



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA

LEONARDO DE JESUS MACHADO GOIS DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO FITOPATOGÊNICA, MORFOLÓGICA E  
FILOGENÉTICA DE ISOLADOS DE *Fusarium* PRESERVADOS NA  
MICOTECA PROF<sup>o</sup> GILSON SOARES DA SILVA.**

São Luís – MA

2022

LEONARDO DE JESUS MACHADO GOIS DE OLIVEIRA

Engenheiro Agrônomo

Mestre em Agroecologia

**CARACTERIZAÇÃO FITOPATOGÊNICA, MORFOLÓGICA E  
FILOGENÉTICA DE ISOLADOS DE *Fusarium* PRESERVADOS NA  
MICOTECA PROF<sup>o</sup> GILSON SOARES DA SILVA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Agroecologia.

**Orientador(a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Antonia  
Alice Costa Rodrigues**

**SÃO LUÍS - MA**

**2022**

Oliveira, Leonardo de Jesus Machado Gois de.

Caracterização fitopatogênica, morfológica e filogenética de isolados de *Fusarium* preservados na Micoteca Prof. Gilson Soares da Silva / Leonardo de Jesus Machado Gois de Oliveira. – São Luís, 2022.

127 f

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, Universidade Estadual do Maranhão, 2022.

Orientadora: Profa. Dra. Antônia Alice Costa Rodrigues.

1.*Fusarium oxysporum* species complex. 2.*Fusarium fujikuroi* species complex. 3.Filogenia. 4.Patogenicidade. 5.Métodos de conservação. I.Título.

CDU: 582.28

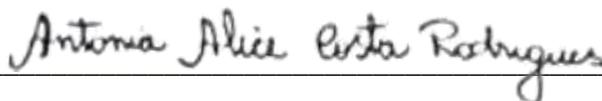
**CARACTERIZAÇÃO FITOPATOGÊNICA, MORFOLÓGICA E  
FILOGENÉTICA DE ISOLADOS DE *Fusarium* PRESERVADOS NA  
MICOTECA PROF<sup>o</sup> GILSON SOARES DA SILVA.**

**LEONARDO DE JESUS MACHADO GOIS DE OLIVEIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Agroecologia.

Aprovada em: 09/12 /2021

**BANCA EXAMINADORA**



---

**Profa. Dr.ª Antonia Alice Costa Rodrigues** - (Orientadora)  
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)



---

**Profa. Dr.ª. Thais Roseli Corrêa** – (1ª examinadora)  
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)



---

**Dr.ª. Erlen Keila Candido e Silva** - (2ª examinadora)  
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)



---

**Prof. Dr. José Ribamar Muniz Campos Neto** – (3º examinador)  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA)



---

**Prof. Dr. Diogo Herison Silva Sardinha** – (4º examinador)  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA)

Ao Senhor Deus, aos meus pais, Iris e Manoel pelo amor a mim dedicados, Aos meus irmãos Leonam, Débora e Diego e a minha madrinha Conceição e Raimunda, Bruna e Adriana.

**DEDICO!**

## **AGRADECIMENTOS**

À **Deus**, por ter me guiado e removido todos os obstáculos do meu caminho.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Antonia Alice Costa Rodrigues, pelos ensinamentos, incentivos, conselhos e amizade, nessa etapa tão importante da minha vida que foi o Doutorado.

À Universidade Estadual do Maranhão, por meio da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, pela oportunidade e espaço concedido para a realização deste curso.

Aos professores da Pós-graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão pelos ensinamentos, e incentivo a mim direcionados;

À FAPEMA pelo apoio financeiro destinado para realização desta pesquisa;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Thais Ribeiro Santiago da UnB pela ajuda na análise molecular e aos amigos Doutorandos e Mestrandos Gustavo Henrique, Leila, Francisco de Assis, Aline, Bianca e a Doutora Camila Machado pela contribuição na realização desta tese Laboratório da Universidade de Brasília pela acolhida;

À equipe do Laboratório de Genética - Labwick, da Universidade Estadual do Maranhão, Campus São Luís;

Aos meus pais, Manoel Gois de Oliveira e Íris de Jesus Machado de Oliveira, pelo carinho e amor incondicional.

A todos meus familiares pelo apoio e força. Aos meus irmãos, Diego, Débora e Leonam e irmãs de coração Bruna, Adriana e Raimunda, as minhas tias Terezinha, Conceição e Hilda pelo convívio.

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia Francisco, Erlen, Larisse, Danielle, Jonalda, Ivaneide, Neto, Mônica, Diogo, Pedro, Rafael, Rayanne, Wildinson, Ruan, Cleude, Dianny, Geusa e Anna pelo convívio e ajuda para realização deste trabalho;

A todos os amigos dos cursos de Mestrado e Doutorado em Agroecologia da turma 2017, pela convivência;

Aos amigos em especial Elys Regina, Laura Brandão, Idayanne Sousa Araújo, Larisse Raquel, Danielle Paz, Erlen Keila, Jonalda Cristina, Raimundo Nonato, Keneson Klay,

Joice, Elizabeth Costa, Larissa de Paula e Suzane, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade e momentos descontraídos que ficaram pra sempre em minha memória.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Agroecologia que sempre ajudam em especial, Nilson, Neto e Rayanne. A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para realização desta pesquisa. Enfim, reitero a todos a minha gratidão. Muito Obrigado!

## RESUMO

Coleções Microbianas são consideradas Centros de Recursos Biológicos e a preservação *ex situ* dos microorganismos é uma prática indispensável para o conhecimento e uso da biodiversidade e a escolha de cada método de preservação deve atender as vantagens e desvantagens oferecidas pelo método e as características de cada espécie fúngica. As espécies do gênero *Fusarium* são conhecidas por exibirem alta semelhança morfológica, e por não apresentarem diferenças entre estirpes patogênicas, não-patogênicas ou saprófitas, portanto, é recomendado o estudo filogenético através de genes codificadores de proteínas como o fator de alongação 1- $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), a segunda maior subunidade da RNA polimerase (RBP2), calmodulina e o gene da  $\beta$ -tubulina (tub2). O objetivo desta tese foi verificar preservação da patogenicidade dos isolados de *Fusarium* em seus respectivos hospedeiros que estão conservados nos diferentes métodos e caracterizar isolados através da combinação da morfologia e relações filogenéticas através de quatro genes codificadores de proteínas. Os isolados foram preservados em três métodos e os resultados de avaliação de patogenicidade dos isolados de *F.oxysporum* f. sp. *lycopersici* preservados no método de solo esterilizado MGSS 40, MGSS 41, MGSS 183, MGSS 225 e MGSS 233 foram patogênicos a cultivar de tomateiro Santa Cruz. Os isolados MGSS 10, MGSS 221, MGSS 224, MGSS 226 e MGSS 277 preservados no método de solo foram patogênicos a *Abelmoschus esculentus* cv. Valença no 1º ensaio e no 2º ensaio os isolados preservados no método de repicagem contínua MGSS 55, MGSS 226 e MGSS 323 foram os mais virulentos a *A. esculentus* cv. Valença. Os isolados MGSS 324 e MGSS 325 preservados no método de repicagem contínua foram patogênicos às variedades de bananeira: ‘Maçã Casca Verde’, ‘Maçã Turiaçu Amarela’, ‘Prata Anã’ e ‘Cacau Figo Cinza’. O isolado MGSS 60 preservado no método de solo esterilizado foi patogênico às cultivares de *Vigna unguiculata* ‘BR-17 Gurguéia’, ‘BRS Tumucumaque’, ‘BRS Guariba’ e ‘Manteiguinha’. O isolado MGSS 329 preservado no método de Castellani foi patogênico a plantas de *Passiflora edulis*, enquanto que isolados conservados no método de repicagem contínua não foram patogênicos. Teste de patogenicidade de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *coriandrii* MGSS 415, MGSS 416 e MGSS 305 preservados no método de repicagem contínua mostraram que os dois primeiros isolados foram patogênicos as cultivares de *Coriandrum sativum*: ‘Verdão’ e ‘Verdão Super’, e o isolado MGSS 305 foi patogênico a cultivar ‘Verdão Super’. A caracterização morfológica dos isolados mostra variabilidade na forma e tamanho dos macro e microconídios e na cor das colônias, com a presença de dois grupos de isolados: o primeiro com presença de monofiálides curtas e o segundo grupo houve a formação de mono e polifiálides. A análise molecular de 58 isolados mostra que 28 isolados pertencem ao complexo de espécies *Fusarium oxysporum*, 3 isolados pertencem ao complexo de espécies de *Fusarium fujikuroi* e 27 isolados não estão em nenhum dos complexos estabelecidos pela literatura.

**Palavras-chave:** *Fusarium oxysporum* species complex, *Fusarium fujikuroi* species complex, filogenia, patogenicidade, métodos de conservação.

## ABSTRACT

Microbial Collections are considered Biological Resource Centers and the *ex situ* preservation of microorganisms is an essential practice for the knowledge and use of biodiversity the choice of each preservation method must take into account the advantages and disadvantages offered by the method and the characteristics of each fungal species. The species of the genus *Fusarium* are known to exhibit high morphological similarity, and for not showing differences between pathogenic, non-pathogenic or saprophytic strains, therefore, the phylogenetic study through genes encoding proteins such as the elongation factor 1- $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), the second largest subunit of RNA polymerase (RBP2), calmodulin and the  $\beta$ -tubulin gene (*tub2*). The objective of this thesis was to verify the preservation of the pathogenicity of *Fusarium* isolates in their respective hosts that are conserved in the different methods and to characterize isolates through the combination of morphology and phylogenetic relationships through four protein-coding genes. The isolates were preserved in three methods and the results of pathogenicity evaluation of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* were preserved in the sterilized soil method MGSS 40, MGSS 41, MGSS 183, MGSS 225, and MGSS 233 were pathogenic to Santa Cruz tomato cultivars. The isolates MGSS 10, MGSS 221, MGSS 224, MGSS 226 and MGSS 277 preserved in the soil method were pathogenic to *Abelmoschus esculentus* cv. Valença in the 1st assay and in the 2nd assay the isolates preserved in the continuous subculture method MGSS 55, MGSS 226, and MGSS 323 were the most virulent to *A. esculentus* cv. Valencia. The isolates MGSS 324 and MGSS 325 preserved in the continuous transplanting method were pathogenic to banana varieties: 'Maçã Casca Verde', 'Maçã Turiaçu Amarela', 'Prata Anã' and 'Cacau Figo Cinza'. The isolate MGSS 60 preserved in the sterilized soil method was pathogenic to the cultivars of *Vigna unguiculata* 'BR-17 Gurguéia', 'BRS Tumucumaque', 'BRS Guariba' and 'Manteiguinha'. The isolate MGSS 329 preserved in the Castellani method was pathogenic to *Passiflora edulis* plants, while the isolates preserved in the continuous subculture method were not pathogenic. Pathogenicity test of isolates of *F. oxysporum* f. sp. *coriandrii* MGSS 415, MGSS 416 and MGSS 305 preserved in the continuous subculture method showed that the first two isolates were pathogenic to the cultivars of *Coriandrum sativum*: 'Verdão' and 'Verdão Super', and the isolate MGSS 305 was pathogenic to the cultivar 'Verdão Super'. The morphological characterization of the isolates shows variability in the shape and size of macro and microconidia and in the color of the colonies, with the presence of two groups of isolates: the first with the presence of short monophialides and the second group with the formation of mono and polyphialides. Molecular analysis of 58 isolates shows that 28 isolates belong to the *Fusarium oxysporum* species complex, 3 isolates belong to the *Fusarium fujikuroi* species complex and 27 isolates are not in any of the complexes established in the literature.

Keywords: *Fusarium oxysporum* species complex, *Fusarium fujikuroi* species complex, phylogeny, pathogenicity, conservation methods.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Plantas de tomateiro cultivar Santa Cruz inoculadas com isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* que apresentaram sintomas leves de Murcha de Fusarium. A- Planta com sintomas leves MGSS 01, B-MGSS 42, C-MGSS 43, D- MGSS 81, E-MGSS 182, F- Testemunha..... **50**
- Figura 2.** Plantas de tomateiro cultivar Santa Cruz inoculadas com isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* que apresentaram sintomas de Murcha de Fusarium. A- Planta morta inoculada com isolado MGSS 40, B- Planta inoculada com isolado MGSS 41, C-MGSS 183, D-MGSS 225, E-MGSS 233 e F- Testemunha..... **51**
- Figura 3.** Suscetibilidade a isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* do Quiabeiro em Plantas da Cultivar Valença, 2019. Plantas com desfolha e murcha (A) A- MGSS 10, Plantas mortas (B-E). B- MGS:S 221, C-MGSS 224, D-MGSS 226, E- MGSS 277, Planta Sadia (F). F- TESTEMUNHA (sem patógeno). ..... **55**
- Figura 4.** Escurecimento vascular de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* do quiabeiro em Plantas da Cultivar Valença, 2019. A- MGSS 10, B- MGSS 221, C-MGSS 224, D-MGSS 226, E- MGSS 277, F- TESTEMUNHA (sem patógeno) ..... **56**
- Figura 5.** Colônias obtidas de isolamento do sistema vascular da cultivar Valença com escurecimento A- MGSS 10, B- MGSS 221, C-MGSS 224, D-MGSS 226, E- MGSS 277. .... **56**
- Figura 6.** Avaliação da suscetibilidade a isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* do quiabeiro em Plantas da Cultivar Santa Cruz, 2019. A- MGSS 10, B- MGSS 221, C-MGSS 224, D-MGSS 226, E- MGSS 277, F- TESTEMUNHA (sem patógeno). ..... **57**
- Figura 7.** Quiabeiro cultivar Valença com sintomas de Murcha de *Fusarium* na parte aérea, causado por *Fusarium. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Plantas com murcha, amarelecimento das folhas e desfolha (A-C). A - Planta inoculada com o isolado MGSS 55. B- Planta inoculada com o isolado MGSS 226. C- Planta inoculada com o isolado MGSS 323. Planta Sadia (D). D- Planta Testemunha (sem patógeno)..... **59**

- Figura 8.** Quiabeiro cultivar Valença com sintomas de fusariose na parte aérea da planta, causado por *Fusarium. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. A- Planta inoculada com o isolado MGSS 221. B- Planta inoculada com o isolado MGSS 277. C- Planta inoculada com o isolado MGSS 224. D- Planta inoculada com o isolado MGSS 10. E- Planta Testemunha (sem patógeno)..... **60**
- Figura 9.** Mudas cultivar Valença com sintomas internos característicos da Murcha de Fusarium e colônias obtidas a partir do reisolamento do *Fusarium. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, comprovando a existência da doença. Plantas com escurecimento vascular (A-C). A- Planta inoculada com MGSS 55. B- Planta inoculada com MGSS 226, C- Planta inoculada com isolado MGSS 323. Colônias obtidas do sistema vascular colonizado pelo patógeno. (D-F). D- MGSS 55, E- MGSS 226, F- MGSS 323. .... **61**
- Figura 10.** Bananeira cultivar Maçã Turiacú Amarela com sintomas de Fusariose, causado por *Fusarium. oxysporum* f. sp. *cubense*. A e B- Planta inoculada com MGSS 324, apresentando amarelecimento das folhas e murcha. C e D- Planta inoculada com o MGSS 324, com pontos escurecidos na região central do rizoma. .... **64**
- Figura 11.** Bananeira cultivar Prata Anã com sintomas de Fusariose, causado por *Fusarium. oxysporum* f. sp. *cubense*. Inoculada com o MGSS 324. A- Planta morta. B- Corte transversal do Rizoma apresentando escurecimento..... **64**
- Figura 12.** Bananeira variedade Maçã Casca Verde com sintomas de Fusariose, causado por *Fusarium. oxysporum* f. sp. *cubense*. Inoculada com o isolado MGSS 324. A- Planta apresentando amarelecimento e queda das folhas com efeito guarda chuva. B- Corte transversal do Sistema Vascular e Rizoma apresentando pontos de escurecimento e apodrecimento..... **64**
- Figura 13.** Bananeira cultivar Pacovan Ken e Mysore resistentes ao isolado MGSS 324 *Fusarium. oxysporum* f. sp. *cubense*. A- Planta exibindo amarelecimento tênue, sem sintomas de fusariose. B- Corte transversal do Sistema Vascular e Rizoma sem escurecimento indicando a resistência da cultivar. C- Variedade Mysore com comportamento resistente ao Mal do Panamá, D- Rizoma da variedade Mysore sem escurecimento..... **65**

- Figura 14.** Reisolamento do rizoma das variedades de bananeira que foram mais suscetível ao MGSS 324 (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*). A- Maçã Turiaçú Amarela. B- Maçã Casca Verde. .... 65
- Figura 15.** Sintomas de Murcha de Fusarium observados nas variedades ‘Cacau Figo Cinza’ e ‘Maçã Casca Verde’ causado pelo isolado MGSS 325. A – Sintomas externos da fusariose na variedade Cacau Figo Cinza B- Sintomas internos de escurecimento do rizoma. C- Sintomas externos da fusariose na variedade Maçã Casca Verde. D- Sintomas internos de escurecimento do rizoma da variedade Maçã Casca Verde..... 66
- Figura 16.** Bananeiras Variedades ‘Caru Roxa’ e ‘Pacovan Ken’ que apresentaram comportamento resistente frente ao isolado MGSS 325. A- Variedade ‘Caru Roxa’, B- Rizoma sem sintomas de escurecimento, C- Variedade Pacovan Ken sem sintomas externos de doença, D – Rizoma da variedade Pacovan Ken sem sintomas internos de escurecimento..... 67
- Figura 17.** Reisolamento de tecidos sintomáticos das variedades de Bananeira ‘Maçã Casca Verde’ e ‘Cacau Figo Cinza’ com comportamento suscetível ao isolado MGSS 325. (A- B) Maçã Casca Verde. A- Isolamento do rizoma com escurecimento. B- Visualização da colônia pura de MGSS 325; (C-D) Cacau Figo Cinza. C- Isolamento do rizoma com escurecimento. D- Crescimento da Colônia pura de MGSS 325..... 67
- Figura 18.** Cultivares de Feijão caupi com sintomas de murcha de Fusarium causadas por *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, A (BRS- Aracê), B (BRS – Pujante), C (Guariba), D (Tumucumaque), E (BR-17 Gurguéia) e F (Manteiguinha)..... 71
- Figura 19.** Planta com presença de murcha de Fusarium, (A) cultivar BR -17 Gurguéia com escurecimentos vasculares e planta (B) cultivar BRS-pujante aparentemente sadia, livre de sintomas da doença..... 72
- Figura 20.** Confirmação da presença do fitopatógeno em plantas de Feijão Caupi, A.cultivar BR- 17 Gurguéia, B.BRS Guariba..... 72
- Figura 21.** Muda de maracujazeiro Amarelo com sintomas de Murcha de Fusarium nas folhas causado por *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*. A- Planta inoculada com o MGSS 329. B- Testemunha..... 75

- Figura 22.** Comprovação do agente causal da murcha de *Fusarium* em Maracujazeiro amarelo (*P. edulis*). A – Colônia pura do *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* isolado MGSS 329 obtida do sistema vascular de mudas sintomáticas. B- Corte transversal no caule de maracujazeiro Amarelo inoculada com o MGSS 329 apresentando escurecimento vascular. .... 75
- Figura 23.** Observação de sintomas causados pelos isolados MGSS 415 e MGSS 416 nas cultivares de Coentro ao 15° dia após inoculação em comparação a testemunha. A- C- Variedade Verdão, A- Testemunha, B- MGSS 415, C- MGSS 416, D-F- Variedade Verdão Super, D- Testemunha, E- MGSS 415, F- MGSS 416..... 77
- Figura 24.** Cultivares de Coentro avaliadas ao 15° (DAI) inoculadas com o isolado MGSS 305. A – Variedade Verdão sem sintomas causados pelo MGSS 305, B- Variedade Verdão Super com folhas apresentando amarelecimento e tombamento..... 78
- Figura 25.** Isolamentos de tecidos sintomáticos de Coentro para confirmação da Murcha de *Fusarium*. A- Crescimento da colônia MGSS 415 a partir do tecido sintomático, B- Colônia pura do patógeno MGSS 415, C- Crescimento da colônia MGSS 416 a partir do tecido sintomático, D- Colônia pura do patógeno MGSS 415..... 78
- Figura 26.** Variabilidade de coloração de colônias de *Fusarium* obtidas de tomateiro (*Solanum lycopersici*). Verso do verso das Colônias. A- Totalmente rosa (MGSS 01), B- Centro Rosa e bordas brancas MGSS 40, C- Rosa claro MGSS 41, D- centro da colônia rosa e bordas roxas MGSS 42, E- Roxo no centro e bordas claras MGSS 43, F- Rosa Claro MGSS 81, G- Totalmente Rosa MGSS 182, H- Rosa MGSS 183, I- Totalmente Rosa MGSS 225, J- Centro Rosa e bordas claras MGSS 233..... 80
- Figura 27.** Variabilidade de coloração de colônias de *Fusarium* obtidas de Quiabeiro (*Abelmoschus esculentus*). Verso do verso das Colônias A- Roxa MGSS 10, B- Branca MGSS 55, C- Rosa com bordas brancas MGSS 221, D- Roxa MGSS 224, E- Rosa MGSS 226, F- Rosa claro MGSS 323, G- Roxo MGSS 277..... 81
- Figura 28.** Variabilidade de coloração de colônias de *Fusarium* obtidas de Bananeira (*Musa* sp). reverso (B-D). (A-B) MGSS 324, A- Verso da Colônia: 81

Centro Rosa e bordas brancas, B- Reverso da colônia Centro rosa e bordas brancas, (C-D) MGSS 325. C- Verso Centro rosa e bordas brancas e D- Reverso da Colônia: Centro roxo e bordas rosas.....	
<b>Figura 29.</b> Variabilidade de coloração de colônias de <i>Fusarium</i> obtidas de Feijão-Caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> ) (A) e Coentro ( <i>Corinadrum sativum</i> ) (B-D). A- Rosa com bordas brancas MGSS 60, B- Salmão MGSS 305, C- Rosa claro MGSS 415, D- Rosa com borda roxa 416.....	<b>81</b>
<b>Figura 30.</b> Variabilidade de coloração de colônias de <i>Fusarium</i> obtidas de Maracujazeiro ( <i>Passiflora edulis</i> ). Verso do verso das Colônias. A- Roxo MGSRS 98, B- Rosa claro MGSS 99, C- Rosa com bordas claras MGSS 101, D – Totalmente Rosa MGSS 103, E – Rosa MGSS 104, F- Rosa Claro MGSS 326, G – Branco MGSS 327, H- Totalmente Rosa MGSS 328, I- Centro Rosa e borda Branca MGSS 329, J- Rosa MGSS 331, K – Rosa MGSS 332, L- Roxa com borda branca MGSS 333, M - Roxa MGSS 334, N- Rosa com borda branca MGSS 335.....	<b>82</b>
<b>Figura 31.</b> Características micromorfológicas comuns de isolados que foram agrupados no grupo 1. A- Macroconídeos retos ou ligeiramente curvados, B- Microconídeos com formato oval, C- Clamidósporos, C1- individuais ou C2- em pares e D- Monofiálide curta.....	<b>83</b>
<b>Figura 32.</b> Características micromorfológicas comuns de isolados que foram agrupados no grupo 2. A- Polifiálides , B- Macroconídeos levemente curvado C- Monofiálides e D- Microconídeos em abundância com formato oval.....	<b>84</b>
<b>Figura 33.</b> Árvore filogenética de Inferência Bayesiana construída a partir do alinhamento de sequências cmdA, rpb2, tef1 $\alpha$ e $\beta$ -tubulina combinados para isolados de <i>F. oxysporum</i> species complex (FOSC). <i>Fusarium udum</i> CBS 177.31 foi utilizado como outgroup.....	<b>90</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> preservados na Micoteca e utilizados no teste de patogenicidade em mudas de tomateiro cultivar Santa Cruz.....	<b>34</b>
<b>Tabela 2.</b>	Isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> preservados na Micoteca utilizados no teste de patogenicidade em mudas de quiabeiro.....	<b>35</b>
<b>Tabela 3</b>	Escala de notas para avaliação da patogenicidade de isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp <i>vasinfectum</i> em plantas de quiabeiro cultivar Valença.....	<b>35</b>
<b>Tabela 4</b>	Reação de cultivares de Bananeira utilizadas no teste de patogenicidade com isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (FOC).....	<b>36</b>
<b>Tabela 5</b>	Escala de notas para avaliação da patogenicidade de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>cubense</i> em plantas de bananeira.....	<b>37</b>
<b>Tabela 6</b>	Isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> preservados na Micoteca utilizados no teste de patogenicidade em mudas de Maracujazeiro amarelo.....	<b>39</b>
<b>Tabela 7</b>	Escala de notas para avaliação da patogenicidade de <i>Fusarium oxysporum</i> em diferentes hospedeiros.....	<b>40</b>
<b>Tabela 8</b>	<i>Primers</i> e temperatura de anelamento utilizados na amplificação de 4 genes para identificação a nível de espécie de <i>Fusarium</i> spp.	<b>42</b>
<b>Tabela 9</b>	Isolados do gênero <i>Fusarium</i> preservados na Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva” nos métodos de Castellani, Liofilização, Repicagem contínua e Solo esterilizado.....	<b>46</b>
<b>Tabela 10</b>	Patogenicidade de isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> em mudas de tomateiro cultivar Santa Cruz.2018.....	<b>50</b>
<b>Tabela 11</b>	Severidade de isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> de quiabeiro nas cultivares Valença e Santa Cruz 47, maio, 2019.....	<b>54</b>
<b>Tabela 12</b>	Patogenicidade de isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> em quiabeiro, cultivar Valença, Novembro de 2020.....	<b>58</b>
<b>Tabela 13</b>	Avaliação da Severidade e Índice de Doença do Mal-do-Panamá em nove cultivares de Bananeira, inoculados com isolados MGSS	

	324 e MGSS 325 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> São Luís - MA, 2020.....	<b>63</b>
<b>Tabela 14</b>	Reação de cultivares de feijão caupi a <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i> , 2019.....	<b>70</b>
<b>Tabela 15</b>	Patogenicidade dos isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> de Maracujazeiro Amarelo, São Luís. 2020.....	<b>73</b>
<b>Tabela 16</b>	Avaliação de patogenicidade de isolados de <i>F. oxysporum</i> em duas cultivares de Coentro ( <i>C. sativum</i> ), 2021.....	<b>77</b>
<b>Tabela 17</b>	Características macromorfológicas e micromorfológicas de isolados de <i>Fusarium</i> .....	<b>86</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>cmdA</b>	Calmodulina
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>FFSC</b>	<i>Fusarium fujikuroi</i> species complex
<b>FOC</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>
<b>FOL</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
<b>FOP</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i>
<b>FOSC</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex
<b>FOT</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i>
<b>FOV</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>
<b>MGSS</b>	Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva”
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>RPB2</b>	Segunda maior subunidade de RNA polimerase
<b>TEF 1<math>\alpha</math></b>	Fator de alongamento de tradução 1- $\alpha$
<b>tub2</b>	$\beta$ --tubulina

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2 - REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
2.1- Importância da Manutenção da Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva” e da Utilização dos Métodos de Preservação de Microrganismos. ....	21
2.2 - Da Taxonomia Clássica à Taxonomia Moderna para Classificação de Fungos. ....	24
2.3- O Gênero <i>Fusarium</i> Link. ....	26
2.3.1- O complexo de espécies dentro do Gênero <i>Fusarium</i> e a filogenia. ....	28
2.3.2-O caso especial de <i>Fusarium oxysporum</i> . ....	29
<b>3-METODOLOGIA .....</b>	<b>31</b>
3.1-Local do Experimento .....	31
3.2 - Obtenção dos isolados fúngicos fitopatogênicos de <i>Fusarium</i> spp. ....	31
3.3 – Método de Preservação de <i>Fusarium</i> spp. ....	32
3.3.1- Preservação em Solo Estéril.....	32
3.3.2- Repicagem Contínua.....	32
3.3.3- Água destilada esterilizada ou Castellani .....	32
3.4 – Teste de Patogenicidade de isolados de <i>F. oxysporum</i> com os respectivos hospedeiros conservados em diferentes métodos. ....	32
3.4.1 – Teste de patogenicidade de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> em plantas de tomateiro ( <i>Solanum lycopersicum</i> ). ....	33
3.4.2 – Teste de patogenicidade de isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> em plantas de quiabeiro ( <i>Abelmoschus esculentus</i> ). ....	34
3.4.3- Teste de patogenicidade de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>cubense</i> em cultivares de bananeira ( <i>Musa</i> sp.). ....	36
3.4.4- Teste de Patogenicidade de isolado de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i> em cultivares de Feijão-Caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> ). ....	38
3.4.5- Teste de Patogenicidade com isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> em maracujazeiro. ....	39
3.4.6- Teste de Patogenicidade com isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> em cultivares de coentro ( <i>Coriandrum sativum</i> ). ....	40
3.4.7- Análise do Índice de Doença .....	41
3.5- Caracterização morfológica de isolados de <i>Fusarium</i> .....	41
3.6– Caracterização Molecular dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. ....	41
3.6.1- Extração de DNA.....	42
3.6.2- Amplificação de PCR .....	42
3.6.3- Sequenciamento de DNA e análises filogenéticas. ....	43
<b>4- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>

4.1 Métodos de Preservação de isolados de <i>Fusarium</i> spp.....	44
4.2 – Teste de patogenicidade de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> em plantas de tomateiro ( <i>Solanum lycopersicum</i> ).....	49
4.3 Teste de patogenicidade de isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> em plantas de quiabeiro ( <i>Abelmoschus esculentus</i> ).....	53
4.3.2- Patogenicidade de isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp <i>vasinfectum</i> conservados em método de repicagem contínua.....	58
4.4 Teste de patogenicidade de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>cubense</i> em cultivares de bananeira ( <i>Musa</i> sp.).....	62
<b>4.5 Teste de Patogenicidade de isolado de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i> em cultivares de Feijão-Caupi (<i>Vigna unguiculata</i>).....</b>	<b>69</b>
4.6 Teste de Patogenicidade com isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> (FOP) em maracujazeiro.....	73
4.7- Teste de Patogenicidade com isolados de <i>F. oxysporum</i> em cultivares de coentro ( <i>Coriandrum sativum</i> ).....	76
4.8 - Caracterização morfológica de isolados de <i>Fusarium</i> .....	80
4.9 Caracterização Molecular dos isolados de <i>Fusarium</i> spp.....	89
<b>5- CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>97</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>99</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>113</b>
<b>APÊNDICE A – SEQUÊNCIAS UTILIZADAS NA ANÁLISE FILOGENÉTICA DE ISOLADOS DE <i>Fusarium</i>.....</b>	<b>114</b>

## 1 – INTRODUÇÃO

A preservação *ex situ* dos microrganismos é uma prática indispensável para o conhecimento e uso da biodiversidade. Sem uma boa conservação dos isolados fúngicos, investigações científicas tornam-se difícil, se não impossível de reproduzir (BUGNI; IRELAND, 2004).

Por muitos anos, diferentes métodos de conservação de culturas foram desenvolvidos para manutenção e conservação de microrganismos (fungos e bactérias), como liofilização, criopreservação, repicagem contínua, água destilada esterilizada, camada de óleo mineral, secagem em papel filtro, secagem em solo, sílica gel entre outros (ESCOBAR; CASTRO-RIOS, 2021).

Os microrganismos requerem frequentemente métodos específicos de preservação, a fim de que sejam assegurados viabilidade, armazenamento, pureza e estabilidade genética. Por medidas de segurança, e para minimizar a possibilidade de perda de linhagens, cada cultura deve ser mantida por pelo menos dois métodos distintos (SETTE *et al.*, 2006).

A identificação de fungos em nível de espécie, é um componente chave de muitos esforços de pesquisa de ciências da vida. A identificação correta das espécies de patógenos das plantas é fundamental para todos os aspectos da ecologia, taxonomia, genômica e bioprospecção, e pode até resultar em medidas de quarentena que influenciam o comércio internacional de plantas e produtos vegetais (RAJA *et al.*, 2017; BEGEROW *et al.*, 2010).

No gênero *Fusarium*, atualmente existem três diferentes conceitos básicos de espécies que estão sendo empregados: morfológica, biológica e filogenética. A maioria das pesquisas usam uma combinação de marcadores morfológicos, biológicos e filogenéticos em uma abordagem polifásica (SUMMERELL; 2019).

A identificação morfológica do *Fusarium* baseia-se principalmente em caracteres macro e micromorfológicos, incluindo a cor e a aparência da colônia e no tamanho, forma e desenvolvimento de esporos sexuais e assexuados, bem como estruturas de formação de esporos (MORETTI, 2009). No entanto, a identificação bem sucedida pode ser difícil por causa de características morfológicas similares ou degradados em meios de cultura (AL HATMI *et al.*, 2016).

