



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

Espécies de *Fusarium* Associadas a Sementes de Maracujá

Athaise Ferreira de Lima

**Recife – PE
2020**

ATHAISE FERREIRA DE LIMA

ESPÉCIES DE *Fusarium* ASSOCIADAS A SEMENTES DE MARACUJÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador(a): André Angelo Medeiros Gomes

Coorientador: Alexandre Reis Machado

Coorientador: Willie Anderson dos Santos Vieira

**RECIFE - PE
OUTUBRO - 2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A865e DE LIMA, ATHAISE FERREIRA
ESPÉCIES DE *Fusarium* ASSOCIADAS A SEMENTES DE MARACUJÁ / ATHAISE FERREIRA DE LIMA. -
2020.
58 f.
- Orientadora: ANDRE ANGELO MEDEIROS .
Coorientadora: Alexandre Reis Machado e Willie Anderson dos Santos Vieira.
Inclui referências e apêndice(s).
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia,
Recife, 2020.
1. FOOSC. 2. *Passiflora edulis*. 3. FIESC. I. , ANDRE ANGELO MEDEIROS, orient. II. Vieira, Alexandre Reis
Machado e Willie Anderson dos Santos, coorient. III. Título

ESPÉCIES DE *Fusarium* ASSOCIADAS A SEMENTES DE MARACUJÁ

ATHAISE FERREIRA DE LIMA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 29/10/20.

ORIENTADOR(A):



Prof. Dr. André Angelo Medeiros Gomes (UFRPE)

EXAMINADORES:



Prof. Dr. Humberson Rocha Silva (UFRPE)



Prof. Dr. Luan Danilo Ferreira de Andrade Melo (UFAL)

**RECIFE-PE
OUTUBRO – 2020**

À minha família e amigos por todo apoio e incentivo, a
Fuzaca e ao Romeu.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Criador pela vida, força e coragem;

A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos a CNPq e FACEPE;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia (PPGF) por todo conhecimento transmitido ao longos destes dois anos;

Ao professor André Ângelo pela orientação e ensinamentos, pela elucidação de dúvidas e por todo o suporte na realização deste experimento;

Ao professor Humberson Rocha pelo auxílio na estatística;

Aos meus coorientadores Willie Anderson e Alexandre por toda contribuição dada ao experimento;

A minha mãe Tereza por tudo, a minha irmã Mayse pelo incentivo, a Fuzaca e ao Romeu por toda alegria compartilhada mesmo a longa distância, sem vocês nada seria possível;

Ao Romildo pela disposição em ajudar na solução de problemas, a Darcy pelo café e pela prosa;

Aos colegas do laboratório de Patologia Pós - Colheita Adriana, Bárbara, Suzy e Wallingson pela acolhida, e em especial ao Erasmo Filho por toda a ajuda e risadas ao longo da condução dos experimentos;

Aos integrantes e responsáveis pelo laboratório de Micologia da UFRPE pela disponibilidade dos equipamentos e ajuda no experimento;

Aos funcionários responsáveis pela limpeza e ao senhor Luiz por toda a solicitude;

Aos amigos conquistados aqui e que seguirão comigo, em especial a Gaby e Ingrid;

A Larissa por ser minha companhia nas horas boas e ruins, por toda a ajuda e paciência com os meus chilikues;

Agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente desta conquista e que venham as próximas!

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	9
INTRODUÇÃO GERAL	10
1. A Cultura do Maracujazeiro	10
1.1. <i>Passiflora edulis</i> e <i>Passiflora alata</i>	11
1.2. Propagação	12
2. Doenças do Maracujazeiro	15
3. Semente como Veículo de Transmissão de Fitopatógenos	18
4. Identificação de Espécies de <i>Fusarium</i>	19
5. Referências Bibliográficas	22
CAPÍTULO II	33
RESUMO	35
1 INTRODUÇÃO	36
2 MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1 Teste de Sanidade das Sementes	37
2.2 Identificação dos Isolados	38
2.3 Teste de Patogenicidade	39
1.3.1 Inoculação em Raízes por <i>Dipping</i>	40
2.3.2 Inoculação com Palito	40
3 RESULTADOS	41
3.1 Identificação dos Isolados <i>Fusarium-like</i>	42
3.2 Teste de Patogenicidade	42
4 DISCUSSÃO	43
5 REFERÊNCIAS	46
6 APÊNDICE	51
CAPÍTULO III	57
CONCLUSÕES GERAIS	58

RESUMO GERAL

O maracujazeiro amarelo *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* é originário do Brasil. Seu fruto possui grande aceitação no mercado interno e externo, podendo ser consumido *in natura* ou processado na forma de sucos e geleias. Além disso, possui muitas propriedades funcionais e medicinais. Um dos métodos mais utilizados para propagar cultivares de maracujazeiro é por meio de sementes. Porém, essas mesmas sementes podem atuar como disseminadoras de importantes fitopatógenos para a cultura. Dentre os patógenos difundidos pelas sementes destacam-se o *Fusarium* spp. O presente estudo visou investigar a presença de *Fusarium* spp. associados a sementes de maracujá, isolar *Fusarium* spp., realizar a identificação molecular dos isolados de *Fusarium* obtidos e avaliar a patogenicidade destes isolados em plântulas de maracujá. Para investigar a presença de fungos fitopatogênicos associados a sementes de maracujá foi realizado *Blotter* teste em diferentes lotes de sementes de *P. edulis* f. *flavicarpa*; avaliou-se a incidência de gêneros fúngicos nas sementes e quando ocorreu o gênero *Fusarium* procedeu-se o isolamento. A identificação a nível de gênero foi realizada através de comparações morfológicas dos fungos observados. Para o gênero *Fusarium* a identificação molecular dos isolados foi realizada por meio de Blast e filogenia com emprego das regiões RPB2 e TEF1. Teste de patogenicidade para os isolados de *Fusarium* foi realizado, neste ensaio foram testadas duas metodologias de inoculação, *dipping* e palito, em duas cultivares, Sol e Redondo Amarelo. Foram encontrados os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Colletotrichum*, *Paecilomyces*, *Cladosporium* e *Fusarium*. Obteve-se 24 isolados de *Fusarium* e com o uso de ferramentas moleculares e a utilização das regiões gênicas RPB2 e TEF1, foi possível discriminar os mesmos como pertencentes aos complexos de espécies *F. oxysporum* e *F. incarnatum-equiseti*. Para o complexo *F. oxysporum* realizou-se a construção da árvore filogenética utilizando a interferência bayesiana, os isolados FS05, F6, FSDr7, F19 se agruparam no mesmo clado com as espécies *F. fabacearum*, *F. callistephi*, os isolados FS02 e FS03 se agruparam no mesmo clado com as espécies *F. veterinarum*, *F. contaminatum*, *F. pharetrum*. Para a variável Incidência não foi constada diferença significativa ($P > 0.05$) entre os isolados quando inoculados via palito de dente, o isolado FS01 quando inoculado por *dipping* diferiu dos demais isolados também inoculados por este método. A cultivar Redondo Amarelo apresentou a maior incidência da doença. E a inoculação via palito colonizado proporcionou o maior tamanho de lesão nas plântulas.

Palavras-chaves: *FOSC*; *Passiflora edulis*; *FIESC*.

GENERAL ABSTRACT

The yellow passion fruit *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* is originally from Brazil. Its fruit is widely accepted in the domestic and foreign markets, and can be consumed fresh or processed in the form of juices and jellies. In addition, it has many functional and medicinal properties. One of the most used methods to propagate passion fruit cultivars is through seeds. However, these same seeds can act as disseminators of important phytopathogens for the crop. Among the pathogens spread by the seeds, *Fusarium* spp. The present study aimed to investigate the presence of *Fusarium* spp. associated with passion fruit seeds, isolate *Fusarium* spp., perform the molecular identification of *Fusarium* isolates obtained and evaluate the pathogenicity of these isolates in passion fruit seedlings. To investigate the presence of phytopathogenic fungi associated with passion fruit seeds, a Blotter test was performed on different seed lots of *P. edulis* f. *flavicarpa*; the incidence of fungal genera in the seeds was evaluated and when the *Fusarium* genus occurred, isolation was carried out. The identification at the gender level was performed through morphological comparisons of the observed fungi. For the *Fusarium* genus, the molecular identification of the isolates was performed using Blast and phylogeny using the RPB2 and TEF1 regions. Pathogenicity test for *Fusarium* isolates was carried out, in this assay two inoculation methodologies, dipping and toothpick, were tested in two cultivars, Sol and Redondo Amarelo. The genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Colletotrichum*, *Paecilomyces*, *Cladosporium* and *Fusarium* were found 24 *Fusarium* isolates were obtained and with the use of molecular tools and the use of the RPB2 and TEF1 gene regions, it was possible to discriminate them as belonging to the complexes of *F. oxysporum* and *F. incarnatum-equiseti* species. For the *F. oxysporum* complex, the phylogenetic tree was built using Bayesian interference, isolates FS05, F6, FSDr7, F19 were grouped in the same clade with the species *F. fabacearum*, *F. callistephi*, isolates FS02 and FS03 if grouped in the same clade with the species *F. veterinarum*, *F. contaminatum*, *F. pharetrum*. For the variable Incidence there was no significant difference ($P > 0.05$) between the isolates when inoculated via toothpick, the isolate FS01 when inoculated by dipping differed from the other isolates also inoculated by this method. The cultivar Redondo Amarelo had the highest incidence of the disease. And inoculation via colonized toothpick provided the largest lesion size in the seedlings.

Keywords: *FOSC*; *Passiflora edulis*; *FIESC*.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

ESPÉCIES DE *Fusarium* ASSOCIADAS A SEMENTES DE MARACUJÁ

INTRODUÇÃO GERAL

1. A Cultura do Maracujazeiro

No Brasil, o nome maracujazeiro é atribuído a diversas espécies pertencentes ao gênero *Passiflora* L. O gênero pertence a classe *Magnoliopsida*, a ordem *Malpighiales* e a família *Passifloraceae* (JUDD *et al.*, 2009). Esta família é constituída por aproximadamente 20 gêneros e 600 espécies, possuindo distribuição ampla em regiões de clima tropical a temperado (MONDIN *et al.*, 2011). As características botânicas mais evidentes desta são o hábito geralmente trepador com gavinhas, sépalas frequentemente semelhantes as pétalas, com androceu e gineceu dispostos em pedúnculo formando um androginóforo (JUDD *et al.* 2009).

O gênero *Passiflora* possui cerca de 520 espécies com ampla distribuição geográfica (MACDOUGAL; FEUILLET, 2004), aproximadamente 140 dessas ocorrem no Brasil (CERVI, 2006) e em torno de 130 espécies são nativas do Brasil, sendo que em torno de 50 delas apresentam valor comercial.

