados nessa pesquisa. As espécies CF/UENF 518 e CF/UENF 525 ficaram agrupadas junto com espécies que pertencem ao clado africano, assim como as espécies *F. denticulatum*, *F. pseudocircinatum*, entre outras.

O clado africano no qual as duas espécies (CF/UENF 518 e CF/UENF 525) ficaram agrupadas é o mais rico e diversificado em espécies dentro do FFSC, com 23 linhagens filogenéticas, das quais quatro representam espécies biológicas, das 19 linhagens filogenéticas restantes, 13 representam espécies de *Fusarium*, espécies para as quais apenas os anamorfos são conhecidos e 6 ainda não foram descritos. Este clado é vertico e inclui a maioria das espécies produtores de micotoxinas específicas, maior diversidade de metabólitos secundários, algumas têm capacidade de produzir seus microconídios em falsas cabeças e cadeias curtas e são capazes de produzir clamidósporos (O'Donnell et al. 1998, Yilmaz et al., 2021).

No clado americano em que a espécie *F. guttiforme* foi agrupada, todas as espécies produzem microconídios apenas em falsas cabeças, nunca em cadeias, além da ausência de clamidósporos. Acredita-se que a capacidade de produção de falsas cabeças e cadeias curtas e de produzir clamidósporos tenha sido perdida na maioria das linhagens no início da evolução do clado americano, haja vista que o clado africano representa o ancestral do FFSC, devido à sua diversidade filogenética (O'Donnell et al., 1998; Kvas et al., 2009; Yilmaz et al., 2021).

O *Fusarium* sp identificado neste estudo infectando o abacaxizeiro possivelmente é uma nova espécie, contudo há necessidade de novos estudos utilizando mais genes para confirmação.

6. CONCLUSÕES

Há variação de características morfológicas em isolados de *Fusarium*.

Os isolados mais patogênicos nos frutos foram CF/UENF 511, CF/UENF 512, CF/UENF 514, CF/UENF 517, CF/UENF 518, CF/UENF 520, CF/UENF 521, CF/UENF 525, CF/UENF 528, CF/UENF 529 e CF/UENF 532. E nas folhas foram CF/UENF 512, CF/UENF 513, CF/UENF 518, CF/UENF 52 e CF/UENF 528.

Tendo como base este estudo, os isolados CF/UENF 511, CF/UENF 512, CF/UENF 518, CF/UENF 525 e CF/UENF 528 são os mais indicados para serem utilizados em estudos de resistência genética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aquije, G.M.F. V., Zorzal, P.B, Buss, D.S., Ventura, J.A, Fernandes, P.M.B., Fernandes, A.A.R. (2010) Cell wal alterations in the leaves of fusariosis resistant and susceptible pineapple cultivars. *Plant Cell Reports*, 29:1109–1117.
- Benítez, S., Chiumenti, M., Sepulcre, F., Achaerandio, I., Pujolá, M. (2012) Modeling the effect of storage temperature on the respiration rate and texture of fresh cut pineapple, *Journal of Food Engineering*, 113: 527-533.
- Berilli, S.S., Freitas, S.J., Santos, P.C., Oliveira, J.G., Caetano, L.C.S. (2014) Avaliação da qualidade de frutos de quatro genótipos de abacaxi para consumo *in natura*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36: 503-508.
- Cabral, J.R.S., Souza, J.S., Ferreira, F.R. (1999) Variabilidade genética e melhoramento do abacaxi. In: Queiróz, M.A. de, Goedert, C.O, Ramos, S. R. R., *Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro*. 1. ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 559-567.
- Cabral, J.R.S., Junghans, D.T. (2003) Variedades de abacaxi. Cruz das Almas: *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical* (Circular Técnica 63), 4p.