As espécies do gênero *Fusarium* são conhecidas por exibirem alta semelhança morfológica, e por não apresentarem diferenças entre estirpes patogênicas, não-

patogênicas ou saprófitas, caracterizadas por uma grande diversidade, especialmente no *habitat* solo. Assim, meios de cultura padronizados em conjunto com dados moleculares multilocus, são utilizados para uma confiável identificação em nível de espécie (O'DONNELL *et al.*, 2009). De um ponto de vista diagnóstico, a separação desta espécie em *formae speciales* tem importância em implicações de quarentena (SUMMERELL; SALLEH; LESLIE, 2003).

Os métodos moleculares substituíram métodos tradicionais de identificação na maioria das pesquisas taxonômicas. Os métodos baseados em DNA, particularmente usando análises de concordância genealógica, levam frequentemente à detecção de novas espécies (WANG *et al.*, 2019; MARYANI *et al.*, 2019; SCHEEL *et al.*, 2013; NUCCI *et al.*, 2013). Os marcadores de rDNA nucleares de diagnóstico padrão, têm resolução limitada para distinguir os táxons atualmente reconhecidos em *Fusarium* (GEISER *et al.*, 2004; AL HATMI *et al.*, 2016).

O gênero *Fusarium* é representado por 17 complexos de espécies baseados em análises filogenéticas de multilocus (O'DONNELL *et al.*, 2013; SANDOVAL-DENIS *et al.*, 2018). Resultados de estudos filogenéticos mostram que as diferentes *formae speciales* de *F. oxysporum* tendem a se agrupar, em vez de haver uma relação filogenética mais próxima da mesma *formae speciales*, indicando que há uma complexidade maior na história evolutiva desta espécie (FOURIE *et al.*, 2009).

Identificação dos fungos ao nível das espécies é primordial nas aplicações científicas (ecologia, taxonomia, genômica e bioprospecção) (RAJA *et al.*, 2017) e para ter acesso a essas espécies, as coleções de culturas fornecem um repositório de biodiversidade que ocorrem em *habitats* naturais, protegem o material genético que pode ser utilizado no desenvolvimento de pesquisas futuras (RHODES *et al.*, 2016).

Diante do exposto, o objetivo desta tese foi verificar preservação da patogenicidade dos isolados de *Fusarium* em seus respectivos hospedeiros que estão conservados nos diferentes métodos e caracterizar isolados através da combinação da morfologia e relações filogenéticas através de quatro genes codificadores de proteínas.

## 2 - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- Importância da Manutenção da Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva” e da Utilização dos Métodos de Preservação de Microrganismos.

Coleções Microbianas são consideradas Centros de Recursos Biológicos, mantendo isolados de diferentes microrganismos em condições ótimas para aplicações em pesquisa, biotecnologia e indústria (SHARMA *et al.*, 2017). A preservação *ex situ* dos microrganismos é uma prática indispensável para o conhecimento e uso da biodiversidade. Sem uma boa conservação dos isolados fúngicos, investigações científicas tornam-se difícil, se não impossível de reproduzir (BUGNI; IRELAND, 2004)

No Centro Mundial de Dados de Microrganismos (WDCM – *World Data Center for Microorganisms*) ([www.wfcc.info/ccinfo/statistics/](http://www.wfcc.info/ccinfo/statistics/)) há registros de cerca de 813 coleções de culturas, distribuídas por 78 países. No continente americano das 153 coleções registradas na WDCM, o Brasil possui quase a metade do número de cadastros com 65 coleções de culturas registradas (WDCM, 2021).

A Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva”- MGSS pertencente a Universidade Estadual do Maranhão é constituída de 420 isolados de microrganismos de diferentes *habitats* e hospedeiros de plantas e insetos, com destaque para o gênero *Fusarium* que apresenta a maior porcentagem de isolados da Coleção, que conta também com microrganismos utilizados em biocontrole de doenças de plantas como *Trichoderma* spp., e de insetos pragas, como *Beauveria* e *Metarhizium* que estão empregados em diferentes métodos de preservação (OLIVEIRA, 2016).

A Coleção está cadastrada junto ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (Sisbio) sob registro nº 5991355. O Comitê de Assessoramento Técnico do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (CAT-Sisbio) é composto pelas seguintes instituições: Ibama, Ministério do Meio Ambiente, Ministério da Ciência e Tecnologia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) entre outros órgãos. A Micoteca MGSS está ainda integrada em uma rede nacional denominada “SpeciesLink”, que foi estabelecida pelo “Centro de Referência em Informação Ambiental” (CRIA), que disponibiliza as informações do acervo para toda comunidade interessada de forma livre e gratuita (SPECIESLINK, 2020).

A disponibilização dessas informações atende ao artigo 17 da Convenção da Diversidade Biológica, no qual o Brasil é signatário, sobre o intercâmbio de informações:

“As partes contratantes devem proporcionar o intercâmbio de informações, de todas as fontes disponíveis do público, pertinentes à conservação e a utilização sustentável da diversidade biológica, levando em conta as necessidades especiais dos países em desenvolvimento” (BRASIL, 2000).

Assim, a importância da manutenção e principalmente preservação de microrganismos caracteriza-se como reflexo da necessidade de utilização de organismos ou espécimes a qualquer momento, quer para fins experimentais, didáticos, industriais ou estudos comparativos (SOLA *et al.*, 2012) de todo esse patrimônio genético guardado em diferentes métodos de preservação na Micoteca Prof. Gilson Soares da Silva e em outras coleções biológicas.

Segundo Gonçalves *et al.*, (2016) a escolha do método de armazenamento depende da infraestrutura e dos equipamentos disponíveis no laboratório, do microrganismo em questão, aliado aos objetivos do trabalho e até mesmo, da preferência do pesquisador. Todo trabalho envolvendo a conservação e o armazenamento de microrganismos deve ser realizado envolvendo absoluta assepsia.

Nakasone *et al.*, (2004) classificaram os métodos de preservação de microorganismos em dois tempos: curto (repique contínuo) e ampliou o número de métodos classificados como a longo prazo (Camada de óleo mineral, água destilada (Castelani), substrato orgânico, solo, sílica gel, congelamento -20 °C e -80 °C, nitrogênio líquido, liofilização).

Existem diversos métodos de preservação de fungos, devendo-se levar em consideração na escolha do métodos, o conhecimento sobre o gênero, e as vantagens e desvantagens de cada método empregado. Dentre os métodos utilizados na MGSS temos: a repicagem contínua, o castellani, solo estéril.

A repicagem contínua é um dos métodos mais antigos, e ainda muito utilizado, e consiste na transferência periódica do microrganismo em estudo para novos tubos de ensaio contendo meio de cultura fresco (GONÇALVES *et al.*, 2016). É considerada uma técnica de conservação de curto prazo, uma vez que as culturas microbianas devem ser reativadas e renovadas periodicamente, para manter as características morfológicas e patogênicas, portanto, esses intervalos de tempo dependem do tipo de microrganismo a ser preservado (ESCOBAR; CASTRO-RIOS, 2021).As vantagens deste método são o baixo custo, método simples, seguro e não requer pessoal especializado (GONÇALVES *et al.*, 2016).

O método da repicagem contínua apresenta como desvantagens possibilidade de

mudanças na virulência, nas características das culturas e decréscimo da esporulação. Além destas, o espaço relativamente grande para o armazenamento, riscos de contaminação e possível perda da linhagem. O tempo de viabilidade é menor do que 1 ano (CUI *et al.*, 2018). Iqbal *et al.*, (2017) constataram que o método de repicagem contínua apresentou baixas taxas de viabilidade aos 24 meses de preservação de *Trichoderma viride*. Pers. Quando os isolados estão prontos no método de repicagem contínua, eles são mantidos refrigerados a 4 °C, onde eles podem permanecer até o momento de uso (BAZÁN *et al.*; 2004).

O método de Água destilada esterilizada ou Castellani consiste em incluir blocos de ágar com estruturas fúngicas em tubos ou frascos com água destilada estéril, e estes são selados por tampas de rosca, borracha ou tampas de algodão e armazenado em temperatura ambiente ou frio (ESCOBAR; CASTRO-RIOS, 2021).

Normalmente, colocam-se cinco discos por frasco de vidro (10mL) contendo água destilada esterilizada até a metade de sua capacidade, e logo após são mantidos em temperatura ambiente ou em torno de 10 °C (GONÇALVES *et al.*, 2016).

Esse método diminui a tendência ao pleomorfismo por parte de algumas espécies de fungos, previne o ataque de ácaros, além de ser um método simples e de baixo custo, que não requer pessoal especializado e garante muito a viabilidade e características das culturas; é útil com praticamente todos os fungos patogênicos porque conseguiu manter viabilidade, pureza e estabilidade por períodos de mais de 20 anos (FERNANDEZ ANDREU *et al.*, 2013).

As desvantagens desse método é que os isolados podem degenerar durante o armazenamento e o tempo de conservação varia de acordo com as características do fungo (HU *et al.*, 2014).

Geralmente fungos como *Calonectria* spp., *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp., *Sclerotium cepivorum*, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz & Sacc., *Phoma* sp. e *Verticillium* spp. quando armazenados em água permanecem viáveis até 10 anos (GONÇALVES *et al.*, 2016).

O armazenamento em solo esterilizado é uma técnica de fácil execução, requer pouco espaço, possibilita a obtenção de grande quantidade de propágulos de microrganismos e garante sua viabilidade por muito tempo (GONÇALVES *et al.*, 2016). Há duas técnicas de preservação de culturas de fungo neste método. A primeira consiste em utilizar solo estéril infestado com inóculo do patógeno e este solo deve ser imediatamente seco após a infestação sendo armazenado em refrigerador. Na segunda

técnica, o solo previamente infestado com o microrganismo é incubado, permitindo assim, o crescimento do fungo (BUENO, 2006).

Este método é de baixo custo e efetivo (SINGH *et al.*, 2018). A viabilidade de isolados de *Fusarium* foi confirmada por Beloti *et al.*, (2017) entre 13 e 25 anos de tempo de preservação nesse método.

O método de conservação em solo esterilizado é indicado para fungos habitantes do solo como *Rhizoctonia* spp., *Sclerotium* spp., *Alternaria* spp., *Cochliobolus* sp., *Calonectria* spp., *Cylindrocladiella*, *Falcocladium*, *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. e *Gliocladium* spp. Grandes coleções podem ser armazenadas por este método numa sala com baixas temperaturas (4–5 °C) (GONÇALVES *et al.*, (2016). Segundo Singh *et al.*, (2018) existe um risco de mutação e perda de esporulação para o gênero *Fusarium*.

## **2.2 - Da Taxonomia Clássica à Taxonomia Moderna para Classificação de Fungos.**

O uso de morfologia na identificação de espécies de fungos é muito importante para entender a evolução dos caracteres morfológicos, no entanto, as abordagens morfológicas da sistemática fúngica, embora rotineiramente utilizadas em estudos taxonômicos para a classificação de fungos a nível ordem ou família (WANG *et al.*, 2016), nem sempre funcionam bem para classificações de nível inferior (espécies) (O'DONNELL *et al.*, 2015). Em algumas linhagens altamente específicas de fungos, os caracteres morfológicos podem ser controversos ou problemáticos, mesmo para os micologistas treinados, pois nem sempre fornecem agrupamentos precisos dentro de um quadro evolutivo, principalmente no nível das espécies (AL-HATMI *et al.*, 2016).

São duas as principais limitações ao uso das características tradicionais micromorfológicas e baseadas no ciclo de vida: a falta de especificidade demonstrada por alguns fungos, e um alto nível de plasticidade fenotípica. Embora existam formas patogênicas altamente específicas ao hospedeiro, no caso das *formae speciales* de *Fusarium oxysporum*, a espécie é um organismo comum habitante do solo, e pode ocorrer em uma ampla gama de materiais, apresentando-se como um organismo saprofítico (BRIDGE; SPOONER; ROBERTS, 2005).

A utilização de dados de sequências para análises filogenéticas, biológicas, genéticas e evolutivas de 126 táxons forneceram entendimento sobre a diversidade inter e intra-relacionamentos de grupos de fungos (HYDE *et al.*, 2020), o que acabou por

complementar a classificação tradicional de fungos baseada na morfologia ao longo do tempo (SUMMERELL, 2019).

Como consequência, surgiram métodos baseados em sequências de DNA para identificar espécies dentro dos fungos mega diversos (HIBBETT *et al.*, 2011; HIBBETT; TAYLOR, 2013; BRIDGE; SPOONER; ROBERTS, 2005).

Nos últimos anos, as modernas ferramentas taxonômicas juntamente com análises moleculares para o inventário da diversidade de fungos têm sinalizado que o reino Fungi é um grupo de organismos altamente variáveis na morfologia, fisiologia, genética e distribuição geográfica (HIBBETT *et al.*, 2011).

De acordo com 10ª edição do *Dictionary of the Fungi* três reinos são aceitos: Chromista, Fungi e Protozoa, e neste trabalho foram descritas 100.000 espécies de fungos até 200, sendo os fungos verdadeiros pertencentes aos filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Microsporidia e Zygomycota; (KIRK *et al.*, 2008). Com o advento das técnicas moleculares Hawksworth, Lücking (2017), concluíram que a estimativa de espécies de fungos comumente citada de 1,5 milhões de espécies existentes na terra, na verdade esteja entre 2,2 e 3,8 milhões de espécies. Os métodos baseados em técnicas moleculares constituem as principais estratégias utilizadas para identificação de fungos fitopatogênicos. Esses métodos são altamente sensíveis, apresentam alta especificidade e permitem detecção rápida e acurada de diversos fungos fitopatogênicos (PINHO; MACHADO; FIRMINO, 2016).

Há diversos marcadores moleculares em estudos de sistemática para diferentes níveis taxonômicos (STUKENBROCK *et al.*, 2012; QUAEDVLIEG *et al.*, 2012; REHNER; BUCKLEY, 2005; ARRUDA *et al.*, 2003), entre eles, o DNA ribossomal (rDNA) têm sido proposto como um marcador potencial de código de barras para fungos (BELLEMAIN *et al.*, 2010; PORTER; GOLDING, 2011; SCHOCH *et al.*, 2012). Apesar de a região ITS (rDNA) funcionar bem como um marcador de código de barras fúngico adequado, ela foi objeto de debate (KISS, 2012), pois não funciona bem em alguns gêneros altamente específicos, como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma*. (SCHOCH *et al.*, 2012; SEIFERT *et al.*, 2007; AL-HATMI *et al.*, 2016).

O objetivo da codificação de barras de DNA é aplicar tecnologia de sequenciamento de DNA de alto rendimento para triagem em larga escala de um ou alguns genes de referência para identificar espécimes desconhecidos e melhorar a descoberta de novas espécies (HEBERT *et al.*, 2003a, HEBERT *et al.*, 2003 b, STOECKLE, 2003; STIELOW *et al.*, 2015).

Os genes codificadores de proteínas são utilizados para a identificação de espécies via codificação de barras, devido à presença de regiões de íntrons, que às vezes evoluem a uma taxa mais rápida em relação aos ITS (GEISER *et al.*, 2004), e são empregadas em análises filogenéticas devido à sua melhor resolução em níveis taxonômicos mais elevados em comparação com genes de rRNA. Entre os marcadores de codificação de proteínas, a maior (RPB1) e a segunda maior (RPB2) subunidades de RNA polimerase, (LIU; HALL, 2004; REEB; LUTZONI; ROUX; 2004) fator de alongamento de tradução 1-alfa tef1), (REHNER; BUCKLEY, 2005) e beta-tubulina ( tub2 / BenA ) (STUKENBROCK *et al.*, 2012, O'DONNELL, CIGELNIK, 1997) e calmodulina (cmdA), foram mais comumente usados para inferir relações filogenéticas entre fungos (QUAEDVLIEG *et al.*, 2012, HIBBETT *et al.*, 2007; O'DONNELL *et al.*, 1998).

Segundo Stielow *et al.*, (2015) é provável que o fator de alongação 1 alfa (TEF1 $\alpha$ ) seja um dos candidatos mais ideais para os códigos de barras não-rDNA por causa de seus "trade-offs" equilibrados, em particular quando se trata de uma aceitação mais ampla da comunidade de usuários existentes, e versatilidade entre importantes ordens de fungos. Estes autores sugerem que para a identificação de espécies desconhecidas ou a validação de espécimes a codificação de barras de DNA fúngica com ITS e TEF1 $\alpha$ , aumentará a resolução e levará ao desenvolvimento de mais conjuntos de dados completos e estruturados.

Geiser *et al.* (2004) afirmam que o gene do fator de alongação 1- $\alpha$  (TEF1 $\alpha$ ), que codifica uma parte essencial do maquinário de tradução de proteínas, tem alta utilidade filogenética porque (i) é altamente informativo ao nível da espécie em *Fusarium*; (ii) cópias não ortólogas do gene não foram detectadas no gênero; e (iii) foram projetados *primers* universais que funcionam em toda a largura filogenética do gênero.

O'Donnell *et al.*, (2015) afirmam que a maior subunidade da RNA polymerase I (RPB1) e a segunda maior subunidade da RNA polymerase II (RPB2) e fator de alongação 1 alfa (TEF 1 $\alpha$ ) são regiões do DNA mais informativas para o gênero *Fusarium*.

### **2.3- O Gênero *Fusarium* Link.**

O gênero *Fusarium* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales e família Nectriaceae teve sua primeira descrição

morfológica em 1809, por Link (BOOTH, 1971), sendo mais tarde dividido em seções por Wollenweber e Reinking, onde forneceu um sistema subgenérico baseado em 16 seções, 65 espécies e 77 variedades e formas subespecíficas em um dos trabalhos pioneiros na taxonomia desse gênero (NELSON *et al.*, 1983).

Na década de 1940 e 1950, Snyder e Hansen reduziram o número de espécies dentro do gênero para nove, e demonstraram que, somente usando culturas derivadas de um único esporo, as identificações de espécies poderiam ser feitas de forma confiável. As nove espécies reconhecidas por Snyder e Hansen foram: *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *F. roseum*, *F. lateritium*, *F. tricinctum*, *F. nivale*, *F. rigidiuscula* e *F. episphaeria*. Outros autores também descreveram morfologicamente espécies do gênero *Fusarium* como Gordon entre (1930-1960), Messiaen e Cassini, Matuo, Raillo (1930) (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

O próximo desenvolvimento significativo na taxonomia de *Fusarium* foi feito por Booth durante os anos 1960 e 1970, e publicado como uma monografia: “The Genus *Fusarium*”. Booth (1971) introduziu o uso da morfologia das células conidiogênicas, especialmente aquelas que produzem os microconídios, como um caráter diagnóstico em nível de espécie. A morfologia das células conidiogênicas agora é essencial para distinguir algumas das espécies nas seções *Liseola* e *Sporotrichiella* (BOOTH, 1971).

Gerlach; Nirenberg (1982) descreveram o gênero *Fusarium* com 90 espécies ou variedades. Já Nelson *et al.*, (1983) criaram um novo sistema taxonômico composto de 30 espécies, tendo como base todos os trabalhos publicados até então. Evidências moleculares baseadas na análise de sequências de DNA, têm mostrado que as seções *Liseola* não são monofiléticas, o que levou Nirenberg; O’Donnell (1998) a fazerem uma revisão na seção *Liseola*, principalmente no complexo de *Gibberella fujikuroi*, propondo 29 espécies, sendo 10 descritas como novas (VENTURA, 2000).

Gräfenhan *et al.*, (2011) estudando a taxonomia do gênero anamórfico *Fusarium*, um dos maiores gêneros de fungos, contendo quase 1.500 espécies, subespécies, variedades e *formae speciales*. *Fusarium* spp. incluem importantes patógenos de plantas e animais, e produtores de micotoxinas, e foram ligados até sete gêneros teleomorfos.

A maioria dos estudos filogenéticos realizados dentro do gênero se concentraram na resolução de relações evolutivas ao nível da espécie, dentro de clados de *Fusarium* de importância agrícola e medicinal (CHOI *et al.*, 2018; O’DONNELL *et al.*, 2010).

*Fusarium* é um gênero diverso de fungos contendo 300 espécies filogeneticamente distintas, com distribuição por todo mundo (Al-HATMI *et al.*, 2016; O’DONNELL *et al.*,

2015). Alguns membros fitopatogênicos do gênero são restritos a uma única espécie hospedeira, enquanto outros tem uma ampla gama de hospedeiros. O gênero está listado como um dos fungos mais destrutivos de plantas.

As estirpes de espécies de *Fusarium* podem causar uma gama extraordinariamente ampla de doenças de plantas. Os mais importantes são podridões da coroa e da raiz, podridões do colmo, podridão de grãos e as doenças vasculares que são bem conhecidas pela maioria dos fitopatologistas (NELSON, TOUSSOUN, COOK, 1981; SUMMERELL *et al.*, 2001), e outras doenças menos conhecidas, como doença de malformação na mangueira (PLOETZ, 2001).

As espécies de *Fusarium* são conhecidas por exibir uma alta plasticidade morfológica (TORBATI *et al.*, 2019), e todas as espécies possuem um estágio saprofítico e são habitantes comuns do solo. Uma preocupação com muitas das espécies que se encontram em diferentes ambientes, é que elas podem ser um conjunto de espécies irmãs, que são morfológicamente indistinguíveis, mas geneticamente distintas, que ainda não foram devidamente resolvidas (SUMMERELL, SALLEH, LESLIE, 2003). Isso exemplifica as complicações do uso de caracteres morfológicos para prever relacionamentos e histórias evolutivas, onde a morfologia frequentemente exibiu discórdia com os dados de sequência de DNA (YILMAZ *et al.*, 2021)

### 2.3.1- O complexo de espécies dentro do Gênero *Fusarium* e a filogenia.

O termo *species complex* ou complexo de espécies, não é bem definido, mas usualmente implica em um grupo de espécies com características morfológicas e marcadores filogenéticos compartilhados, e em algum nível de especiação crítica. Apesar de não ter status formal nomenclatural na *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants* (ICN), esse termo trouxe uma estabilidade nomenclatural e um mecanismo para auxiliar no delineamento de espécies particularmente para pesquisadores dessa taxonomia (SUMMERELL *et al.*, 2019).

*Fusarium fujikuroi species complex* (FFSC) é um dos maiores grupos do gênero *Fusarium*, e com ações dentro de ecossistemas de diferentes formas (IMAZAKI; KADOTA, 2015; MOUSSA *et al.*, 2017; AOKI *et al.*, 2018) e segundo Yilmaz *et al.*, (2021) mais de 60 espécies filogenéticas foram reconhecidas neste complexo.

Espécies dos dois complexos *Fusarium oxysporum species complex* (FOSC) e *Fusarium fujikuroi species complex* (FFSC) produzem micotoxinas, por exemplo, dentro

do FOOSC a espécie *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* já foi relatada produzindo ácido fusárico, e alta produção dessa micotoxina está associada a patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. (SINGH; SINGH; UPADHYAY, 2017), (LEE *et al.*, 2008) e *F. verticillioides* produzindo Fumonisin, moniliformina (JUNIOR *et al.*, 2019).

A análise filogenética com base na diversidade de sequências do DNA tem sido um fator crucial, e atualmente são usados os marcadores moleculares como ITS,  $\beta$ -tubulina, Alelos MAT e Calmodulina. Porém, a Histona H3 e o fator de alongação 1 alfa (TEF - 1 $\alpha$ ) são considerados mais úteis em estudos taxonômicos de fungos dentro do gênero *Fusarium* (RAMDIAL *et al.*, 2017).

Segundo O'Donnell *et al.*, (2015), quatro tecnologias complementares, porém distintas, e os avanços teóricos têm sido a chave para grande descoberta acelerada de espécies das últimas três décadas dentro do gênero *Fusarium*: são a união de PCR e sequenciamento de DNA automatizado no início de 1990, a aceitação de estudos baseados em *Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition* (GCPSR) como o padrão-ouro para o reconhecimento de espécies dentro da comunidade *Fusarium*, e grande número de isolados em coleções de culturas públicas acessíveis.

Através da GCPSR foi proposta uma hipótese biogeográfica a partir de evidências filogenéticas com três clados principais descritos dentro do FFSC, nomeados como clados africano, americano e asiático (O'DONNELL *et al.*, 1998; YILMAZ *et al.*, 2021). Além da descoberta de novas espécies nos últimos anos como *F. chinhoiense*, *F. longicornicola* e *F. pilosicola* (YILMAZ *et al.*, 2021), *F. odoratissimum*, *F. purpurascens*, *F. phialophorum*, *F. grosnichelii*, *F. duoseptatum*, *F. cugenangense*, *F. tardichlamydosporum*, *F. cugenangense*, *F. hexaseptatum*, *F. tardicrescens*, *F. kalimantanense*, *F. sangayamense* (MARYANI *et al.*, 2019).

### 2.3.2-O caso especial de *Fusarium oxysporum*.

A espécie *Fusarium oxysporum* pertence ao filo Ascomycota, classe Ascomycetes e ordem Hypocreales. Espécies fitopatogênicas distribuídas dentro do gênero *Fusarium*, dentre as quais o *F. oxysporum*, tem sua fase telomórfica desconhecida, sendo uma espécie grupo composta de dezenas de espécies que necessitam ser claramente definidas e separadas de maneira adequada (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

*F. oxysporum* é responsável por uma enorme variedade de doenças de plantas, normalmente envolvendo uma síndrome de murcha vascular (BERTOLDO *et al.*, 2015).

O fitopatógeno *F. oxysporum* é um fungo habitante do solo que invade as raízes e pode induzir a murcha vascular e a podridão radicular nas plantas hospedeiras colonizando o tecido do xilema (MICHELSE; REP, 2009; MA. *et al.*, 2013).

Dentro do gênero *Fusarium*, as *formae speciales* são mais comumente encontradas em *F. oxysporum*. Ao longo dos anos foi percebido uma variação na descrição do número de *formae speciales*. Segundo Michielse; Rep., (2009) mais de 120 *formae speciales* diferentes foram identificadas com base na especificidade das espécies hospedeiras. Gullino *et al.* (2012) e Lievens *et al.* (2012) afirmaram existir mais de 150 *formae speciales* de acordo com o hospedeiro específico, e mais recentemente Edel-Hermann; Lecomte (2019) revelaram existência de 106 *formae speciales* bem documentadas e 37 *formae speciales* insuficientemente documentadas.

As *formae speciales* de *F. oxysporum* são praticamente sempre definidas em termos de patogenicidade a um hospedeiro ou a um grupo de hospedeiros, geralmente relacionados. Estas podem ser subdivididas em raças, geralmente com base na patogenicidade, mas para um conjunto particular de linhagens, variedades ou cultivares do hospedeiro. Na prática, as cepas geralmente são atribuídas a uma única *formae specilaes*, geralmente com base em um teste de patogenicidade contra o hospedeiro em particular. Uma vez atribuídos a uma especialidade, as cepas raramente são verificadas se podem ser patogênicas em relação a outros hospedeiros. (LESLIE; SUMMERELL, 2006). A terminologia subespecífica é necessária para combinar os diferentes níveis de relação que existem entre diferentes grupos de *Fusarium*.

Existem três raças do *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansena que atacam ao hospedeiro *Solanum lycopersicum*. A raça 1 amplamente distribuída em todo mundo, enquanto a raça 2 foi reportada nos Estados Unidos, Brasil, Holanda, Grã-Bretanha, México, Austrália, Marrocos, Israel e Iraque e a raça 3 foi reportada no Brasil, Austrália, EUA, Coreia, África do Sul e Chile (REIS *et al.*, 2004a; CHOI *et al.*, 2013; JACOBS *et al.*, 2013; SEPÚLVEDA-CHAVERA *et al.*, 2014, JOSHI, 2018).

As raças de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Sm.) W.C. Snyder & H.N. Hansen foram designadas com base na sua patogenicidade a variedades diferenciadoras de banana (*Musa* sp.), em condições de campo. Foram descritas quatro raças patogênicas de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. A raça 1 ataca os clones Gros Michel (AAA), Maçã (Silk, AAB), Prata (AAB) e Pisang awak (ABB); a raça 2 ataca Bluggoe (ABB), conhecido no Brasil como 'Figo'. O mal-do-Panamá é endêmico em todas as regiões bananiculoras do mundo, as raças de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* 1 e 2 são distribuídas em quase todo o

Brasil e países da América do Sul, América Central e África (BRASIL, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2018), raça 3 ataca as helicônias (*Heliconia* spp.), mas como não afeta as bananeiras, não é mais considerada como parte da estrutura racial da forma *specialis cubense* (PLOETZ, 2005), a raça 4 está distribuída nos seguintes países Taiwan, Malásia, Sumatra, Filipinas, Vietnã, China, Austrália e Colômbia (JUNIOR *et al.* 2018; GARCÍA-BASTIDAS *et al.*, 2019).

*Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *tracheiphilum* E. F. Smith., Synd. & Hans., podem atacar *Vigna unguiculata*, *Glycine max*, *Gerbera jamesonii* e *Chrysanthemum morifolium* (EDEL-HERMANN; LECOMTE, 2019) atualmente descritas em quatro raças (1 a 4) tem sido relatada na Austrália, no Nordeste do Brasil e também na África especificamente na Nigéria (POTTORFF *et al.*, 2012).

As cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Atk) Synd. & Hans. estão atualmente separadas em sete raças em todo o mundo de acordo com sua capacidade de infectar variedades de espécies de algodão (*Gossypium* spp.), quiabeiro (*Abelmoschus esculentus* L.) e espécies das famílias Fabaceae, Solanaceae e Asteraceae (EDEL-HERMANN; LECOMTE, 2019, DAVIS *et al.*, 2006).

### **3-METODOLOGIA**

#### **3.1-Local do Experimento**

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratório de Fitopatologia - LABFITO, casa de vegetação, Laboratório de Genética – Labwick pertencente a Universidade Estadual do Maranhão, campus Paulo VI em São Luís – MA e no Laboratório de Fitopatologia da Universidade de Brasília – UnB, em Brasília- DF.

#### **3.2 - Obtenção dos isolados fúngicos fitopatogênicos de *Fusarium* spp.**

Foram obtidos cinquenta e oito isolados de *Fusarium* da Micoteca “Prof.º Gilson Soares da Silva” da Universidade Estadual do Maranhão oriundos de plantas sintomáticas. Todos isolados classificados a partir de estruturas morfológicas, e conservados em diferentes métodos estão catalogados com informações e fotografias.

### **3.3 – Método de Preservação de *Fusarium* spp.**

#### 3.3.1- Preservação em Solo Estéril

Tubos de ensaio contendo 5g de solo foram esterilizados por pelo menos duas vezes a 121° C por 1 hora e seco em temperatura ambiente. Para a preservação dos isolados, primeiramente foram cultivados isolados fúngicos em meio de cultura BDA em placas de 9 cm de diâmetro e incubadas em BOD com fotoperíodo de 12h, após sete dias de crescimento das colônias foram adicionadas as placas água destilada esterilizada e com uso de lâminas esterilizadas feito a raspagem para obtenção de solução de conídios ajustada para  $1 \times 10^6$  conídios/ mL e posterior transferências de 2 mL da suspensão de cada isolado para os tubos de ensaio contendo solo estéril. As amostras foram vedadas e estocadas em freezer a 5° C.

#### 3.3.2- Repicagem Contínua.

Foram efetuadas transferências de fragmentos de micélio de um meio de cultura (amostra matriz), para um novo meio de cultura Batata-Dextrose-Àgar - BDA, em tubos de ensaio, visando o desenvolvimento máximo vegetativo, estruturas de resistência e de propagação dos isolados fúngicos. As culturas foram estocadas em baixas temperaturas (10 °C). A repicagem contínua foi feita antes da exaustão total do meio de cultivo, a fim de evitar alterações morfológicas e fisiológicas nas culturas fúngicas.

#### 3.3.3- Água destilada esterilizada ou Castellani

Este método consistiu no armazenamento de discos de meio de cultura de BDA sintético, contendo micélio jovem dos isolados fúngicos, em vidros do tipo penicilina, contendo aproximadamente 4 ml de água destilada esterilizada, após a transferência dos discos, os frascos foram vedados e identificados. A preservação foi efetuada em baixas temperaturas, podendo também ser feita em temperatura ambiente. Com isso o fungo teve a diminuição do metabolismo e formação do estado latente devido à falta de fontes nutritivas.

### **3.4 – Teste de Patogenicidade de isolados de *F. oxysporum* com os respectivos hospedeiros conservados em diferentes métodos.**

Foram realizados testes de patogenicidade com isolados de *F. oxysporum* em seus respectivos hospedeiros, preservados na Micoteca “Prof.º Gilson Soares da Silva” em diferentes períodos de tempo.