As plantas do gênero geralmente são trepadoras herbáceas ou lenhosas de ramos quadrangulares ou cilíndricos, suberificadas, com ou sem pelos. Podendo atingir de 5 a 10 metros de altura (TEIXEIRA, 1994). As plantas de crescimento escandente geralmente necessitam de suporte para a sustentação e desenvolvimento da planta. Para os pomares comerciais os sistemas mais utilizados são espaldeira e latada (RUGGIERO *et al.*, 1996).

As diferentes espécies de *Passiflora* possuem formatos foliares diversificados (ovada, elíptica, fendida, cordada, lanceolada e partida) (JESUS *et al.*, 2015). Quanto à disposição das folhas, a maioria das espécies é simples e alterna, orbiculares ou elípticas, lobadas ou inteiras, na maioria das espécies a margem é inteira, base cordada, truncada, arredondada ou cuneada, o pecíolo com ou sem glândulas, glândulas peciulares sésseis, estipitadas ou pedunculadas. Algumas espécies possuem folhas compostas (ULMER; MACDOUGAL, 2004). As gavinhas são geralmente solitárias e inexistentes em espécies lenhosas (CUNHA *et al.*, 2002). As flores são hermafroditas, pomposas, grandes, com coloração variada, protegidas na base por brácteas (JESUS *et al.*, 2015). A corona é uma das características do gênero, o androginóforo colunar está presente no centro da flor. A estrutura feminina possui três estiletos livres ou conectados na base, estigmas capitados. A estrutura masculina é constituída por cinco estames, com filetes livres ou conectados nas anteras dorsofixas e versáteis. A abertura floral pode se proceder pela manhã, tarde ou a noite, dependendo da espécie (FALEIRO *et al.*, 2017).

Os frutos geralmente são bagas ou cápsulas deiscentes ou indeiscentes, apresentando formatos variáveis (oblongo, arredondado, ovalado, periforme, fusiforme, elipsoide), com cores diversificadas. Geralmente as sementes são compridas, pontuada, reticuladas, ou alveoladas transversalmente e envoltas em arilo muscilaginoso (FALEIRO *et al.*, 2017; JESUS *et al.*, 2015; ULMER; MACDOUGAL, 2004; VANDERPLANK, 2000).

No Brasil, a principal espécie cultivada é *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, (maracujá azedo, maracujá amarelo), encontrada em mais de 90% dos cultivos de maracujá. As outras espécies cultivadas incluem *P. alata* Curtis (maracujá-doce), *P. setacea* DC. (maracujá do sono), *P. cincinnata* Mast. (maracujá do mato), *P. edulis* Sims f. *edulis* (maracujá roxo nativo), *P. nitida* Kunth (maracujá suspiro), *P. quadrangularis* L. (maracujá gigante) e *P. maliformis* L. ('cholupa'), todas cultivadas em pomares domésticos (FALEIRO *et al.*, 2015).

Esta trepadeira ocorre em todo o Brasil, no Paraguai, Argentina, ilhas das Índias Ocidentais, na América Central, Venezuela e Equador (BERNACCI, 2003). O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, principalmente para a fabricação de suco concentrado e para o consumo *in natura* (SILVA *et al.*, 2005).

O maracujazeiro possui múltiplos usos desde a produção de frutos para consumo (*in natura*), produção de sucos e geleias, produção de flores ornamentais e produção de matéria-prima com propriedades funcionais e medicinais para indústrias de alimentos, condimentos, cosméticos e farmacêutica (FALEIRO *et al.*, 2015).

Intensificou-se no país na década de 70, colocando-se entre as principais frutíferas cultivadas. Atualmente, o Brasil possui uma área colhida de aproximadamente 42.731 hectares e em 2018 obteve em torno de 602.651 toneladas de produção. As principais regiões que se destacam como produtoras dessa cultura são Nordeste, enfatizando os estados da Bahia e Ceará; Sul, em Santa Catarina; e o Sudeste, com os estados de São Paulo e Minas Gerais sendo importantes produtores desse fruto (IBGE, 2019).

1.1 *Passiflora edulis* e *Passiflora alata*

A planta de *Passiflora edulis* Sims é escandente, glabra ou laxamente pilosa. Caule cilíndrico ou subanguloso, estriado. Folhas trilobadas, membranáceas ou subcoriáceas. Flores axilares de tamanho variado possuindo de 5 a 7,5 cm de diâmetro. Fruto globoso ou ovóide, a casca possui cor muito variável, amarelo, amarelo-esverdeado ou púrpura escuro. Sementes numerosas e com formato ovais, muito duras cercadas de uma polpa amarela gelatinosa de sabor ácido e aroma intenso (CERVI, 1997; LOPEZVARGAS *et al.*, 2013).

O maracujazeiro amarelo é estimado tanto pela qualidade de seus frutos, que são ricos em sais minerais e vitaminas A e C, quanto pelo sabor e aroma do seu suco que o torna bastante apreciado, além das diversificadas propriedades farmacológicas (LIMA, 2002) sendo uma frutífera que apresenta expressão econômica em ascensão no nordeste brasileiro, que é responsável por 60% a produção brasileira (IBGE, 2019).

A *Passiflora alata* é uma planta de hábito trepador, lenhosa em sua base e de grande vigor. Seu caule apresenta secção quadrangular, apresentando deslignificação à medida em que avança para o seu ápice. Suas folhas são inteiras, amplamente ovadas ou ovado oblongadas, as flores apresentam aroma forte e agradável, possuindo coloração variada, hermafroditas e auto incompatíveis, seus frutos são de formato variado entre ovoides, obovais ou piriformes, já a coloração é variada entre tons de amarelo podendo chegar ao alaranjado brilhante com a maturidade do fruto. A polpa apesar de ser adocicada e aromática, apresenta uma leve acidez (CUNHA *et al.* 2002; FUMIS; KAVATI; PIZA JUNIOR, 2002; SAMPAIO, 2007).

O maracujá doce tem se tornado cada vez mais relevante em virtude do seu uso como matéria prima para a indústria de fitoterápicos e cosméticos. Os frutos são altamente atrativos por suas características visuais como: a coloração externa e o diâmetro, apresentando ainda boa qualidade gustativa e nutritiva, o que auxilia na aceitação, e o torna um produto de grande potencial para o mercado interno e externo (CEREDA, 1976; MANOEL, 2007; VASCONCELOS, 1991).

1.2 Propagação

Por se tratar de uma planta auto incompatível, existe a necessidade da polinização cruzada entre flores de diferentes plantas para que ocorra a produção de frutos (AKAMINE; GIROLAMI, 1957). Os estudos de Gilmartin (1958), a respeito da polinização manual das flores do maracujazeiro amarelo, comprovaram que as flores autopolinizadas não geram frutos.

As mamangavas do gênero *Xylocopa* (*Hymenoptera: Anthophoridae*) estão entre os principais agentes polinizadores de flores de maracujá, como *P. edulis* Sims e *P. alata*. Diversos estudos relacionados a polinização do maracujazeiro constataram a importância das espécies de mamangavas como agentes polinizadores devido ao tamanho do inseto e hábitos comportamentais durante a coleta de néctar (CAMILLO, 1978; CARVALHO; TEÓFILO SOBRINHO, 1973; CORBET; WILLMER, 1980; NISHIDA, 1958).

O maracujá pode ser propagado por meio de sementes ou assexuadamente por meio de enxertia, estacas ou tecido cultura *in vitro*, sendo a propagação por sementes a mais utilizada

(PANTANO, 2007).

A semente pode ser definida como um óvulo maduro e fecundado, gerado sexualmente e podendo conter em seu interior substâncias de reserva protegidas por um ou dois envoltórios (casca), a semente possui a capacidade de gerar uma nova planta (BAKER; SMITH, 1966).

Segundo Nunes e Queiroz (2001), as sementes do maracujazeiro podem ser do tipo ortodoxas ou ortodoxas intermediárias. As sementes ortodoxas são as que apresentam maior tolerância a secagem, aos baixos níveis de umidade e temperatura no armazenamento. Estas podem ser armazenadas em embalagens herméticas e submetidas a baixas temperaturas, conservando assim a sua viabilidade por mais tempo. Já o conceito de sementes ortodoxas intermediárias foi proposto por Ellis *et al.* (1990), neste padrão as sementes toleram a perda de água nos teores entre 7,0 e 10,0%, mas não são tolerantes ao armazenamento por longos períodos.

A propagação via sementes é o método mais empregado para a propagação da maioria das espécies de *Passiflora* cultivadas comercialmente com finalidade alimentícia. A qualidade fisiológica, genética e sanitária é um fator indispensável para o sucesso da propagação, pois permite a formação de mudas uniformes e vigorosas. Em algumas espécies do gênero, as sementes podem apresentar baixa porcentagem de germinação devido a dormência natural ou adquirida por más condições no armazenamento gerando a necessidade de tratamentos para a quebra de dormência (FALEIRO *et al.*, 2019).

É importante ressaltar que outros fatores exercem influência direta na qualidade das mudas, como a umidade, temperatura, recipiente e substrato, destacando sobre tudo a qualidade das sementes (BRAGA; JUNQUEIRA, 2003; LOPES *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 1993;

WAGNER JÚNIOR *et al.*, 2006). O método de propagação das variedades comerciais via sementes possui muitas vantagens, dentre elas estão o processo simples de produção de mudas, menor tempo de formação, menor demanda de trabalho e a logística mais simples para transporte e comercialização de sementes. Outra vantagem é a aquisição de plantas geneticamente distintas nos plantios, evitando problemas como baixa produção de flores e frutas e de polpa, este problema pode ser explicado devido as dificuldades de polinização e fecundação cruzada, oriundas da autoincompatibilidade genética que ocorre na maioria das espécies de maracujá adulto. Também é fundamental mencionar a relevância da propagação sexual no melhoramento genético, considerando a possibilidade de combinar em uma única semente diferentes características de interesse através de um processo de hibridização intra e interespecífico seguido de ciclos de recombinação e seleção. Outra aplicação importante da propagação sexual é o fato de ser mais fácil manter recursos genéticos através de sementes

ortodoxas, ou seja, sementes que mantêm sua capacidade de germinação mesmo quando armazenadas em baixas temperaturas e umidade (FALEIRO *et al.*, 2019).