- Castro, N.R., Coêlho, R.S.B., Laranjeira, D., Couto, E.F., Souza, M.B.R.D. (2008) Occurrence, inoculation methods and aggressivity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in *Heliconia* spp., *Summa Phytopathologica*, 34: 127-130.
- Clement, C.R., De Cristo-Araújo, M., D'Eeckenbrugge, G. C.; Pereira, A.A, Rodrigues, D.P (2010) Origem e Domesticação de Cultivos Nativos Amazônicos. *Diversidade*. 2: 72-106.
- Cotias-de-Oliveira, A.L.P., Assis, J.G.A., Bellintanil, M.C., Andrade, J.C.S., Guedes, M.L.S. (2000) Chromosome numbers in Bromeliaceae, *Genetics and Molecular Biology*, 23: 173-177.
- Crestani, M., Barbieril, R.L., Hawerth, F.J., Carvalho, F.I.F. de, Oliveira, A.C. de (2010) Das Américas para o Mundo: origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro. *Ciência Rural*, 40: 1473-1483.
- Crous, P.W., Wingfield, M.J., Lombard, L., et al. (2019) Fungal Planet description sheets: 951–1041. *Persoonia*. 43: 223–425.
- Cunha, G.A.P. (2007) Equipe técnica de abacaxi comemora 30 anos de atividades e realizações. Cruz das Almas: *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical* (Documentos 170), 18p.
- D'Eeckenbrugge, G.C., Duval, M.F., Van Miegoet, F. (1993) Fertility and self-incompatibility in de genus *Ananas*. *Acta Horticulturae*, 334: 45-52.
- D'Eeckenbrugge, G.C., Leal, F. (2003) Morphology, anatomy and taxonomy. In: Bartholomew, D.P., Paull, R.E., Rohrbach, K.G. *The pineapple: botany, production and uses*. 1. ed. Wallingford: Oxford University Press, p.13-35.
- Donaldson, G.C., Ball, L.A., Axelrood, P.E. and Glass, L.N. (1995) Primer sets developed to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes are useful in differentiating *Fusarium* species associated with conifers. *Applied Environment Microbiology*. 61: 1331-1340.

- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32:1792–1797.
- Edwards, J., Auer, D., De Alwis S., Summerell, B., Aoki, T., Proctor, R.H., O'Donnell, K. (2016) *Fusarium agapanthi* sp. nov., a novel bikaverin and fusarubin-producing leaf and stem spot pathogen of *Agapanthus praecox* (African lily) from Australia and Italy. *Mycologia*. 108: 981–992
- Ferreira, E.A., Silva, J.R., Almeida, G.V.B. de, Santos, W.V. (2011) Abacaxi. In: Rodrigues, M.G.V., Dias, M.S.C., *Cultivo Tropical de Fruteiras*. 1. ed. Belo Horizonte: Epamig, p. 7-16.
- Garcia, W.M., Krause, W., Araújo, D.V. de, Silva, C.A., Miranda, A.F. de (2015) Comportamento *in vitro* do agente etiológico da fusariose e avaliação de métodos de inoculação em abacaxizeiro. *Revista Caatinga*. 28: 263-268.
- Guarro, J., Gene, J., Stchigel, A.M. (1999) Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 454-500.
- Granada, G.G., Zambiasi, R.C., Mendonça, C.R.B. (2004) Abacaxi: produção, mercado e subprodutos. Curitiba: Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (Boletim 22) 18p.
- Groenewald, S., Van Den Berg, N., Marasas, W.F.O. and Viljoen, A. (2006) The application of high-through put AFLPs in assessing genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Mycological Research* 110: 297–305.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics – FAOSTAT (2020) Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em 15 de de janeiro de 2022.
- França-Santos, A, Alves, R.S., Leite, N.S., Fernandes, R.P.M. (2009) Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas comosus* (abacaxi). *Scientia Plena*, 5: 1-6.