#### 3.4.1 – Teste de patogenicidade de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*).

O experimento foi implantado em casa de vegetação, utilizando-se a variedade de tomateiro Santa Cruz, semeadas em vasos com capacidade de 2kg, contendo solo e esterco bovino autoclavados na proporção 3:1, deixando-se duas plantas por vaso. Foram utilizados nos testes de patogenicidade dez isolados diferentes preservados em método de solo esterilizado da espécie *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* - FOL (Tabela 1) os testes foram realizados em mudas, transplantada aos 15 dias e inoculadas aos 30 dias após a semeadura. Para o preparo do inóculo, os isolados do fitopatógeno foram cultivados em placas de Petri com meio de cultura BDA, mantidas em BOD durante sete dias a  $25 \pm 2$  °C, sob o regime de alternância luminosa (12 h claro/12 h escuro). As suspensões de esporos foram preparadas pela adição de 20 mL de água destilada esterilizada (ADE) em cada placa, raspagem e filtragem em camada dupla de gaze. Após filtragem foi ajustada a concentração para  $1 \times 10^6$  conídios. mL<sup>-1</sup>. A inoculação procedeu-se por corte em “meia lua” no sistema radicular, efetuando-se um sulco e deposição de suspensão no volume de 20 mL por planta, sendo duas plantas por vaso, e tirada à média por cada repetição/vaso. A avaliação foi feita com 25 dias, através escala de notas de Santos (1999), que variou de 1 a 5, avaliando os sintomas externo e interno. Foram consideradas nota 1) as plantas sadias; nota 2) para as plantas doentes com sintoma vascular leve; nota 3) para as plantas com sintoma de amarelecimento foliar e escurecimento vascular; nota 4) para as plantas com murcha severa associada a escurecimento vascular, necrose foliar e clorose e, nota 5) para as plantas mortas. Foram realizados reisolamentos do patógeno pelo plaqueamento do tecido sintomático para cumprir com o Postulado de Koch. O Índice de Doença calculado a partir da escala de notas utilizadas na avaliação está descrito no item 3.4.7. Também foi calculado a Percentagem de Infecção, em razão dos sintomas da doença se manifestar em toda planta hospedeira, através da seguinte fórmula:  $PI = (N^\circ \text{ de plantas infectadas} / N^\circ \text{ total de plantas avaliadas}) \times 100$ .

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 11 tratamentos e cinco repetições, a testemunha consistiu em plantas de tomateiro inoculadas apenas com água destilada esterilizada, o experimento teve as médias submetidas à transformação  $\sqrt{x}$

e comparadas pelo teste de Duncan ao nível de 5 % de probabilidade e todas as análises foram realizadas utilizando o software INFOSTAT (DI RIENZO *et al.*, 2018).

**Tabela 1.** Isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* preservados na Micoteca, utilizados no teste de patogenicidade em mudas de tomateiro cultivar Santa Cruz.

Tratamentos	Tempo de Preservação
MGSS 01	10 anos
MGSS 40	9 anos
MGSS 41	9 anos
MGSS 42	8 anos
MGSS 43	8 anos
MGSS 81	8 anos
MGSS 182	7 anos
MGSS 183	7 anos
MGSS 225	20 anos
MGSS 233	20 anos

3.4.2 – Teste de patogenicidade de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em plantas de quiabeiro (*Abelmoschus esculentus*).

Para o teste de patogenicidade em quiabeiro foram realizados dois ensaios para os cinco isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* preservados no método de solo esterilizado, no primeiro teste foi utilizada a cultivar Santa Cruz e no segundo teste foi utilizado a cultivar Valença e um terceiro ensaio para o método de repicagem continua com a cultivar Valença (Tabela 2). As sementes foram semeadas diretamente em vasos com capacidade de 2kg, contendo solo e esterco bovino autoclavados na proporção 3:1, deixando-se três plantas por vaso e inoculadas aos 21 dias após a semeadura. Para o preparo do inóculo, os isolados do fitopatógeno foram cultivados em placas de Petri com meio de cultura BDA, mantidas em BOD durante sete dias a  $25 \pm 2$  °C, sob o regime de alternância luminosa (12 h claro/12 h escuro). As suspensões de esporos foram preparadas pela adição de 20 mL de água destilada esterilizada (ADE) em cada placa, e feita raspagem e filtragem em camada dupla de gaze. Após filtragem foi ajustada a concentração para  $1 \times 10^6$  conídios. mL<sup>-1</sup>. A inoculação procedeu-se por corte em “meia lua” no sistema radicular, efetuando-se um sulco e deposição de suspensão no volume de 20 mL por planta, sendo três plantas por vaso para o ensaio 1 e 2 e duas plantas por vaso para o ensaio 3, e tirada à média por cada repetição/vaso. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, para os isolados preservado no método de solo esterilizado com seis tratamentos e cinco repetições, enquanto que para os isolados preservados em repicagem continua continha oito tratamentos e cinco repetições, a testemunha consistiu

em plantas de quiabeiro inoculadas apenas com água destilada esterilizada, o experimento teve as médias comparadas pelo teste de Duncan ao nível de 5 % de probabilidade.

**Tabela 2.** Isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* preservados na Micoteca utilizados no teste de patogenicidade em mudas de quiabeiro.

Cultivar	Tratamentos	Método de Preservação	Tempo de Preservação
<b>1° ensaio</b> <b>Santa Cruz</b>	MGSS 10	Solo	9 anos
	MGSS 221	Solo	24 anos
<b>2° ensaio</b> <b>Valença</b>	MGSS 224	Solo	21 anos
	MGSS 226	Solo	19 anos
	MGSS 277	Solo	3 anos
<b>3° ensaio</b> <b>Valença</b>	MGSS 10	Repicagem continua	9 anos
	MGSS 55	Repicagem continua	15 anos
	MGSS 221	Repicagem continua	24 anos
	MGSS 224	Repicagem continua	21 anos
	MGSS 226	Repicagem continua	19 anos
	MGSS 277	Repicagem continua	3 anos
	MGSS 323	Repicagem continua	2 anos

Para todos os experimentos, a avaliação foi feita com 21 dias, através escala de notas de adaptado de Cia *et al.*, (1977), que variou de 1 a 5, avaliando os sintomas externo e interno (Tabela 3).

**Tabela 3.** Escala de notas para avaliação da patogenicidade de isolados de *F. oxysporum* f. sp *vasinfectum* em plantas de quiabeiro cultivar Valença.

Nota	Descrição	
	Interna	Externa
1	Plantas sem sintomas de murcha nos vasos examinados através de corte na base do caule	Plantas saudáveis sem sintomas de murcha ou amarelecimento foliar
2	Plantas com vasos escurecidos com coloração chocolate no primeiro terço do caule	Plantas com sintomas de murcha leve característico e com presença de algumas folhas amarelecidas
3	Plantas com vasos escurecidos até o segundo terço do caule. Presença de algumas folhas	Plantas com sintomas de murcha e totalmente desfolhadas
4	Plantas com caule totalmente escurecido, com ou sem folhas	Plantas com sintomas de murcha acentuada, desfolhadas e com caule amarelecido
5	Plantas mortas com vasos totalmente enegrecidos	Plantas mortas completamente desfolhadas

Para as reações das variedades aos patógenos a partir do Índice de Doença (ID) descrito no item 3.4.7 foram observadas os seguintes grupos de classes: 0% = imunidade

(I); 0.01-25% = Altamente Resistente (AR); 25-50% = Medianamente Resistente (MR); 50-75% = Medianamente Suscetível (MS); e 75-100% = Altamente Suscetível (AS) (REIS *et al.* 2004b).

Foram realizados reisolamentos do patógeno pelo plaqueamento do tecido sintomático para cumprir com o Postulado de Koch em todas as etapas.

### 3.4.3- Teste de patogenicidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* em cultivares de bananeira (*Musa* sp.).

Foram utilizados no teste de patogenicidade nove variedades diferentes de bananeira: banana ‘Cacau Figo Cinza’, ‘Mysore’, ‘Prata Anã’, ‘Caru Roxa’, ‘Maçã Turiaçu Amarela’, ‘Maçã Casca Verde’, ‘Pratinha’, ‘Nanica’ e ‘Pacovan Ken’, com comportamento pré-estabelecido em relação à doença Mal do Panamá (Tabela 4). As mudas, tipo chifrinho, foram obtidas na Fazenda Escola da UEMA-FESL, campus São Luís, plantadas em vasos com capacidade de 10 kg, contendo solo e esterco bovino autoclavados na proporção 3:1, deixando-se uma planta por vaso.

Os isolados de *Fusarium* utilizados no teste foram MGSS 324 e MGSS 325 oriundos da Micoteca “Prof.º Gilson Soares da Silva”, onde encontra-se conservado nos métodos de repicagem contínua há 2 anos.

**Tabela 4.** Reação de cultivares de Bananeira utilizadas no teste de patogenicidade com isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC)

Cultivar	Grupo Genômico	Reação a FOC
Maçã Casca Verde	AAB	Altamente suscetível
Prata Anã	AAB	Suscetível
Pratinha	AAB	Suscetível
Maçã Turiaçu Amarela	AAB	Suscetível
Nanica	AAA	Resistente
Caru Roxa	AAA	Resistente
Cacau Figo Cinza	ABB	Suscetível raça 2
Mysore	AAB	Resistente
Pacovan Ken	AAAB	Resistente

Para o preparo do inóculo, os isolados MGSS 324 e MGSS 325 foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, mantido em BOD durante sete dias a  $25 \pm 2$  °C, sob o regime de alternância luminosa (12 h claro/12 h escuro). As suspensões de esporos foram preparadas pela adição de 10 mL de água destilada esterilizada (ADE) em cada placa, raspagem e filtragem em camada dupla de gaze. Após filtragem foi ajustada a concentração para  $10^6$  conídios. mL<sup>-1</sup>, com auxílio de câmara de Neubauer. A inoculação dos fitopatógenos foi realizada aos 45 dias de idade das mudas. A inoculação procedeu-se por corte em “meia lua” no sistema radicular, efetuando-se um sulco no solo e deposição de suspensão no volume de 40 mL de suspensão por planta.

As avaliações foram realizadas 60 dias após inoculação, através de corte transversal na região do rizoma observando pontos descoloridos atribuindo-se notas conforme a escala proposta por MOHAMED *et al.*, (1999) (Tabela 5). Foram realizados reisolamentos do patógeno pelo plaqueamento do tecido sintomático para cumprir com o Postulado de Koch.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com nove tratamentos e quatro repetições, as testemunhas de cada variedade consistiram em plantas inoculadas apenas com água destilada esterilizada, o experimento teve as médias comparadas pelo teste de Duncan ao nível de 5 % de probabilidade.

**Tabela 5.** Escala de notas para avaliação da patogenicidade de *Fusarium oxysporum* f. sp *cubense* em plantas de bananeira.

Nota	Descrição dos sintomas
0	Nenhuma descoloração no rizoma. Plantas saudias Região do rizoma sem descoloração, descoloração na junção da raiz e o
1	rizoma
2	Até 5% da região central do rizoma com descoloração
3	6-20% da região central do rizoma com descoloração
4	21-49% da região central do rizoma com descoloração
5	Mais de 50% da região central do rizoma com descoloração Descoloração inteira do rizoma e
6	murcha
7	Planta morta

#### 3.4.4- Teste de Patogenicidade de isolado de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em cultivares de Feijão-Caupi (*Vigna unguiculata*).

Para o teste de patogenicidade de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* foram utilizadas seis variedades de Feijão Caupi: BRS Aracê, BRS Pujante, BRS Guariba, BRS Tumucumaque, Br-17 Gurguéia e Manteiguinha no qual foram semeadas em vasos de capacidade de 2kg, contendo solo autoclavado e esterco de bovino autoclavado na proporção 3:1, deixando-se duas plantas por vaso e inoculadas aos 30 dias de idade.

Para o preparo do inóculo, o isolado MGSS 60 foi cultivado em placas de Petri com meio de cultura BDA) e mantidas em BOD durante sete dias a  $25 \pm 2$  °C, sob o regime de alternância luminosa (12 h claro/ 12 h escuro). As suspensões de esporos foram ajustadas para a concentração para  $1 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup> com auxílio da câmara de Neubauer. A inoculação procedeu-se por ferimento no sistema radicular, através da abertura de um sulco em “meia lua” ao redor do colo da planta, onde depositou-se a suspensão no volume de 20 mL por planta, sendo duas plantas por vaso.

Os sintomas da doença foram avaliados aos 21 dias após a inoculação das plantas, utilizando-se uma escala que variou de 0 a 4 de acordo com os níveis de severidade, onde 0 = ausência de sintomas; 1 = ausência de sintomas externos de murcha e presença de escurecimento vascular confinada à raiz principal; 2 = sintomas iniciais da doença (amarelecimento e murcha) e escurecimento vascular atingindo o terço inferior do caule; 3 = sintomas bem definidos da doença (amarelecimento, murcha, lesões foliares e seca de folhas) e escurecimento vascular atingindo o terço médio da planta; e 4 = sintomas bem definidos da doença e escurecimento vascular atingindo o terço superior da planta ou plantas mortas pela escala de notas de Schoonhoven; Pastor-corrales, (1987).

Após a avaliação da severidade, fragmentos das plantas com sintomas foram coletados e reisolados para confirmação da presença do patógeno nas plantas inoculadas.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos e 10 repetições. o experimento teve as médias submetidas à transformação  $\sqrt{x}$  e comparadas pelo teste de Duncan ao nível de 5 % de probabilidade e todas as análises foram realizadas utilizando o software Infostat (DI RIENZO *et al.*, 2018).

A partir da avaliação do índice da doença (ID) (item 3.4.7) foi determinado a reação das cultivares utilizando a escala de reação das cultivares para Feijão-Caupi, em que: 0% = imunidade, 1-10% = altamente resistente, 11-20% = moderadamente

resistente, 21-40% = moderadamente suscetível, 41- 60% = suscetível, 70% = altamente suscetível (FAWOLE, 1989).

3.4.5- Teste de Patogenicidade com isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* em maracujazeiro.

Sementes da variedade de maracujá amarelo (*P. edulis*) foram semeadas diretamente em vasos com capacidade de 5 kg contendo solo e esterco bovino autoclavados na proporção 3:1, deixando-se duas plantas por vaso.

Em seguida, realizou-se teste de patogenicidade com quatorze isolados da espécie *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* oriundos da Micoteca “Prof.º Gilson Soares da Silva”, onde encontram-se conservados nos métodos de Repicagem Contínua e Castellani (Tabela 6).

**Tabela 6.** Isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* preservados na Micoteca utilizados no teste de patogenicidade em mudas de Maracujazeiro amarelo.

<b>Tratamentos</b>	<b>Método de Preservação</b>	<b>Tempo de Preservação</b>
MGSS 98	Repicagem contínua	8 anos
MGSS 99	Repicagem contínua	8 anos
MGSS 101	Repicagem contínua	8 anos
MGSS 103	Repicagem contínua	8 anos
MGSS 104	Repicagem contínua	8 anos
MGSS 326	Castellani	10 anos
MGSS 327	Castellani	10 anos
MGSS 328	Castellani	10 anos
MGSS 329	Castellani	10 anos
MGSS 331	Castellani	10 anos
MGSS 332	Castellani	10 anos
MGSS 333	Castellani	10 anos
MGSS 334	Castellani	10 anos
MGSS 335	Castellani	10 anos

Para o preparo do inóculo, os isolados foram cultivados em placas de Petri com meio de cultura BDA, mantidas em BOD durante sete dias a  $25 \pm 2$  °C, sob o regime de alternância luminosa (12h claro/12h escuro). As suspensões de esporos preparadas com adição de 20 mL de água destilada esterilizada (ADE) por placa, seguida de raspagem e filtragem da suspensão em camada dupla de gaze, ajustando-se a concentração para  $1 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>. A inoculação ocorreu quando a planta estava com 45 dias de idade

efetuando-se um sulco em “meia lua” ao redor do sistema radicular, e deposição de suspensão no volume de 20 mL por planta.

A avaliação sucedeu com 120 dias após inoculação de acordo com a escala de notas adaptada de CIA *et al.* (1977), com as notas variando de 1 a 4 (Tabela 7). Foram realizados reisolamentos do patógeno pelo plaqueamento do tecido sintomático para cumprir com o Postulado de Koch em todas as etapas.

Também foi calculado a Percentagem de Infecção, em razão dos sintomas da doença se manifestar em toda planta hospedeira, através dada seguinte fórmula:  $PI = (N^\circ \text{ de plantas infectadas} / N^\circ \text{ total de plantas avaliadas}) \times 100$ .

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quinze tratamentos e quatro repetições a testemunha consistiu em plantas inoculadas apenas com água destilada esterilizada, e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

**Tabela 7.** Escala de notas para avaliação da patogenicidade de *Fusarium oxysporum* em diferentes hospedeiros.

Autor	Escala de Nota
Adaptado de Cia <i>et al.</i> (1977)	1-Plantas sadias 2- Escurecimento interno somente na parte basal das raízes e em até 35 % das folhas amareladas. 3- Escurecimento acima da parte basal das raízes e até 75 % das folhas amareladas 4- Plantas mortas

3.4.6- Teste de Patogenicidade com isolados de *Fusarium oxysporum* em cultivares de coentro (*Coriandrum sativum*).

Sementes de Coentro (*C. sativum*) das variedades Verdão e Verdão Super foram semeadas em vasos com solo e esterco autoclavados na proporção (3:1) em casa de vegetação. Aos 30 dias de idade as mudas de coentro foram inoculadas por imersão das raízes em suspensão de conídios ( $1 \times 10^6$  conídios/mL) obtida de colônias com 10 dias de crescimento em meio BDA, que estavam preservados no método de repicagem contínua e com tempo de conservação de 3 anos para o isolado MGSS 305 e 2 meses para os isolados MGSS 415 e MGSS 416.

Durante 15 dias após inoculação do patógeno foi efetuado o acompanhamento dos sintomas da doença nas plantas. Após esse período foram retiradas as plantas sintomáticas

e realizado o isolamento do colo das plantas para cumprir o Postulado de Koch em todas as etapas e confirmação do patógeno responsável pelos sintomas da doença e finalizando com obtenção de colônias puras do patógeno. Foi realizado o cálculo do Percentual de Infecção (PI) para cada tratamento avaliado aos 15 dias após a inoculação.

O Delineamento estatístico foi inteiramente Casualizado (DIC) em esquema fatorial 2 (variedades) x 4 (três isolados mais uma testemunha não inoculada) x 5 repetições sendo constituída a unidade experimental de 5 plantas por vaso. As plantas de coentro utilizadas como controle foram inoculadas somente com água destilada estéril. As análises foram realizadas pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico InfoStat (DI RIENZO *et al.*, 2020).

#### 3.4.7- Análise do Índice de Doença

A partir dos dados obtidos com a escala de notas descritas nos itens anteriores, foram calculados os índices de severidade da doença (SVD) ou Índice de Doença (ID) através da equação, descrita por McKinney (1923) através da fórmula:

$$SVD = \left[ \frac{(N1)+(N2 \times 2)+(N3 \times 3)+(N4 \times 4)}{(N0+N1+N2+N3+N4) \times k} \right] \times 100$$

Em que: N0 é o número de plantas com doença na categoria 0, N1 é o número de plantas com doença na categoria 1, N2 é o número de plantas com doença na categoria 2, N3 é o número de plantas com doença na categoria 3, N4 é o número de plantas com doença na categoria 4 e k é o número de categorias.

### 3.5- Caracterização morfológica de isolados de *Fusarium*.

Para caracterização dos isolados foi realizado a confecção de microculturas para observação das estruturas dos fungos em microscópio óptico, para posterior registro fotográfico em câmera AxioCam (ZEISS®), a classificação foi realizada através das chaves de identificação: The *Fusarium* Laboratory Manual (LESLIE; SUMMERELL, 2006) e The Genus *Fusarium* (BOOTH, 1971) e pelas características das colônias quanto a cor, formato e número de células dos conídios (microconídios e macroconídios) e presença ou ausência de clamidósporos e tipos de fiáides.

### 3.6- Caracterização Molecular dos isolados de *Fusarium* spp.

Cinquenta e oito isolados preservados na Micoteca foram utilizados para a caracterização molecular para entendimento das relações filogenéticas do gênero

*Fusarium* spp.

### 3.6.1- Extração de DNA.

A extração foi realizada através da utilização de KIT HiPura™ para extração de DNA genômico de fungos spp. O preparo das amostras para extração consistiu no cultivo dos isolados em meio sólido, e posteriormente raspagem da massa micelial das colônias. Após a obtenção das amostras, cerca de 100 mg de tecido fúngico foram macerados na presença de nitrogênio líquido até formar um pó fino seguindo a recomendação de acordo com o protocolo de extração do fabricante do Kit.

De cada amostra de DNA extraída foi retirada uma alíquota para verificação da qualidade e concentração do DNA, através de análise comparativa em gel de agarose a 0,9 % contendo brometo de etídeo a 0,01 % (v/v). Após este processo as amostras foram armazenadas a -80 °C até o momento do uso.

### 3.6.2- Amplificação de PCR

Foi realizada a caracterização molecular dos isolados de *Fusarium* spp. utilizando quatro genes: Fator de alongação 1-  $\alpha$  (TEF-1 $\alpha$ ), a segunda maior subunidade da RNA polimerase (RBP2), Calmodulina (cmdA) e  $\beta$ -tubulina (*tub2*) para o melhor entendimento das relações evolutivas entre as diferentes espécies de *Fusarium* através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para amplificação dos genes TEF-1 $\alpha$ , RPB2, cmdA e *tub2* foram utilizados os iniciadores e temperaturas de anelamento dos primers descritos na tabela 8.

**Tabela 8.** Primers e temperatura de anelamento utilizados na amplificação de 4 genes para identificação a nível de espécie de *Fusarium* spp.

Gene	Primers	Primer sequence 5'-3':	Autores
TEF 1- $\alpha$	EF1-728f	GTT AAG AGG CGC GGT GTC GGT GTG	Carbone; Kohn, (1999)
	EF-2	GGA AGT ACC AGT GAT CAT GTT	O'Donnell <i>et al.</i> , (1998)
RPB2	5F2	GGG GWG AYC AGA AGA AGG C	Reeb et al, (2004)
	7cR	CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT	Liu <i>et al.</i> , (1999)
B-tubulina	T1	AAC ATG CGT GAGATTGTAAGT	O'Donnell; Cigelnik,
	Beta-	GCRCGNGGVACRTACTTGTT	(1997)
	Sandy-R		Stukenbrock <i>et al.</i> , (2012)
Calmodulina	Cal 235f	TTCAAGGAGGCCTTCTCCCTCTT	Quaedvlieg <i>et al.</i> , (2012)
	Cal2Rd	TGRTCNGCCTCDCGGATCATCTC	

As reações de amplificação foram realizadas em uma mistura de reação de 25  $\mu\text{L}$  que consistiu em 6,25  $\mu\text{L}$  de DREAM Taq PCR Master Mix® (Thermo Fischer Scientific), 0,6  $\mu\text{L}$  (10 $\mu\text{M}$ ) de cada iniciador e 1  $\mu\text{L}$  de DNA. O PCR foi realizado em Termociclador modelo Biosystems (Applied Biosystems) e as condições da PCR foram as seguintes para amplificação do gene Fator de alongação 1 $\alpha$  utilizando os primers descritos na tabela 10: desnaturação inicial a 94 ° C durante 85 s seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 ° C durante 35 s, anelamento a 59 ° C por 55 s e extensão a 72 ° C durante 90 s, seguido de extensão final por 10 min a 72 ° C. Para amplificação do gene RPB2 seguiu-se o protocolo de desnaturação inicial a 94° C em 90 segundos seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 ° C por 30 segundos, anelamento de 55° C durante 90 segundos, extensão a 68 ° C por 2 minutos e extensão final de 68 ° C por 5 minutos. Para o gene Calmodulina utilizou-se o seguinte protocolo de amplificação: Desnaturação inicial 95 ° C durante 3 minutos, seguida de 34 ciclos de desnaturação 95 ° C por 45 segundos, anelamento durante 30 segundos a 50 ° C, extensão de 90 segundos a 72 ° C e extensão final de 72 ° C durante 10 minutos. O gene  $\beta$ - tubulina foi amplificado sob condições de desnaturação inicial de 95 ° C por 3 minutos, seguida de 34 ciclos (95 ° C – 45 segundos; 52 ° C por 30 segundos; 72 ° C a 90 segundos) e extensão final de 72° C a 10 minutos.

Para verificar a qualidade dos produtos de PCR foram realizadas leituras em BioDrop e uma alíquota do produto da reação de amplificação (3  $\mu\text{L}$ ) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v) em tampão TBE 1X e amostras foram coradas com 1  $\mu\text{L}$  de GelRed, a uma voltagem de 90 V por 1 hora. O *Scada 100bp DNA Ladder* (Sinapse inc.) foi utilizado como marcador de peso molecular. Decorrido o tempo de eletroforese, o gel foi retirado da cuba e visualizado.

Os produtos de PCR foram purificados com EXOSAP (Termofischer®) seguindo o protocolo de purificação em termociclador a 37° C por 15 minutos e 80 ° C por 15 minutos e devidamente acondicionados e enviados para sequenciamento no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília - UCB.

### 3.6.3- Sequenciamento de DNA e análises filogenéticas.

As sequências de DNA obtidas foram avaliadas quanto à qualidade de sequenciamento, com base nos respectivos eletroferogramas, alinhadas par-a-par e editadas manualmente, para obtenção de uma sequência consenso para cada um dos isolados. As sequências consenso geradas foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information website* -

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por meio da ferramenta *do BLAST search*, para confirmação do gênero de cada um dos isolados.

As sequências dos isolados obtidos neste trabalho em conjunto com as depositadas no NCBI/Genbank (APÊNDICE A) de cada gene individual foram alinhadas através do algoritmo Muscle implementado no software MEGA versão 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), e cortadas nas extremidades estes arquivos foram exportados como fasta e utilizados no programa Mesquite para serem concatenados todos os quatro genes em único arquivo no formato nexus, que posteriormente foi utilizado para a escolha do melhor modelo evolutivo através do winpaup e MrmodelTest e o arquivo foi submetido a plataforma Cipres Science Gateway onde foram utilizados o programa MrBayes on Xsede para a construção de árvore filogenética para Inferência Bayesiana (IB), ao final da análise foi gerado um arquivo com árvore filogenética e utilizado o programa FigTree para edição e constatação dos resultados obtidos.

## **4- RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Métodos de Preservação de isolados de *Fusarium* spp.**

Foram preservados 58 isolados de *Fusarium*, e utilizados três métodos diferentes. Nos métodos de Castellani, Repicagem contínua e Solo Estéril foram preservados dez isolados oriundos de *S. lycopersicum*, três isolados oriundos de *Musa* sp., um isolado oriundo de *Heliconia*, sete isolados oriundos de *A. esculentus*, trinta e um isolados oriundos de *Passiflora edulis*, dois isolados oriundos de *Capsicum* sp., um isolado oriundo de *Coriandrum sativum* e um isolado oriundo de *Vigna unguiculata* (Tabela 9).

Historicamente, a preservação de microrganismos começou com o desenvolvimento da microbiologia a partir da segunda metade do século XIX (BELOTI *et al.*, 2017). No Centro Mundial de Dados de Microrganismos (WDCM – World Data Center for Microorganisms) ([www.wfcc.info/ccinfo/statistics/](http://www.wfcc.info/ccinfo/statistics/)) há registros de cerca de 813 coleções de culturas, distribuídas por 78 países (WDCM, 2021). Algumas das mais importantes instituições na preservação de microrganismos são: American Type Culture Collection (ATCC), EUA; o Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Alemanha; o Instituto Micológico Internacional (IMI), Inglaterra; o Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Holanda e o Japanese Collection of Microorganisms (JCM), Japão (URUBURU, 2003).

Normalmente, as coleções de culturas são consideradas um meio de preservar a diversidade microbiana *ex situ* (SETTE *et al.*, 2013). Por isso, através da conservação em três métodos da repicagem contínua, água destilada e solo estéril neste estudo, conseguiu-se utilizar os isolados nos diferentes experimentos para conhecimento da patogenicidade, morfologia e filogenia do gênero *Fusarium* e estes ainda servirão para experimentos futuros.

Diante de muitos métodos propostos para conservação de fungos, Liberal *et al.*, (2013) e Finatti; Aparecido (2009) afirmam que não existe um único método ideal para todos os fungos, a escolha do método envolve características referente ao microrganismo a ser preservado visando a viabilidade e preservação morfológica e patogênica.

**Tabela 9.** Isolados do gênero *Fusarium* preservados na Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva” nos métodos de Castellani, Liofilização, Repicagem contínua e Solo esterilizado.

MGSS	Complexo de Espécie	Hospedeiros	Castellani	Repicagem Contínua	Solo Esterilizado	Local	Tempo de Preservação
01	FOSC	<i>S.lycopersicum</i>	x	x	x	São Luís -MA	2011
09	FFSC	Musa sp.	x	x	x	São Luís -MA	2011
10	FOSC	<i>A.esculentus</i>	x	x	x	São Luís -MA	2011
14	FOSC	Heliconia sp	x	x	x	São Luís -MA	2011
40	FOSC	<i>S.lycopersicum</i>	x	x	x	Recife - PE	2012
41	FOSC	<i>S.lycopersicum</i>	x	x	x	Venda Nova do Imigrante -ES	2012
42	FOSC	<i>S.lycopersicum</i>	x	x	x	São Luís -MA	2013
43	FFSC	<i>S.lycopersicum</i>	x	x	x	São Luís -MA	2013
55	FOSC	<i>Abelmoschus esculentus</i>	x	x	x	São Luís -MA	2005
59	FFSC	<i>P. edulis</i>	x	x	x	São Luís -MA	2012
60	FOSC	<i>V. unguiculata</i>	x	x	x	São Luís -MA	2012
81	FOSC	<i>S.lycopersicum</i>	x	x	x		2013
96	FFSC	<i>P. edulis</i>	x	x	x	São Luís -MA	2013
97	FOSC	<i>P. edulis</i>	x	x	0	São Luís -MA	2013
98	FFSC	<i>P. edulis</i>	x	x	0	São Luís -MA	2013
99	FOSC	<i>P. edulis</i>	x	x	x	São Luís -MA	2013
101	FOSC	<i>P. edulis</i>	x	x	x	São Luís -MA	2013
103	FOSC	<i>P. edulis</i>	x	x	x	São Luís -MA	2013

MGSS	Complexo de Espécie	Hospedeiros	Castellani	Repicagem Contínua	Solo Esterilizado	Local	Tempo de Preservação
104	FOSC	<i>P. edulis</i>	x	x	0	São Luís -MA	2013
107	FFSC	<i>P. edulis</i>	x	x	0	São Luís -MA	2013
155	FOSC	<i>Capsicum sp.</i>	x	x	0	São Luís -MA	2013
182	FOSC	<i>S.lycopersicum</i>	x	x	x	Brasília-DF	2014
183	FOSC	<i>S.lycopersicum</i>	x	x	x	Brasília-DF	2014
188	FOSC	<i>Capsicum sp.</i>	x	x	x	Pinheiro - MA	2016
221	FOSC	<i>A. esculentus</i>	x	x	x	São Luís - MA	1997
224	FOSC	<i>A. esculentus</i>	x	x	x	São Luís - MA	2000
225	FOSC	<i>S.lycopersicum</i>	x	x	x	São Luís - MA	2001
226	FOSC	<i>A. esculentus</i>	x	x	x	Paço do Lumiar - MA	2002
233	FOSC	<i>S.lycopersicum</i>	x	x	x	Pernambuco	2001
234	FOSC	<i>A.muricata</i>	x	x	x	São Luís - MA	2017
237	FOSC	<i>P. edulis</i>	x	x	x	Barra do Corda - MA	1997
277	FOSC	<i>A. esculentus</i>	x	x	x	São Luís - MA	2018
305	FOSC	<i>C. sativum</i>	x	x	x	São Luís - MA	2018
318	FFSC	<i>Heliconia sp.</i>	x	x	x	São Luís - MA	2011
320	FFSC	<i>P. edulis</i>	x	x	0	São Luís - MA	2011
323	FOSC	<i>A. esculentus</i>	x	x	0	São Luís - MA	2019
324	FOSC	<i>Musa sp.</i>	x	x	0	São Luís - MA	2019

MGSS	Complexo de Espécie	Hospedeiros	Castellani	Repicagem Contínua	Solo Esterilizado	Local	Tempo de Preservação
325	FOSC	<i>Musa sp.</i>	x	x	0	São Luís – MA	2019
326	FOSC	<i>P. edulis</i>	x	x	0	São Luís – MA	2011
327	FOSC	<i>P. edulis</i>	x	x	x	São Luís – MA	2011
328	FOSC	<i>P. edulis</i>	x	x	0	São Luís – MA	2011
329	FOSC	<i>P. edulis</i>	x	x	0	São Luís – MA	2011
330	FOSC	<i>P. edulis</i>	x	x	0	São Luís – MA	2011
331	FFSC	<i>P. edulis</i>	x	x	x	São Luís – MA	2011
332	FOSC	<i>P. edulis</i>	x	x	0	São Luís – MA	2011
333	FFSC	<i>P. edulis</i>	x	x	0	São Luís – MA	2011
334	FFSC	<i>P. edulis</i>	x	x	0	São Luís – MA	2011
335	FFSC	<i>P. edulis</i>	x	x	0	São Luís – MA	2011
336	FFSC	<i>P. edulis</i>	x	x	0	São Luís – MA	2011
337	FOSC	<i>P. edulis</i>	x	x	0	São Luís – MA	2011
338	FOSC	<i>P. edulis</i>	x	x	x	São Luís – MA	2011
339	FFSC	<i>P. edulis</i>	x	x	0	São Luís – MA	2011
340	FOSC	<i>P. edulis</i>	x	x	0	São Luís – MA	2011
341	FOSC	<i>P. edulis</i>	x	x	x	São Luís – MA	2011
342	FFSC	<i>P. edulis</i>	x	x	0	São Luís – MA	2011
343	FOSC	<i>P. edulis</i>	x	x	0	São Luís – MA	2011
344	FOSC	<i>P. edulis</i>	x	x	0	São Luís – MA	2011
345	FOSC	<i>P. edulis</i>	x	x	0	São Luís – MA	2011
TOTAL	58 isolados		58	58	33		

Apesar da importância da manutenção de microrganismos para utilização a qualquer tempo, observa-se uma lacuna entre as publicações científicas pertinentes, no sentido de que um número significativamente reduzido de estudos tem sido produzido, (COSTA *et al.*, 2009) especialmente quando se avalia a preservação de patogenicidade desses microrganismos oriundos de plantas.