A propagação assexual já foi estudada em muitas espécies de *Passiflora*. Embora a via sementes seja a mais empregada, a assexual pode ser usada na maioria dessas espécies. Este método possui como vantagem principal a possibilidade de clonar plantas-mãe com as características agrônômicas desejáveis. Quando se considera também as espécies selvagens, outra vantagem é a possibilidade de se selecionar as plantas com maior produtividade, com maior tamanho dos frutos e maior resistência a doenças. Segundo Junqueira *et al.* (2006), a produção de mudas via propagação assexual, pode acarretar em ganhos significativos em termos de produtividade e uniformidade nos pomares. Porém para se estabelecer um pomar via propagação assexuada, os materiais usados devem ser de plantas diferentes para permitir a fecundação cruzada, uma vez que a maioria das espécies apresentam autoincompatibilidade (ALEXANDRE *et al.*, 2009).

A propagação via estaquia já apresentou sucesso em maracujazeiros comerciais e selvagens, existem diversos estudos sobre o enraizamento de espécies de *Passiflora* (BRAGA *et al.*, 2006; RONCATTO *et al.*, 2008; VAZ *et al.*, 2009) que demonstraram a viabilidade da produção de novas plantas através de estaquia, embora as respostas variem dependendo da espécie. Muitos fatores influenciam a taxa de enraizamento das estacas e o sucesso da produção de mudas como os fatores genéticos das diferentes espécies, o tipo de substrato, o tipo de corte, as condições de temperatura e umidade, além do uso de fitohormônios (BRAGA *et al.*, 2006; MELETTI; NAGAI, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 1993; RONCATTO *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2012; VAZ *et al.*, 2009;).

A propagação de plantas de maracujá através de enxertos tem sido defendida, pois combina as características da planta de interesse e do porta enxerto, sendo possível através desta combinação o aumento da resistência a doenças causadas por patógenos que vivem no solo, o aumento da tolerância á seca e ao estresse salino e o aumento na vida útil dos pomares (MACHADO *et al.*, 2015; RUGGIERO, 1991).

Outra alternativa de propagação assexual é a *in vitro*, principalmente para os maracujazeiros de uso ornamental e medicinal, pois características como cor, aroma e número de flores produzidas ou produção de fito constituintes medicinais é de grande importância (BRAGLIA *et al.*, 2010; OZAROWSKI; THIEM, 2013; PIPINO *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2010). Para as espécies destinadas a alimentação, a micropropagação clonal possui potencial, porém como na propagação por estaquia deve-se atentar a implantação devido aos problemas que possam surgir em decorrência da autoincompatibilidade (FALEIRO *et al.*, 2019).

Na propagação via cultura de tecidos pode ser empregada a germinação de sementes in vitro e resgate de embriões. Outra aplicação é a possibilidade de limpeza clonal dos acessos mantidos em bancos de germoplasma (ALEXANDRE *et al.*, 2009; GONZALEZ - BENITO *et al.*, 2009; GUZZO *et al.*, 2011). A técnica in vitro mais utilizada para esse fim é a cultura do meristema ou ápice do tronco (PARMESSUR *et al.*, 2002; PRAMMANEE *et al.*, 2011).

2. Doenças do Maracujazeiro

De acordo com Joy e Sherin (2012), diversos fatores são responsáveis pela diminuição da produtividade e longevidade do maracujazeiro, dentre estes destacam-se os fitopatógenos como vírus, bactérias e principalmente fungos. Sendo que, as principais doenças são:

Antracnose - A epidemia causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* é favorecida por altas temperaturas e umidade relativa, geralmente as temperaturas próximas a 27°C favorecem a produção de esporos. Inicialmente aparecem lesões circulares nas folhas possuindo coloração clara e borda amarelada, posteriormente ocorre a necrose dos meristemas apicais e lesões nos caules e pecíolos, que causam intensa desfolha e podem resultar na morte da planta. Quando atacam as flores causam lesões circulares nas pétalas que acabam resultando na perda das mesmas, já os frutos sintomáticos apresentam lesões circulares profundas que afetam a qualidade dos mesmos, em condições ambientais favoráveis há a produção de conídios de cor rosa-alaranjado no centro das lesões e em casos mais severos ocorre a queda dos frutos (CAMPO-ARANA *et al.*, 2015; RODRÍGUEZ; NIÑO, 2009; SIPSA, 2014; SOUSA *et al.*, 2014).

Vírus do endurecimento dos Frutos - O *Cowpea Aphid Born Mosaic Virus* (CABMV) é pertencente à Família *Potyviridae* e ao gênero *Potyvirus*, é transmitido para o maracujazeiro por meio de afídeos, no entanto, o controle químico é ineficiente uma vez que os afídeos não permanecem nas plantas e a transmissão ocorre de maneira não persistente (FREITAS *et al.*, 2015). Os sintomas da infecção viral são caracterizados pela presença de mosaico nas folhas, frutos com endurecimento do pericarpo e com polpa reduzida, a doença pode causar a redução drástica da vida útil dos pomares (SPADOTTI *et al.*, 2019; VIANA *et al.*, 2014).

Verrugose - A verrugose, sarna ou cladosporiose é causada pelo fungo *Cladosporium* spp., a doença recebe esse nome devido ao seu sintoma mais corriqueiro: as lesões superficiais nos frutos. A infecção geralmente ocorre nos tecidos mais jovens, sob condições de alta umidade e brandas temperaturas, os sintomas podem ocorrer em folhas, gavinhas, ramos, flores e frutos. Os frutos sob ataque dos fungos apresentam em sua superfície manchas circulares,

translúcidas que se tornam ásperas e proeminentes e adquirem coloração parda, não afetando a qualidade da polpa, mas afetando a aceitação no mercado devido a alteração na aparência. Quando ocorre nos tecidos fotossintetizantes a verrugose pode causar a desfolha abundante, o que prejudica a planta e pode levá-la a morte (SIMMONDS,1932; SUSSEL, 2015).

Bacteriose do maracujazeiro – Causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, pode apresentar infecção sistêmica que acontece inicialmente junto as nervuras foliares, a bactéria penetra nos ferimentos causando crestamento que posteriormente evolui para o pecíolo, após, atinge os vasos dos caules mais delgados o que resulta numa desfolha intensa, seca de ponteiros, culminando em morte prematura das plantas, já a forma localizada se restringe as folhas, essencialmente as mais internas, os sintomas se iniciam no limbo foliar, as manchas translúcidas angulares evoluem para manchas secas de coloração parda rodeadas por halo amarelo. Nos frutos as manchas são grandes, a princípio oleosas e esverdeadas, depois pardas, geralmente circulares e delimitadas, nas condições favoráveis o patógeno penetra na polpa, fermentando-a, podendo alcançar as sementes e inviabilizando a comercialização, a doença pode causar desfolha, que pode reduzir ou impedir a formação de frutos (DIAS; TAKATSU, 1987; LIMA, 2004; VIANA *et al.*, 2003).

Podridão de Lasiodiplodia - A doença é causada pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae*, apresenta sintomas nos ramos e frutos, percebe-se nos ramos um escurecimento que posteriormente se torna secamento, as lesões possuem cor parda e aspecto seco. Os sintomas podem iniciar em quaisquer partes dos ramos, provocando murcha e morte de toda a parte superior da planta, já nos frutos há a formação de manchas arredondadas e de cor marrom-claras, que se tornam pretas à medida que a doença evolui, na parte externa dos frutos observa-se a presença dos picnídios e na parte interna a polpa é tomada pelo micélio escuro do fungo e em seguida ocorre a mumificação dos frutos (PONTE,1993; VIANA *et al.*, 2000).

Podridão do colo do maracujazeiro - Em maracujazeiro a podridão do colo possui agente etiológico *Fusarium solani* (NIRENBERG; BRIELMAIER-LIEBETANZ, 1996), porém Bueno *et al.* 2014, descreveu este como uma nova *formae speciales*, os autores basearam-se em patogenicidade e na análise filogenética das regiões ITS-5.8S rDNA e TEF-1 α de oito isolados, sendo o agente etiológico renomeado para *F. solani* f. sp. *passiflorae*. A especialização de *Fusarium* a um hospedeiro permite sua classificação em *formae specialis* (f.sp.). Entretanto análises filogenéticas moleculares elucidaram que a maioria das *formae speciales* é representada por grupos não-monofiléticos. Outro, porém, é que o agrupamento em *formae speciales* pode encobrir a variabilidade genética das populações, as reais relações filogenéticas, distribuição geográfica e variedade de hospedeiro desses patógenos (BAAYEN *et al.*, 2000;

O'DONNELL *et al.*, 1998).

A doença conhecida como podridão do colo e raízes, é tida como uma das principais doenças que afetam o sistema radicular do maracujazeiro (SILVA *et al.*, 2014). A sintomatologia se principia com lesões no colo da planta, que evoluem até causarem podridões em todo o sistema radicular, refletindo na parte aérea na forma de murcha de ramos e amarelecimento, podendo causar a morte da planta (FISCHER *et al.*, 2010). Geralmente observa-se os sintomas em plantas adultas, entretanto em condições favoráveis, como alta temperatura e umidade e solos que já possuem histórico desta doença, as plantas mais jovens podem ser acometidas pelo patógeno (PONTE *et al.*, 1998). No colo, observa-se rachaduras e intumescimento da casca, exibindo coloração arroxeada nas bordas das lesões e sob alta umidade pode-se observar a formação de peritécios (FISCHER *et al.*, 2005). O fungo pode sobreviver no solo por muitos anos através de seus clamidósporos e a disseminação ocorre através de qualquer prática que resulte em movimentação do solo infestado, mudas infectadas também são responsáveis pela disseminação, estudos comprovaram que ferimentos possuem grande efeito no desenvolvimento da doença, outro fato importante sobre a doença é a interação da mesma com demais microrganismos e insetos que auxilia na disseminação, assim como o contato das raízes de plantas infectadas com raízes das plantas sadias (CEDEÑO *et al.*, 1990; FISCHER *et al.*, 2005; LIN; CHANG, 1985).

Murcha ou fusariose em maracujazeiro - Em maracujazeiros a murcha ou fusariose, tem como agente causal *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* - FOP, os sintomas iniciais podem ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta e são caracterizados pela murcha dos ramos ponteiros, as fases de florescimento e frutificação são as que apresentam o maior número de plantas com sintoma de murcha, a murcha proporciona à folha a perda da cor verde, assumindo assim o aspecto de cartucho. Se a planta já estiver produzindo frutos, estes também poderão apresentar sintomas de murcha. Subsequentemente, ocorre uma evolução para uma murcha generalizada das folhas que permanecem aderidas aos ramos. Em condições mais secas as cascas permanecem fixadas aos ramos, já em condições de alta umidade estas se destacam facilmente. Observa-se internamente nas plantas infectadas estrias de coloração ferrugem nos tecidos do lenho. A murcha é resultante do bloqueio dos vasos do xilema, que faz com que não haja absorção de água e nutrientes pelas raízes da planta (LARANJEIRA *et al.*, 2018; SANTOS FILHO *et al.*, 2004; SANTOS FILHO; SANTOS, 2003).