- Hennequin, C., Abachin, E., Symoens, F., Lavarde, V., Reboux, G., Norald, N. Berche, P. (1999) Identification of *Fusarium* species involved in human infections by 28S rRNA gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 3586-3589.
- Hepperle, D. (2011) DNA Dragon 1.4.1 - DNA Sequence Contig Assembler Software. Disponível em: <https://www.dna-dragon.com/>. Acesso em 16 de junho de 2021.
- Hove, F.V., Waalwijk, C., Logrieco, A., Munaut, F., Moretti, A. (2011) *Gibberella musae* (*Fusarium musae*) sp. nov., a recently discovered species from banana is sister to *F. verticillioides*. *Mycologia*, 103:570-585.
- Ibrahim, N.F., Mohd, M.H., Nor, N.M.I, Zakaria. L. (2017) Characterization of *Fusarium spp.* associated with pineapple fruit rot and leaf spot in Peninsular Malaysia. *Journal of Phytopathology*. 165: 718-726.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA (2021) Produção agrícola municipal. Disponível em:<[http:// www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)>. Acesso em 27 de janeiro de 2022.
- Jacobs, A., Wyk, P.S.V., Marasas, W.F., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J., Coutinho, T.A. (2010) *Fusarium ananatum* sp. nov. in the *Gibberella fujikuroi* species complex from pineapples with fruit rot in South Africa. *Fungal biology*, 114: 515-527.
- Joy, P.P., Sindhu, G. (2012) Diseases of pineapple (*Ananas comosus*): Pathogen, symptoms, infection, spread & management. Vazhakulam: Pineapple Research Station, 14p.
- Clittich, C.J.R., Leslie, J.F., Nelson, P.E., Marasas, W.F.O. (1997) *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): A new species in section *Liseola* from sorghum. *Mycologia*. 89: 643-652.

- Kristensen, R., Torp, M., Kosiak, B. and Holst-Jensen, A. (2005) Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translocation elongation factor 1- α gene sequences. *Mycological Research* 109: 173-186.
- Kvas, M., Marasas, W.F.O., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J., Steenkamp, E.T (2009) Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Diversity*. 34: 1-21.
- Laraba, I., Kim, H.S., Proctor, R.H., Busman, M., O'Donnell, K., Felker, F.C., Aime, M.C., Kock, R.A., Wurdack, K.J. (2020) *Fusarium xyrophilum*, sp. nov., a member of the *Fusarium fujikuroi* species complex recovered from pseudoflowers on yellow-eyed grass (*Xyris* spp.) from Guyana. *Mycologia* 112: 39–51.
- Leal, F. (1995) Pineapple – *Ananas comosus* (Bromeliaceae). In: Smartt, J., Simmonds, N.W. *Evolution of crop plants*. 2. Ed. Nova York: Longman Singapore, p. 19-22.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A. (2006) The *Fusarium* Laboratory Manual, 1st Edition. *Blackwell Publishing*.
- Leslie, J.F., Anderson, L.L., Bowden, R.L. and Lee, Y.W. (2007) Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology*. 119: 25-32.
- Marin-Felix, Y., Groenewald, J.Z.,L. Cai, Q.C., Marincowitz, S., Barnes, I., Bensch, K., U. Braun, E., Camporesi, Damm, U., Beer, Z.W., Dissanayake, A., Edwards, J., Giraldo, A., Hernandez-Restrepo, M., Hyde, K.D., Jayawardena, R.S., Lombard, L., Luangsa-ard, J., McTaggart, A.R., Crous, P.W. (2017) Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1 STUDIES. *Studies in Mycology*, 86:99–216.

- Marin-Felix, Y., Hernández-Restrepo, M., Iturrieta-González, I. et al, García, D., Gené, J., Groenewald, J.Z., Cai, L., Chen, Q., Quaedvlieg, W., Schumacher, R.K., Taylor, P.W.J., Ambers, C., Bonthond, G., Edwards, J., Krueger-Hadfield, S. A., Luangsa-ard, J.J., Morton, L., Moslemi, A., Sandoval-Denis, M., Crous, P.W. (2019) Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 3. *Studies in Mycology*, 94:1–124
- Massola Júnior, N.S., Krugner, T.L. (2018) Fungos fitopatogênicos. In L. Amorim, J. A.M. Rezende, A. Bergamin Filho (Eds.) *Manual de Fitopatologia*. 5 ed. *Agronômica Ceres*, p. 107–142.
- Matos, A.P. de, Cabral, J.R.S. (2005) Manejo integrado da fusariose do abacaxizeiro. Cruz das Almas: *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical* (Documentos 32), 2p.
- Matos, A.P., Reinhardt, D.H. (2009) Pineapple in Brazil: Characteristics, research and perspective. *Acta Horticulturae*, 822: 25-36.
- Matos, A.P., Sanches, N.F., Teixeira, F.A., Simão, A.H., Gomes, D.C., Elias Júnior, J. (2009) Monitoramento da fusariose em plantios de abacaxi ‘Pérola’ conduzidas em sistema de produção integrada no Estado do Tocantins. *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical* (Documentos 184), 37p.
- Matos, A.P., Sanches, N.F., Teixeira, F.A., Simão, A.H. (2011) Pineapple Integrated Pest Management - An Overview. *Acta Horticulturae*, 902: 339-347.
- Matos, A.P. (2019) Main pests affecting pineapple plantations and their impact on crop development. *Acta Horticulturae*, 1239: 137-146.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Gateway Computing Environments Workshop*, GCE 2010.