A importância de conservar, independentemente do método escolhido, garante que seja possível a realização de pesquisas a qualquer tempo. O método de preservação precisa manter as características originais dos fitopatógenos, tais como capacidade de esporular e patogenicidade (APARECIDO *et al.*, 2001).

No próximo tópico apresenta-se a viabilidade de fungos fitopatogênicos conservados em diferentes métodos e o efeito na preservação dessa característica ao longo do tempo de conservação.

#### **4.2 – Teste de patogenicidade de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*).**

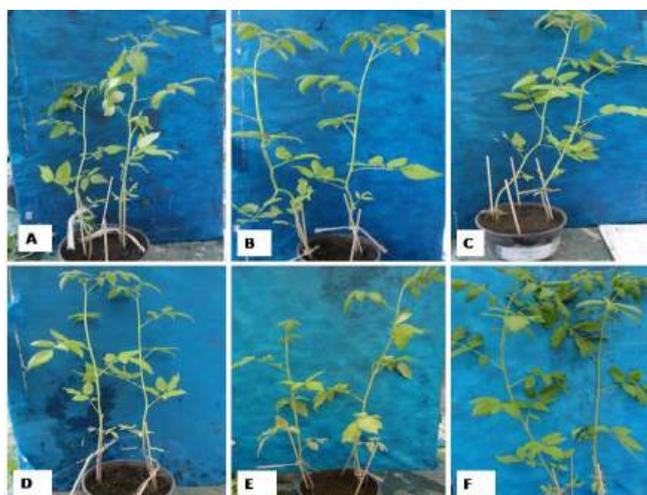
O experimento conduzido utilizando a cultivar de Tomateiro Santa Cruz demonstrou que dos dez isolados avaliados, cinco diferiram estatisticamente de Testemunha (tratamento controle) e apresentaram sintomas característicos da doença Murcha de *Fusarium* do Tomateiro, sendo eles: MGSS 40, MGSS 41, MGSS 183, MGSS 225 e MGSS 233. Em contrapartida, cinco isolados não diferiram da testemunha e foram os seguintes: MGSS 01, MGSS 42, MGSS 43, MGSS 81 e MGSS 182 (Tabela 10), e visualmente percebe-se que as plantas de tomateiro da cultivar ‘Santa Cruz’ inoculadas com esses isolados, não apresentaram nenhum sintoma característico da doença avaliada (Figura 1).

Dentre os isolados que apresentaram diferença significativa com relação à testemunha, foram verificados altos percentuais de infecção que variavam entre 50 e 90 %: MGSS 183 (90 %); MGSS 225 (80 %); MGSS 41 (70 %); MGSS 233 (60 %); MGSS 40 (50 %). Com relação ao índice de doença (ID) destes mesmos isolados, observou-se uma variação percentual entre 46 e 68 %, com destaque para os isolados MGSS 183 (64 %) e MGSS 225 (68%) (Tabela 10).

**Tabela 10.** Patogenicidade de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em mudas de tomateiro cultivar Santa Cruz.2018.

Tratamentos	Média das Notas	Percentual de Infecção PI (%)	Índice de Doença ID (%)
MGSS 01	1,30 ab <sup>1</sup>	0	0
MGSS 40	2,40 bcd	50	48
MGSS 41	2,30 bcd	70	46
MGSS 42	1,00 a	0	0
MGSS 43	1,00 a	0	0
MGSS 81	1,50 abc	0	0
MGSS 182	1,00 a	0	0
MGSS 183	3,20 d	90	64
MGSS 225	3,40 d	80	68
MGSS 233	2,70 cd	60	54
Testemunha	1,00 a	0	20
CV (%)	23,87		

<sup>1</sup>Médias TRANSFORMADAS para raiz de x seguidas das mesmas letras (coluna), não diferem entre si estatisticamente pelo Teste de DUNCAN a nível de 5 % de probabilidade. Santa Cruz.

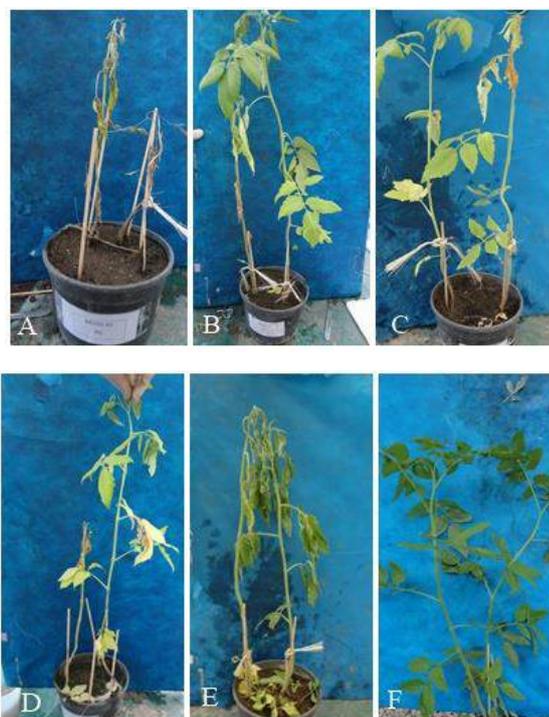


**Figura 1.** Plantas de tomateiro cultivar Santa Cruz inoculadas com isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* que não apresentaram sintomas de Murcha de Fusarium. A- Planta com sintomas leves MGSS 01, B-MGSS 42, C-MGSS 43, D- MGSS 81, E-MGSS 182, F- Testemunha.

Os isolados MGSS 40, MGSS 41, MGSS 183, MGSS 183, MGSS 225 e MGSS 233 provocaram sintomas característicos da doença, como amarelecimento intenso das folhas mais velhas que gradualmente foram murchando (Figuras 2B e 2E), e apresentaram necrose total ou parcial do limbo, com avanço da doença o amarelecimento aumentou de forma a atingir as folhas mais novas (Figuras 2C e 2D). Em consequência da colonização do patógeno, a planta acumula géis, gomas e tiloses nos vasos, o que resulta na obstrução

dos vasos do xilema, dificultando a condução de água e nutrientes. Com comprometimento total do sistema vascular da planta, esta planta murcha de forma definitiva e morre, ao cortar o caule das plantas no sentido longitudinal, observa-se coloração marrom na região do xilema mais intensa na base do caule (INOUE-NAGATA *et al.*, 2016).

No experimento com a cultivar ‘Santa Cruz’, que é suscetível ao FOL observou-se que houve a perda de patogenicidade de cinco isolados de FOL, e cinco isolados permanecem com a patogenicidade preservada. Recentemente, foi identificada em isolados patogênicos de FOL uma enzima chamada “tomatinase” que está relacionada como fator de virulência e envolvida no processo de degradação de composto de defesa da planta chamada tomatina (MURUGAN *et al.*, 2020).



**Figura 2.** Plantas de tomateiro cultivar Santa Cruz inoculadas com isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* que apresentaram sintomas de Murcha de *Fusarium*. A- Planta morta inoculada com isolado MGSS 40, B- Planta inoculada com isolado MGSS 41, C-MGSS 183, D-MGSS 225, E-MGSS 233 e F- Testemunha.

Existem três fatores de resistência dominantes e do tipo raça-específicos (I, I-2 e I-3) geneticamente bem caracterizados em espécies do gênero *Solanum* (sect. *Lycopersicon*) e introgrididos em variedades comerciais (HEMMING *et al.*, 2004).

Em contrapartida, o surgimento de novas raças parece ser uma regra para a espécie *F. oxysporum*, Ma *et al.* (2010) confirmaram a transferência horizontal de pequenos

cromossomos condicionalmente responsáveis pela virulência entre uma cepa patogênica a outra cepa não patogênica ao realizarem o teste de patogenicidade em plantas de tomateiro. Essa descoberta explica o surgimento de novas linhagens patogênicas dentro de *F. oxysporum*, o que foi descrito também por Vlaardingerbroek *et al.*, (2016) em que isolado não patogênico apresentou virulência moderada em plantas de tomateiro após a transferência de horizontal de genes (HCT) de um isolado patogênico de *F. oxysporum*. Palácio *et al.*, (2014) concluíram em seus estudos que variedades de tomateiro disponíveis no mercado com relato de resistência ao patógeno não apresentaram resposta bem sucedida às raças locais. A progressão da infecção pelo sistema vascular é complexa.

Os isolados patogênicos resultaram no desenvolvimento de sintomas típicos da doença como amarelecimento nas folhas mais velhas, murcha e crescimento reduzido e ao cortar o caule das plantas no sentido longitudinal, observa-se coloração marrom na região do xilema mais intensa na base do caule.

Outro ponto importante para se avaliar a preservação da patogenicidade foi o método de solo esterilizado, empregado na conservação desses isolados. A preservação deve sempre atender as necessidades do organismo em questão, pois utilizando o método apropriado de forma correta evita contaminações e mutações que podem levar à perda das características morfológicas, fisiológicas e genéticas (LIBERAL *et al.*, 2013) e uma dessas características é patogenicidade do isolado.

O tempo de preservação dos isolados que apresentaram diferença estatística em relação a testemunha variou de sete anos para o isolado MGSS 183, nove anos para os isolados MGSS 40 e MGSS 41 e 20 anos para os isolados MGSS 225 e MGSS 233.

O método de conservação de solo esterilizado foi eficiente para *formae speciales lycopersici*, pois sete isolados conseguiram colonizar os tecidos do hospedeiro, com destaque para cinco isolados que apresentaram os maiores índices de doença e apenas três isolados não produziram sintomas característicos da doença no hospedeiro.

Apesar de inúmeros trabalhos voltados para os métodos de conservação indicarem o método do solo para o gênero *Fusarium* Link. (GONÇALVES *et al.*, 2016), Singh *et al.*, (2018) discordam e desencorajam a utilização para este gênero por causa mutações e perda de esporulação.

Na literatura, a maioria dos trabalhos estão voltados para a viabilidade dos métodos, porém propomos neste trabalho, que além da viabilidade de crescimento também seja realizada a verificação da patogenicidade desses isolados quando tratar-se de fungos fitopatogênicos.

### **4.3 Teste de patogenicidade de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em plantas de quiabeiro (*Abelmoschus esculentus*).**

No experimento com cinco isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, conservados no método de solo esterilizado verificou-se que todos os isolados diferiram estatisticamente da testemunha, e foram patogênicos a plantas de quiabeiro da cultivar ‘Valença’.

Os isolados apresentaram um percentual de Infecção (PI) entre 60 e 93,3%, com destaque para os isolados MGSS 221 (93,3 %) e MGSS 224 (93,3 %) com os maiores percentuais de infecção. Em relação ao Índice de Doença (ID) foram constatados índices que variavam entre 60 e 89,33% destacando-se os isolados MGSS 226 (81,33%), MGSS 221 (88%) e MGSS 224 (89,33%) (Tabela 11).

**Tabela 11.** Severidade de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* de quiabeiro nas cultivares Valença e Santa Cruz 47, maio, 2019.

<b>Cultivar Valença</b>				
<b>Tratamentos</b>	Média das Notas	Percentual de Infecção PI (%)	Índice de Doença ID (%)	Reação
<b>MGSS 10</b>	3,00 b	80,0	60	MS
<b>MGSS 221</b>	4,20 b	93,3	88	AS
<b>MGSS 224</b>	4,46 b	93,3	89,33	AS
<b>MGSS 226</b>	4,06 b	86,6	81,33	AS
<b>MGSS 277</b>	3,13 b	60,0	62,66	MS
<b>Testemunha</b>	1,00 a	0	-	-
<b>CV (%)</b>	29,7			
<b>Cultivar Santa Cruz 47</b>				
<b>Tratamentos</b>	Média das Notas	Percentual de Infecção PI (%)	Índice de Doença ID (%)	Reação
<b>MGSS 10</b>	1,00 a	0	0	AR
<b>MGSS 221</b>	1,10 a	0	0	AR
<b>MGSS 224</b>	1,13 a	0	0	AR
<b>MGSS 226</b>	1,17 a	0	0	AR
<b>MGSS 277</b>	1,00 a	0	0	AR
<b>Testemunha</b>	1,00 a	0	-	
<b>CV (%)</b>	18,76			

**Método de Preservação:** Solo Esterilizado e **Tempo de Preservação:** MGSS 10 – 9 anos; MGSS 221 – 24 anos; MGSS 224 – 21 anos; MGSS 226 – 19 anos; MGSS 277- 3 anos

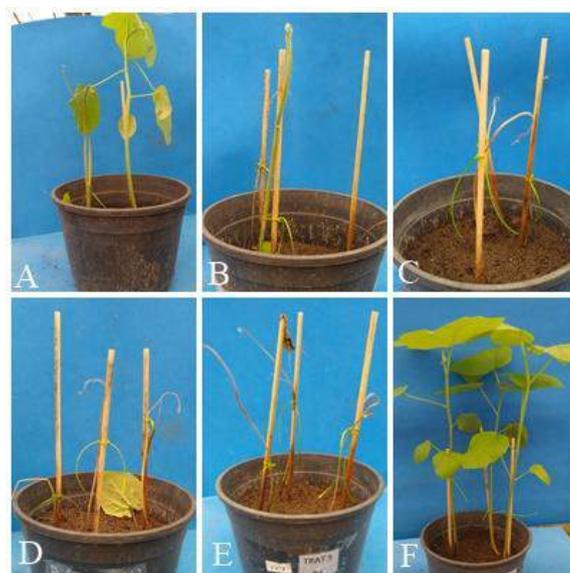
<sup>1</sup>Médias seguidas das mesmas letras (coluna), não diferem entre si estatisticamente pelo Teste de Duncan ao nível de 5 % de probabilidade

A reação da variedade aos patógenos foi observada seguinte grupo de classes: 0% = imunidade (I); 0.01-25% = Altamente Resistente (AR); 25-50% = Medianamente Resistente (MR); 50-75% = Medianamente Suscetível (MS); e 75-100% = Altamente Suscetível (AS) (REIS *et al.* 2004b).

De acordo com a reação da cultivar ‘Valença’ aos isolados de FOV, foi constatado que a referida cultivar comportou-se como altamente suscetível (AS) aos isolados MGSS 221, MGSS 224 e MGSS 226, pois apresentaram Índice de Doença acima de 75% e comportamento medianamente suscetível (MS) em relação aos isolados MGSS 10 e MGSS 277 (Tabela 11).

Observou-se ainda que todos os isolados causaram sintomas característicos de fusariose em quiabeiro, e todos os isolados causaram morte em plantas da cultivar analisada. Os principais sintomas observados foram amarelecimento, murcha, desfolha e escurecimento vascular que levaram à morte da planta (Figura 3 e 4).

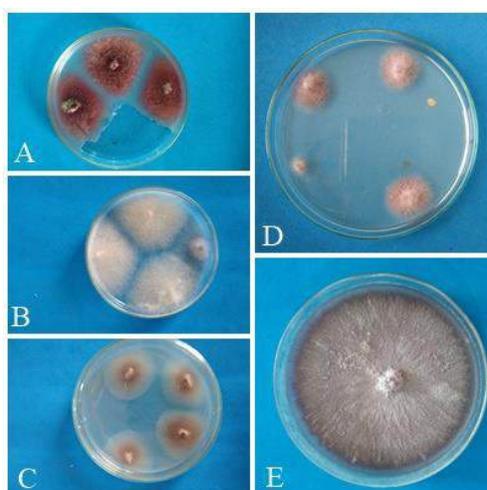
Foi realizado o reisolamento de plantas mortas ou sintomáticas e observação das características morfológicas confirmaram o agente causal como *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Figura 3,4 e 5).



**Figura 3.** Suscetibilidade a isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* do Quiabeiro em Plantas da Cultivar Valença, 2019. Plantas com desfolha e murcha (A) A- MGSS 10, Plantas mortas (B-E). B- MGS:S 221, C-MGSS 224, D-MGSS 226, E- MGSS 277, Planta Sadia (F). F- TESTEMUNHA (sem patógeno).



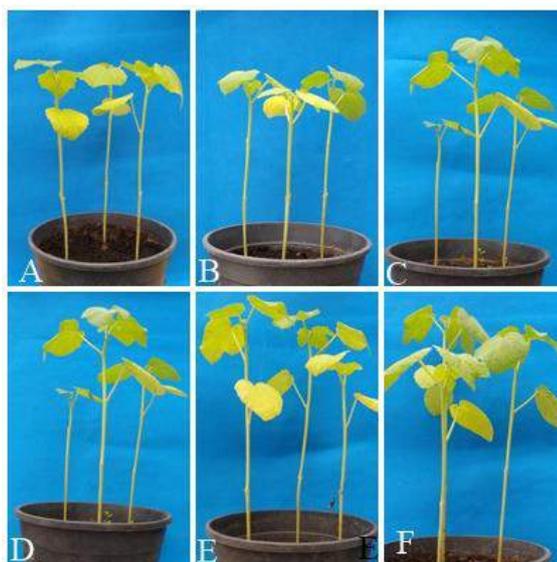
**Figura 4.** Escurecimento vascular de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* do Quiabeiro em Plantas da Cultivar Valença, 2019. A- MGSS 10, B- MGSS 221, C-MGSS 224, D-MGSS 226, E- MGSS 277, F- TESTEMUNHA (sem patógeno).



**Figura 5.** Colônias obtidas de isolamento do sistema vascular da cultivar Valença com escurecimento A- MGSS 10, B- MGSS 221, C-MGSS 224, D-MGSS 226, E- MGSS 277.

No teste de patogenicidade em mudas de quiabeiro cultivar Santa Cruz 47 com os mesmos isolados (MGSS 10, MGSS 221, MGSS 224, MGSS 226 e MGSS 277) conservados no método de solo esterilizado revelaram que nenhum deles diferiram estatisticamente da testemunha (Tabela 11).

A cultivar de quiabeiro Santa Cruz 47 comportou-se como altamente resistente aos isolados causadores de Murcha de *Fusarium* (Tabela 11). As plantas não apresentaram os sintomas característicos da doença como é possível observar na figura 6.



**Figura 6.** Avaliação da suscetibilidade a isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* do quiabeiro em plantas da cultivar Santa Cruz, 2019. A- MGSS 10, B- MGSS 221, C-MGSS 224, D-MGSS 226, E- MGSS 277, F- TESTEMUNHA (sem patógeno).

Esses resultados demonstram que a Cultivar ‘Valenç’a de quiabeiro deve ser utilizada em testes de patogenicidade de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* pela sua suscetibilidade a todos os isolados. A cultivar ‘Santa Cruz 47’ deve ser evitada na avaliação de patogenicidade de isolados de FOV, pois apresenta comportamento de resistência ao patógeno. Essa característica de resistência da cultivar ‘Santa Cruz 47’ foi verificada por Aguiar *et al.*, (2013) que três acessos de quiabeiro entre elas a cultivar Santa Cruz 47 eram mais promissoras fontes de resistência contra *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Edel-Hermann; Lecomte (2019) afirmam que a patogenicidade deve ser avaliada sob condições controladas e com uso de uma cultivar suscetível como foi o caso da cultivar Valença para que todo potencial do patógeno seja expressado.

Existe claramente um fator do genótipo da cultivar ‘Santa Cruz 47’ sobre a resposta de alta resistência aos isolados de FOV avaliados e segundo Silva *et al.*, (2021) existem poucos bancos de germoplasma de quiabeiro no Brasil, o conhecimento sobre a variabilidade genética do quiabeiro, pode no futuro proporcionar mais variedades resistentes ao *F.oxysporum* f. sp. *vasinfectum* aos agricultores brasileiros.

Com relação ao método de conservação os resultados mostram claramente que este método de solo esterilizado é indicado para *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* onde foi possível constatar que isolados conservados entre vinte e quatro anos (MGSS 221), vinte e um anos (MGSS 224) e 19 anos (MGSS 226) foram altamente agressivos a cultivar Valença.

O método de conservação em solo esterilizado foi altamente eficiente tanto na manutenção dos isolados quanto na preservação da patogenicidade, pois todos os isolados avaliados foram patogênicos a cultivar suscetível avaliada. Portanto, o método deve ser indicado para a forma *specialis vasinfectum*. A viabilidade de *Fusarium* também foi avaliada por Beloti *et al.*, (2017) que confirmaram de 68 isolados conservados 38 deles estavam viáveis, alguns com período superior a 15 anos de conservação *ex situ*.

4.3.2- Patogenicidade de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* conservados em método de repicagem contínua.

Para o teste com os mesmos isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (MGSS 10, MGSS 55, MGSS 221, MGSS 224, MGSS 226, MGSS 277, MGSS 323) conservados no método de repicagem contínua, constatou-se que os isolados MGSS 323, MGSS 55, MGSS 226 diferiram significativamente da testemunha, em contrapartida os outros quatro isolados, apesar de terem produzido infecção em algumas plantas, não diferiram do tratamento controle (testemunha) (Tabela 12).

**Tabela 12.** Patogenicidade de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em quiabeiro, cultivar Valença, Novembro de 2020.

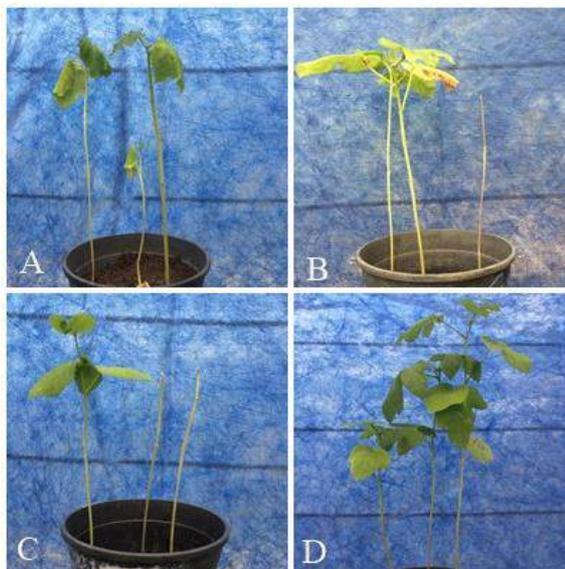
Tratamentos	Média das Notas	Percentual de Infecção PI (%)	Índice de Doença ID (%)	Reação
MGSS 221	1,27 ab	26,6	25,3	MR
MGSS 277	1,4 ab	40	28	MR
MGSS 224	1,53 ab	53,3	30,6	MR
MGSS 10	1,8 abc	40	36	MR
MGSS 55	1,93 bcd	53,3	38,6	MR
MGSS 226	2,6 cd	86,6	52	MS
MGSS 323	2,73 d	86,6	54,6	MS
Testemunha	1 a	0	0	-
<b>CV</b>	<b>34,4</b>	-	-	

**Método de Preservação:** Repicagem contínua. **Tempo de Preservação:** MGSS 10 – 9 anos, MGSS 55 – 15 anos, MGSS 221- 24 anos, MGSS 224 – 21 anos, MGSS 226 – 19 anos. MGSS 277 – 3 anos, MGSS 323 – 2 anos

<sup>1</sup>Médias seguidas das mesmas letras (coluna), não diferem entre si estatisticamente pelo Teste de Duncan ao nível de 5 % de probabilidade

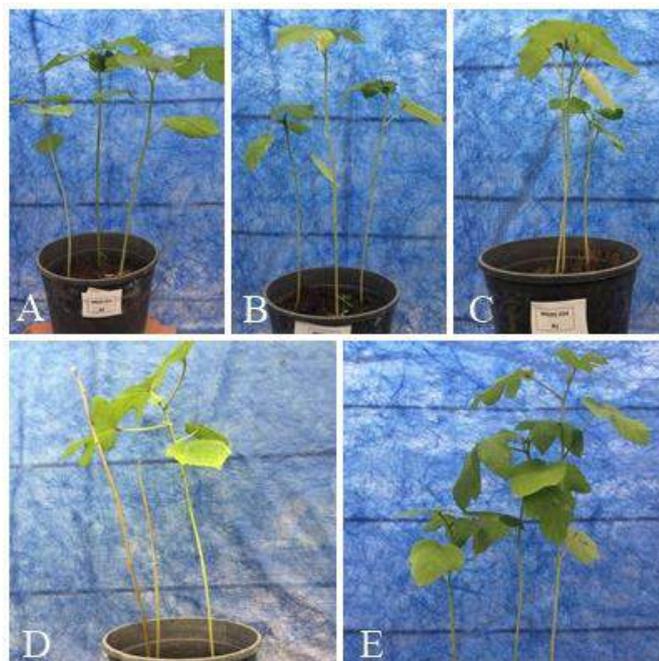
A reação da variedade aos patógenos foi observada seguinte grupo de classes: 0% = imunidade (I); 0.01-25% = Altamente Resistente (AR); 25-50% = Medianamente Resistente (MR); 50-75% = Medianamente Suscetível (MS); e 75-100% = Altamente Suscetível (AS) (REIS *et al.* 2004b).

Os isolados mais virulentos, MGSS 55, MGSS 226 e MGSS 323 apresentaram percentual de infecção de 53, 83,6 e 86,6 % e Índice de Doença de 38,6; 52 e 54,6%, respectivamente, embora os outros isolados tenham apresentado algum percentual de infecção eles não diferiram na avaliação de severidade da doença em comparação com a testemunha.



**Figura 7.** Quiabeiro cultivar Valença com sintomas de Murcha de *Fusarium* na parte aérea, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Plantas com murcha, amarelecimento das folhas e desfolha (A-C). A - Planta inoculada com o isolado MGSS 55. B- Planta inoculada com o isolado MGSS 226. C- Planta inoculada com o isolado MGSS 323. Planta Sadia (D). D- Planta Testemunha (sem patógeno).

Os isolados MGSS 10, MGSS 221, MGSS 224, MGSS 277 apresentaram sintomas leves da doença com percentual de infecção PI entre 26,6 e 53,3 % e Índice de Doença entre 25,3 e 36 %. (Tabela 12 e Figura 8).



**Figura 8.** Quiabeiro cultivar Valença com sintomas de Murcha de Fusarium na parte aérea da planta, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. A- Planta inoculada com o isolado MGSS 221. B- Planta inoculada com o isolado MGSS 277. C- Planta inoculada com o isolado MGSS 224. D- Planta inoculada com o isolado MGSS 10. E- Planta Testemunha (sem patógeno).

Os sintomas em plantas mais velhas de FOV em seus hospedeiros, incluem nanismo, murcha, clorose e necrose das folhas e morte, muitas vezes começando no topo da planta (DAVIS *et al.*, 2006). O diagnóstico da Murcha de *Fusarium* é realizado por meio do sintoma mais característico desta doença, que pode ser observado em cortes transversais do caule ou da raiz, os quais apresentam um escurecimento dos feixes vasculares decorrente da oxidação, e polimerização de compostos fenólicos (CHITARRA, 2014). Essas características de doença causados por FOV foram identificadas na variedade ‘Valença’, e os sintomas de escurecimento vascular e colônias do agente causal estão apresentados na figura 9.



**Figura 9.** Mudas cultivar Valença com sintomas internos característicos da Murcha de *Fusarium* e colônias obtidas a partir do reisolamento do *Fusarium. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, comprovando a existência da doença. Plantas com escurecimento vascular (A-C). A- Planta inoculada com MGSS 55. B- Planta inoculada com MGSS 226, C- Planta inoculada com isolado MGSS 323. Colônias obtidas do sistema vascular colonizado pelo patógeno. (D-F). D- MGSS 55, E- MGSS 226, F- MGSS 323.

A cultivar Valença apresentou comportamento de alta suscetibilidade para os isolados MGSS 221 e MGSS 224 no 1º ensaio, e no 2º ensaio a cultivar ‘Valença’ apresentou comportamento medianamente resistente para esses dois isolados. Com relação ao comportamento da referida cultivar, quando inoculada com o isolado MGSS 226, apresentou uma classificação de medianamente suscetível, enquanto no ensaio anterior a cultivar foi altamente suscetível ao mesmo isolado.

Houve influência do método de preservação utilizado (1º ensaio: Solo esterilizado e 2º ensaio: Repicagem Contínua), pois todos os cinco isolados utilizados nos dois ensaios, causaram menores Índices de Doença na cultivar Valença no último ensaio. Uma das explicações para esse fato é que segundo Gonçalves *et al.*, (2016), os isolados preservados por algum tempo, e que passam por repicagens periódicas podem levar o patógeno ao hábito saprofítico, alteração de sua morfologia, a diminuição e perda de sua capacidade de esporular, e a redução de sua agressividade e até mesmo de sua virulência. Daí a importância da rotina de testes de patogenicidade para confirmação das características originais dos patógenos preservados em “Coleções de Microrganismos”.

Um fato importante é que dois dos três isolados mais virulentos estavam preservados entre 15 anos (MGSS 55) e 19 anos (MGSS 226), isso que significa dizer que suas características genéticas não foram alteradas ao longo do tempo de conservação. Não há muitos trabalhos que investiguem a patogenicidade de isolados em função do método utilizado. Porém, a busca pelo emprego do método que garanta a virulência é primordial em estudos e pesquisas que visem melhoramento de plantas, controle biológico, ensino acadêmico entre outros empregos desses microrganismos.

A Micoteca “Prof.º Gilson Soares da Silva” - MGSS armazena fungos fitopatogênicos daí a importância não apenas de verificar a viabilidade de crescimento dos fungos, mas também de examinar a permanência da patogenicidade desses microrganismos nos métodos de conservação a todo momento. Uma vez que esses isolados são utilizados em pesquisas que visam o controle de patógenos por antagonistas (controle biológico de doenças de plantas, e análises da relação patógeno-hospedeiro dentre outras investigações que necessitam de patógenos virulentos.

#### **4.4 Teste de patogenicidade de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp *cubense* em cultivares de bananeira (*Musa* sp.)**

O teste de patogenicidade realizado com os isolados de *F. oxysporum* f. sp *cubense* MGSS 324 e MGSS 325 envolvendo nove variedades de bananeira, evidenciaram que o comportamento patogênico dos dois isolados variou de acordo com o genótipo das variedades analisadas (Tabela 13).

O isolado MGSS 324 apresentou maior severidade da murcha de *Fusarium* em mudas da variedade ‘Maçã Turiaçu Amarela’(AAB) grupo Maçã, ‘Prata Anã’ (AAB) grupo Prata e ‘Maçã Casca Verde’ (AAB) grupo Maçã (Figuras 10, 11, 12) diferindo estatisticamente das variedades resistentes ‘Mysore’ e ‘Pavocan Ken’ (Figuras 10, 11, 12 e 13).

**Tabela 13.** Avaliação da Severidade e Índice de Doença do Mal-do-Panamá em nove cultivares de Bananeira, inoculados com isolados MGSS 324 e MGSS 325 de *F. oxysporum* f. sp. *cabense* São Luís - MA, 2020.