Em condições não favoráveis o FOP produz clamidósporos que garante a sobrevivência do mesmo, mesmo na ausência de hospedeiro (NELSON, 1981). Quando há presença de hospedeiro, sucede-se a liberação de compostos orgânicos radiculares, que podem estimular a

germinação de esporos que se encontravam em estado de dormência (SCHROTH; HILDEBRAND, 1964). O patógeno pode sobreviver de forma saprofítica sobre restos culturais e matéria orgânica (AGRIOS, 2005; DARIVA *et al.*, 2015).

A penetração nas raízes se dá por aberturas naturais e ferimentos causados por implementos agrícolas e por espécies de nematoides (FISCHER *et al.*, 2010; LIBERATO; COSTA, 2001). Após a penetração, a colonização prossegue, em graus variados, no córtex radicular (GORDON, 2017). A disseminação pode ocorrer dentro de uma mesma área de cultivo pela ação das chuvas e/ou irrigação e pelo contato de raízes infectadas com raízes sadias (AGRIOS, 2005; BEDENDO; AMORIM, 2011). A longas distâncias a disseminação ocorre por mudas infectadas (GUIMARÃES, 2015).

3. Semente como Veículo de Transmissão de Fitopatógenos

As sementes podem hospedar e transportar diversos microrganismos patogênicos, estes microrganismos podem ser divididos em dois grupos distintos. O grupo de armazenamento e o grupo de organismos de campo, sendo neste a predominância de espécies fitopatogênicas. Os fungos compreendem o maior número de espécies associadas a sementes, seguidos por bactérias, vírus e nematoides. Grande parte dos fungos fitopatogênicos podem ser transmitidos pelas sementes das plantas que os hospedam (CARVALHO *et al.*, 2011; LAZAROTTO *et al.*, 2010).

Sementes infectadas com fungos fitopatogênicos constituem uma grande ameaça a economia e aos campos de cultivo, sendo a prevenção da infecção de plantas por patógenos transmitidos via sementes crucial. Os eventos a respeito da transmissão de sementes para as plantas já foram elucidados (BAKER; SMITH, 1966). Carneiro (1987), observou que os danos causados por patógenos que são transmitidos por sementes afluem principalmente durante a germinação e/ou na formação de mudas.

Para os patógenos, a transmissão via sementes representa uma grande vantagem, pois este mecanismo além de garantir a sobrevivência a longo prazo, representa uma maior chance de infectar a progênie de seu hospedeiro e também de maximizar a disseminação a longas distâncias (VAN den BOSCH *et al.*, 2010).

Epidemiologicamente, a transmissão de patógenos via sementes representa um possível modo de infecção primária no qual os fitopatógenos podem iniciar as epidemias, uma vez que, a presença de uma quantidade pequena de propágulos infectados em muitos casos pode ser suficiente para a ocorrência de ataques severos (CAPPELLI, 2007; POCHON *et al.*, 2012).

O maracujazeiro é propagado, predominante por sementes e estas são suscetíveis a muitos patógenos (MACHAD, 1988; MCGEE, 1981; MENTEN, 1991; LIMA *et al.*, 2011; OLIVEIRA; PRATES JÚNIOR, 2011).

Há muitas investigações sobre a associação e disseminação de agentes fitopatogênicos pelas sementes em diferentes espécies vegetais, (CARDOSO *et al.*, 2006; LUCCA FILHO, 1985; SANTOS *et al.*, 2000;). Cerqueira *et al.* (2019), ao investigar os fungos associados as sementes de maracujazeiro encontraram importantes gêneros fitopatogênicos a cultura como *Fusarium*, *Lasioidiploidia*, *Cladosporium* e também fungos de armazenamento como *Penicillium* e *Aspergillus*.

4. Identificação de Espécies de *Fusarium*

Fusarium solani (Mart.) se destaca por ser patógeno de inúmeras culturas e possui mais de 20 *formae speciales* conhecidas. Análises de filogenia molecular denotam que *F. solani* engloba várias espécies filogenéticas distintas, dessa forma refere-se a esse grupo de fungos como complexo de espécies *Fusarium solani* – FSSC (O'DONNELL, 2000; O'DONNELL *et al.*, 2010). FSSC é composto por diversas espécies importantes como patógenos de várias plantas cultivadas, além de patógenos de humanos e de animais existem ainda algumas espécies produtoras de toxinas, endófitas e saprófitas (GERLACH; NIRENBERG, 1982; ZHANG *et al.*, 2006). As populações de FSSC são responsáveis por doenças em plantas economicamente importantes. Análises filogenéticas de sequências de DNA confirmaram que *F. solani* é um complexo de espécies maioritariamente crípticas, composto por pelo menos 47 espécies filogeneticamente distintas, anteriormente desconhecidas devido à semelhança morfológica entre elas (O'DONNELL, 2000; O'DONNELL *et al.*, 2010; SCHROERS *et al.*, 2016).

Neste complexo há algumas espécies que apresentam comportamento reprodutivo com populações homo e heterotáticas, ressalta-se assim que quando as populações apresentam reprodução sexuada, seja ela observada em campo ou induzidas em laboratório por via de cruzamentos, a distinção utilizando o conceito biológico de espécies é possível (COVERT *et al.*, 2007; MATUO; SNYDER, 1973). A variabilidade patogênica reflete em uma maior variabilidade genética de *F. solani*, que pode ser dividido em clados, o Clado 1 composto por isolados da Nova Zelândia, o Clado 2 abrange pelo menos oito espécies filogenéticas estão associadas a podridão vermelha na raiz da soja e a podridão radicular do feijoeiro, presentes no continente Americano, e o Clado 3 sendo este o mais diversificado de todos composto por isolados associadas ao solo, plantas e doenças humanas (O'DONNELL, 2000; O'DONNELL

et al., 2008).

FSSC é o mais importante na ocorrência de podridão de raízes, possuindo hifas septadas que formam um micélio branco-acinzentado, flocoso, variando de esparso a denso. Os microconídios produzidos são ovalados, uni ou bicelulares e formados em grande quantidade nas extremidades de microconidióforos. Os macroconídios são fusiformes, multiseptados formados a partir de conidióforos emergentes de esporodóquios e são em média quatro vezes maiores que os microconídios. As hifas produzem abundantemente clamidósporos ovais a globosos, com paredes lisas ou rugosas. São formados no ápice dos ramos laterais curtos ou intercalares à hifa e podem sobreviver no solo por vários anos (FISCHER *et al.*, 2005; LESLIE; SUMMERELL, 2006). Clamidósporo é uma estrutura que tem como função garantir a sobrevivência do fungo no solo sob as condições mais diversas. Esta estrutura é formada através da modificação de uma ou mais células hifa, a parede da hifa sofre um processo de espessamento resultante do desenvolvimento de uma parede interna secundária (MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011).

A fase sexuada possui peritécios onde se formam os ascos cilíndricos e formam oito ascósporos elipsoidais hialinos, que posteriormente adquirem coloração marrom-claro (BEDENDO, 2011). Ressalta-se que os ascósporos e os conídios do fungo são patogênicos.

Caracteriza-se por apresentar micélio extensivo e cotonoso, frequentemente produzindo coloração rósea, púrpura ou amarela no meio de cultura. Apresentam microconídios abundantes, geralmente unicelulares, ovoides, formados em conidióforos simples ou ramificados; e macroconídios também abundantes falcados e multiseptados; produzem clamidósporos. (BOOTH, 1971; NELSON *et al.*, 1983).

Ressalta-se que *F. oxysporum* também se trata de um complexo de espécies (FOSC), que é constituído por mais de 144 *formae speciales*. FOSC é o mais importante economicamente no gênero *Fusarium*, neste complexo de espécies estão inclusos isolados patogênicos (plantas, homens e animais) e não-patogênicos, além de estar em quinto lugar na lista dos fungos mais importantes científica e economicamente (DEAN *et al.*, 2012; GEISER *et al.*, 2013; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Historicamente, FOSC tem sido definido como um fungo assexual, embora vários estudos tenham indicado a possível presença de um ciclo sexual enigmático, a existência de uma fase sexuada é suportada também por estudos filogenéticos que incluíram FOSC dentro do clado de *Gibberella* (ARIE *et al.*, 2000; AOKI *et al.*, 2014; BAAYEN *et al.*, 2000; GORDON, 2017; O'DONNELL *et al.*, 2009; YUN *et al.*, 2000). Esses estudos também mostraram que FOSC exibe uma subestrutura filogenética complicada, indicativa de múltiplas espécies

críticas dentro deste complexo (GORDON; MARTYN, 1997; LAURENCE *et al.*, 2014). Fato que é comum aos outros complexos de espécies de *Fusarium*.

Segundo Both (1971), a morfologia dos esporos é uma característica relevante para a identificação de *Fusarium*. São taxonomicamente usados para se identificar as espécies: o comprimento dos macroconídios, o formato da célula basal, presença dos microconídios, tipo de célula conidiogênica (fiálide) e a presença ou ausência de clamidósporos (NELSON *et al.*, 1983).

A identificação do gênero envolve três conceitos de espécie: morfológica, baseada na similaridade dos caracteres morfológicos observáveis, denominados de marcadores morfológicos; biológica, baseado na compatibilidade sexual entre membros da mesma espécie; e a filogenética baseado na análise de sequências gênicas (O'DONNELL *et al.*, 2000; SUMMERELL *et al.*, 2003).

A combinação dos conceitos de espécie filogenética e morfologia é o mais usual para a distinção das espécies do gênero *Fusarium*. Segundo Leslie e Summerell (2006), para a filogenia se utiliza a amplificação de sequências de DNA de genes selecionados, através destes são construídos filogramas que fornecem informações sobre a variabilidade e relações evolutivas.

Baseados em diferenças sutis na morfologia e no alinhamento de sequências das regiões gênicas calmodulina (CmdA), segunda subunidade maior da RNA polimerase II dependente de DNA (RPB2), fator de alongação 1 - α (TEF1) e β -tubulina (Tub2), Lombard *et al.* (2019), propuseram a epitificação de *F. oxysporum* e descreveram 15 novas espécies. Segundo O'Donnel *et al.* (2015), as regiões TEF1 e RPB2 possuem maior confiabilidade e consistência para a delimitação de espécies, devido ao alto nível de polimorfismo da sequência e não possuem cópias não-ortólogas, outro ponto importante é que estas regiões são facilmente amplificadas para todas as espécies do gênero.