- Moraes, A.M. de, Almeida, F.A.C., Cazé Filho, J. (2007) Disinfection and *In Vitro* Establishment of Axillary Buds of Pineapple. *Tecnologia e Ciência*, 1: 39-44.
- Nei, M., Kumar, S. (2000) Molecular Evolution and Phylogenetics. *Oxford University Press*, 333 p.
- Nirenberg, H.I., O'Donnell, K. (1998) New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90: 434-458.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E. (1997) Two divergent intragenomic rDNAITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 7: 103–116.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., Ploetz, R.C. (1998) Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of National Academy of Sciences*. 95: 2044–2049.
- O'Donnell, K., Nirenberg, H.I., Aoki, T., Cigelnik, E. (2000) A multi-gene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*. 41: 61–78
- O'Donnell, K., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G., Sarver, B.A., Balajee, S.A., Schroers, H.J., Summerbell, R.C., Robert, V.A., Crous, P.W., Zhang, N., Aoki, T., Jung, K., Park, J., Lee, Y.H., Kang, S., Park, B., Geiser, D.M. (2010) Internet-Accessible DNA Sequence Database for Identifying *Fusarium* from Human and Animal Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 48:3708-3718.
- Oliveira, M.D.M, Leite, L.C.N, Pereira, R. (2011) Incidência de fusariose e avaliação de métodos de inoculação de *Fusarium guttiforme* em folhas de abacaxizeiro. *Revista Caatinga*, 24: 137-142.

- Oliveira, A.M.G., Natale, W., Rosa, R.C.C., Junghans, D.T. (2015) Adubação N-K no abacaxizeiro 'BRS Imperial' - I - efeito no desenvolvimento e na floração da planta. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 37: 755-763.
- Otero-Colina, G., Rodriguez-Alvarado, G., Fernandez-Pavia, S., et al. (2010) Identification and characterization of a novel etiological agent of mango malformation disease in Mexico, *Fusarium mexicanum* sp. nov. *Phytopathology*. 100: 1176–1184.
- Parente, G.D.L., Almeida, M.M., Silva, J.L., Silva, C.G., Alves, M.F. (2014) Cinética da produção do fermentado alcoólico de abacaxi pérola e caracterização da bebida. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 9: 230-247.
- Pereira, E.M., Leite Filho, M.T., dos Santos, Y.M.G., Pereira, B.B.M., Maracajá, P.B. (2015) Elaboração e qualidade de geleia e compota de abacaxi "Pérola". *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 10: 149-153.
- Pinho, D., Dutra, D., Pereira, O. (2013) Notes on *Ceratocystis paradoxa* causing internal post-harvest rot disease on immature coconut in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 38:152–157.
- Pissarra, T., Chaves, G.M., Ventura, J.A. (1979) Sintomatologia da fusariose (*Fusarium moniliforme* Sheld. var. *subglutinans* Wr. e Reink) do abacaxizeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 4: 255-263.
- Ploetz, R. (2001) Phylogenies and reproductive strategies of globally dispersed populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. 133- 142.
- Posada, D., Buckley, T. (2004) Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics: Advantages of Akaike. *Syst. Biol.* 53:793–808.