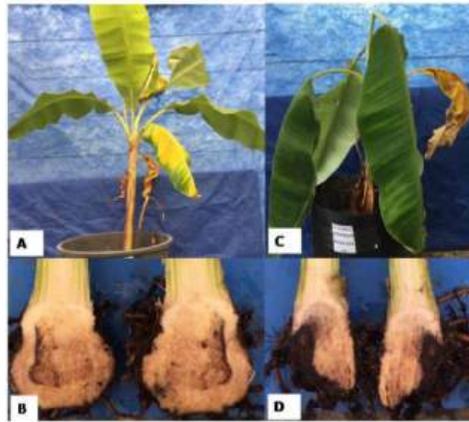
Variedades	MGSS 324		MGSS 325	
	ID (%)	Severidade	ID (%)	Severidade
Mysore	9,37	0,75 ab	18,75	1,21 abc
Maçã Turiaçu Amarela	<b>40,62</b>	<b>1,79 c</b>	46,87	1,90 cde
Prata Anã	<b>53,12</b>	<b>1,93 c</b>	40,62	1,72 bcde
Pratinha	18,75	1,18 abc	31,25	1,54 bcde
Caru Roxa	18,75	1,21 abc	6,25	0,50 a
Cacau Figo Cinza	34,37	1,43 abc	<b>53,12</b>	<b>2,01 de</b>
Nanica	31,25	1,50 abc	21,87	1,29 bcd
Maçã Casca Verde	37,5	1,72 bc	<b>59,37</b>	<b>2,15 e</b>
Pacovan Ken	12,5	0,68 a	15,62	0,93 ab
CV (%)		44,49		33,44

Método de Preservação: Repicagem Contínua; **Tempo de preservação:** 2 anos

<sup>1</sup>Médias seguidas das mesmas letras (coluna), não diferem entre si estatisticamente pelo Teste de Duncan ao nível de 5 % de probabilidade

As plantas apresentaram sintomas clássicos descritos por Gasparotto *et al.*, (2020), como amarelecimento de folhas que progride das folhas mais velhas para as mais jovens e essas folhas gradualmente colapsam no pecíolo ou mais frequentemente em direção à base da nervura central e se quebram, dando uma aparência de “guarda-chuva fechado” com folhas mortas ao redor do pseudocaule (Figura 10 e 12).

O Índice de Doença (ID) variou entre 9,37 e 53,12 % dentro das variedades analisadas, as variedades ‘Mysore’ (9,37 %) e ‘Pacovan Ken’ (12,5 %) com os menores índices de Doença e o destaque com maiores índices de Doença foi para as variedades ‘Maçã Casca Verde’(37,5 %), ‘Maçã Turiaçu Amarela’ (40,62 %) e ‘Prata Anã’(53,12 %) (Tabela 13).



**Figura 10.** Bananeira cultivar Maçã Turiacú Amarela com sintomas de Murcha de Fusarium, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. A e B- Planta inoculada com MGSS 324, apresentando amarelecimento das folhas e murcha. C e D- Planta inoculada com o MGSS 324, com pontos escurecidos na região central do rizoma.



**Figura 11.** Bananeira cultivar Prata Anã com sintomas de Murcha de Fusarium, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Inoculada com o MGSS 324. A- Planta com Murcha de Fusarium após 60 dias da inoculação. B- Corte transversal do Rizoma apresentando escurecimento.



**Figura 12.** Bananeira variedade Maçã Casca Verde com sintomas de Murcha de Fusarium causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Inoculada com o isolado MGSS 324. A- Planta apresentando amarelecimento e queda das folhas com efeito guarda chuva. B- Corte transversal do Sistema Vascular e Rizoma apresentando pontos de escurecimento e apodrecimento.



**Figura 13.** Bananeira cultivar Pacovan Ken e Mysore resistentes ao isolado MGSS 324 *Fusarium. oxysporum* f. sp. *cubense*. A- Planta exibindo amarelecimento tênue, sem sintomas de Murcha de Fusarium. B- Corte transversal do Sistema Vascular e Rizoma sem escurecimento indicando a resistência da cultivar. C- Variedade Mysore com comportamento resistente ao Mal do Panamá, D- Rizoma da variedade Mysore sem escurecimento.

O Postulado de Koch foi cumprido com a realização do reisolamento dos tecidos com sintomas e obtenção das colônias puras, para posterior armazenamento nos diferentes métodos de preservação da Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva” - MGSS (Figura 14).



**Figura 14.** Reisolamento do rizoma das variedades de bananeira que foram mais suscetível ao MGSS 324 (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*). A- Maçã Turiacú Amarela. B- Maçã Casca Verde. Colônias puras do reisolamento das cultivares mais afetadas pelo isolado MGSS 324 (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*) (C-E). C- Maçã Casca Verde. D- Prata Anã. E- Maçã Turiacú Amarela.

O isolado MGSS 325 apresentou maior severidade nas variedades ‘Maçã Casca Verde’(AAB), ‘Cacau Figo Cinza’(ABB) quando comparadas as variedades ‘Caru Roxa’(AAA), ‘Pacovan Ken’(AAAB) e ‘Mysore’(AAB) (Tabela 13.)

Este isolado causou Índices de Doença (ID) mais elevados nas variedades do que o isolado 324. O Índice de Doença (ID) variou de 6,25 a 59,37 % entre as variedades estudadas, com destaque para as cultivares ‘Caru Roxa’ (6,25 %), ‘Pacovan Ken’ (15,62 %) e ‘Mysore’ (18,75 %) pois apresentaram os menores Índices de Doença (ID) e destaques para as variedades ‘Maçã Casca Verde’ (59,37%) e ‘Cacau Figo Cinza’ (53,12 %) com Índices mais elevados do que as variedades citadas anteriormente (Figura 15).



**Figura 15.** Sintomas de Murcha de Fusarium observados nas variedades ‘Cacau Figo Cinza’ e ‘Maçã Casca Verde’ causado pelo isolado MGSS 325. A – Sintomas externos da fusariose na variedade Cacau Figo Cinza B- Sintomas internos de escurecimento do rizoma. C- Sintomas externos da fusariose na variedade Maçã Casca Verde. D- Sintomas internos de escurecimento do rizoma da variedade Maçã Casca Verde.

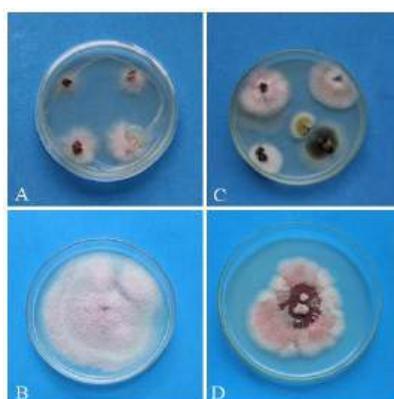
De maneira geral, ainda existiu um terceiro grupo de variedades, que apresentaram Índice intermediário entre os dois destaques já citados, com Índice de Doença (ID) entre 21,87 e 46,87 % e foram as referidas cultivares ‘Nanica’ (21,87 %), ‘Pratinha’ (31,25 %), ‘Prata Anã’ (40,62 %) e ‘Maçã Turiaçu Amarela’ (46,87 %).

As variedades ‘Caru Roxa’ e ‘Pacovan Ken’ comportaram-se como resistentes, observou-se internamente que o rizoma dessas cultivares não apresentaram sintomas de escurecimento (Figura 16). Não existem muitos estudos relacionados a variedade ‘Caru Roxa’ com relação a resistência ao Mal do Panamá, esse registro da variedade como resistente indica que esta variedade poderá ser utilizada no melhoramento genético de bananeiras contra o *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.



**Figura 16.** Bananeiras Variedades ‘Caru Roxa’ e ‘Pacovan Ken’ que apresentaram comportamento resistente frente ao isolado MGSS 325. A- Variedade ‘Caru Roxa’, B- Rizoma sem sintomas de escurecimento, C- Variedade Pacovan Ken sem sintomas externos de doença, D – Rizoma da variedade Pacovan Ken sem sintomas internos de escurecimento.

Foi realizado o reisolamento para cumprir o Postulado de Koch e obtenção de colônias puras, confirmando ser *F. oxysporum* f. sp. *ubense* o agente causal da doença (Figura 17).



**Figura 17.** Reisolamento de tecidos sintomáticos das variedades de Bananeira ‘Maçã Casca Verde’ e ‘Cacau Figo Cinza’ com comportamento suscetível ao isolado MGSS 325. (A- B) Maçã Casca Verde. A- Isolamento do rizoma com escurecimento. B- Visualização da colônia pura de MGSS 325; (C-D) Cacau Figo Cinza. C- Isolamento do rizoma com escurecimento. D- Crescimento da Colônia pura de MGSS 325.

Ao confrontar informações da origem de cada isolado (MGSS 324 e 325) com os resultados dos testes de patogenicidade constatou-se que, MGSS 324 obtido de variedade Maçã Turiaçu Amarela, apresentou maior severidade de doença nesta variedade e na variedade Prata Anã e o isolado MGSS 325 obteve maior Índice de Doença em Maçã Casca Verde que foi seu hospedeiro de origem seguido pela variedade Cacau Figo Cinza indicando que ambos isolados apesar de causarem doença nos seus hospedeiros de origem também causaram doença em outras variedades.

No Brasil, a murcha de *Fusarium* causa grandes perdas nas variedades do tipo ‘Prata’, com altos níveis de incidência constatados nos últimos anos na cultivar Prata-Anã, principal variedade plantada no país (BRASIL, 2018). Ribeiro *et al.*, (2018) avaliando 41 acessos do Banco Ativo de Germoplasma constatou que a cultivar Prata Anã era suscetível a *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, como foi constatado neste estudo. Também há relatos de suscetibilidade para a Variedade Cacau Figo Cinza em relação a Murcha de *Fusarium* da Bananeira (PEREIRA *et al.*, 2005), o que indica a presença da raça 2 do referido patógeno.

A constatação de que os isolados atacaram mais severamente as variedades hospedeiras de origem neste estudo, apresenta a hipótese de coevolução entre o patógeno e os hospedeiros fato constatado por Maryani *et al.*, (2019).

A verificação constante da patogenicidade é de extrema importância no diagnóstico precoce de isolados pertencente a *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, pois as raças 1 e 2 estão amplamente distribuídos pelo Brasil (RIBEIRO *et al.*, 2018) e ainda existe em diversos países a constatação da raça 4 Tropical (TR4) e subtropical (SR4) deste patógeno que está devastando plantações em vários países produtores de banana, tais como Taiwan, Malásia, Sumatra, Filipinas, Vietnã, China e Austrália (JUNIOR *et al.* 2018).

O mal do Panamá é de grande severidade para as cultivares Maçã, Prata, Pacovan e Prata-anã, todas de grande aceitação popular (CORDEIRO, 2003) o que torna o problema ainda mais grave, pois o fitopatógeno é amplamente difundido em todas as regiões produtoras do país, e as variedades cultivadas, incluindo Maçã e as cultivares do subgrupo Prata, que representam 95% da totalidade dos bananais nacionais são, na sua maioria, suscetíveis a doença (AMORIM *et al.*, 2016).

Com relação ao método de preservação, repicagem contínua, os dois isolados foram patogênicos as variedades suscetíveis, mesmo dois anos após a conservação mostrando que a preservação da patogenicidade é viável ainda por esse tempo. Segundo Escobar; Castro-Rios (2021), esse método demonstra excelentes resultados na manutenção de cepas por até quatro anos.

Em vista de algumas desvantagens apresentadas pelo método de repicagem contínua, a verificação da conservação da patogenicidade neste método deve ser maior em relação a métodos de conservação longa, como por exemplo, método de liofilização. Ibal *et al.*, (2017) concluíram que a viabilidade de *Trichoderma viride* em repicagem contínua aos 24 meses era apenas de 10%, mostrando a baixa eficiência do método por

longos anos, portanto deve-se seguir os testes para monitorar não somente a viabilidade, mas também a patogenicidade dos isolados nesse método.

#### 4.5 Teste de Patogenicidade de isolado de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em cultivares de Feijão-Caupi (*Vigna unguiculata*).

O ensaio com as seis cultivares de Feijão-Caupi inoculadas com o isolado MGSS 60 de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* demonstraram que existe diferenças quanto ao comportamento fenotípico expresso de resistência ou suscetibilidade das diferentes cultivares, existindo três grupos formados de acordo com a classe de reação (Tabela 14).

O primeiro grupo formado pelas cultivares BR-17 Gurguéia e BRS Tumucumaque que foram classificadas como suscetíveis ao isolado MGSS 60 de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. Um segundo grupo formado pelas cultivares BRS Guariba, Manteiguinha e BRS Tumucumaque, apresentaram um comportamento moderadamente suscetíveis e o terceiro grupo com as cultivares BRS Aracê e BRS Pujante, classificadas como imune segundo a escala de reação de Fawole, (1989) e estas duas últimas cultivares citadas diferiram estatisticamente de todas as outras cultivares analisadas.

Resultados relacionados a suscetibilidade das cultivares BRS Tumucumaque e BR 17 Gurguéia também foram relatados por Noronha *et al.* (2013), ao avaliarem 36 genótipos e apenas dois mostraram-se altamente resistentes e seis moderadamente resistentes.

Atualmente são registradas a existência de 4 raças de FOT que variam de acordo com as interações dos genótipos diferenciais, porém a raça 3 é a mais predominante e a estratégia da utilização de cultivares resistentes é a mais indicada para o controle da doença (POTTORFF *et al.*, 2012).

Sobre a severidade da doença a cultivar BRS Aracê, apresentou comportamento imune a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* quando relacionada a sintomatologia da doença assim como a cultivar BRS Pujante (Figura 19-B) observou-se plantas visualmente saudáveis, avaliando raiz, caule e folhas descartando sintomas ou presença da doença, admitindo índice 0% (Tabela 16). Segundo Omoigui *et al.*, (2018) a resistência de Feijão Caupi a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* está ligada a um gene dominante.

Pottorff *et al.*, (2012) relataram a identificação do *locus Fot3-1* que confere resistência à *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* raça 3 em Feijão Caupi.

**Tabela 14.** Reação de cultivares de feijão caupi a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, 2019.

Cultivar	Severidade	Índice da doença (%)	Reação
BRS Aracê	0,00a	0,00	Imune
BRS Pujante	0,00a	0,00	Imune
BRS Guariba	1,37 b	40	Moderadamente suscetível
Manteiguinha	1,38 b	40	Moderadamente suscetível
BRS Tumucumaque	1,57 b	52	Suscetível
BR-17 Gurguéia	1,69 b	58	Suscetível
<b>CV %</b>			<b>28,23</b>

**Método de Preservação:** Solo esterilizado, **Tempo de Preservação:** 6 anos

<sup>1</sup>Médias transformadas para raiz de x seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade. <sup>2</sup>Avaliação da intensidade de doença foi realizada usando a seguinte escala de avaliação de resistência: 0% = imunidade, 1-10% = altamente resistente, 11-20% = moderadamente resistente, 21-40% = moderadamente suscetível, 41- 60% = suscetível, 70% = altamente suscetível

As cultivares BRS Guariba e Manteiguinha apresentaram resultados semelhantes entre si, com um percentual de Índice de Doença (ID) de 40 % comportando-se como moderadamente suscetíveis a Murcha de *Fusarium* (Tabela 14). As cultivares BR-17 Gurguéia e BRS Tumucumaque, apresentaram os maiores índices de doença (ID) com 58 % e 52 %, respectivamente. Nessas cultivares, observou-se plantas com avaliação da escala de notas mais altas, ou seja, com sintomas bem definidos da doença como redução do crescimento e clorose, acompanhada de queda prematura de folhas, seguida da murcha típica e a morte das plantas (Figura 18 - C, D, E e F) e segundo Athayde Sobrinho *et al.*, (2005) esses são os sintomas típico da doença murcha de *Fusarium* em *Vigna unguiculata*.



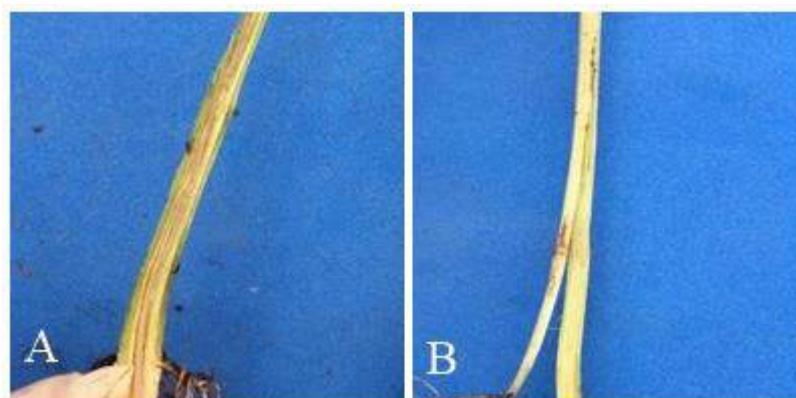
**Figura 18.** Cultivares de Feijão caupi com sintomas de murcha de *Fusarium* causadas por *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, A (BRS- Aracê), B (BRS – Pujante), C (Guariba), D (Tumucumaque), E (BR-17 Gurguéia) e F (Manteiguinha).

O comportamento suscetível da cultivar BR-17 Gurguéia também foi observada por Rodrigues *et al.*, (2006), que avaliaram a indução de resistência a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em Caupi e utilizaram as cultivas BR-17 Gurguéia e IPA-206 como testemunhas suscetíveis, detectaram índices de doença de 68,85 % e 66,04 % respectivamente, após 18 dias da inoculação do patógeno. Embora, na época de avaliação, os índices de doença observados tenham sido muito próximos, a expressão dos sintomas na cultivar IPA-206 foi mais tardia que na BR-17 Gurguéia.

Noronha *et al.*, (2013) ressaltam que a identificação de fontes de resistência e o desenvolvimento de cultivares resistentes constituem na principal medida de controle

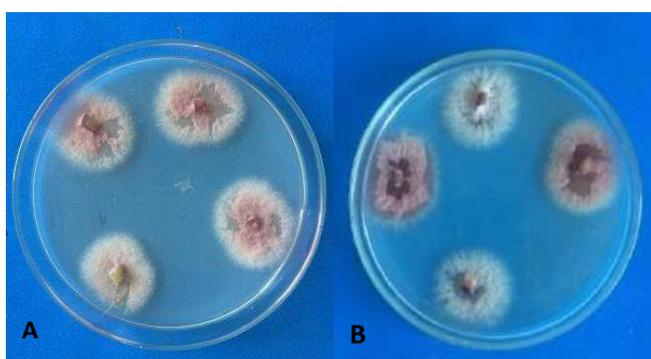
destas doenças radiculares. Aliadas ao uso de práticas sustentáveis que ajudem na supressão de patógenos do solo.

Analisou-se o sistema vascular das plantas que apresentavam sintomas da doença e posteriormente foi realizado isolamento do tecido doente. A figura 19, demonstra o sistema vascular de plantas com a presença de murcha de *Fusarium* e plantas com ausência da doença, verificadas durante à análise visual.



**Figura 19.** Planta com presença de murcha de *Fusarium*, (A) cultivar BR -17 Gurguéia com escurecimentos vasculares e planta (B) cultivar BRS-pujante aparentemente sadia, livre de sintomas da doença.

Houve a confirmação do agente etiológico *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* mediante o reisolamento de partes do caule da planta, com escurecimento vascular (Figura 20).



**Figura 20.** Confirmação da presença do fitopatógeno em plantas de Feijão Caupi, A.cultivar BR- 17 Gurguéia, B.BRS Guariba.

Em relação ao método e o tempo de conservação, o isolado MGSS 60 estava preservado no método de solo esterilizado por 6 anos e foi marcante a agressividade do isolado as cultivares suscetíveis a ele.

Um fato marcante que mesmo após seis anos não houve alteração nas características fitopatogênicas do isolado, e que mais uma vez este método apresentou

bons resultados na patogenicidade em plantas suscetíveis de Feijão-Caupi em diferentes genótipos avaliados.

#### 4.6 Teste de Patogenicidade com isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* (FOP) em maracujazeiro.

De acordo com os resultados da análise de patogenicidade dos 14 isolados de FOP que estão apresentados na tabela 15, o isolado MGSS 329 destacou-se com maior percentual de infecção (62,5%) e índice de doença (46,8%) diferindo estatisticamente da testemunha. Os isolados MGSS 98, MGSS 99, MGSS 101, MGSS 103, MGSS 104, MGSS 326, MGSS 327, MGSS 328, MGSS 331, MGSS 332, MGSS 333, MGSS 334 e MGSS 335 não diferiram estatisticamente da testemunha (Tabela 15).

**Tabela 15.** Patogenicidade dos isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* de Maracujazeiro Amarelo, São Luís. 2020.

Tratamentos	Método e tempo (anos) de Preservação	Médias das Notas	Percentual de Infecção PI (%)	Índice de Doença ID (%)
MGSS 98	RC/8	1,00 a	0	0
MGSS 99	RC/8	1,00 a	0	0
MGSS 101	RC/8	1,00 a	0	0
MGSS 103	RC/8	1,00 a	0	0
MGSS 104	RC/8	1,00 a	0	0
MGSS 326	CA/10	1,00 a	0	0
MGSS 327	CA/10	1,25ab	25	31,2
MGSS 328	CA/10	1,50 ab	50	37,5
<b>MGSS 329</b>	<b>CA/10</b>	<b>1,75 b</b>	<b>62,5</b>	<b>43,8</b>
MGSS 331	CA/10	1,50ab	25	37,5
MGSS 332	CA/10	1,00 a	0	0
MGSS 333	CA/10	1,00 a	0	0
MGSS 334	CA/10	1,13ab	12,5	28,1
MGSS 335	CA/10	1,38ab	37,5	34,3
Testemunha	-	1,00 a	0	0
<b>CV</b>		<b>25,15</b>	-	-

**Método de Preservação: CA (Castellani); RC (Repicagem Contínua)**

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ) a 5% de probabilidade.

Ferreira *et al.*, (2015) encontraram resultados semelhantes ao testar isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, que apresentaram variação na agressividade do patógeno indicando variabilidade genética na população. A murcha de *Fusarium* em Maracujazeiro têm gerado uma busca constante por genótipos resistentes para a reprodução de plantas, no entanto, a manutenção de isolados com boa esporulação e agressivos desse patógeno é difícil (MELO *et al.*, 2019), por isso a importância de realização dos testes de patogenicidade e preservação em Coleções Micológicas.

Uma das variáveis que influenciou a virulência fazendo com que a maioria dos isolados não causassem sintomas, pode ter sido o método de inoculação, o que constataram Silva *et al.* (2011) ao analisarem três métodos de inoculação (imersão de raízes na suspensão de inóculo, método da areia e fubá de milho colonizados e método por ferimento das raízes por perfuração do solo, seguido de inoculação) observaram que o método de imersão de raízes na suspensão do inóculo foi o mais eficiente na mortalidade de maracujazeiro inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*. Melo *et al.*, (2019) e Marostega *et al.*, (2019) utilizando o método de imersão de raízes, obtiveram resultados de patogenicidade e mortalidade após inoculação aos 45 dias. e segundo Preisigke *et al.*, (2017) o sucesso da patogenicidade de FOP se deve ao tempo maior de exposição das raízes aos conídios, aumentando a possibilidade de penetração do patógeno.

Foi possível observar nas mudas com sintomas de Murcha de *Fusarium* inoculadas com o isolado MGSS 329 (Figuras 21) sintomas de amarelecimento das folhas com início aos 80 dias após inoculação. e com o corte transversal pontos escurecidos no sistema vascular. Segundo Preisigke *et al.*, (2017) antes de ocorrer a murcha, as folhas mudam a coloração de verde-brilhante para verde-pálido ou verde amarelado. Pode-se observar mudança na coloração dos tecidos do xilema, com a ocorrência de coloração ferruginosa, sintomas característicos da doença. Melo *et al.*, (2019) observaram que dos 13 isolados avaliados de FOP variaram de 17 a 52 dias o período de incubação e aparecimento dos sintomas em *Passiflora edulis* com sintomas de amarelecimento leve a moderado, os sintomas apareceram com menos tempo do que o verificado em nossos estudos.

Ao final da avaliação dos sintomas internos, o caule de plantas sintomáticas e assintomáticas foram abertas com um corte transversal e verificou-se escurecimento dos tecidos internos do caule. Após, realizou-se o reisolamento dos tecidos sintomáticos e após crescimento confirmou-se ser o *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Figura 21 e 22).



**Figura 21.** Muda de maracujazeiro Amarelo com sintomas de Murcha de *Fusarium* nas folhas causado por *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*. A- Planta inoculada com o MGSS 329. B- Testemunha.



**Figura 22.** Comprovação do agente causal da murcha de *Fusarium* em Maracujazeiro amarelo (*P. edulis*). A – Colônia pura do *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* isolado MGSS 329 obtida do sistema vascular de mudas sintomáticas. B- Corte transversal no caule de maracujazeiro Amarelo inoculada com o MGSS 329 apresentando escurecimento vascular.

Ao relacionar o método e o tempo de preservação o isolado MGSS 329 estava preservado no método de Castellani por 10 anos e ainda manteve suas características originais de patogenicidade. A viabilidade do método de Castellani foi verificada por Sakr (2018) em 4 espécies de *Fusarium* constatando a taxa de 100 % de crescimento após 1

ano de preservação.

Nenhum dos isolados conservados por oito anos no método de repicagem contínua diferiram da testemunha. A conservação ao longo de oito anos como os utilizados neste experimento no método de repicagem contínua exige inúmeras repicagens ao longo do tempo acarretando mudanças morfológicas e fisiológicas como constatou Hussien *et al.*, (2021) que observaram mudanças morfológicas após nove repicagens sucessivas de isolados de *Metarhizium* spp. Segundo Homolka *et al.*, (2013) o método de repicagem contínua é um método que além de consumir tempo está sujeito a contaminação e não impede as variações fisiológicas durante a manutenção de longo prazo.

#### **4.7- Teste de Patogenicidade com isolados de *F. oxysporum* em cultivares de coentro (*Coriandrum sativum*).**

De acordo com os resultados obtidos no teste de patogenicidade, as duas cultivares foram suscetíveis aos isolados de *F. oxysporum*. Os isolados MGSS 415 e MGSS 416 diferiram estatisticamente de todos os tratamentos, porém o isolado MGSS 415 causou o maior número de plantas com tombamento ou morte na cultivar Verdão Super em relação ao mesmo isolado avaliado na cultivar Verdão (Tabela 16).

O isolado MGSS 305 apresentou média de plantas doentes menor na cultivar Verdão Super do que os outros dois isolados avaliados, porém na cultivar Verdão esse mesmo isolado não causou nenhum tombamento ou morte das plantas e não diferiu estatisticamente da testemunha.

Os isolados mais agressivos foram MGSS 415 e MGSS 416 que apresentaram Percentual de Infecção entre 80 e 100 % nas duas cultivares de coentro avaliadas, em contrapartida o isolado MGSS 305 apresentou baixos percentuais de Infecção de apenas 16 % na variedade verdão Super e 0 % na variedade Verdão.

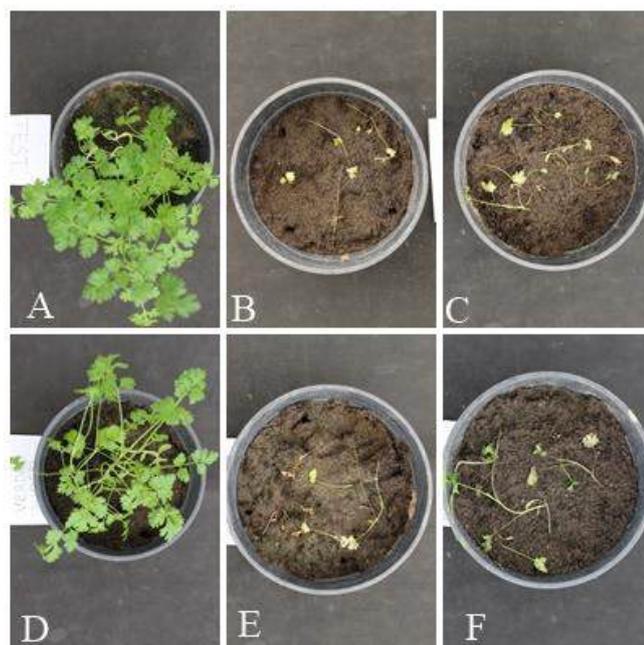
**Tabela 16.** Avaliação de patogenicidade de isolados de *F. oxysporum* em duas cultivares de Coentro (*C. sativum*), 2021.

TRATAMENTO	VARIEDADE	PLANTAS DOENTES	PERCENTUAL DE INFECCÇÃO (PI) (%)
TESTEMUNHA	VERDÃO	0,00 a*	0
MGSS 305	VERDÃO	0,00 a	0
MGSS 415	VERDÃO	4,00 c	80
MGSS 416	VERDÃO	4,60 d	92
TESTEMUNHA	VERDÃO SUPER	0,00 a	0
MGSS 305	VERDÃO SUPER	0,80 b	16
MGSS 415	VERDÃO SUPER	5,00 d	100
MGSS 416	VERDÃO SUPER	4,80 d	96
CV (%)		19,21	-

**Método de preservação:** Repicagem contínua, **Tempo de preservação:** MGSS 305 – 3 anos; MGSS 415 – 2 meses. MGSS 416 – 2 meses

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico InfoStat (DI RIENZO *et al.*, 2020).

A avaliação ao 15° dia após a inoculação revelou um grande número de plantas apresentando tombamento e mortes nas duas cultivares causados pelos isolados MGSS 415 e MGSS 416 (Figura 23).



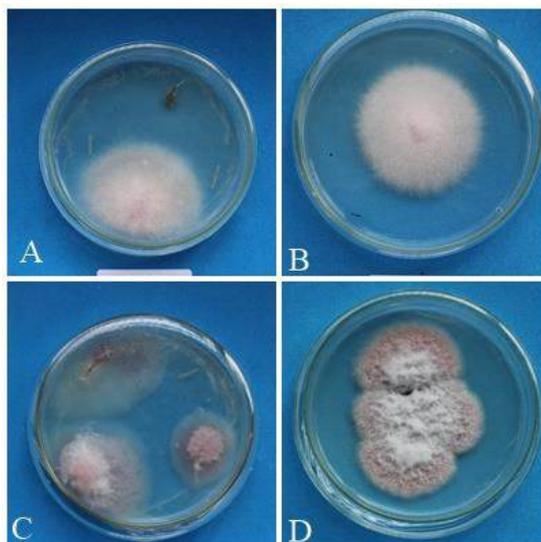
**Figura 23.** Observação de sintomas causados pelos isolados MGSS 415 e MGSS 416 nas cultivares de Coentro ao 15° dia após inoculação em comparação a testemunha. A- C- Variedade Verdão, A- Testemunha, B- MGSS 415, C- MGSS 416, D-F- Variedade Verdão Super, D- Testemunha, E- MGSS 415, F- MGSS 416.

Observou-se ainda nenhuma planta sintomática na variedade Verdão causado pelo isolado MGSS 305, e um número pequeno de plantas doentes apresentando folhas com clorose e tombamento na variedade Verdão Super (Figura 24).



**Figura 24.** Cultivares de Coentro avaliadas ao 15° (DAI) inoculadas com o isolado MGSS 305. A – Variedade Verdão sem sintomas causados pelo MGSS 305, B- Variedade Verdão Super com folhas apresentando amarelecimento e tombamento.

Foi realizado após a avaliação o isolamento de plantas sintomáticas e obtenção de colônias puras para confirmação do patógeno, e logo após armazenado os isolados nos métodos de conservação de Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva” (Figura 25).



**Figura 25.** Isolamentos de tecidos sintomáticos de Coentro para confirmação da Murcha de Fusarium. A- Crescimento da colônia MGSS 415 a partir do tecido sintomático, B- Colônia pura do patógeno MGSS 415, C- Crescimento da colônia MGSS 416 a partir do tecido sintomático, D- Colônia pura do patógeno MGSS 415.

Com relação ao método de preservação, todos os isolados estavam no método de Repicagem contínua, com variação de três anos conservados para o isolado MGSS 305 e 2 meses para os isolados MGSS 415 e MGSS 416, sendo os dois últimos os mais agressivos nas duas variedades de Coentro avaliadas. Esse método é uma técnica universalmente aplicável atualmente usada na maioria das coleções com baixo orçamento ou como um segundo método de manutenção. O uso dessa técnica apresenta desvantagens como perda de patogenicidade, virulência e esporulação.

Essas desvantagens são as hipóteses que explicam a baixa ou nenhuma virulência do MGSS 305 em cultivares de coentro, o tempo de armazenamento também é um fator importante, como o fato do método apresentar excelentes resultados de manutenção até 4 anos (ESCOBAR; CASTRO-RIOS, 2021), porém não se mostra viável do ponto de vista da preservação da patogenicidade como verificado nesse trabalho.

Os isolados que estavam apenas dois meses conservados foram altamente agressivos causando acima de 80 % das mortes nas duas cultivares de Coentro. Enquanto o isolado conservado há 24 meses apresentou sintomas leves em uma única variedade e nenhum sintoma na cultivar Verdão. Talvez esse tempo seja limite para essas espécies oriundas de *C. sativum*. A estocagem e a preservação de material microbiológico revelam-se como um empreendimento de alta complexidade. No campo teórico, destaca-se o volume significativamente reduzido de obras em torno do tema, identificando-se uma maior concentração das produções nas áreas da reprodução e da indústria farmacêutica e alimentícia (COSTA *et al.*, 2009). O que traz uma importância grande deste trabalho que alia o uso da conservação dos fungos fitopatogênicos a sua preservação de patogenicidade.