Sabendo-se que as doenças causadas por *Fusarium* spp. são as mais agressivas e causam as maiores perdas na cultura, além de possuírem difícil manejo por se tratarem de fungos de solo que possuem estruturas de resistência, o presente estudo busca i) investigar a presença de *Fusarium* spp. associados as sementes de maracujá; ii) isolar *Fusarium* spp. associados a sementes de maracujá; iii) fazer a identificação molecular dos isolados de *Fusarium* associados a sementes de maracujá e iv) avaliar a patogenicidade destes isolados em plântulas de maracujá.

5. Referências Bibliográficas

- AGRIOS, G.N. Diseases caused by fungal-like organisms. *In*: AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5.ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p. 404-414.
- AKAMINE, E. K., GIROLAMI, G. Problems in fruit set in yellow passion fruit. **Farm Science**, Hawaii, v.17, n.2, p.3-4, 1957.
- ALEXANDRE, R.S.; BRUCKNER, C.H.; LOPES, J.C. **Propagação do maracujazeiro: aspectos morfológicos, fisiológicos e genéticos**. Alegre: EDUFES, 2009. p.208.
- AOKI, T.; O'DONNELL, K.; GEISER, D.M. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. **Journal of General Plant Pathology**, Japan, v.80,p. 189–201,2014. DOI 10.1007/s10327-014-0509-3.
- ARIE, T; KANEKO, I.; YOSHIDA, T.; NOGUCHI, M.; NOMURA, Y.; YAMAGUCHI, I. Mating-type genes from asexual phytopathogenic ascomycetes *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. **Molecular Plant Microbe**, v.13. p. 1330–1339,2000. DOI: 10.1094/MPMI.2000.13.12.1330.
- BAAYEN, R.P.O.; DONNELL, K.; BONANTS, P.J.M.; CIGELNIK, E.; KROON, L.P.N.M.; ROEBROECK, E.J.A.; WAALWIJK, C. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic *formae speciales* causing wilt and rot disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 8, p.891-900, 2000. DOI: 10.1094/PHYTO.2000.90.8.891.
- BAKER, K.F.; SMITH, S.H. Dynamics of seed transmission of plant pathogens. **Annual Reviews Phytopathology**, v.14, p. 311-334, 1966. DOI:10.1146/annurev.py.04.090166.001523.
- BEDENDO, I. P.; AMORIM, L. Ambiente e doença. *In*: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. p.133-147.
- BEDENDO, I. P. Podridões de raiz e colo. *In*: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. p.443-449.
- BERNACCI, L.C. *Passifloraceae*. *In*: WANDERLEY, M.G.L; SHEPARD, G.J.; GUILIETTI, A.M. Melhem TS (coords) **Flora fanerogâmica do estado de São Paulo**. São Paulo: RiMa, FAPESP, 2003. p. 247-257.
- BRAGLIA, L.; BENEDETTI, L.; GIOVANNINI, A.; NICOLETTI, F.; BIANCHINI, C.; PIPINO, L.; MERCURI, A. In vitro plant regeneration as a tool to improve ornamental characters in *Passiflora* species. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.855, p.47-52, 2010. DOI: 10.17660/ActaHortic.2010.855.5.
- BRAGA, M.F.; JUNQUEIRA, N.T.V. **Produção de mudas de maracujá-doce**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2003, 28p. (Documentos, 93).
- BRAGA, M.F.; SANTOS, E.C.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SOUSA, A.A.T.C.; FALEIRO, F.G.;

- REZENDE, L.N.; JUNQUEIRA, K.P. Enraizamento de estacas de três espécies silvestres de *Passiflora*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.2, p.284-288, 2006. DOI: 10.1590/S0100-29452006000200029.
- BOOTH, C. **The genus *Fusarium***. Common wealth Mycological Institute, Surrey, United Kingdom.1971.
- BUENO, C.J.; FISCHER, I.H.; ROSA, D.D.; FIRMINO, A.C.; HARAKAVA, R.; OLIVEIRA, C.M.G.; FURTADO, E.L. *Fusarium solani* f. sp. *passiflorae*: a new *formae specialis* causing collar rot in yellow passion fruit. **Plant Pathology**. v. 63, p. 382-389,2014. DOI: 10.1111/ppa.12098.
- CAMILLO, E. Estudos sobre incremento da população dos polinizadores do maracujá (*Hymenoptera: Anthophoridae*). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.30, n.7, p.594, 1978.
- CAMPO-ARANA, R.O.; ESCOBAR-LOPEZ, F.M.; SEGURA-CEPEDA, L.E. Patogenicidad de cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* aisladas en distintos órganos de la planta de maracuyá amarillo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* O. Deg). **Fitopatología Colombiana**. v.39, p.41-44, 2015.
- CAPPELLI, C. Seeds: pathogen transmission through. *In: Encyclopedia of Plant and Crop Science*. Boca Raton. Florida: Taylor & Francis. p.1142–1147, 2007.
- CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. dos; MORAIS, M. H. **Deteção e controle de *Lasiodiplodia theobromae* em sementes de graviola (*Annona muricata* L.)**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 22 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 27).
- CARNEIRO, J.S. Teste de sanidade de sementes de essências florestais. *In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. Patologia de sementes*. Campinas: Cargill. p.363-393, 1987.
- CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO JÚNIOR, M.; SILVA, M.C. Controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in vitro e em sementes, e promoção de crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v.36, n.1, p.28-34, 2011. DOI: 10.1590/S1982-56762011000100004.
- CEDEÑO, L.; PRÜ, E.L.P.; MARQUES, N.J.; TAVIRA, M.E. *Nectria haematococca*, agente causal de la muerte repentina de la parchita em Venezuela. **Fitopatología Venezolana**, v. 3, p.15-18.1990.
- CEREDA, E. Perda de massa do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) durante o armazenamento sob condição ambiente. **Ciência e cultura**, v.26, n.1, p.7-11, 1976.
- CERQUEIRA, A.E.S.; LISBOA, M.S.; OLIVEIRA, C.I.F.; OLIVEIRA, M.Z.A.; OLIVEIRA, E.J.; BARBOSA, C.J. **Prospecção de fungos associados a sementes de maracujá amarelo no Estado da Bahia**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura,2019. 16 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/ Embrapa Mandioca e Fruticultura, 101).
- CERVI, A.C. *Passifloraceae* do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., Subgênero *Passiflora*. Departamento de Botânica. Universidade Federal do Paraná. **Fontqueria XLV**, Madrid. p. 4-6, 1997.

CERVI, A.C. O gênero *Passiflora* L. (*Passifloraceae*) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. **Adumbrationes ad Summae Editionem**, v. 16: p 1-5, 2006.

CORBET, S. A.; WILLMER, P. G. Pollination of the yellow passion fruit: nectar, pollen, and carpenter bees. **Journal of Agriculture Science**, v.95, n. 3, p. 655-666, 1980.

COVERT, S.F.; AOKI, T.; O'DONNELL, K.; STARKEY, D.; HOLLIDAY, A.; GEISER, D.M.; CHEUNG, F.; TOWN, C.; STROM, A.; JUBA, J.; SCANDIANI, M.M.; YANG, X.B. Sexual reproduction in the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium tucumaniae*. **Fungal Genetics and Biology**. v, 44, p. 799–807, 2007. DOI: 10.1016/j.fgb.2006.12.009.

CUNHA, M.A.P. BARBOSA, L.C., JUNQUEIRA, N.T.V., Espécies de maracujazeiro. In: LIMA, A.A., **Maracujá produção: aspectos técnicos**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e fruticultura, p.15- 28, 2002.

DARIVA, J. M.; XAVIER, A. A.; COSTA, M. R.; RIBEIRO, R. C. F.; SOUSA, T. V. Variabilidade genética de isolados de *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* associados ao maracujazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.37, p. 377-386, 2015. DOI: 10.1590/0100-2945-119/14.

DEAN, R.; VAN KAN, J.A.L.; PRETORIUS, Z.A.; HAMMOND- KOSACK, K.; DI PIETRO, A.; SPANU, P.D.; RUDD, J.J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G.D. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**. v.13.p. 414–430, 2012. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x.

DIAS, S.C.; TAKATSU, A. Ocorrência de bacteriose do maracujazeiro (*Passiflora* sp.) causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 2, p. 140, 1987.

ELLIS, R. H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? **Journal of Experimental Botany**. Cambridge, V.41, N.230, P. 1167-1174, Sept. 1990. DOI: 10.1093/jxb/41.9.1167.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; COSTA, A.M. **Ações de pesquisa e desenvolvimento para o uso diversificado de espécies comerciais e silvestres de maracujá** (*Passiflora* spp.). Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 26p. 2015 (Documentos, 329).

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; COSTA, A.M.; JESUS, O.N.; MACHADO, C.F. **MARACUJÁ: *Passiflora* spp.** Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). p. 31, 2017.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; JUNGHANS, T.G.; JESUS, O.N.; MIRANDA, D.; OTONI, W.C. Advances in passion fruit (*Passiflora* spp.) propagation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 41, n. 2. P. 1-17, 2019. DOI: 10.1590/0100-29452019155.

FISCHER, I. H.; LOURENÇO, S. A.; MARTINS, M. C.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Seleção de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da podridão do colo do maracujazeiro causada por *Nectria hematococca*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 250-258, 2005. DOI: 0.1590/S0100-41582005000300006.

FISCHER, I. H., ALMEIDA A. M.; FILETI, M. S.; BERTANI, M. A.; ARRUDA. M. C.;

BUENO, C. J. Avaliação de passifloraceas, fungicidas e *Trichoderma* para o manejo da podridão do colo do maracujazeiro, causada por *Nectria haematococca*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 709-717, 2010. DOI: 10.1590/S0100-29452010005000090.

FISCHER, I.H.; BUENO, C.J.; GARCIA, M.J.M.; ALMEIDA, A.M. Reação de maracujazeiro-amarelo ao complexo fusariose-nematoide de galha. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 223-227, 2010. DOI: 10.4025/actasciagron.v32i2.3445.

FUMIS, T.T., SAMPAIO, A.C., 2- Aspectos botânicos do maracujá doce (*Passiflora alata*). In: LEONEL, S., SAMPAIO, A.C., **Maracujá – Doce**: Aspectos técnicos e econômicos. – São Paulo: Editora UNESP, 2007.

FREITAS, J. C. O.; VIANA, A. P.; SANTOS, E. A.; SILVA, F. H. L.; PAIVA, C. L.; RODRIGUES, R.; SOUZA, M. M.; EIRAS, M. Genetic basis of the resistance of a passion fruit segregant population to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). **Tropical plant pathology**, v.40, n.5, p.291–297, 2015. DOI: 10.1007/s40858-015-0048-2.