- Proctor, R.H., Van, H.F., Susca A., et al. (2013) Birth, death and horizontal transfer of the fumonisin biosynthetic gene cluster during the evolutionary diversification of *Fusarium*. *Molecular Microbiology* 90: 290–306.
- R Core Team (2014). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Rahjoo, V., Zad, J., Javan-Nikkhah, M., Gohari, A.M., Okhovvat, S.M., Bihamta, M.R., Razzaghian, J. and Klemsda, S.S. (2008) Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. *Journal of Plant Pathology*. 90: 463-468.
- Rakeman, J.F., Bui, U., Lafe, K., Chen, Y.C., Honeycutt, R.J., Cookson, B.T. (2005) Multilocus DNA sequence comparisons rapidly identify pathogenic molds. *Journal Clinical Microbiology*. 44: 3324-3333.
- Rambaut, A. (2009) FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees.
- Rambaut, A., Drummond A.J. (2013) Tracer v1.6. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.
- Rannala, B., Yang, Z. (1996) Probability Distribution of Molecular Evolutionary Trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of molecular evolution*. 43:304–311.
- Ranganathan, S., Balajee, S.A.M. (2000) Anti-Cryptococcus activity of combination of extracts of *Cassia alata* and *Ocimum sanctum*. *Mycoses*. 43: 299-301.
- Reinhardt, D.H.(2000) A planta e o seu ciclo. In: Reinhardt, D.H., Souza, L.F., Cabral, J.R.S. (Org.) Abacaxi produção: aspectos técnicos. Embrapa. 13-14.

- Reinhardt, D.A., Alves, A.A (2003) O perfil atual do agronegócio do abacaxi em Itaberaba – BA. Disponível em: <<https://www.itaberabanoticias.com.br/bahia>>. Acesso em 25 de agosto de 2020.
- Reinhardt, D.H.R., Bartholomew, D.P., Souza, F.V.D., Carvalho, A.C.P.P.D., Pádua, T.R.P.D., Junghans, D.T., Matos, A.P.D. (2018) Advances in pineapple plant propagation. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 40.
- Rohrbach K.G., (1994) Fusariosis. In: Ploetz, R.C., Zentmeyer, G.A., Nishijima, W.T., Rohrbach, K.G., Ohr, H.D., Compendium of Tropical Fruit Diseases. *The American Phytopathological Society*. 45-56.
- Rohrbach, K.G., Schmitt, D. (1998) Fusariosis. In: Compendium of Tropical Disease. Ploetz, R.C., Zentmeyer, G.A., Nishijima, W.T., Rohrbach, K.G, Ohr, H.D. *The American Phytopathological Society*. 49.
- Sanches, N.F., Matos, A.P. (2013) Abacaxi: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Brasília: *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia* (Coleção 500 Perguntas, 500 Respostas), 201p.
- Sandoval-Denis, M., Guarnaccia, V., Polizzi, G., et al. (2018). Symptomatic Citrus trees reveal a new pathogenic lineage in *Fusarium* and two new *Neocosmospora* species. *Persoonia*. 40: 1–25.
- Santos, P.C. dos, Silva, M.P.S. da, Freitas, S. de J., Berilli, S. da S., Altoé, J.A., Silva, A. de A., Carvalho, A.J.C. de. (2014) Ácidos húmicos e brassinosteroide no crescimento e estado nutricional de rebentos de coroas de abacaxi. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 9: 532-537.
- Savelkoul, P.H., Aerts, H.J.M., DeHass, J., Dijkshoorn, L., Duim, B., Otsen, M., Rademaker, J.L.W., Schouls, L. and Lenstra, J.A. (2001) Mini review, Amplified- fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 3083-3091.