O Coentro é cultivado em praticamente todos os países do mundo. As maiores áreas de produção de coentro estão na China, Índia e antiga União Soviética e o México se destaca como o maior produtor e exportador nas Américas, com cerca de 5.000 hectares anuais cultivados para consumo interno e exportação (REIS; LOPES, 2016).

Em diversos países foi relatado a primeira ocorrência da Murcha de Fusarium em plantas de Coentro (*C. sativum*) como nos Estados Unidos (KOIKE; GORDON, 2005) na Itália (GILARDI *et al.*, 2017), Índia (ASHWATHI *et al.*, 2017). No Brasil essa doença não foi descrita com a caracterização molecular da espécie, apenas existe caracterização morfológica a nível de gênero.

Na última circular técnica N° 157 da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA sobre as doenças do Coentro no Brasil não há abordagem desse patógeno dentre os agentes causais de doenças do Coentro (REIS; LOPES, 2016).

Esses três isolados foram obtidos de áreas de cultivo de agricultores familiares de das cidades de Formosa e São Luís do Maranhão, região Nordeste. No Brasil, essa cultura é trabalhada principalmente pela agricultura familiar e normalmente tem pouco acesso a assistência técnica e ainda não há relatos de cultivares resistentes ao patógeno. Isso de certa forma é uma preocupação para categoria da população que vive do cultivo de Coentro especialmente no Nordeste brasileiro.

#### 4.8 - Caracterização morfológica de isolados de *Fusarium*.

De acordo com as características macromorfológicas de coloração de colônias os isolados utilizados nos testes de patogenicidade, apresentaram uma variabilidade de cores expressas entre branco, rosa claro até roxo no meio de cultura de BDA (Figura 26, 27, 28, 29 e 30). Observou-se diferenças macromorfológicas em colônias obtidas do mesmo hospedeiro e entre hospedeiros diferentes.



**Figura 26.** Variabilidade de coloração de colônias de *Fusarium* obtidas de tomateiro (*Solanum lycopersici*). Verso do verso das Colônias. A- Totalmente rosa (MGSS 01), B- Centro Rosa e bordas brancas MGSS 40, C- Rosa claro MGSS 41, D- centro da colônia rosa e bordas roxas MGSS 42, E- Roxo no centro e bordas claras MGSS 43, F- Rosa Claro MGSS 81, G- Totalmente Rosa MGSS 182, H- Rosa MGSS 183, I- Totalmente Rosa MGSS 225, J- Centro Rosa e bordas claras MGSS 233.



**Figura 27.** Variabilidade de coloração de colônias de *Fusarium* obtidas de Quiabeiro (*Abelmoschus esculentus*). Verso do verso das Colônias A- Roxa MGSS 10, B- Branca MGSS 55, C- Rosa com bordas brancas MGSS 221, D- Roxa MGSS 224, E- Rosa MGSS 226, F- Rosa claro MGSS 323, G- Roxo MGSS 277.



**Figura 28.** Variabilidade de coloração de colônias de *Fusarium* obtidas de Bananeira (*Musa* sp). reverso (B-D). (A-B) MGSS 324, A- Verso da Colônia: Centro Rosa e bordas brancas, B- Reverso da colônia Centro rosa e bordas brancas, (C-D) MGSS 325. C- Verso Centro rosa e bordas brancas e D- Reverso da Colônia: Centro roxo e bordas rosas.



**Figura 29.** Variabilidade de coloração de colônias de *Fusarium* obtidas de Feijão-Caupi (*Vigna unguiculata*) (A) e Coentro (*Corinadrum sativum*) (B-D). A- Rosa com bordas brancas MGSS 60, B- Salmão MGSS 305, C- Rosa claro MGSS 415, D- Rosa com borda roxa 416.

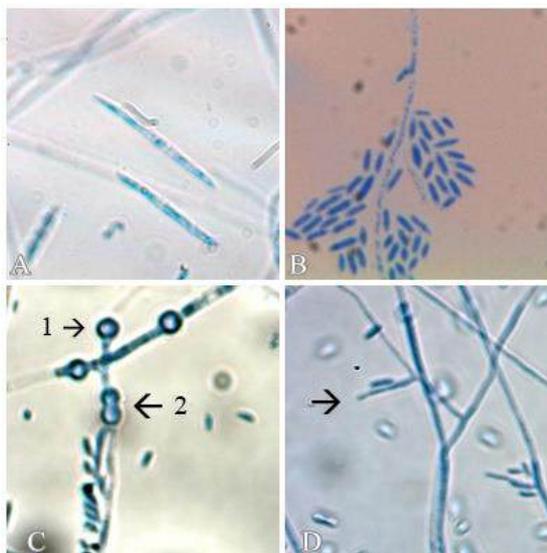


**Figura 30.** Variabilidade de coloração de colônias de *Fusarium* obtidas de Maracujazeiro (*Passiflora edulis*). Verso do verso das Colônias. A- Roxo MGSR 98, B- Rosa claro MGSS 99, C- Rosa com bordas claras MGSS 101, D – Totalmente Rosa MGSS 103, E – Rosa MGSS 104, F- Rosa Claro MGSS 326, G – Branco MGSS 327, H- Totalmente Rosa MGSS 328, I- Centro Rosa e borda Branca MGSS 329, J- Rosa MGSS 331, K – Rosa MGSS 332, L- Roxa com borda branca MGSS 333, M - Roxa MGSS 334, N- Rosa com borda branca MGSS 335.

As variações de coloração de colônias de *Fusarium* em diferentes espécies ou até mesmo dentro da mesma espécie é comum. Nirmaladevi *et al.*, (2016) relataram a variação macromorfológica entre colônias de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* apresentando coloração branca a rosa, com maior frequência de coloração roxa em meio de cultura de Batata-Dextrose-Ágar (BDA). Teixeira, Coelho e Tebaldi (2017) observaram diferenças de coloração e crescimento micelial entre isolados de *F. oxysporum* f. sp. *Passiflorae*, quando cultivados em três meios de cultivo, entre eles, meio de cultura BDA.

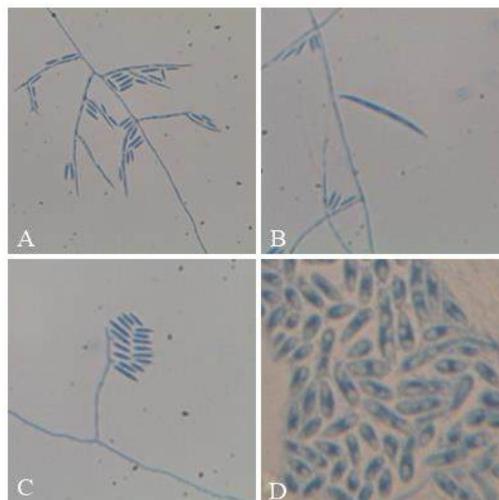
De acordo com as características micromorfológicas foi possível separar os isolados em dois grupos maiores: o grupo 1 que apresentava monofiálides curtas e dentro desses grupos havia os isolados com presença de clamidósporos e outros sem a formação dessa estrutura de resistência além de macroconídeos, microconídeos (Figura 31) e o grupo 2 que apresentou características como polifiálides, com presença de microconídeos, presença ou ausência de macroconídeos levemente curvados e ausência de clamidósporos (Tabela 17 e Figura 32).

O grupo 1 formado por 31 isolados apresentaram características de espécies do complexo *Fusarium oxysporum* de diferentes *formae speciales*. *F. oxysporum* é caracterizado principalmente por microconídeos formados em falsas cabeças em monofiálides curtas, macroconídeos de 3 septos formados em monofiálides de conidióforos ramificados em esporodóquios e clamidósporos com uma aparência lisa ou rugosa formados individualmente ou em pares (FOURIE *et al.*, 2011).



**Figura 31.** Características micromorfológicas comuns de isolados que foram agrupados no grupo 1. A- Macroconídeos retos ou ligeiramente curvados, B- Microconídeos com formato oval, C- Clamidósporos, C1- individuais ou C2- em pares e D- Monofiálide curta.

O grupo 2 apresentaram características semelhantes as espécies pertencentes ao complexo *Fusarium fujikuroi* (FFSC). Essas espécies produzem mono e polifiálides, microconídeos, globoso, oval, napiforme dispostos em cadeia ou falsas cabeças, os macroconídeos tem paredes finas, quase retas a ligeiramente curvas. Os clamidósporos raramente são formados em FFSC, embora possam estar presentes em algumas espécies, formadas principalmente intercaladamente nas hifas ou agrupadas em cadeia (AL-HATMI *et al.*, 2019).



**Figura 32.** Características micromorfológicas comuns de isolados que foram agrupados no grupo 2. A- Polifialídes , B- Macroconídeos levemente curvado C- Monofialídes e D- Microconídeos em abundância com formato oval.

Existe uma falta de estabilidade de caracteres morfológicos e estes não podem fornecer a resolução necessária para identificar adequadamente uma espécie de *Fusarium oxysporum*. Alguns isolados podem não produzir clamidósporos, como o caso de isolados MGSS 01, MGSS 55, MGSS 60, este fato foi constatado por Lombard *et al.*, (2019) que afirmam que existem espécies pertencentes ao complexo *F. oxysporum* que não produzem clamidósporo e outras produzem abundantemente.

Todos os isolados produziram abundantemente microconídeos, que variavam entre 0 e 2 septos, e a maioria dos isolados apresentaram macroconídeos que variavam no formato reto e levemente curvado, muitos deles a quantidade era esparsa e em quatro isolados não foram observados produção de macroconídeos (Tabela 16). Essa característica já foi observada por Fourie *et al.*, (2009) em isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* pertencente ao complexo de espécies *F. oxysporum* (FOSC). O uso da morfologia na identificação de espécies de fungos é muito importante para entender a evolução de caracteres morfológicos. No entanto, abordagens para sistemática de fungos embora usada rotineiramente em estudos taxonômicos a nível de ordem ou família nem sempre resolve a diferenciação a nível de espécie (RAJA *et al.*, 2017).

A identificação a nível de espécies em FFSC é difícil devido a alta diversidade morfológica e variação intraespecífica de características microscópicas (O'DONNELL *et al.*, 2015). Algumas espécies apresentam morfologia muito similar no complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* como por exemplo, *F. proliferatum* e *F. fujikuroi*; *F.*

*sacchari* e *F. subglutinans* assim como *F. verticillioides* e *F. andiyazi* (LESLIE; SUMMERELL, 2006) e a *F. udum* pertencente ao complexo FFSC apresenta-se muito similar a *F. oxysporum* por apresentar clamidósporos, microconídios formando falsas cabeças em monofiálides curtas e indistinguível de *F. oxysporum* (Pfenning *et al.*, 2019). Segundo Yilmaz *et al.*, (2021) FFSC contém 65 espécies aceitas e um largo número de espécies críticas somente identificadas baseadas em inferência filogenética.

**Tabela 17.** Características macromorfológicas e micromorfológicas de isolados de *Fusarium*.

MGSS	ASPECTOS MORFOLÓGICOS							
	MACROSCÓPICOS	MICROSCÓPICOS					MACROCONÍDEOS	
	COLORAÇÃO	FORMA	Nº DE SEPTOS	FIÁLIDES	CLAMIDÓSPOROS	FORMA	Nº DE SEPTOS	
01	Branco no centro e bordas roxas	Oval	0-2	Monofiálide curta	Ausente	Delgado, reto	3-5	
10	Roxa	Oval	0-1	Monofiálide curta	Individual	Lado dorsal mais curvado que o ventral	3-5	
40	Roxa	Oval	1	Monofiálide curta	Em pares	Delgado, reto	3-5	
41	Rosa	Oval	0-1	Monofiálide curta	Individual	Delgado, reto	3-5	
42	Roxa	Oval	0-1	Monofiálide curta	Individual ou em pares.	Delgado, reto	3-5	
43	Rosa e bordas claras	Oval	0-1	Mono e Polifialides		Ausente	Delgado, reto	-
55	Rosa	Oval	0-2	Monofiálide curta	Ausente	Delgado, reto	3-5	
60	Roxa	Oval	0-2	Monofiálide curta	Ausente	Lado dorsal mais curvado que o ventral	3-4	
81	Rosa	Oval	0-1	Monofiálides curta	Ausente	Lado dorsal mais curvado que o ventral	3-5	
98	Roxa	Oval	0-1	Mono e polifiálide	Ausente	Ausente	3-5	
99	Rosa	Oval e Obovóide com base truncada	0-2	Monofiálide	Ausente	Delgado, reto	3-5	
101	Rosa com bordas claras	Oval e Obovóide com base truncada	0-1	Monofiálide	Ausente	Delgado, reto	3-5	
103	Rosa claro	Oval e Obovóide	0-2	Monofiálides	Ausente	Lado dorsal mais curvado que o ventral	3-5	
104	Rosa	Oval	0-1	Monofiálides	Ausente	Delgado, reto	3-5	
182	Totalmente Rosa	Oval	0-1	Monofiálide curta	Agrupado em cadeia.	Lado dorsal mais curvado que o ventral	3-5	

MGSS	MACROSCÓPICOS		MICROSCÓPICOS				
	COLORAÇÃO	MICROCONÍDEOS			MACROCONÍDEOS		
		FORMA	Nº DE SEPTOS	FIÁLIDES	CLAMIDÓSPOROS	FORMA	Nº DE SEPTOS
183	Totalmente Rosa	Oval	1	Monofiálide curta	Individual	Delgado, reto	3-5
221	Rosa com borda branca	Oval e Obovóide com base truncada	0	Monofiálide curta	Ausente	Lado dorsal mais curvado que o ventral	3-5
224	Roxa	Oval e obovóide com base truncada	0-2	Monofiálide curta	Ausente	Lado dorsal mais curvado que o ventral	3-5
225	Rosa	Oval e Obovóide com base truncadae	0-2	Monofiálide curta	Ausente	Lado dorsal mais curvado que o ventral	3-5
226	Rosa	Oval e Obovóide com base truncada	0-2	Monofiálide curta	Ausente	Lado dorsal mais curvado que o ventral	3-5
233	Roxa	Oval	0-2	Monofiálide curta	Individual	Lado dorsal mais curvado que o ventral	3-5
277	Roxa	Oval	0-1	Monofiálide curta	Individual	Delgado, reto	3-5
305	Rosa	Oval	0	Monofiálide /curta	Ausente	Lado dorsal mais curvado que o ventral	4-6
323	Rosa claro	Oval	0-2	Monofiálide curta	Individual	Delgado, reto	3-6
324	Rosa	Oval	0-2	Monofiálide curta	Individual	Delgado, reto	3-5
325	Rosa	Oval	0-2	Monofiálide curta	Individual/em pares	Delgado, reto	3-5
326	Rosa Claro	Oval	0-2	Mono e polifiálide	Ausente	-Ausente	-
327	Rosa Claro	Oval	0-1	Mono e Polifiálide	Ausente	-Ausente	-
328	Rosa	Oval	0-1	Monofiálide curta	Individual	Ausente	
329	Rosa	Oval	0-1	Monofiálide curta	Individual	Reto	3-5
331	Rosa	Oval	0-1	Monofiálide e polifiálide	Ausente	Delgado, reto	3-5
332	Rosa	Oval	0-1	Monofiálide curta	Individual	Reto	3-5
<b>Cont.</b>							
MGSS	MACROSCÓPICOS		MICROSCÓPICOS				

	MICROCONÍDEOS				MACROCONÍDEOS		
	COLORAÇÃO	FORMA	Nº DE SEPTOS	FIÁLIDES	CLAMIDÓSPOROS	FORMA	Nº DE SEPTOS
333	Roxa com borda branca	Oval	0-2	Mono e Polifiálide	Ausente	Reto	3-5
334	Roxa	Oval	0-1	Monofiálide	Ausente	Reto	3
335	Rosa com borda branca	Oval	0-1	Monofiálide curta	Individual	Reto	3-5
415	Rosa	Oval	0-1	Monofiálide	Ausente	Ausente	
416	Rosa	Oval	0-1	Monofiálide	Ausente	Reto	3-5

#### 4.9 Caracterização Molecular dos isolados de *Fusarium* spp.

##### Sequenciamento de DNA e análises filogenéticas.

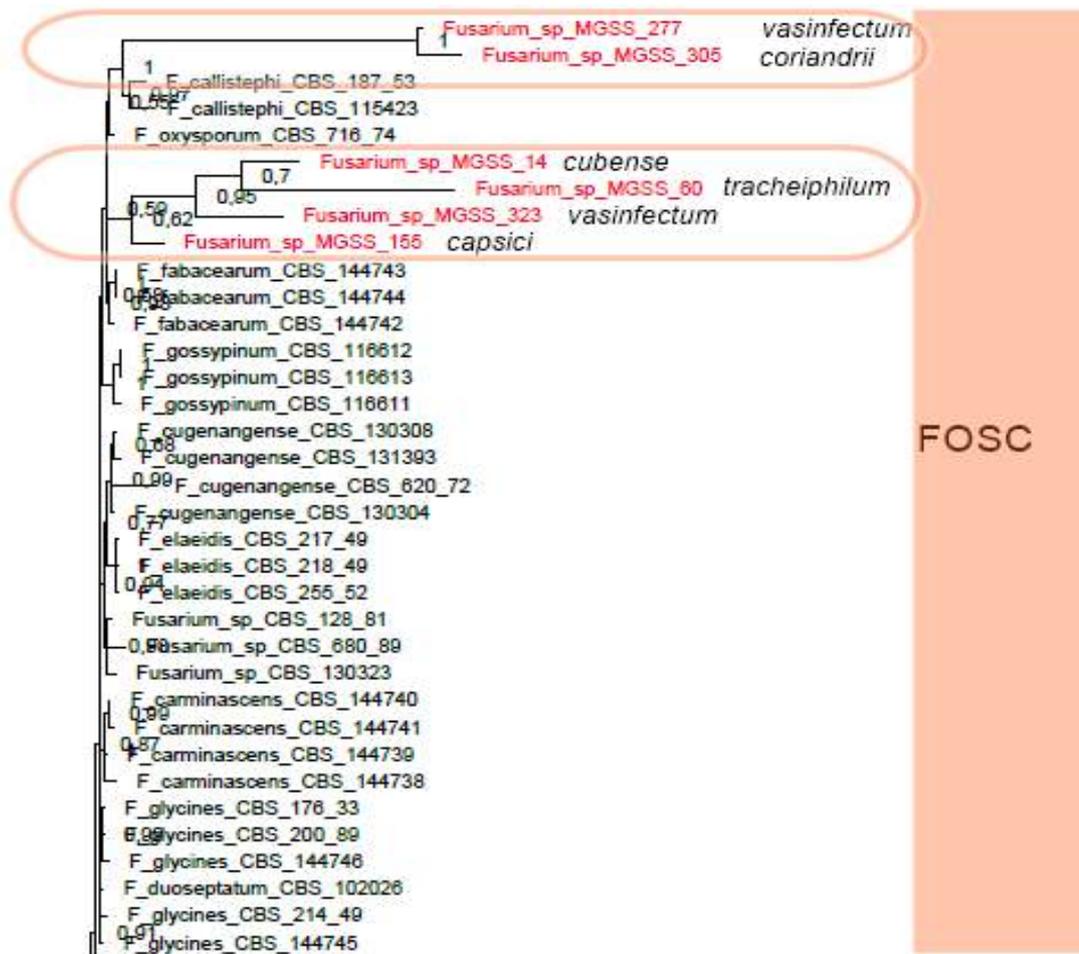
Foram caracterizados através da análise multilocus dos genes TEF1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tub2, cdmA e RPB2 um total de 58 isolados obtidos da Micoteca Prof. Gilson Soares da Silva. Dentre esses 28 isolados foram agrupados dentro complexo de espécies *F. oxysporum* (FOSC) e 3 isolados foram agrupados dentro complexo de espécies *F. fujikuroi* (FFSC) e 27 isolados que não pertencem a nenhum complexo de espécies conhecido.

Analisando a árvore filogenética construída com isolados do complexo de espécies *F. oxysporum* (FOSC) observou-se que os 28 isolados pertenciam a 7 formae speciales (*vasinfectum*, *coriandrii*, *capsici*, *lycopersici*, *tracheiphilum*, *cubense*, *passiflorae*) (Figura 33).

Foi observado na árvore filogenética construída que formou-se um clado da formae speciales *lycopersici* altamente suportado com probabilidade posterior de (0,97) com os isolados MGSS 81, MGSS 182 e MGSS 183. O isolado MGSS 41 agrupou-se em um clado que continha dezoito sequências da espécie de *F. nirenbergiae*, e o isolado MGSS 233 agrupou-se em um clado com sete sequências da espécie de *F. languescens* com probabilidade posterior de 0,98. Quatorze isolados obtidos de diferentes hospedeiros (MGSS 42, MGSS 225, MGSS 188, MGSS 325, MGSS 40, MGSS 55, MGSS 103, MGSS 226, MGSS 326, MGSS 329, MGSS 332, MGSS 344, MGSS 345) tinham um ancestral em comum com a espécie *F. triseptatum*.

Três isolados MGSS 324, MGSS 237 e MGSS 337 estavam dentro do complexo de FFSC. O isolado MGSS 324 estava agrupado em um clado com suporte de 0,99 de probabilidade posterior e é filogeneticamente próximo da espécie *F. ananatum* e em outro clado altamente suportado com 1 de probabilidade posterior, o isolado MGSS 237 agrupou-se com sequência do isolado CBS 449.97 (Local: Gana) pertencente a espécie *F. pseudocircinatum* e em outro ramo do mesmo clado agrupou-se o isolado MGSS 337 ao isolado MGSS 237 e o isolado CBS 449.97 ambos pertencentes a espécie *F. pseudocircinatum*.

Vinte e sete isolados não se agruparam dentro de complexos de espécies de *Fusarium* e formaram um grupo independente que estão filogeneticamente na base dos complexos FOSC, FFSC e FNSC, sendo vinte e quatro desses isolados foram obtidos de *Passiflora edulis*.



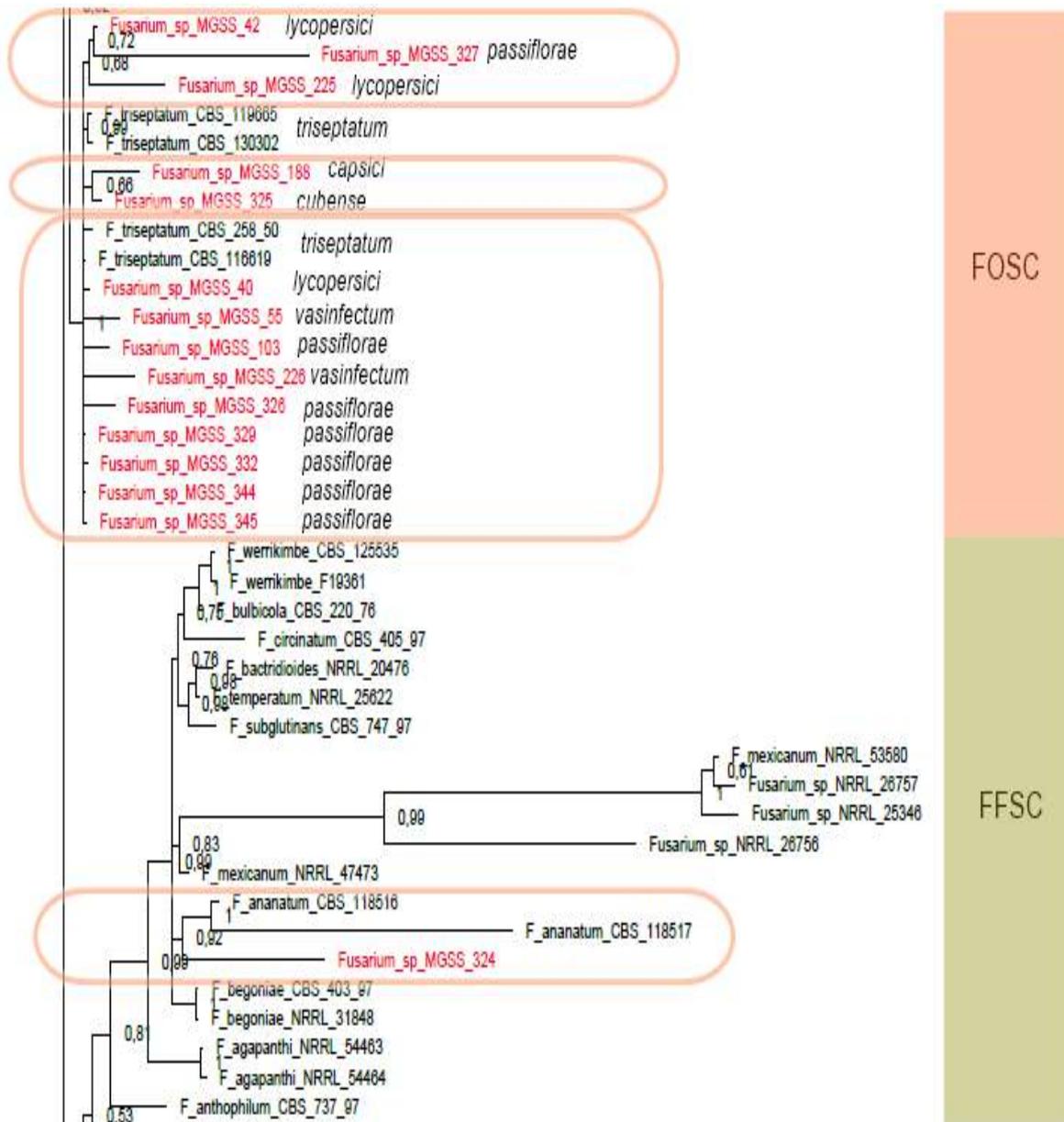
**Figura 33.** Árvore filogenética de Inferência Bayesiana construída a partir do alinhamento de sequências *cmdA*, *rpb2*, *tef1 $\alpha$*  e  $\beta$ -tubulina combinados para isolados do gênero *Fusarium*. *Macroconia phlogioides* CBS 125496 foi utilizado como outgroup.



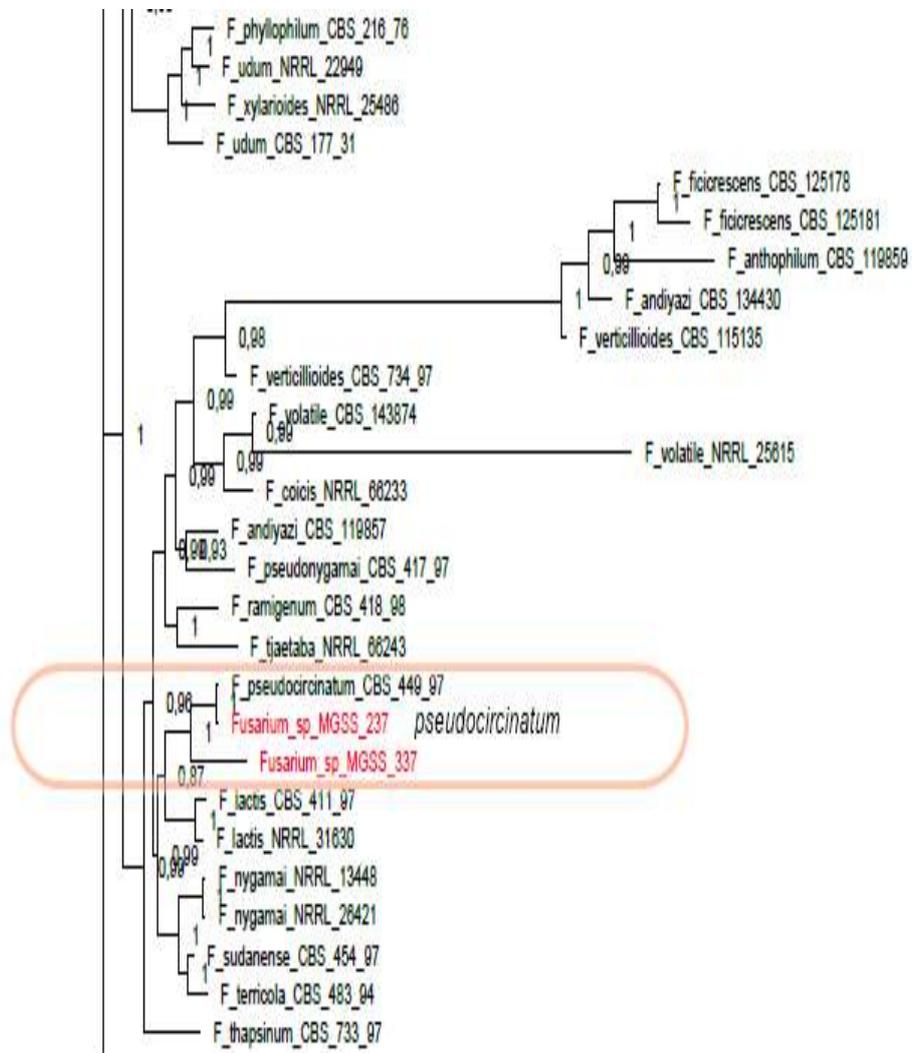
**Figura 33 continuação.** Árvore filogenética de Inferência Bayesiana construída a partir do alinhamento de sequências *cmdA*, *rpb2*, *tef1 $\alpha$*  e  $\beta$ -tubulina combinados para isolados do gênero *Fusarium*. *Macroconia phlogioides* CBS 125496 foi utilizado como outgroup.



**Figura 33 continuação.** Árvore filogenética de Inferência Bayesiana construída a partir do alinhamento de sequências *cmdA*, *rpb2*, *tef1 $\alpha$*  e  $\beta$ -tubulina combinados para isolados do gênero *Fusarium*. *Macroconia phlogioides* CBS 125496 foi utilizado como outgroup.

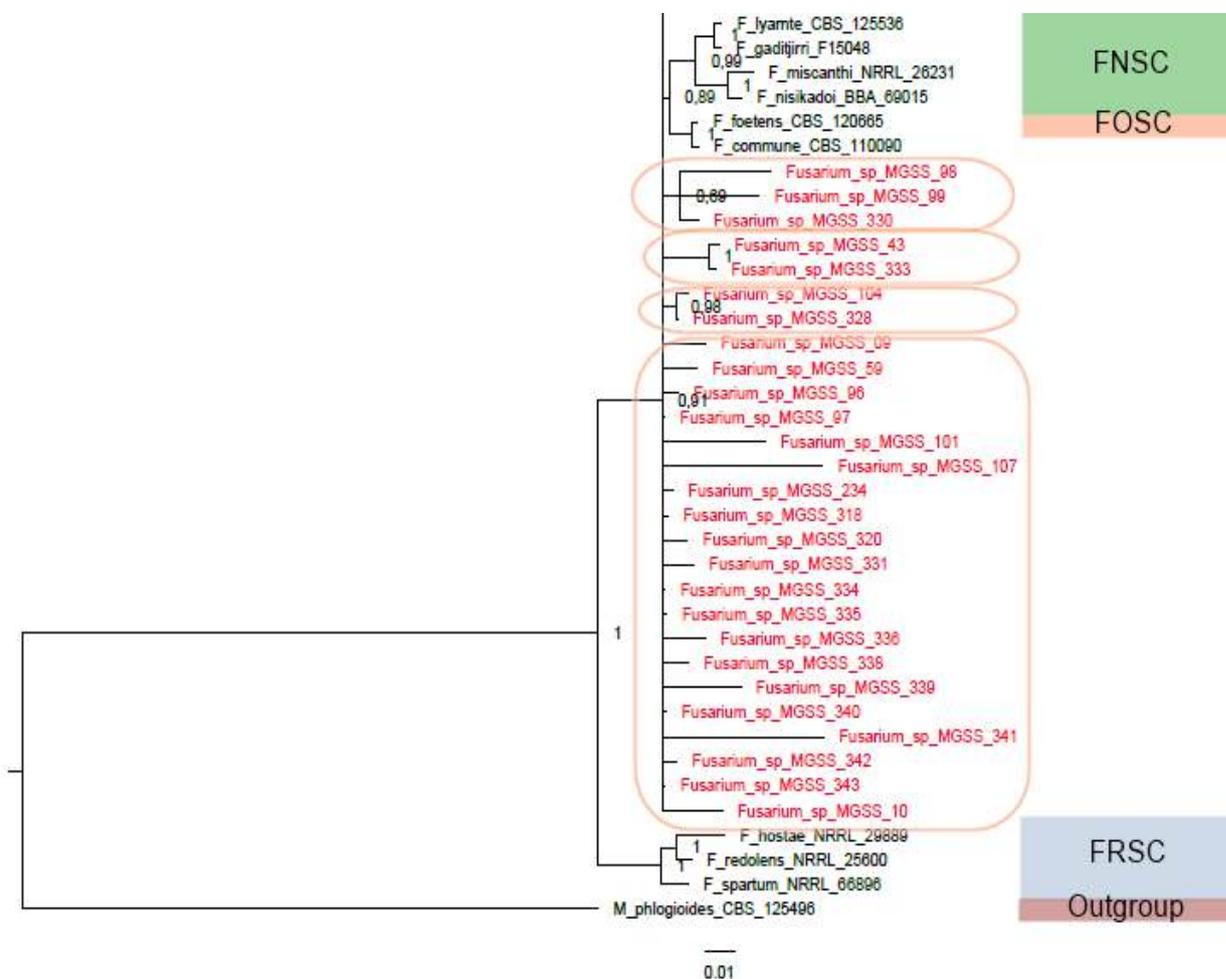


**Figura 33 continuação.** Árvore filogenética de Inferência Bayesiana construída a partir do alinhamento de sequências *cmdA*, *rpb2*, *tef1 $\alpha$*  e  $\beta$ -tubulina combinados para isolados do gênero *Fusarium*. *Macroconia phlogioides* CBS 125496 foi utilizado como outgroup.