GERLACH, W.; NIRENBERG, H. The genus *Fusarium* – a pictorial atlas. **Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem** v.209.p.1–406,1982.

GEISER, D.M.; AOKI, T.; BACON, C.W. One fungus, one name: Defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. **Phytopathology**. v.103.p.400–408,2013. DOI: 10.1094/PHYTO-07-12-0150-LE.

GILMARTIN, A. Post-fertilization, seed and ovary development in *Passiflora edulis* Sims. **Tropical Agriculture-Trinidad**, v. 35, p. 41-58. 1958.

GONZALES-BENITO, M.E.; AGUILA, N.; AVILA, T. Germination and embryo rescue from *Passiflora* species seeds post-cryopreservation. **CryoLetters**, Lewes, v.30, p.142-147, 2009.

GORDON, T.R.; MARTYN, R.D. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. **Annual Review of Phytopathology** v.35.p. 111–128,1997. DOI: 10.1146/annurev.phyto.35.1.111.

GORDON, T. R. *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* wilt syndrome. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, p. 23-39, 2017. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080615-095919.

GUIMARÃES, A. L. S. Prevalência, incidência e padrão espacial da fusariose do maracujazeiro no estado da Bahia. 2015. 115f. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.

GUZZO, F.; CEOLDO, S.; ANDREATTA, F.; LEVI, M. In vitro culture from mature seeds of *Passiflora* species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.61, p.108-113, 2011. DOI: 10.1590/S0103-90162004000100018

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Maracujá: área plantada e quantidade produzida. Brasília, 2019. (IBGE - Produção Agrícola Municipal). Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 07 out. 2020.

JESUS, O.N.; OLIVEIRA, E.J.; FALEIRO, F.G.; SOARES, T.L. 2015. **Descritores morfoagronômicos ilustrados para *Passiflora* spp.** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e

Fruticultura. p.66, 2015.

JOY, P.P. & C.G, SHERIN. **Diseases of passion fruit** (*Passiflora edulis*): Pathogen, Symptoms, Infection, Spread & Management.2012.

JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOG, E. A., STEVENS, P. F. & DONOGHUE, M. J. **Sistemática vegetal**: Um enfoque filogenético. Porto Alegre: Artmed.2009, p.632.

JUNQUEIRA, N.T. V.; LAGE, D. A.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R.; BORGES, T. A.; ANDRADE, S. R. M. de. Reação a doenças e produtividade de um clone de maracujazeiro-azedo propagado por estaquia e enxertia em estacas herbáceas de *Passiflora* silvestre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, p.97-100, 2006. DOI: 10.1590/S0100-29452006000100027.

KAVATI, R.; PIZA JUNIOR, C. T. **Cultura do maracujá-doce**. Campinas, 2002. p.10-12. (Boletim Técnico, 244).

LARANJEIRA, F.F.; LIMA, G.S.; SILVA LIMA, L.K.S.; GIRARDI, E.A.; JESUS, O.N. Fusariose do maracujazeiro: etiologia, epidemiologia e estratégias de manejo. In: Lopes, U.P. & Michereff, S.J. (Eds.) **Desafios do Manejo de Doenças Radiculares Causadas por Fungos**. Recife: EDUFRPE, 2018.p.(75-94).

LAURENCE, M.H.; SUMMERELL, B.A.; BURGESS, L.W.; LIEW, E.C.Y. Genealogical concordance phylogenetic species recognition in the *Fusarium oxysporum* species complex. **Fungal Biology**.v. 118.p.374–384,2014. DOI: 10.1016/j.funbio.2014.02.002.

LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. **The Fusarium laboratory manual**. 1st ed. Blackwell Publishing Ltd; Oxford, London: 2006.

LIBERATO, J. C.; COSTA, H. Doenças Fúngicas, Bacterianas e Fitonematoides. In: BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. (Eds.). **Maracujá**: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001, 472 p.

LIMA, A. DE A. Introdução. In: LIMA, A. de A. (Ed.). **Maracujá produção**: aspectos técnicos. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, p. 9, 2002. (Frutas do Brasil, 15).

LIMA, A. de A. **Maracujá**: produção e qualidade na passicultura. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 396p. 2004.

LIMA, A. de A.; BORGES, A. L.; FANCELLI, M.; CARDOSO, C. E. L. Maracujá: sistema de produção convencional. In: PIRES, M. de M.; JOSÉ, A. R. S.; CONCEIÇÃO, A. O. da (Org.). **Maracujá**: avanços tecnológicos e sustentabilidade. Ilhéus: Editus, 2011. p. 203-237.

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. DOI: 10.3767/persoonia.2019.43.01.

LOPES, J.C.; BONO, G.M.; ALEXANDRE, R.S.; MAIA, V.M. Germination and vigor of passion fruit seeds in different estages of fruit maturation, substrate and presence or the aril. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.5, p.1340-1346, 2007. DOI: 10.1590/S1413-70542007000500010.

- LÓPEZ-VARGAS, J.H.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.Á.; VIUDA-MARTOS, M. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. **Food Research International**, v.51, p.756-763, 2013. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.01.055.
- LUCCA FILHO, O. A. Importância da sanidade na produção de sementes de alta qualidade. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 7, n. 1, p. 113-124, 1985.
- LIN, Y.S.; CHANG, H.J. Collar rot of passion fruit possibly caused by *Nectria haematococca* in Taiwan. In: PARKER, C.A.; ROVIRA, A.D.; MOORE, K.J.; WONG, P.T.W.; KOLLMORGEN, J.F. (Eds) Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens, **APS Press**, St Paul, Minnesota, p. 41-45, 1985.
- MACDOUGAL, J. M. & FEUILLET, C. Systematics. p.27–31. In: ULMER, T. & J. M. MACDOUGAL, J.M. (Eds.). *Passiflora*: Passion flowers of the world. Cambridge: **Timber Press**, 2004.
- MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília ESAL/FAEPE, 1988, p. 107.
- MACHADO, C.F.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; JESUS, O.N.; ARAÚJO, F.P.; GIRARDI, E.A. **A enxertia do maracujazeiro: técnica auxiliar no manejo fitossanitário de doenças do solo**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura.p.15, 2015. (Circular Técnica, 116).
- MANOEL, L. Pós-Colheita. In: LEONEL, S., SAMPAIO, A.C., **Maracujá – Doce: Aspectos técnicos e econômicos**. – São Paulo: Editora UNESP, 2007.
- MASSOLA JÚNIOR, N. S.; KRUGNER, T. L. Fungos Fitopatogênicos. In: L. Amorim, J. A. M. Rezende, A. Bergamin Filho. (Org.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. São Paulo: Ceres v.1 ,2011. p. 149-206.
- MATUO, T.; SNYDER, W.C. Use of morphology and mating populations in the identification of *formae speciales* in *Fusarium solani*. **Phytopathology**. v.63. p. 562– 565,1973. DOI: 10.1094/Phyto-63-562.
- McGEE, D. C. Seed pathology: its place in modern seed production. **Plant Disease**, St. Paul, v. 65, n. 8, p. 638-642, 1981.
- MELETTI, L. M. M.; NAGAI, V. Enraizamento de estacas de sete espécies de maracujazeiro (*Passiflora* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.14, n.2, p.163-168, 1992.
- MENTEN, J. O. M. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: Editora ESALQ, 1991, p. 321.
- MONDIN, C.A.; CERVI, A.C.; MOREIRA, G.R.P. Sinopse das espécies de *Passiflora* L. (*Passifloraceae*) do Rio Grande do Sul, Brasil. **Brazilian Journal of Biosciences**. v. 9, p. 3-27, 2011.
- NELSON, P. E.; TOUSON, T. A.; MARASSAS, W.F.O. *Fusarium species, an illustrated*

manual for identification. University Park: Pennsylvania State University Press, 1983, p.193.

NIRENBERG, H.I. & BRIELMAIER-LIEBETANZ, U. *Nectria ipomoeae* Halst., anamorph: *Fusarium striatum* Sherb. on *Passiflora edulis* Sims. **Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienstes**, v. 48, p.270–275, 1996.

NISHIDA, T. Pollination of the passion fruit in Hawaii. **Journal Economic Entomology**.v.51, n.2, p.146-149, 1958.

NUNES, T.S.; QUEIROZ, L.P. A família *Passifloraceae* na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus**, v. 1, n.1, p. 33-46, 2001.

O'DONNELL, K.; KISTLER, H.C.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R.C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, USA 95, p.2044–2049, 1998.

O'DONNELL, K. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, Lawrence, v. 92, n. 5, p. 919-938, 2000. DOI: 10.1080/00275514.2000.12061237.

O'DONNELL, K.; SUTTON, D.A.; FOTHERGILL, A.; MCCARTHY, D.; RINALDI, M.G.; BRANDT, M.E.; ZHANG, N.; GEISER, D.M. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. **Journal Clinical Microbiology**. v.46.p. 2477-2490, 2008. DOI: 10.1128/JCM.02371-07.

O'DONNELL, K.; GUEIDAN, C.; SINK, S.; JOHNSTON, P.R.; CROUS, P.W.; GLENN, A.; RILEY, R.; ZITOMER, N.C.; COLYER, P.; WAALWIJK, C.; VAN DER LEE, T.; MORETTI, A.; KANGS.; HYE-SEON, K.; GEISER, D.M.; JUBA, J.H.; ROBERT, P.; BAAYEN, M.G.; CROMEY, S.B.; SUTTON, AD.; SKOVGAARD, K.; PLOETZ, R.; KISTLER, C.H.; ELLIOTT, M.; DAVIS.M.; SARVER, B.A.J. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. **Fungal Genetics and Biology**. v.46. p. 48-936,2009. DOI: 10.1016/j.fgb.2009.08.006.

O'DONNELL, K.; SUTTON, D.A.; FOTHERGILL, A.; MCCARTHY, D.; RINALDI, M.G.; BRANDT, M.E.; ZHANG, N.; GEISER, D.M. Molecular phylogenetic diversity: multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. **Journal Clinical Microbiology**. v.46. p. 2477–2490, 2010. DOI: 10.1128/JCM.02371-07.

O'DONNELL, K.; WARD, T.J.; ROBERT, V.A.R.G.; CROUS, P.W.; GEISER, D.M.; SEOGCHAN, K. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. **Phytoparasitica** v.43. p. 583–595, 2015. DOI: 10.1007/s12600-015-0484-z.

OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B.; VASCONCELLOS, L.A.B.C. Avaliação de mudas de maracujazeiro em função do substrato e do tipo de bandeja. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.50, n.2, p.261- 266, 1993.DOI: 10.1590/S0103-90161993000200014.