- Scauflaire, J., Gourgue, M., Munaut, F. (2011). *Fusarium temperatum* sp. nov. from maize, an emergent species closely related to *Fusarium subglutinans*. *Mycologia*, 103: 586-597.
- Souza, F.V.D. (2011) A nova face do melhoramento genético de abacaxi na Embrapa Mandioca e Fruticultura. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2011_1/abacaxi/index.htm>. Acesso em 02 de de junho de 2020.
- Soares, J.M. (2011) *Caracterização morfológica, molecular e patogênica do agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro no Brasil*. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Lavras – MG, Universidade Federal de Lavras, 58p.
- Souza, J. da S., Souza, L.F. da S. (2000) Aspectos socioeconômicos. In: Silva, J.M. de M. Abacaxi produção: aspectos técnicos, 1. ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 77p.
- Souza, E.H., Souza, F.V.D., Costa, M.A.P., Costa Junior, D.S., Santos-Serejo, J.A., Amorim, E.P., Ledo, C.A.S. (2012) Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59: 1357-1476.
- Souza, J.T. de, Trocoli, R.O., Monteiro F.P. (2016) Plants from the Caatinga Biome Harbor Endophytic *Trichoderma* Species Active in the Biocontrol of Pineapple Fusariosis. *Biological Control*, 94: 25–32.
- Souza, W.C.O., Nascimento, L.C., Oliveira, M.D.M, Porcino, M.M., Silva, H.A.O (2017) Genetic diversity of *Fusarium spp.* in pineapple ‘Pérola’ cultivar. *Eur J Plant Pathol*. 150:853–868.
- Stepien, L., Koczyk, G., Waskiewicz, A. (2013) Diversity of *Fusarium* species and Mycotoxins Contaminating Pineapple. *Journal Applied Genetics*, 54: 367–380.

- Schilling, A.G., Moeller, E.M. and Geiger, H.H. (1996) Polymerase chain reaction based on assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. avenaceum*. *Phytopathology* 86: 515–522
- Teixeira, J.B. (2001) Produção de mudas de abacaxi de alta qualidade através de micropropagação. 1. ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia 26p.
- Tsuji, S.S. (2012) *Análise filogenética e patogênica do agente causal da fusariose do abacaxizeiro*. Dissertação (Mestrado) – Recife – PE, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 51p.
- Van Hove, F., Waalwijk, C., Logrieco, A., et al. (2011) *Gibberella musae* (*Fusarium musae*) sp. nov., a recently discovered species from banana is sister to *F. verticillioides*. *Mycologia*. 103: 570–585.
- Ventura, J.A., Zambolim, L., Gilbertson, R.L. (1993) Proposição de nova forma *specialis* em *Fusarium subglutinans* em abacaxizeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 18: 280.
- Ventura, J.A., Costa, H., Zambolim, L. (1994) Resistência de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* ao benomyl em condições de campo. *Fitopatologia Brasileira*, 18: 328.
- Proposição de nova forma *specialis* em *Fusarium subglutinans* em abacaxizeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 18: 208-1993.
- Ventura, J. A. (2000) Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados. Parte II: Chaves para identificação. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 8: 303-338.
- Ventura, J.A, Zambolim, L. (2002) Controle das doenças do abacaxizeiro. In: Zambolim, L., Vale, F.X.R. do, Monteiro, A.J.A., Costa, H. *Controle de doenças de plantas: fruteiras*. 1. ed. Viçosa: UFV, p. 445-509.

- Ventura, J.A., Cabral, J.R.S., Matos, A.P. (2009) 'Vitória': new pineapple cultivar resistant to fusariosis. *Acta Horticulturae*, 822: 51-55.
- Ventura, J.A., Costa, H. (2010) Estratégias para o controle da fusariose do abacaxizeiro. *Tropical Plant Pathology*, 35: 104-107.
- Versieux, L.M., Wendt, T. (2007) Bromeliaceae diversity and conservation in Minas Gerais state, Brazil. *Biodiversity and Conservation*, 16: 2989-3009.
- Viana, E.S., Reis, R.C., Jesus, J.L., Junghans, D.T., Souza, F.V.D. (2013) Caracterização físico-química de novos híbridos de abacaxi resistentes à fusariose. *Ciência Rural*, 43: 1155-1161.
- Vilaplana, R., Pérez-Revelo, K., Valencia-Chamorro, S. (2018). Essential oils as an alternative postharvest treatment to control fusariosis, caused by *Fusarium verticillioides*, in fresh pineapples (*Ananas comosus*). *Scientia Horticulturae*, 238: 255-263.
- Zamperlini, G.P. (2010) Crescimento e desenvolvimento fotoquímico do processo fotossintético em abacaxizeiro 'Vitória'. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Vitória – ES, Universidade Federal do Espírito Santo, 60p.
- Yilmaz, N., Sandoval-Denis, M., Lombard, L., Visagie, C. M., Wingfield, B. D., Crous, P. W. (2021). Redefining species limits in the *Fusarium fujikuroi* species complex. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 46:129-162.