FFSC

**Figura 33 continuação.** Árvore filogenética de Inferência Bayesiana construída a partir do alinhamento de sequências *cmdA*, *rpb2*, *tef1 $\alpha$*  e  $\beta$ -tubulina combinados para isolados do gênero *Fusarium*. *Macroconia phlogioides* CBS 125496 foi utilizado como outgroup.



**Figura 33 continuação.** Árvore filogenética de Inferência Bayesiana construída a partir do alinhamento de sequências *cmdA*, *rpb2*, *tef1 $\alpha$*  e  $\beta$ -tubulina combinados para isolados do gênero *Fusarium*. *Macroconia phlogioides* CBS 125496 foi utilizado como outgroup.

Análises de sequências de ácidos nucleicos tem mostrado que muitas *formae speciales* *apii*, *cubense*, *lycopersici* são polifiléticos, ou seja, possuem dois ou mais ancestrais em comum (EPSTEIN *et al.*, 2017, MARYANI *et al.*, 2019) enquanto *Fusarium oxysporum* f. sp. *loti* é uma *formae speciales* monofilética, que apresenta um único ancestral em comum a todos os indivíduos

Os isolados das *formae speciales* *vasinfectum* e *cubense* estavam em diferentes clados e agruparam-se com sequencias de outras *formae speciales*, revelando uma natureza polifilética, ou seja, diferentes *formae speciales* descendem de dois ou mais

ancestrais independentes. A maioria das *formae speciales* estudadas filogeneticamente revelam múltiplas origens evolucionárias como foi constatado por Epstein *et al.*, (2017), Hill *et al.*, (2011) e Fourie *et al.*, (2009).

Os isolados obtidos de *S. lycopersicum* MGSS 81, MGSS 182 e MGSS 183 formaram um clado exclusivo de *formae speciales lycopersici*, este clado pode indicar uma nova espécie, MGSS 233 agrupou-se a espécie *F. languescens* e o isolado MGSS 41 pertence a espécie *F. nirenbergiae*. Estes resultados indicam que diferentes espécies são responsáveis por murcha de *Fusarium* em *S. lycopersicum*, fato também constatado por Lombard *et al.*, (2019).

O isolado MGSS 305 que foi obtido de *Coriandrum sativum* constitui a primeira caracterização molecular pertencente ao *F. oxysporum* species complex (FOSC) no Brasil e agrupou-se ao isolado MGSS 277 da *formae speciales vasinfectum*. A *formae speciales coriandrii* tem sido associada a patogenicidade em *C. sativum*, porém Edel-Hermann (2019) afirma que essa *formae speciales* está insuficientemente documentada.

*F. oxysporum* está entre os dois mais importantes fungos fitopatogênicos com base em uma pesquisa dentro da Comunidade Internacional de Fitopatologistas (DEAN *et al.* 2012) e segundo Summerell, (2019) é altamente recomendado ao gênero *Fusarium* que o status de *formae speciales* seja restrito a cepas dentro de *F. oxysporum* (ou FOSC), cuja identidade é confirmada por diagnósticos de DNA (TEF1 $\alpha$  e RPB1 / RPB2), e que foram testados de patogenicidade para confirmar Postulados de Koch.

Neste trabalho observou-se que isolados que causam murchas vasculares em *Musa* sp. pertencem a diferentes complexos de espécies de *Fusarium*. O isolado obtido de *Musa* sp. MGSS 324 pertence ao FFSC e isolado MGSS 325 pertence ao FOSC concluindo que outras espécies estão associadas a murcha de *Fusarium* em bananeira.

Resultados semelhantes foram encontrados por Maryani *et al.*, (2019) que encontraram isolados de três complexos de espécies associadas a Murcha de *Fusarium* em bananeiras, a maioria das espécies pertenciam ao complexo de espécies *F. oxysporum*, porém foram encontradas espécies do complexo *F. fujikuroi* (FFSC) dentre elas *F. sacchari*, *F. mangiferae*, *F. proliferatum* e *F. verticilliioides*, além de espécies do complexo *F. incarantum-equiseti* (FIESC).

Foi observado na árvore filogenética que vinte e sete isolados de *Fusarium* desse estudo não se agruparam em nenhum dos atuais complexos reconhecidos formando um grupo independente que tinha uma relação filogenética com FNSC, resultados semelhantes foram observados por Laurence *et al.*, (2015), onde identificaram uma nova

espécie *F. newnesense* que não estava agrupada a nenhum complexo de espécie conhecido e era uma linhagem basal para os complexos FOOSC, FFSC e próximo a *F. commune*.

Análises filogenéticas utilizando o gene Fator de alongação 1alfa (TEF) é frequentemente aplicada porque é altamente informativo ao nível da espécie em *Fusarium*; cópias não ortólogas do gene não foram detectadas no gênero; e primers universais foram projetados que funcionam em toda a largura filogenética do gênero (GEISER *et al.*, 2004). Maryani *et al.*, (2019) avaliaram as análises individuais de regiões dos genes *rpb2*, *tef1* e *rpb1* e relataram que as regiões *tef1* e *rpb1* foram os mais informativos filogeneticamente entre complexos e dentro dos complexos de espécies de *Fusarium* e segundo O'Donnell *et al.*, (2015) os genes *rpb2*, *tef1* e *rpb1* são ideais na utilização de filogenia desse gênero.

Novas descobertas taxonômicas realizadas através da utilização de múltiplos genes na caracterização molecular revelaram que espécies ainda não descritas como agentes causais da Murcha de *Fusarium* são responsáveis pelas doenças a diversos hospedeiros.

À medida que um número cada vez maior de cepas e espécies são examinadas com poderosas ferramentas moleculares, as linhas aparentemente distintas usadas para separar alguns grupos de cepas em espécies provavelmente se tornarão mais claras, talvez muito mais claras, do que atualmente (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

## 5- CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foram patogênicos os isolados MGSS 40, MGSS 41, MGSS 183, MGSS 225, MGSS 233 (*lycopersici*); MGSS 10, MGSS 55, MGSS 221, MGSS 224, MGSS 226, MGSS 277 e MGSS 323 (*vasinfectum*); MGSS 325 (*cubense*); MGSS 324 (FFSC); MGSS 60 (*tracheiphilum*); MGSS 329 (*passiflorae*); MGSS 305, MGSS 415 e MGSS 416 (*coriandrii*).
- Quanto as cultivares são suscetíveis Valença (*A. esculentus*) à *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*; as variedades Maçã Casca Verde (AAB), Maçã Turiaçu Amarela (AAB); Prata Anã (AAB) e Cacau Figo Cinza (ABB) (*Musa* sp.) a *F. oxysporum* f. sp. *cubense* e *Fusarium* sp.; Variedades BRS Guariba, BRS Tumucumaque, Manteiguinha e BR17 Gurguéia (*Vigna unguiculata*) a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*; as cultivares Verdão Super e Verdão (*C. sativum*) a *F. oxysporum* f. sp. *coriandrii*;

- Com relação aos métodos de conservação em relação a preservação da patogenicidade o método de conservação em solo esterilizado foi eficiente para isolados das formaes especiales *lycopersici*, *vasinfectum* e *tracheiphilum*, o método de repicagem contínua foi eficiente para isolados das formaes especiales *vasinfectum*, *cubense* e *coriandrii* e o método de Castellani apresentou eficiência em único isolado da formaes especiales *passiflorae*;
- As colônias de *Fusarium* apresentaram diversidade nas características macromorfológicas de coloração e também nas características micromorfológicas que dividiu os isolados em dois grupos quanto ao tipo de fiálides: monofiálides curtas e polifiálides;
- A análise molecular revelou 28 isolados dentro do complexo de espécies *F. oxysporum* (FOSC);
- Três isolados pertencentes ao complexo de espécies *F. fujikuroi* (FFSC) foram obtidos de *P. edulis* e *Musa* sp.
- Vinte e sete isolados não pertencem a nenhum dos complexos de espécies de *Fusarium* reconhecidos filogeneticamente;

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, M. F. *et al.* Search for sources of resistance to Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*) in okra germplasm. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 13, p.33-40, 2013.
- AL-HATMI, A. M.S. *et al.* Global molecular epidemiology and genetic diversity of Fusarium, a significant emerging group of human opportunists from 1958 to 2015, **Emerging Microbes & Infections**, v.5, n.1, p. 1-11, 2016.
- AL-HATMI, A.M.S. *et al.* Fusarium volatile, a new potential pathogen from a human respiratory sample. **Fungal Systematics and Evolution**, v. 4, p. 171–181, 2019.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, p.722, 2016.
- AOKI, T.; KASSON, M.T.; BERGER, M.C.; FREEMAN S.; GEISER, D.M.; K. O'DONNELL. *Fusarium oligoseptatum* sp. nov., a mycosymbiont of the ambrosia beetle *Euwallacea validus* in the Eastern U.S. and typification of *F. ambrosium*. **Fungal Systematics and Evolution**, v. 1, Junho, p.23–39, 2018.
- APARECIDO, C.C.; EGYDIO, A. P. M.; FIGUEIREDO, M. B. Avaliação de três diferentes métodos utilizados na Micoteca do Instituto Biológico de São Paulo para preservação de fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, v.27, p.421-424, 2001.
- APARECIDO, C.C. *et al.* Avaliação de diferentes Métodos para Preservação de Fungos Fitopatogênicos. **Biológico**, São Paulo, v.80, n.1, p.1-7, 2018.
- ARMSTRONG, G.; ARMSTRONG, J. *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases in Fusarium: diseases, biology, and taxonomy (eds Nelson, P. E. *et al.*) p. 391–399, 1981.
- ARRUDA, M. C. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; MILLER, R. N. G.; RESENDE, M. L. V.; FELIPE, M. S. S. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis pernicioso* from different geographic origins and hosts. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, p. 25-37, 2003.
- ASHWATHI, S.; USHAMALINI, C.; PARTHASARATHY S.; NAKKEERAN, S. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with Vascular Wilt of Coriander in India. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.6, n.5, p. 1055-1059, 2017.
- ATHAYDE SOBRINHO, C.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. Doenças fúngicas e bacterianas. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). **Feijão-**

**Caupi: avanços tecnológicos.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 463- 486, 2005.

AYALA-ZERMEÑO, M. A.; GALLOU, A. *et al.* Viability, purity, and genetic stability of entomopathogenic fungi species using different preservation methods. **Fungal Biology**, v.121, p. 920-928, 2017.

BAZÁN, D., SALAS, N., AGUIRRE, R., BRAVO, M., BECERRA, E., LENGUA, R., *et al.* Análisis comparativo del cultivo de cepas de *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus eringii*. **Revista Peruana de Ingeniería Química**, v.7, n.1, p. 24- 29, 2004.

BEGEROW, D.; NILSSON H.; UNTERSEHER M.; MAIER, W. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 87, pp. 99–108, 2010. DOI 10.1007/s00253-010-2585-4.

BELLEMAIN, E.; CARLSEN, T.; BROCHMANN, C.; COISSAC, E.; TABERLET, P.; KAUSERUD, H. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. **BMC Microbiol.** n.10, p.189, 2010

BELOTI, I. F.; JULIATTI, B.C.M; JULIATTI, F.C. Evaluation of the Gelatin Technique for the Preservation of Phytopathogenic Fungi. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 33, n. 4, p. 923-932, 2017.

BERTOLDO, C.; GILARDI, G.; SPADARO, D. *et al.* Genetic diversity and virulence of Italian strains of *Fusarium oxysporum* isolated from *Eustoma grandiflorum*. **Eur. J. Plant Pathol.**, n.141, p.83–97, 2015.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. **In:** MICHEREFF; S. J.; BARROS, R. Proteção de plantas na agricultura sustentável. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, p. 1-15, 2005.

BOOTH, C. **The Genus *Fusarium***. Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 257p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidades e Florestas. **A Convenção sobre a Diversidade Biológica.** Brasília, DF, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Raça 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*: subsídios para caracterização de praga quarentenária ausente / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : MAPA/SDA, 2018. 37 p.

BRIDGE, P. D; SPOONER, B. M.; ROBERTS, P. J. The Impact of Molecular Data in Fungal Systematics. *Advances in Botanical Research, Incorporating Advances in Plant Pathology*, v. 42, p.33-67, 2005.

BUENO, C.J. Métodos de Preservação para fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 3, n, 2, p. 1-8, 2006.

BUGNI, T.S.; IRELAND, C.M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Nat. Prod. Rep.**, v.21, p.143–163, 2004.

CARBONE, I.; KOHN, L.M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, v.91, n.3, pp. 553-556, 1999.

CHITARRA, L.G. Identificação e controle das principais doenças do algodoeiro, Cartilha 2, **Embrapa Algodão**, Campina Grande – PB, 3. ed., 82 p., 2014.

CHOI, H-W.; HONG, S.K.; LEE, Y.K.; SHIM, H.S. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 causing fusarium wilt on tomato in Korea. **Plant Disease**, n. 97, p. 137, 2013.

CHOI, H-W.; HONG, S.K.; LEE, Y.K.; KIM, W. G.; CHUN, S. Taxonomy of *Fusarium fujikuroi* species complex associated with bakanae on rice in Korea, **Australasian Plant Pathology**, n.47, p.23–34, 2018.

CIA, E.; GRID-PAPP, L.L.; SOAVE, J.; FERRAZ, C. A. M. Resistência de Novos Cultivares de Algodoeiro a *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e a *Xanthomonas malvacearum*. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 3, p. 260-270, 1977.

CORDEIRO, Z.J.M. (Ed.) Cultivo da Banana para o Pólo Petrolina Juazeiro. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. Disponível em: .10 fev.2020

COSTA, E.C. *et al.* PRINCÍPIOS DA ESTOCAGEM E PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS MICROBIOLÓGICAS. **Ciência Animal**, v.19, n.2, p.111-122, 2009.

CRISTE, A. *et al.* Research Concerning Use of Long-Term Preservation Techniques for Microorganisms. Scientific Papers: **Animal Science and Biotechnologies**, v.47, n.2, 2014.

CUI, H.; REN, X.; YUN, L.; HOU, Q. FENG, F.; LIU, H. Simple and inexpensive long-term preservation methods for *Phytophthora infestans*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 152, p. 80–85, 2018.

DAVIS, R.M. *et al.* Fusarium Wilt cotton: Population Diversity and Implications for Management, **Plant Disease**, v. 90, n.6, p. 692-703, 2006.

DEAN, R. *et al.* The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, n.13, p.414–430, 2012.

DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C.W. InfoStat versión 2018. Centro de Transferencia InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2018.

EMBRAPA. Plataforma Nacional de Recursos Genéticos. (Brasília, DF). Coleções de microrganismos fitopatogênicos 2007. Disponível em: <http://plataformarg.cenargen.embrapa.br/pnrg/rede-microbiana/projetos-componentes/projeto-componente-4> Acesso em: 28.02.2020.

EDEL-HERMANN, V.; LECOMTE, C. Current Status of *Fusarium oxysporum* Formae Speciales and Races. Review, **Phytopathology**, v. 109, n.4, p. 512-530, 2019.

EPSTEIN, L.; KAUR, S.; CHANG, P. L.; CARRAQUILLA-GARCIA, N. *et al.* Races of the Celery Pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* are polyphyletic. **Phytopathology**, n.107, p. 463-473, 2017.

ESCOBAR, L. P. B.; CASTRO-RÍOS, K. Methods for the culture conservation of edible and medicinal fungi. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v.10 n.4, p. 620-625, 2021.

FAWOLE, E.A. Evaluation of cowpea lines for resistance to wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*. **Fitopatol. bras.** v14 p.232- 234, 1989.

FERNANDEZ ANDREU, C. M. *et al.* Conservación de cultivos de hongos de importancia médica en agua destilada. **Rev. Cubana Med. Trop.**, v. 65, n. 3, p. 361-369, 2013.

FERREIRA, R.B.; RODRIGUES, A.A.C.; MORAES, F.H.R.; SILVA, E.K.C. nascimento, I.O. Resíduos orgânicos no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* em maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Acta biol. Colomb.** v.20, n3, p. 111-120, 2015.

FINATTI, D.; APARECIDO, C.C. Caracterização fisiológica e comparação de diferentes métodos na Preservação em Laboratório de isolados do gênero *Verticillium*. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.76, n.4, p.715-720, out./dez., 2009.

FOURIE, G. *et al.* Evolutionary relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* vegetative compatibility groups. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 14, p. 4770-4781, 2009. doi:10.1128/AEM.00370-09.

FOURIE, G.; STEENKAMP, E.T. *et al.* Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis *cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, p. 533–542, 2011.

GARCÍA-BASTIDAS, F. A. *et al.* First report of Fusarium wilt Tropical Race 4 in Cavendish bananas caused by *Fusarium odoratissimum* in Colombia. **Plant Disease** (in press), <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-1922-PDN> (2019).

GASPAROTTO, L.; DITA, M.; ALEXANDRE, R. J. *et al.* *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raça 4 tropical: Perigo para a bananicultura nacional. **Comunicado Técnico**, Embrapa, Manuas – AM, n. 149, p.1-20, 2020.

GEISER, D.M.; JIMENEZ-GASCO, M.D.; KANG, S.C.; MAKALOWSKA, I.; VEERARAGHAVAN, N.; WARD, T.J.; ZHANG, N.; KULDAU, G.A.; O'DONNELL, K. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, Ámsterdam, v. 110, p.473-479, 2004.

GERLACH, W., NIRENBERG, H. The genus *Fusarium* – a pictorial atlas. **Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtsch.** Berlin-Dahlem, v.209, p. 1–406, 1982.

GILARDI, G. *et al.* First Report of Fusarium Wilt of Coriander (*Coriandrum sativum*) Caused by *Fusarium oxysporum* in Italy. *AperTO - Archivio Istituzionale Open Access dell'Università di Torino, Università Degli Studi di Torino*, p. 1-3, 2017.

GONÇALVES, R.C.; ALFENAS, A.C.; MÁFIA, R.G. Armazenamento de Microrganismos em Cultura com Ênfase em fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C.; MÁFIA, R.G.(Eds). **Métodos em Fitopatologia** 2º Edição, UFV, Viçosa-MG, 2016.

GRÄFENHAN, T.; SCHROERS, H.-J.; NIRENBERG, H. I.; SEIFERT, K. A. An overview of the taxonomy, phylogeny, and typification of nectriaceous fungi in *Cosmospora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella*, and *Volutella*. **Studies Mycology**, v. 68, p.79–113, 2011.

GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. *Fusarium* wilts of some ornamental hosts. In M. L. GULLINO, J. KATAN, & A. GARIBALDI (Eds.), **Fusarium wilts of greenhouse vegetable and ornamental crops**. St. Paul: American Phytopathological Society, pp. 221–225, 2012.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v.270, p.313–321, 2003a.

HEBERT, P.D.N.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J.R. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v.270 (suppl.1), p.S96–S99, 2003b.

HEMMING, M.N.; BASUKI, S.; McGRATH, D.J.; CARROLL, B.J.; JONES, D.A. Fine mapping of the tomato I3 gene for *Fusarium* wilt resistance and elimination of co-segregating resistance gene analogue as a candidate for I-3. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, p.409–418, 2004.

HERRON, D.A.; WINGFIELD, M.J.; WINGFIELD, B.D. *et al.* Novel taxa in the *Fusarium fujikuroi* species complex from *Pinus* spp. **Studies in Mycology**, p. 80, p. 131–150, 2015.

HIBBETT, D. S; TAYLOR, J.W. Fungal systematics: is a new age of enlightenment at hand?. **Nature Reviews Microbiology**, v.11, p.129–133, 2013.

HIBBETT, D.S.; OHMAN, A.; GLOTZER, D.; NUHN, M.; KIRK, P.M.; NILSSON, R.H. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. **Fungal Biol. Rev.**, v.25, n.1, p. 38–47, 2011.

HIBBETT, D. S. *et al.* A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, p. 509–547, 2007.

HILL, A. L.; REEVESB, P. A.; LARSON, R. L.; FENWICK, A. L.; HANSON, L. E.; PANELLA, L. Genetic variability among isolates of *Fusarium oxysporum*

from sugar beet. **Plant Pathology**, n.60, p.496–505, 2011.

HAWKSWORTH, D.L.; LÜCKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiol Spectrum**, n.5, v.4, p.1-17, 2017.

HOMOLKA, L. Methods of Cryopreservation in Fungi. In: V.K. Gupta *et al.* (eds.), **Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology**, Fungal Biology, p. 9-16, 2013.

HU, X.; WEBSTER, G.; XIE, L.; YU, C.; LI, Y.; LIAO, X. A new method for the preservation of axenic fungal cultures. **Journal of Microbiological Methods**, v.99, n.1, p. 81-83, 2014.

HUSSIEN, R.H.M.; EZZAT, S.M. *et al.* Comparative study of fungal stability between *Metarhizium* strains after successive subculture. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v.31, n.2, p. 1-6, 2021.

HYDE, K.D.; DONG, Y. *et al.* – Fungal diversity notes 1151–1276: taxonomic and phylogenetic contributions on genera and species of fungal taxa. **Fungal Diversity**, v. 100, p.5–277, 2020.

IMAZAKI I.; KADOTA, I. Molecular phylogeny and diversity of *Fusarium* endophytes isolated from tomato stems. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 9, p.1-16, 2015.

INOUE-NAGATA, A.K. *et al.* Doenças do Tomateiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (org.) **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 5ed. Ouro Fino, MG, Agronômica Ceres, v. 2, p- 697-731, 2016.

IQBAL, S. *et al.* Isolation, preservation and revival of *Trichoderma viride* in culture media. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v.5, n.3, p. 1640-1646, 2017.

JACOBS A; GOVENDER R; VAN HEERDEN SW. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 causing tomato wilt in South Africa. **Australasian Plant Disease Notes**, v.8, p.145–147,2013.

JOSHI, R. A review of *Fusarium oxysporum* on its plant interaction and industrial use. **Journal of Medicinal Plant Studies**, v.6, n.3, p. 112-115, 2018.

JUNIOR, O.F.R. *et al.* Fumonisin Production by *Fusarium verticillioides* in Maize Genotypes Cultivated in Different Environments. **Toxins**, v.11, n. 215, 2019.

JUNIOR, W. J. DA S. *et al.* MANEJO DO MAL-DO-PANAMÁ DA BANANEIRA UTILIZANDO *Trichoderma* sp. E ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia sidoides*. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, v.15, n.2, p.73-90, 2018.

KISS, L. Limits of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences as species barcodes for Fungi. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.109, p.E1811–E1811, 2012.

- KOIKE, S.T.; GORDON, T.R. First Report of Fusarium Wilt of Cilantro Caused by *Fusarium oxysporum* in California. **Plant Disease**, Disease Notes, v. 89, n.10, 2005.
- LAURENCE, M.H. et al. Six novel species of *Fusarium* from natural ecosystems in Australia. **Fungal Diversity**, v.25, p. 1-19, 2015.
- LEE, HEE-SEOK; SONG, HYUK-HWAN; JEONG, JIN-HO; SHINB, CHA-GYUN *et al.* Cytotoxicities of enniatins H, I, and MK1688 from *Fusarium oxysporum* KFCC 11363P, **Toxicon**, v. 51, p.1178–1185, 2008.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium laboratory manual**. Ames: Blackwell, 2006, 388 p.
- LIBERAL, M. H. T.; SOUZA, R. de M.; MAGALHÃES, H. Aplicação da legislação brasileira de acesso e repartição de benefícios para o diagnóstico e a pesquisa epidemiológica de recursos genéticos microbianos de origem animal. In: FERREIRA, S. N.; SAMPAIO, M. J. A. M. (Org.). **Biodiversidade e conhecimentos tradicionais associados: implementação da legislação de acesso e repartição de benefícios no Brasil**. SBPC, São Paulo, 153-168, 2013.
- LIEVENS, B.; HANSSSEN, I. M.; REP, M. Recent developments in the detection and identification of *formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum*: from pathogenicity testing to molecular diagnostics. In M. L. Gullino, J. Katan, & A. Garibaldi (Eds.), **Fusarium wilts of greenhouse vegetable and ornamental crops** St. Paul: American Phytopathological Society, pp. 47–55, 2012.
- LIU, Y.L.; HALL, B.D. Body plan evolution of ascomycetes, as inferred from an RNA polymerase II phylogeny. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 101, n.13, p.:4507–4512. 2004.
- LIU, Y.L.; WHELEN S.; HALL, B.D. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. **Molecular Biology and Evolution**, v.16, p.1799-1808, 1999.
- LOMBARD L.; SANDOVAL-DENIS, M.; LAMPRECHT, S.C.; CROUS, P.W. Epitypification of *Fusarium oxysporum* – clearing the taxonomic chaos. **Persoonia**, v. 43, p.1–47, 2019.
- KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 10th ed. **CAB International**, Wallingford, United Kingdom. 2008.
- MA, L. J. *et al.* Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. **Nature**, v. 464, 2010.
- MAROSTEGA, T. N., LARA, L. P., OLIVEIRA, D. S., CHIMELLO, A. M., GILIO, T. A. S., PRESIGKE, S. C., ARAUJO, K. L., SERAFIM, M. E.; NEVES, L. G. Molecular and Aggressiveness Characterization of Isolates of *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae* Associated to Passion Fruit Wilting. **Journal of Agricultural Science**, v.11, p.407-420, 2019.

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

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

MELO, N. J. DE A.; NEGREIROS, A. M. P.; MEDEIROS, H. L. DE S.; JÚNIOR, R. S. Evaluation of *Fusarium* wilt disease in passion fruit species inoculated with *Fusarium oxysporum* f.sp.  *passiflorae*, **Journal of Phytopathology**, p.1–7, 2019.

MICHIELSE, C. B.; REP, M. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. **Mol. Plant Pathol.**, v.10, pp.311–324 2009.

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

MORETTI AN, Taxonomy of *Fusarium* genus, a continuous fight between lumpers and splitters. **Matica Srpska Journal for Natural Sciences**, v.117, pp.7-13, 2009.

MOUSSA, T. A. A.; AL-ZAHRANI, H. S.; KADASA, N. M. S.; AHMED, S. A.; G.; HOOG, SYBREN DE.; AL-HATMI, A. M. S. Two new species of the *Fusarium fujikuroi* species complex isolated from the natural environment. **Antonie Van Leeuwenhoek**, n.110, p.819–832, 2017.

MURUGAN, L.; KRISHNAN, N.; VENKATARAVANAPPA, V.; SAHA, S.; MISHRA, A.K.; SHARMA, B.K.; RAI, A.B. Molecular characterization and race identification of *Fusarium oxysporum* f. sp.  *lycopersici* infecting tomato in India. **Biotech.**, v. 10, n.486, p.1-12, 2020.

NAKASONE, K.K.; PETERSON A.W.; JONG, S. Preservation and distribution of fungal cultures. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS. **Biodiversity of fungi, inventory and monitoring methods**. 1st ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2004.

NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; COOK, R. J., eds. ***Fusarium*: Diseases, Biology and Taxonomy**. Pennsylvania State University, University Park, 1981.

NELSON, P.E., TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F.O. ***Fusarium Species: An illustrated manual for identification***. Pennsylvania State University Press. London. 1983.

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

NIRMALADEVI, D. *et al.* Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Sci. Rep.** v. 6, p.-14, 2016.

NORONHA, M. A.; LOPES, C. L. R.B. P.; OLIVEIRA, B. M. M.; VENTURA, H. P.; TÔRRES, R. J. A.; MICHEREFF, S. J.; SILVA, K. J. D. Resistência de genótipos de feijão-caupi a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* In: CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, III., 2013, Recife. Anais... Pernambuco, p. 3, 2013.

NUCCI M, VARON A, GARNICA M, AKITI T, BARREIROS G, TROPE B, NOUÉR S, Increased incidence of invasive fusariosis with cutaneous portal of entry, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, p. 567-1572, 2013.

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

O'DONNELL, K. *et al.* A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, n. 46, p.936–948, 2009.

O'DONNELL, K.; WARD, T.J.; ROBERT V.; CROUS PW.; GEISER DM.; KANG S. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: current status and future directions. **Phytoparasitica**, v. 43, p. 583–595, 2015.

O'DONNELL, K.; SUTTON, D.A.; RINALDI, M.G.; SARVER, B.A.J.; BALAJEE, S.A. *et al.* Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, p. 3708–3718, 2010.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIREMBERG, H. I. Molecular Systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York, v. 90, p. 465-493, 1998.

O'DONNELL, K., CIGELNIK, E. Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* Are Nonorthologous, **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.7, p.103-116, 1997.

OLIVEIRA, L.J.M.G. **Organização, conservação e informatização da micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva” da Universidade Estadual do Maranhão.** Dissertação (Mestrado em Agroecologia) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luis, p.178., 2016.

OMOIGUI, L.O.; DANMAIGONA C.C.; KAMARA A.Y.; EKEFAN E.J.; TIMKO M.P. Genetic analysis of *Fusarium* wilt resistance in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Plant Breed**, v.137, p.773–781. 2018.

PALÁCIO, M.N.M.; LÓPEZ, G.E.; ASTUDILLO, Á.R.M.; MASACHE, B.R.S.; CASTILLO, Á.M.J.; MILIÁN-GARCÍA, Y. Caracterización morfológica y

evaluación de resistencia a *Fusarium oxysporum* en especies silvestres del género *Solanum* sección *Lycopersicon*. **Rev. Colombiana de Biotecnología**, v.16, n.1. p.62-73, 2014.

PEREIRA, C. R.; PEREIRA, J. R.; CASTRO, M. E. A.; GASPAROTTO, L. Ocorrência do Mal-do-Panamá em Bananeira do Subgrupo Figo, em Piau, Minas Gerais. **Fitopatol. bras.**, n. 30, v.5, 2005.

PFENNING, L. H.; MELO, M. P. *et al.* *Fusarium udum* revisited: a common, but poorly understood member of the *Fusarium fujikuroi* species complex. **Mycological Progress**, p.18, p.107–117, 2019.

PINHO, D.B.; MACHADO, A.R.; FIRMINO, A.L. Princípios e Métodos para Identificação Molecular de fungos. In: ALFENAS, A.C.; MÁFIA, R.G.(Orgs.) **Métodos em Fitopatologia**, 2 ed., Viçosa, Ed. UFV, 2016.

PIRES, G.C.C.; APARECIDO, C.C.; FINATTI, D. Preservação em laboratório de fungos filamentosos por longos períodos de tempo. *Divulgação Técnica. Biológico*, São Paulo, v.74, n.1, p.9-16, 2012.

PLOETZ, R. C. Malformation: A unique and important disease of mango, *Mangifera indica* L. in: *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*. B. A. Summerell, J. F. LESLIE, D. BACKHOUSE, W. L. BRYDEN, L. W. BURGESS, eds. **American Phytopathological Society**, St. Paul, MN, p.233-247, 2001.

PORTER, T.M.; GOLDING, G.B. Are similarity- or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons? **New Phytol.** n.192, pp. 775–782, 2011.

POTTORFF M, WANAMAKER S, MA YQ, EHLERS JD, ROBERTS PA, CLOSE TJ. Genetic and Physical Mapping of Candidate Genes for Resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* Race 3 in Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], **PLoS ONE**, v.7, n.7, p.1-12, 2012, e41600. doi:10.1371/journal.pone.0041600

PREISIGKE, S.C.; SILVA, L.P.; SERAFIM, M.E.; BRUCKNER, C.H.; ARAÚJO, K.L.; NEVES, L.G. Seleção precoce de espécies de *Passiflora* resistente a fusariose. **Summa Phytopathologica**, v.43, n.4, p.321-325, 2017.

QUAEDVLIEG, W.; GROENEWALD, J.Z.; JESÚS YÁÑEZ-MORALES, M.; CROUS, P.W. DNA barcoding of *Mycosphaerella* species of quarantine importance to Europe. **Persoonia**, n. 29, p.101–115, 2012.

RAJA, HUZefa A. MILLER, ANDREW N.; PEARCE, CEDRIC J.; OBERLIES, NICHOLAS H. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. **Journal of Natural Products**, v. 80, p. 756–770, 2017.