OLIVEIRA, M. Z. A. de; PRATES JÚNIOR, P. Sementes sadias: um meio de reduzir perdas agrícolas. **Revista Bahia Agrícola**, Salvador, BA, v. 9, n. 1, p. 28-31, 2011.

OZAROWSKI, M.; THIEM, B. Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.23, p.937-947, 2013. DOI: 10.1590/S0102-695X2013000600011.

PANTANO, S.C., 4- Propagação. In: LEONEL, S., SAMPAIO, A.C., **Maracujá – Doce: Aspectos técnicos e econômicos.** – São Paulo: Editora UNESP, 2007.

PARMESSUR, Y.; ALJANABI, S.; SAUMTALLY, S.; DOOKUN-SAUTALLY, A. Sugarcane yellow leaf virus and sugarcane yellows phytoplasma: elimination by tissue culture. **Plant Pathology**, New Delhi, v.51, p.561-566, 2002. DOI: doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00747.x.

PRAMMANEE, S.; THUMJAMRAS, S.; CHIEMSOMBAT, P.; PIPATTANAWONG, N. Efficient shoot regeneration from direct apical meristem tissue to produce virus-free purple passion fruit plants. **Crop Protection**, Oxford, v.30, p.1425-1429, 2011. DOI: 10.1016/j.cropro.2011.07.008.

PIPINO, L.; BRAGLIA, L.; GIOVANNINI, A.; FASCELLA, G.; MERCURI, A. In vitro regeneration of *Passiflora* species with ornamental value. **Propagation of Ornamental Plants**, Sofia, v.8, p.47-49, 2008.

POCHON, S.; TERRASSON, E.; GUILLEMETTE, T.; IACOMI VASILESCU, B.; GEORGEAULT, G.; JUCHAUX, M.; BERRUYER, R.; DEBEAUJON, I.; SIMONEAU, P.; CAMPION, C. The *Arabidopsis thaliana-Alternaria brassicicola* pathosystem: A model interaction for investigating seed transmission of necrotrophic fungi. **Plant Methods**. p. 8-16, 2012. DOI: 10.1186/1746-4811-8-16.

PONTE, J.J. As doenças do maracujá-amarelo no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.15, n.2, p.11-14, 1993.

RODRÍGUEZ, M.; NIÑO, N. Archivos de diagnóstico en laboratorio 2000-2009. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia - Universidad Jorge Tadeo Lozano, 2009.

RONCATTO, G.; NOGUEIRA FILHO, G.C., RUGGIERO, C., OLIVEIRA, J.C.; MARTINS, A.B.G. Rooting of herbaceous cutting of different passion fruit plant species. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.4, p.1094-1099, 2008. DOI: 10.1590/S0100-29452008000400041.

RUGGIERO, C. Enxertia do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A. R.; FERREIRA, F. R.; VAZ, R. L. (Ed.). **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991, p.43-60.

RUGGIERO, C.; SÃO JOSÉ, A.R.; VOLPE, C.A.; OLIVEIRA, J.C.; DURINGAN, J.F.; BAUMGARTNER, J.C.; SILVA, J.R.; NAKAMURA, K.; FERREIRA, M.E.; KAVATI, R.; PEREIRA, V.P. 1996. **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília: Embrapa SPI, 1996. 64p. Publicações Técnicas Frupex, 19.

SANTOS, A. A. dos; CARDOSO, J. E.; FREIRE, F. C. O. **Fungos associados a sementes de graviola e de ateira no Estado do Ceará**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2000. 11 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Boletim de Pesquisa, 33).

SANTOS FILHO, H. P.; SANTOS, C. C. F. In: SANTOS FILHO, H. P.; JUNQUEIRA, N. T.

V. (Eds.). **Maracujá: fitossanidade**. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica, 2003, p. 12-21.

SANTOS FILHO, H. P.; LARANJEIRA, F. F.; SANTOS, C. C. F.; BARBOSA, C. J. Doenças do maracujazeiro. In: LIMA, A. A.; CUNHA, M. A. P. (Eds.). **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004, p. 239-280.

SANTOS, F.C.; RAMOS, J.D.; PASQUAL, M.; REZENDE, J.C.; SANTOS, F.C.; VILLA, F. Micropropagação do maracujazeiro do sono. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v.57, p.112-117, 2010. DOI: 10.1590/S0034-737X2010000100018.

SANTOS, T.M.; FLORES, P.S.; OLIVEIRA, S.P.; SILVA, D.F.P.S.; BRUCKNER, C.H. Tempo de armazenamento e métodos de quebra de dormência em sementes do maracujá-de-restinga. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, Viçosa, MG, v.2, n.1, p.26-31. 2012.

SCHROTH, M. N.; HILDEBRAND, D. C. Influence of plant exudates on root-infecting fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 2, p. 101-132, 1964. DOI: 10.1146/annurev.py.02.090164.000533.

SCHROERS, H.J.; GARY, J.; SAMUELS, N.Z.; DYLAN P.G.; SHORT, J.J.; GEISER, D.M. Epitypification of *Fusisporium (Fusarium) solani* and its assignment to a common phylogenetic species in the *Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, v.108.p.806-819, 2016. DOI: 10.3852/15-255.

SILVA T.V.; RESENDE, E.D.; VIANA, A.P.; ROSAS, R.C.C.; PEREIRA, S.M.F.P.; CARLOS, L.A.; VITORAZI, L. Influência dos estádios de maturação na qualidade do suco de maracujá-amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, p. 472-475, 2005.

SILVA, A.N.; AZEVEDO, G.B.; ROCHA SOBRINHO, G.G.; NOVAES, Q.S. Efeito de produtos químicos e de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium solani* do maracujazeiro. **Interciencia**, v. 39, n. 6, p. 398, 2014.

SIMMONDS, J.H. Powdery spot and fruit scab of the passion vine. **Queensland Agricultural Journal**, Brisbane, v.38, n.2, p.143-152, 1932.

SIPSA - Sistema de Información de Precios y Abastecimientos del Sector Agropecuario. (2014). Antracnosis, importancia y manejo integrado en el cultivo de tomate de árbol (*Cyphomandra betaceae*). Disponível em:

<https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/insumos_factores_de_produccion_ene_2014.pdf>. Acesso em: 08 de out 2020.

SOUSA, M.A.; PIRES, M.C.; PEIXOTO, J.R.; FALEIRO, F.G.; BLUM, L.E. Reação deprogênes de maracujazeiro azedo à antracnose. **Bioscience Journal**.v.30, p.563-570, 2014.

SPADOTTI, D.M.A.; BELLO, V.H.; FAVARA, G.M.; STANGARLI, O.S.; KRAUSE-SAKATE, R.; REZENDE, J.A.M. *Passiflora edulis*: new natural host of *Melochia yellow mosaic virus* in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 14, n. 23, 2019. DOI: 10.1007/s13314-019-0354-5.

SUMMERELL, B.A.; SALLEH, B.; LESLIE, J.F. An utilitarian approach to *Fusarium*

identification. **Plant Disease**, St. Paul, v.87, n. 2, p. 117-128, 2003. DOI: 10.1094/PDIS.2003.87.2.117.

SUSSEL, A. A. B. **Estudo da Epidemiologia da Verrugose do-Maracujazeiro**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 33p. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 327,2015.

TEIXEIRA, C.G. Cultura. *In*: Teixeira, C.G.; Castro, J.V.; Tocchini, R.P.; Nisida, A.L.A.C.; Hashizume, T.; Medina, J.C.; Turatti, J.M.; Leite, R.S.S.F.; Bliska, F.M.M.; Garcia, A.E.B.C. (Eds.) **Maracujá: cultura, matéria prima, processamento e aspectos agronômicos**. Campinas: Instituto Tecnologia de Alimentos, 1994, p. 1-142.

ULMER, T. E MACDOUGAL, J.M. **Passiflora: passion flowers of the world**. Portland: TimberPress, 2004, p.430.

VAN den BOSCH, F.; FRAAIJE, B.A.; VAN DEN BERG, F.; SHAW, M.W. Evolutionary bistability in pathogen transmission mode. **Proceedings. Biological sciences/The Royal Society**.v.277. p.1735–1742,2010. DOI: 10.1098/rspb.2009.2211.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. 3. Ed. Cambridge: MIT Press, 2000.

VASCONCELLOS, M.A.S., Biologia Floral do maracujazeiro doce (*Passiflora alata*) nas condições de Botucatu/SP. 1991, 99f. **Dissertação** (Mestrado Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1991.

VAZ, C. F.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; SANTOS, E.C.; FONSECA, K.G.; JUNQUEIRA, K.P. Enraizamento de espécies silvestres de maracujazeiro utilizando cinco doses de ácido indolilbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.31, n.3, p.816-822, 2009.DOI: 10.1590/S0100-29452009000300027.

VIANA, F.M.P.; DOS SANTOS, A.A.; SOBRINHO, C.A.; FREIRE, C.O.; CARDOSO, J.E. Podridão preta dos frutos do maracujazeiro em plantios comerciais no Nordeste brasileiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.453, 2000.

VIANA, F.M.P.; FREIRE, F.C.O.; CARDOSO, J.E.; VIDAL, J.C. **Principais Doenças do Maracujazeiro na Região Nordeste e seu Controle**. Comunicado Técnico, n. 86. Fortaleza, CE. Outubro, 2003.

VIANA, C. A. D. S.; PIRES, M. D. C.; PEIXOTO, J. R.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BLUM, L. E. B. Resistência parcial de genótipos de maracujá-azedo à virose do endurecimento do fruto (*Cowpea Aphid Borne Mosaic Virus* CABMV). **Bioscience journal** (Online), v.30, n.3, p.338-345, 2014.

YUN, S.H.; ARIE, T.; KANEKO, I. et al. Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and asexual *Gibberella/Fusarium* species. **Fungal Genetics and Biology**.v. 31. p. 7–20,2000. DOI: 10.1006/fgbi.2000.1226.

WAGNER JÚNIOR, A.; ALEXANDRE, R.S.; NEGREIROS, J.R.D.S.; PIMENTEL, L.D., SILVA, J.O.D.C.; BRUCKNER, C. H. Effects of substrate on germination and initial growth of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.4, p.643-647, 2006. DOI: 10.1590/S1413-70542006000400008.

ZHANG, N.; O'DONNELL, K.; SUTTON, D.A.; NALIM, F.A.; SUMMERBELL, R.C.; PADHYE, A.A.; GEISER, D.M. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. **Journal Clinical Microbiology**. v.44.p.2186–2190,2006. DOI: 10.1128/JCM.00120-06.