RAMDIAL. H.; LATCHOO, R.K.; HOSEIN, F.N.; RAMPERSAD, S.N. Phylogeny and haplotype analysis of fungi within the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex. **Phytopathology**, n. 107, p. 109-120, 2017.

REEB, V.; LUTZONI, F.; ROUX, C. Contribution of RPB2 to multilocus phylogenetic studies of the euascomycetes (Pezizomycotina, Fungi) with special emphasis on the lichen-forming Acarosporaceae and evolution of polyspory. **Mol Phylogenet Evol.**, v. 32, p.1036–1060, 2004.

REHNER, S.A.; BUCKLEY, E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia**, v. 97, p.84–98, 2005.

REIS, A.; BOITEUX, L.S.; GIORDANO, L.B.; COSTA, H.; LOPES, C.A. Ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 em tomate no Brasil e seleção de novas fontes de resistência ao patógeno. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n.2, Brasília -DF, Embrapa Hortaliças, 2004a.

REIS, A.; GIORDANO, L.B.; LOPES, C.A.; BOITEUX, L.S. Novel sources of multiple resistance to three races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in *Lycopersicon* germplasm. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, n. 4, p. 495-502, 2004b.

REIS, A.; LOPES, C.A. Doenças do Coentro no Brasil. **Circular Técnica 157**. Empresa Brasileira de Agropecuária, Embrapa, Brasília, p.1-6, 2016.

RIBEIRO, L.R. *et al.* Sources of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in banana germplasm. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 40, n. 1, 2018.

RODRIGUES, A.A.C.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R.S.B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p.492-499, 2006.

RHODES, L.; SMITH, K F.; MACKENZIE, L.; WOOD, SA.; PONIKLA, K.; HARWOOD, DT.; PACKER, M.; MUNDAY, R. The Cawthron Institute Culture Collection of Micro-algae: a significant national collection, **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v.50, n. 2, p.291-316, 2016.

SAKR, N. Evaluation of Two Storage Methods for Fungal Isolates of *Fusarium* sp. and *Cochliobolus sativus*. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, v.53, n.1, pp. 11–18, 2018.

SANDOVAL-DENIS, M.; GUARNACCIA, V.; POLIZZI, G.; CROUS, P.W. Symptomatic Citrus trees reveal a new pathogenic lineage in *Fusarium* and two new *Neocosmospora* species. **Persoonia**, v. 40, p. 1–25, 2018.

SANTOS, J. R. M. Protocolo de Tecnologia: Seleção para resistência a doenças em hortaliças. **EMBRAPA Hortaliças**, Brasília. Comunicado Técnico, pp. 11. 1999.

SCHEEL, C.; HURST, S.; BARREIROS, G.; AKITI, T.; NUCCI, M.; BALAJEE, S. Molecular analyses *Fusarium* isolates recovered from a cluster of invasive mold infections in a Brazilian hospital. **BMC Infectious Diseases**, p.13-49, 2013.

SCHOCH, C.L.; SEIFERT, K.A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J.L.; LEVESQUE, C.A.; CHEN, W.; FUNGAL BARCODING CONSORTIUM. Nuclear

ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proc Natl Acad Sci U S A** (In press. doi:10.1073/pnas.1117018109), 2012.

SEIFERT, K. A.; SAMSON, R. A.; DEWAARD, J. R.; HOUBRAKEN, J.; STUKENBROCK, E. H. *et al.* *Zymoseptoria ardabiliae* and *Z. pseudotritici*, two progenitor species of the *Septoria tritici* leaf blotch fungus *Z. tritici* (synonym: *Mycosphaerella graminicola*), **Mycologia**, v.104, n.6, p.1397-407, 2012.

LÉVSEQUE, C. A.; MONCALVO, J. M.; LOUIS-SEIZE, G.; HEBERT, P. D. N. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.104, p.3901–3906, 2007.

SEPÚLVEDA-CHAVERA G; HUANCA W; SALVATIERRA RE; LATORRE BA. First report of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomatoes in the Azapa Valley of Chile. **Plant Disease**, n.98, p.143, 2014.

SETTE, L.D. *et al.* Recomendações para Operação e Gerenciamento de Coleções de Culturas de Microrganismos. **Sociedade Brasileira de Microbiologia**, p. 1-14, 2006.

SETTE, L.D. *et al.* Microbial culture collections as pillars for promoting fungal diversity, conservation and exploitation. **Fungal Genetics and Biology**, v.60, p. 2–8, 2013.

SHARMA, S. K., KUMAR, R., VAISHNAV, A., SHARMA, P. K., SINGH, U. B., & SHARMA, A. K. *Microbial Cultures: Maintenance, Preservation and Registration Modern Tools and Techniques to Understand Microbes*. Heidelberg: Springer International Publishing, 2017.

SILVA, A. DOS S, OLIVEIRA, E. J. LARANJEIRA, F.F. JESUS, O. N. Seleção de metodologias para inoculação da fusariose do maracujazeiro causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *Passiflorae*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** / Embrapa Mandioca e Fruticultura, 20 p., 2011.

SILVA, E. H. C. *et al.*, Morphoagronomic characterization and genetic diversity of a Brazilian okra [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench] panel. **Genet Resour Crop Evol.** v.68, p.371–380, 2021.

SINGH, S.; SINGH, P.; GAIKWAD, S.; MAURYA, D. *Conservation of Fungi: A Review on Conventional Approaches: Conventional to Modern Approaches*. 2018.

SINGH, V. K.; SINGH, H. B; UPADHYAY, R. S. Role of fusaric acid in the development of ‘Fusarium wilt’ symptoms in tomato: Physiological, biochemical and proteomic perspectives. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.118, p. 320-332, 2017.

SOLA, C.; OLIVEIRA, A. P. de; FEISTEL, J. C.; REZENDE, C. S. M. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, N.14; p. – 2012.

SPECIESLINK. 2020. Cria - DataCleaning. Disponível em: [dataCleaning \(cria.org.br\)](https://datacleaning.cria.org.br) Acesso em: 06.abr.2021.

- STIELOW, J.B. *et al.* One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. **Persoonia**, v.35, p. 242–263, 2015.
- STOECKLE M. Taxonomy, DNA, and the Bar Code of Life. **Bioscience**, v.53, p.796-797, 2003.
- STUKENBROCK, E. H.; QUAEDVLIEG, W.; JAVAN-NIKHAH, M.; ZALA, M.; CROUS, P. W.; MCDONALD, B. A. *Zymoseptoria ardabiliae* and *Z. pseudotritici*, two progenitor species of the Septoria tritici leaf blotch fungus *Z. tritici* (synonym: *Mycosphaerella graminicola*), **Mycologia**, n.6, p.1-23, 2012.
- SUMMERELL, B. A., LESLIE, J. F., BACKHOUSE, D., BRYDEN, W. L., AND BURGESS, L. W. eds. Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium. **American Phytopathological Society**, St. Paul, MN, 2001.
- SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. A Utilitarian Approach to *Fusarium* Identification. **Plant Disease**, v. 87, n. 2, p.117- 128, 2003.
- SUMMERELL, B.A. Resolving Fusarium: Current Status of the Genus. **Annual Review of Phytopathology**, v. 57, p. 323–339, 2019.
- TEIXEIRA, L. M; COELHO, L.; TEBALDI, N. D. Characterization of Fusarium oxysporum isolates and resistance of passion fruit genotypes to fusariosis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n.3, 2017.
- TORBATI, M. *et al.* Multigene phylogeny reveals new fungicolous species in the Fusarium tricinctum species complex and novel hosts in the genus Fusarium from Iran. **Mycological Progress**, v. 18, p.119–13, 2019.
- URUBURU, F. 2003. History and services of culture collections. **International Microbiology**, v. 6, p. 101-103, 2003.
- VALIELA, M. F. Introducción a la Fitopatología, 2 ed. Buenos Aires, Talleres Gráficos, “Gadda”. 1952.
- VENTURA, J.A. Taxonomia de Fusarium e seus segregados . Parte II – chaves para identificação. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, LUZ, W. C. (Ed.), v. 8, p. 303-338, 2000.
- VLAARDINGERBROEK, I.; BEERENS, B.; ROSE, L. *et al.* Exchange of core chromosomes and horizontal transfer of lineage-specific chromosomes in Fusarium oxysporum, **Environmental Microbiology**, p. 1-12, 2016.
- WANG Z.; NILSSON RH; JAMES TY; DAI Y.; TOWNSEND JP In Biology of Microfungi ; **Springer**, pp. 25-46, 2016.

WANG, M.M.; CHEN, Q.; DIAO, Y.Z.; DUAN, W.J.; CAI, L. *Fusarium incarnatum-equiseti* complex from China. **Persoonia**, v.43, p. 70–89, 2019.

WDCM – World Data Center for Microorganisms. World Directory of Culture Collections, 2021. **Disponível:** [www.wfcc.info/ccinfo/statistics/](http://www.wfcc.info/ccinfo/statistics/). acessado em: 02/03/2021.

WUNSCH, M. J.; BAKER, A.H; KALB, D.W.; BERGSTROM, G. C. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *loti* Forma Specialis nov., a Monophyletic Pathogen Causing Vascular Wilt of Birdsfoot Trefoil, **Plant Disease**, v. 93 m. 1, p. 58-66, 2009.

YILMAZ N, SANDOVAL-DENIS M, LOMBARD L, *et al.* Redefining species limits in the *Fusarium fujikuroi* species complex. **Persoonia**, p.46, p.129–162, 2021.

**APÊNDICE**

APÊNDICE A – SEQUÊNCIAS UTILIZADAS NA ANÁLISE FILOGENÉTICA DE ISOLADOS DE *Fusarium*.

Espécies	Coleção	Hosp./Substrato	Origem	Acesso Genbank			
				cmdA	Rpb2	Tef1	Tub2
<i>F. agapanthi</i>	NRRL 54463 <sup>T</sup>	<i>Agapanthus praecox</i>	Australia	KU900611	KU900625	KU900630	KU900635
	NRRL 54464	<i>A. praecox</i>	Australia	KU900613	KU900627	KU900632	KU900637
<i>F. ananatum</i>	CBS 118516 <sup>T</sup>	<i>Ananas comosus</i> fruit	South Africa	LT996175	LT996137	LT996091	LT996112
	CBS 118517	<i>A. comosus</i> fruit	South Africa	KU603990	KU604273	KU604480	KU603895
<i>F. andiyazi</i>	CBS 119857 <sup>T</sup>	<i>Sorghum bicolor</i> soil debris	South Africa	LT996176	LT996138	LT996092	LT996113
	CBS 134430	Human	Turkey	KU603956	KU604232	KU604450	KU603867
<i>F. anthophilum</i>	CBS 737.97	<i>Hippeastrum</i> sp.	Germany	LT996177	LT996139	LT996093	LT996114
	CBS 119859	<i>Cymbidium</i> sp. leaf spot	New Zealand	KU603988	KU604279	KU604427	KU603931
<i>F. bactridioides</i>	NRRL 20476	<i>Cronartium conigenum</i>	USA	AF158343	-	AF160290	U34434
<i>F. begoniae</i>	CBS 403.97	<i>Begonia elatior</i> hybrid	Germany	AF158346	LT996140	AF160293	U61543
	NRRL 31848	<i>Begonia elatior</i> hybrid	USA	-	-	AY329035	AY329044
<i>F. bulbicola</i>	CBS 220.76 <sup>T</sup>	<i>Nerine bowdenii</i>	Germany	KF466327	KF466404	KF466415	KF466437
<i>Fusarium callistephi</i>	CBS 187.53 <sup>T</sup>	<i>Callistephus chinensis</i>	The Netherlands	MH484693	MH484875	MH484966	MH485057
<i>F. callistephi</i>	CBS 115423	<i>Agathosma betulina</i>	South Africa	MH484723	MH484905	MH484996	MH485087
<i>F. carminascens</i>	CBS 144739	<i>Zea mays</i>	South Africa	MH484752	MH484934	MH485025	MH485116

Cont.							
Espécies	Coleção	Hosp./Substrato	Origem	Acesso Genbank			
				cmdA	Rpb2	Tef1	Tub2
<i>F. carminascens</i>	CBS 144740	<i>Z. mays</i>	South Africa	MH484753	MH484935	MH485026	MH485117
<i>F. carminascens</i>	CBS 144741	<i>Z. mays</i>	South Africa	MH484754	MH484936	MH485027	MH485118
<i>F. carminascens</i>	CBS 144738 T	<i>Z. mays</i>	South Africa	MH484755	MH484937	MH485028	MH485119
<i>F. circinatum</i>	CBS 405.97 <sup>T</sup> NRRL	<i>Pinus radiata</i>	USA	KM231393	HM068354	KM231943	KM232080
<i>F. coicis</i>	66233 <sup>T</sup>	<i>Coix gasteenii</i>	Australia	LT996178	KP083274	KP083251	LT996115
<i>F. commune</i>	CBS_110090	Soil	Denmark		MW934368	AF362263	
<i>F. contaminatum</i>	CBS 111552	Pasteurized fruit juice	The Netherlands	MH484718	MH484900	MH484991	MH485082
<i>F. contaminatum</i>	CBS 114899 <sup>T</sup>	Pasteurized chocolate milk	Germany	MH484719	MH484901	MH484992	MH485083
<i>F. contaminatum</i>	CBS 117461	Tetra pack with milky nutrition	The Netherlands	MH484729	MH484911	MH485002	MH485093
<i>F. cugenangense</i>	CBS 620.72	<i>Crocus</i> sp.	Germany	MH484697	MH484879	MH484970	MH485061
<i>F. cugenangense</i>	CBS 130304	<i>Gossypium barbadense</i>	China	MH484739	MH484921	MH485012	MH485103
<i>F. cugenangense</i>	CBS 130308	Human toe nail	New Zealand	MH484738	MH484920	MH485011	MH485102
<i>F. cugenangense</i>	CBS 131393	<i>Vicia faba</i>	Australia	MH484746	MH484928	MH485019	MH485110
<i>F. curvatum</i>	CBS 247.61	<i>Matthiola incana</i>	Germany	MH484694	MH484876	MH484967	MH485058
<i>F. curvatum</i>	CBS 238.94	<i>Beaucarnia</i> sp.	The Netherlands	MH484711	MH484893	MH484984	MH485075
<i>F. curvatum</i>	CBS 141.95	<i>Hedera helix</i>	The Netherlands	MH484712	MH484894	MH484985	MH485076

Cont.							
Espécies	Coleção	Hosp./Substrato	Origem	Acesso Genbank			
				cmdA	Rpb2	Tef1	Tub2
<i>F. duoseptatum</i>	CBS 102026	<i>Musa</i> <i>sapientum</i> cv. Pisang ambon	Malaysia	MH484714	MH484896	MH484987	MH485078
<i>F. elaeidis</i>	CBS 217.49	<i>Elaeis</i> sp.	Zaire	MH484688	MH484870	MH484961	MH485052
<i>F. elaeidis</i>	CBS 218.49	<i>Elaeis</i> sp.	Zaire	MH484689	MH484871	MH484962	MH485053
	CBS 255.52	<i>Elaeis</i> <i>guineensis</i>	Unknown	MH484692	MH484874	MH484965	MH485056
<i>F. fabacearum</i>	CBS 144742	<i>Z. mays</i>	South Africa	MH484756	MH484938	MH485029	MH485120
<i>F. fabacearum</i>	CBS 144743T	<i>Glycine max</i>	South Africa	MH484757	MH484939	MH485030	MH485121
<i>F. fabacearum</i>	CBS 144744	<i>G. max</i>	South Africa	MH484758	MH484940	MH485031	MH485122
<i>F. foetens</i>	CBS 120665	<i>Nicotiana</i> <i>tabacum</i>	Iran	MH484736	MH484918	MH485009	MH485100
<i>F. ficicrescens</i>	CBS 125178T	<i>Ficus carica</i> fruit	Iran	KU603958	KT154002	KU604452	KP662896
<i>F. ficicrescens</i>	CBS 125181	<i>Ficus carica</i> fruit	Iran	KU603959	KT154003	KU604453	KP662897
<i>F. gaditjirri</i>	F15048	<i>Heteropogon</i> <i>triticeus</i>	Australia		HQ662690	AY639636	
<i>F. glycines</i>	CBS 176.33	<i>Linum</i> <i>usitatissium</i>	Unknown	MH484686	MH484868	MH484959	MH485050
<i>F. glycines</i>	CBS 214.49	Unknown	Argentina	MH484687	MH484869	MH484960	MH485051
<i>F. glycines</i>	CBS 200.89	<i>Ocimum</i> <i>basilicum</i>	Italy	MH484706	MH484888	MH484979	MH485070
<i>F. glycines</i>	CBS 144745	<i>G. max</i>	South Africa	MH484759	MH484941	MH485032	MH485123

<i>Cont.</i>							
Espécies	Coleção	Hosp./Substrato	Origem	Acesso Genbank			
				cmdA	Rpb2	Tef1	Tub2
<i>F. glycines</i>	CBS 144746 = CPC 25808T	<i>G. max</i>	South Africa	MH484760	MH484942	MH485033	MH485124
<i>F. gossypinum</i>	CBS 116611	<i>Gossypium hirsutum</i>	Ivory Coast	MH484725	MH484907	MH484998	MH485089
<i>F. gossypinum</i>	CBS 116612	<i>G. hirsutum</i>	Ivory Coast	MH484726	MH484908	MH484999	MH485090
<i>F. gossypinum</i>	CBS 116613T	<i>G. hirsutum</i>	Ivory Coast	MH484727	MH484909	MH485000	MH485091
<i>F. hoodiae</i>	CBS 132476	<i>H. gordonii</i>	South Africa	MH484748	MH484930	MH485021	MH485112
<i>F. hoodiae</i>	CBS 132477	<i>H. gordonii</i>	South Africa	MH484749	MH484931	MH485022	MH485113
<i>F. hostae</i>	NRRL 29889	<i>Hosta sp.</i>			JX171640	AY329034	
<i>F. lactis</i>	CBS 411.97NT	<i>Ficus carica</i>	USA	AF158325	LT996149	AF160272	U61551
<i>F. lactis</i>	NRRL 31630	<i>Capsicum annuum</i>	Belgium	FR870301	FR870313	FR870289	FR870325
<i>F. languescens</i>	CBS 645.78 T	<i>Solanum lycopersicum</i>	Morocco	MH484698	MH484880	MH484971	MH485062
<i>F. languescens</i>	CBS 646.78	<i>S. lycopersicum</i>	Morocco	MH484699	MH484881	MH484972	MH485063
<i>F. languescens</i>	CBS 413.90	<i>S. lycopersicum</i>	Israel	MH484708	MH484890	MH484981	MH485072
<i>F. languescens</i>	CBS 300.91	<i>S. lycopersicum</i>	The Netherlands	MH484709	MH484891	MH484982	MH485073
<i>F. languescens</i>	CBS 302.91	<i>S. lycopersicum</i>	The Netherlands	MH484710	MH484892	MH484983	MH485074
<i>F. languescens</i>	CBS 872.95	<i>S. lycopersicum</i>	Unknown	MH484713	MH484895	MH484986	MH485077
<i>F. languescens</i>	CBS 119796	<i>Z. mays</i>	South Africa	MH484735	MH484917	MH485008	MH485099
<i>F. libertatis</i>	CBS 144748	<i>Aspalathus sp.</i>	South Africa	MH484750	MH484932	MH485023	MH485114

<i>Cont.</i>							
Espécies	Coleção	Hosp./Substrato	Origem	Acesso Genbank			
				cmdA	Rpb2	Tef1	Tub2
<i>F. libertatis</i>	CBS 144747	<i>Aspalathus</i> sp.	South Africa	MH484751	MH484933	MH485024	MH485115
<i>F. libertatis</i>	CBS 144749 T	Rock surface	South Africa	MH484762	MH484944	MH485035	MH485126
<i>F. lyarnte</i>	CBS 125536				JX171661	EF107118	
<i>F. mexicanum</i>	NRRL 47473	<i>Mangifera indica</i> inflorescence	Mexico	GU737389	Not public	GU737416	GU737308
<i>F. mexicanum</i>	NRRL 53580	<i>Mangifera indica</i> inflorescence	Mexico	GU737394	-	GU737421	GU737367
<i>F. miscanthi</i>	NRRL 26231	<i>Miscanthus sinensis</i>	Denmark		JX171634	MN193878	
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 129.24	<i>Secale cereale</i>	Unknown	MH484682	MH484864	MH484955	MH485046
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 149.25	<i>Musa</i> sp.	Unknown	MH484683	MH484865	MH484956	MH485047
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 181.32	<i>S. tuberosum</i>	USA	MH484685	MH484867	MH484958	MH485049
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 758.68	<i>S. lycopersicum</i>	The Netherlands	MH484695	MH484877	MH484968	MH485059
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 744.79	<i>Passiflora edulis</i>	Brazil	MH484700	MH484882	MH484973	MH485064
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 127.81	<i>Chrysanthemum</i> sp.	USA	MH484701	MH484883	MH484974	MH485065
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 129.81	<i>Chrysanthemum</i> sp.	USA	MH484703	MH484885	MH484976	MH485067
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 196.87	<i>Bouvardia longiflora</i>	Italy	MH484704	MH484886	MH484977	MH485068

<i>Cont.</i>							
Espécies	Coleção	Hosp./Substrato	Origem	Acesso Genbank			
				cmdA	Rpb2	Tef1	Tub2
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 840.88 <sup>T</sup>	<i>Dianthus caryophyllus</i>	The Netherlands	MH484705	MH484887	MH484978	MH485069
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 115416	<i>Agathosma betulina</i>	South Africa	MH484720	MH484902	MH484993	MH485084
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 115417	<i>A. betulina</i>	South Africa	MH484721	MH484903	MH484994	MH485085
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 115419	<i>A. betulina</i>	South Africa	MH484722	MH484904	MH484995	MH485086
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 115424	<i>A. betulina</i>	South Africa	MH484724	MH484906	MH484997	MH485088
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 123062	Tulip roots	USA	MH484737	MH484919	MH485010	MH485101
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 130300	Amputated human toe	USA	MH484743	MH484925	MH485016	MH485107
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 130301	Human leg ulcer	USA	MH484744	MH484926	MH485017	MH485108
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 130303	<i>S. lycopersicum</i>	USA	MH484741	MH484923	MH485014	MH485105
<i>F. nirenbergiae</i>	CPC 30807	-	South Africa	MH484768	MH484950	MH485041	MH485132
<i>F. nisikadoi</i>	BBA_69015	Triticum aestivum	Japan		MG282421	KR909358	
<i>F. nygamai</i>	NRRL 13448 <sup>T</sup>	Necrotic Sorghum root	Australia	AF158326	EF470114	AF160273	U34426
<i>F. nygamai</i>	NRRL 26421	Human	Egypt	KU603949	EF470127	HM347121	KU603865
<i>F. odoratissimum</i>	CBS 794.70	<i>Albizia julibrissin</i>	Iran	MH484696	MH484878	MH484969	MH485060
<i>F. odoratissimum</i>	CBS 102030	<i>M. sapientum</i> cv. Pisang mas	Malaysia	MH484716	MH484898	MH484989	MH485080
<i>F. odoratissimum</i>	CBS 130310	<i>Musa</i> sp.	Australia	MH484740	MH484922	MH485013	MH485104
<i>F. oxysporum</i>	CBS 221.49	<i>Camellia sinensis</i>	South East Asia	MH484690	MH484872	MH484963	MH485054

<i>Cont.</i>							
Espécies	Coleção	Hosp./Substrato	Origem	Acesso Genbank			
				cmdA	Rpb2	Tef1	Tub2
<i>F. oxysporum</i>	CBS 144134 <sup>ET</sup>	<i>S. tuberosum</i>	Germany	MH484771	MH484953	MH485044	MH485135
<i>F. oxysporum</i>	CBS 144135	<i>S. tuberosum</i>	Germany	MH484772	MH484954	MH485045	MH485136
<i>F. oxysporum</i>	CBS 716.74	<i>Vicia faba</i>	Germany	AF158366	JX171583	AF008479	U34435
<i>F. oxysporum</i>	CBS 744.97	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	USA	AF158365	LT575065	AF160312	U34424
<i>F. oxysporum</i>	CPC 25822	<i>Protea</i> sp.	South Africa	MH484761	MH484943	MH485034	MH485125
<i>F. pharetrum</i>	CBS 144750	<i>Aliodendron dichotomum</i>	South Africa	MH484769	MH484951	MH485042	MH485133
<i>F. pharetrum</i>	CBS 144751 <sup>T</sup>	<i>A. dichotomum</i>	South Africa	MH484770	MH484952	MH485043	MH485134
<i>F. phyllophilum</i>	CBS 216.76 <sup>T</sup>	<i>Dracaena deremensis</i> leaf	Italy	KF466333	KF466410	KF466421	KF466443
<i>F. pseudocircinatum</i>	CBS 449.97 <sup>T</sup>	<i>Solanum</i> sp.	Ghana	AF158324	LT996151	AF160271	U34427
<i>F. pseudonygamai</i>	CBS 417.97 <sup>T</sup>	<i>Pennisetum typhoides</i>	Nigeria	AF158316	LT996152	AF160263	U34421
<i>F. ramigenum</i>	CBS 418.98 <sup>T</sup>	<i>Ficus carica</i>	USA	KF466335	KF466412	KF466423	KF466445
<i>F. redolens</i>	NRRL 25600	<i>Pisum sativum</i>	Unknown		MT409443	MT409453	
<i>F. spartum</i>	NRRL 66896	<i>Rhizosphere of Macrochloa tenacissima</i>	Tunisia		MT409449		
<i>F. subglutinans</i>	CBS 747.97	<i>Zea mays</i>	USA	AF158342	JX171599	AF160289	U34417

<i>Cont.</i>							
Espécies	Coleção	Hosp./Substrato	Origem	Acesso Genbank			
				cmdA	Rpb2	Tef1	Tub2
<i>F. sudanense</i>	CBS 454.97 <sup>T</sup>	<i>Striga hermonthica</i>	Sudan	LT996185	LT996155	KU711697	KU603909
<i>F. temperatum</i>	NRRL 25622	<i>Zea mays</i>	South Africa	AF158354	Not public	-	AF160317
<i>F. terricola</i>	CBS 483.94 <sup>T</sup>	Soil	Australia	KU603951	LT996156	KU711698	KU603908
<i>F. thapsinum</i>	CBS 733.97	<i>Sorghum bicolor</i>	South Africa	LT996186	JX171600	AF160270	U34418
<i>F. tjaetaba</i>	NRRL 66243 <sup>T</sup>	<i>Sorghum interjectum</i>	Australia	LT996187	KP083275	KP083263	GU737296
<i>F. trachichlamydosporum</i>	CBS 102028	<i>M. sapientum</i> cv. Pisang awak legor	Malaysia	MH484715	MH484897	MH484988	MH485079
<i>F. triseptatum</i>	CBS 258.50 <sup>T</sup>	<i>Ipomoea batatas</i>	USA	MH484691	MH484873	MH484964	MH485055
<i>F. triseptatum</i>	CBS 116619	<i>G. hirsutum</i>	Ivory Coast	MH484728	MH484910	MH485001	MH485092
<i>F. triseptatum</i>	CBS 119665	Sago starch	Papua New Guinea	MH484734	MH484916	MH485007	MH485098
<i>F. triseptatum</i>	CBS 130302	Human eye	USA	MH484742	MH484924	MH485015	MH485106
<i>F. udum</i>	CBS 177.31	<i>Digitaria eriantha</i>	South Africa	MH484684	MH484866	MH484957	MH485048
<i>F. udum</i>	NRRL 22949	<i>Lactarius pubescens</i>	Germany	AF158328	LT996172	AF160275	U34433
<i>F. verticillioides</i>	CBS 734.97	<i>Zea mays</i>	Germany	AF158315	EF470122	AF160262	U34413
<i>F. verticillioides</i>	CBS 115135	Human	Sweden	KU603944	KU604217	KU604384	KU603861
<i>F. veterinarianum</i>	CBS 109898	Shark peritoneum	The Netherlands	MH484717	MH484899	MH484990	MH485081

<i>Cont.</i>							
Espécies	Coleção	Hosp./Substrato	Origem	Acesso Genbank			
				cmdA	Rpb2	Tef1	Tub2
<i>F. veterinarium</i>	CBS 117787	Swab sample near filling apparatus	The Netherlands	MH484730	MH484912	MH485003	MH485094
<i>F. veterinarium</i>	CBS 117790	Swab sample near filling apparatus	The Netherlands	MH484731	MH484913	MH485004	MH485095
<i>F. veterinarium</i>	CBS 117791	Pasteurized milk-based product	The Netherlands	MH484732	MH484914	MH485005	MH485134
<i>F. veterinarium</i>	CBS 117792	Pasteurized milk-based product	The Netherlands	MH484733	MH484915	MH485006	MH485079
<i>F. veterinarium</i>	NRRL 54984	Mouse mucosa	USA	MH484763	MH484945	MH485036	MH485127
<i>F. veterinarium</i>	NRRL 54996	Little blue penguin foot	USA	MH484764	MH484946	MH485037	MH485128
<i>F. veterinarium</i>	NRRL 62542	Unknown animal faeces	USA	MH484765	MH484947	MH485038	MH485129
<i>F. veterinarium</i>	NRRL 62545	Endoscope of veterinary clinic	USA	MH484766	MH484948	MH485039	MH485130
<i>F. veterinarium</i>	NRRL 62547	Canine stomach	USA	MH484767	MH484949	MH485040	MH485131
<i>F. volatile</i>	CBS 143874 <sup>T</sup>	Human bronchoalveolar lavage fluid	French Guiana	MK984595	LR596006	LR596007	LR596008
<i>F. volatile</i>	NRRL 25615	<i>Oryza sativa</i> seed	Nigeria	AF158357	-	AF160304	AF160348
<i>F. werrikimbe</i>	CBS 125535 <sup>T</sup>	<i>Sorghum leiocladum</i>	Australia	-	-	EF107131	EF107133

<i>Cont.</i>							
Espécies	Coleção	Hosp./Substrato	Origem	Acesso Genbank			
				cmdA	Rpb2	Tef1	Tub2
<i>F. werrikimbe</i>	F19361	<i>Sorghum leiocladum</i>	Australia	-	-	EF107132	EF107134
<i>F. xylarioides</i>	NRRL 25486 <sup>T</sup>	<i>Coffea</i> trunk	Ivory Coast	-	HM068355	AY707136	AY707118
<i>Fusarium</i> sp.	CBS 128.81	<i>Chrysanthemum</i> sp.	USA	MH484702	MH484884	MH484975	MH485066
<i>Fusarium</i> sp.	CBS 680.89	<i>Cucumis sativus</i>	The Netherlands	MH484707	MH484889	MH484980	MH485071
<i>Fusarium</i> sp.	CBS 130323	Human nail	Australia	MH484745	MH484927	MH485018	MH485109
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 25346	Pine pitch canker	USA	AF158349	-	AF160296	U61642
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 26756	Plant leaf litter	Cuba	AF158360	-	AF160307	AF160336
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 26757	Pine pitch canker	USA	AF158361	-	AF160308	AF160351
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 01	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 09	<i>Musa</i> sp.	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 10	<i>Abelmoschus esculentus</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 14	<i>Heliconia</i> sp.	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 40	<i>S. lycopersicum</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 41	<i>S. lycopersicum</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 42	<i>S. lycopersicum</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 43	<i>S. lycopersicum</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 55	<i>A. esculentus</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 59	<i>Passiflora edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP

<i>Cont.</i>							
Espécies	Coleção	Hosp./Substrato	Origem	Acesso Genbank			
				cmdA	Rpb2	Tef1	Tub2
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 60	<i>Vigna unguiculata</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 81	<i>S. lycopersicum</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 96	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 98	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 103	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 107	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 155	<i>Capsicum annum</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 182	<i>S. lycopersicum</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 183	<i>S. lycopersicum</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 188	<i>Capsicum</i> sp.	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 221	<i>A. esculentus</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 224	<i>A. esculentus</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 225	<i>S. lycopersicum</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 226	<i>A. esculentus</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 233	<i>S. lycopersicum</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 277	<i>A. esculentus</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 305	<i>Coriandrum sativum</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 318	<i>Heliconia</i> sp.	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 320	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 323	<i>A. esculentus</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 324	<i>Musa</i> sp.	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 325	<i>Musa</i> sp.	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 326	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 327	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP

<i>Cont.</i>							
Espécies	Coleção	Hosp./Substrato	Origem	Acesso Genbank			
				cmdA	Rpb2	Tef1	Tub2
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 328	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 329	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 330	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 331	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 332	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 333	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 334	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 335	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 336	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 337	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 338	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 339	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 340	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 341	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 342	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 343	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 344	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	MGSS 345	<i>P. edulis</i>	Brazil	NP	NP	NP	NP
<i>Macroconia phlogioides</i>	CBS 125496	<i>Quercus</i> sp.	USA	MW834118	HQ897732	MW834284	MW834311

NP – não publicado