CAPÍTULO II

Espécies de *Fusarium* Associadas a Sementes de Maracujá

Submissão: **Plant Pathology**

Qualis CAPES (Ciências Agrárias I) = A1

Espécies de *Fusarium* Associadas a Sementes de Maracujá

Athaise Ferreira de Lima¹, Erasmo Ribeiro da Paz Filho¹, Marcos Paz Saraiva Câmara¹, Willie Anderson dos Santos Vieira¹, Alexandre Reis Machado², Humberson Rocha Silva¹, André Ângelo Medeiros Gomes¹.

1 Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE;

2 Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

RESUMO

O maracujazeiro amarelo *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* é originário do Brasil. Seu fruto possui grande aceitação no mercado interno e externo, podendo ser consumido *in natura* ou processado na forma de sucos e geleias. Além disso, possui muitas propriedades funcionais e medicinais. Um dos métodos mais utilizados para propagar cultivares de maracujazeiro é por meio de sementes. Porém, essas mesmas sementes podem atuar como disseminadoras de importantes fitopatógenos para a cultura. Dentre os patógenos difundidos pelas sementes destacam-se o *Fusarium* spp. O presente estudo visou investigar a presença de *Fusarium* spp. associados a sementes de maracujá, isolar *Fusarium* spp., realizar a identificação molecular dos isolados de *Fusarium* obtidos e avaliar a patogenicidade destes isolados em plântulas de maracujá. Para investigar a presença de fungos fitopatogênicos associados a sementes de maracujá foi realizado *Blotter* teste em diferentes lotes de sementes de *P. edulis* f. *flavicarpa*; avaliou-se a incidência de gêneros fúngicos nas sementes e quando ocorreu o gênero *Fusarium* procedeu-se o isolamento. A identificação a nível de gênero foi realizada através de comparações morfológicas dos fungos observados. Para o gênero *Fusarium* a identificação molecular dos isolados foi realizada por meio de Blast e filogenia com emprego das regiões RPB2 e TEF1. Teste de patogenicidade para os isolados de *Fusarium* foi realizado, neste ensaio foram testadas duas metodologias de inoculação, *dipping* e palito, em duas cultivares, Sol e Redondo Amarelo. Foram encontrados os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Colletotrichum*, *Paecilomyces*, *Cladosporium* e *Fusarium*. Obteve-se 24 isolados de *Fusarium* e com o uso de ferramentas moleculares e a utilização das regiões gênicas RPB2 e TEF1, foi possível discriminar os mesmos como pertencentes aos complexos de espécies *F. oxysporum* e *F. incarnatum-equiseti*. Para o complexo *F. oxysporum* realizou-se a construção da árvore filogenética utilizando a interferência bayesiana, os isolados FS05, F6, FSDr7, F19 se agruparam no mesmo clado com as espécies *F. fabacearum*, *F. callistephi*, os isolados FS02 e FS03 se agruparam no mesmo clado com as espécies *F. veterinarum*, *F. contaminatum*, *F. pharetrum*. Para a variável Incidência não foi constada diferença significativa ($P > 0.05$) entre os isolados quando inoculados via palito de dente, o isolado FS01 quando inoculado por *dipping* diferiu dos demais isolados também inoculados por este método. A cultivar Redondo Amarelo apresentou a maior incidência da doença. E a inoculação via palito colonizado proporcionou o maior tamanho de lesão nas plântulas.

Palavras-chaves: FOOSC; *Passiflora edulis*; FIESC

1 INTRODUÇÃO

O maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) é originário do Brasil e se trata da principal espécie cultivada de *Passiflora* no país. O fruto possui grande aceitação no mercado interno e no mercado internacional devido aos seus múltiplos usos, desde o consumo *in natura*, sucos e geleias até matéria-prima com propriedades funcionais e medicinais nas indústrias de alimentos, condimentos, cosméticas e farmacêuticas (FALEIRO *et al.*, 2015; YOCKTENG *et al.*, 2011).

As variedades comerciais são propagadas principalmente via sementes, este tipo de propagação tem como vantagens o processo simples de formação de mudas e uma logística mais facilitada para transporte e comercialização. Plantas oriundas de sementes são geneticamente distintas o que contribui para diminuição de problemas como a dificuldade de polinização e a fecundação cruzada, além da relevância deste tipo de propagação no melhoramento e na manutenção de recursos genéticos (FALEIRO *et al.*, 2019).

Entretanto as sementes são eficientes modos de introdução e disseminação de patógenos em novas áreas. Danos decorrentes da associação fitopatógeno com sementes não se limitam as perdas diretas da população em campo, mas envolvem outras implicações, que podem ocasionar sérios danos em todo o sistema de produção (AGUIAR *et al.*, 2001; MACHADO,1994; MARCOS FILHO, 2001).

Os patógenos podem causar inúmeros danos as sementes, dentre eles a morte em pré-emergência, podridão, tombamentos de mudas, manchas necróticas em folhas, caules e frutos, deformações, interferindo no vigor das plântulas e no stand inicial (NEEGAARD,1977).

Sementes infectadas com fitopatógenos são uma grande ameaça a economia e aos campos de cultivo. Existem vários estudos sobre a patogenicidade de isolados fúngicos associados a sementes de diversas plantas de interesse agrônômico e florestal (PARISI; OLIVEIRA, 2006; BENETTI *et al.*, 2009; BOTELHO *et al.*, 2008; LAZAROTTO *et al.*, 2010; LISBÔA-PADULLA *et al.*, 2010; REGO *et al.*, 2012). Alguns gêneros já foram detectados em sementes de maracujá como *Cladosporium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Colletotrichum* (FISCHER; REZENDE, 2008).

Entre os fitopatógenos que podem estar vinculados as sementes de maracujá destacam-se as espécies pertencentes aos complexos *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, *Fusarium nirenbergiae* (sinonímia - *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*) é responsável pela murcha do maracujazeiro, doença que pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta. O fungo penetra na planta através de ferimentos ou aberturas naturais nas raízes, coloniza os vasos

35 do xilema promovendo sintomas de murcha, podendo provocar a morte da planta
36 (AGRIOS,2005; VIANA *et al.*,2013). *Fusarium solani* - ocasiona a doença conhecida como
37 podridão do colo e raízes, é uma das principais doenças que afetam o sistema radicular do
38 maracujazeiro (SILVA *et al.*, 2014). Esta doença está presente em várias regiões produtoras do
39 Brasil, causando grande mortalidade de plantas (FISCHER *et al.*, 2005). O manejo das doenças,
40 causadas por espécies de *Fusarium* em maracujazeiro, é dificultoso, principalmente por essas
41 espécies produzirem estruturas de resistência (clamidósporos) que ficam viáveis por longos
42 períodos mesmo na ausência do hospedeiro.

43 Sabendo que *Fusarium* spp. causam doenças que são limitantes a passicultura e que a
44 propagação via sementes é um método comum no cultivo de maracujá, objetivou-se com este
45 estudo i) investigar a presença de *Fusarium* spp. associados as sementes de maracujá; ii) isolar
46 *Fusarium* spp. associados a sementes de maracujá; iii) fazer a identificação molecular dos
47 isolados de *Fusarium* associados a sementes de maracujá; iv) avaliar a patogenicidade destes
48 isolados em plântulas de maracujá.

49

50 **2 MATERIAL E MÉTODOS**

51

52 Frutos de *P. edulis* f. *flavicarpa* maduros foram coletados em centrais de abastecimento
53 CEASA-PE e encaminhados ao Laboratório de Patologia Pós-Colheita da Universidade Federal
54 Rural de Pernambuco.

55

56 **2.1 Teste de Sanidade das Sementes**

57

58 Os frutos foram lavados com detergente em água corrente e desinfestados com
59 hipoclorito de sódio a 1% por cinco minutos e novamente lavados em água corrente, então estes
60 foram seccionados transversalmente e a polpa contendo sementes, mucilagem e restos
61 placentários retirada com auxílio de uma colher, o material obtido foi homogeneizado e dividido
62 em três partes iguais. Duas dessas partes tiveram o arilo (capa de constituição gelatinosa, rica
63 em pectina, que envolve completamente as sementes) removido de forma manual com
64 fricção sobre peneira e água corrente até a limpeza total (OSIPI, 2011). Em uma dessas partes
65 de arilo removido foi realizada uma desinfestação com imersão a hipoclorito de sódio 1% por
66 três minutos (BRASIL, 2009).

67 Para investigar os fungos associados as sementes, foi realizado o teste em substrato de
68 papel (*Blotter* teste). Este foi constituído por três tratamentos: sementes com arilo e sem

69 desinfestação; sementes sem arilo e desinfestadas, e sementes sem arilo e sem desinfestação.
70 Para a análise, utilizou-se de 400 sementes em cada lote investigado, divididas em 16 caixas do
71 tipo Gerbox, nas quais as sementes foram dispostas individualmente sobre a camada de papel
72 filtro umedecido (2 folhas de papel mata borrão), mantendo-se distanciadas 1-2 cm uma das
73 outras.

74 As caixas contendo as sementes permaneceram sob lâmpadas de luz fluorescente
75 branca, em fotoperíodo de 12 horas (temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$). Observou-se diariamente cada
76 semente com o auxílio de um estereomicroscópio, para monitorar a ocorrência de frutificações
77 típicas do crescimento de fungos nas sementes, sendo os mesmos características importantes
78 para auxiliar na identificação fúngica. Quando observada a presença de estruturas fúngicas nas
79 sementes, realizou-se preparações microscópicas para essas estruturas. Os fungos foram
80 identificados a nível de gênero, com auxílio de chaves dicotômicas. Para isolados que
81 apresentaram características morfológicas inerentes ao gênero *Fusarium* como a presença de
82 macroconídios, microconídios, presença ou ausência de clamidósporos, células conidiogênicas
83 fialídicas, procedeu-se o isolamento direto em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA). Os isolados
84 foram preservados em método de Castellani (FIGUEIREDO, 1967) e acondicionados em
85 geladeira a 4°C .

86 O *Blotter* teste foi realizado por seis vezes com lotes distintos de sementes de *P. edulis*
87 *f. flavicarpa*, os gêneros fúngicos foram quantificados e os resultados obtidos foram expressos
88 em percentual (BRASIL, 2009).

89

90 **2.2 Identificação dos Isolados**

91

92 A identificação a nível de espécie dos isolados pertencentes ao gênero *Fusarium* foi
93 através do uso de sequências de DNA, informativas para estudos comparativos de evolução de
94 espécies do gênero.

95 Os isolados foram cultivados em meio BDA por sete dias, a biomassa foi raspada com
96 lâmina de vidro esterilizada, depositada em cadinho congelada e macerada com pistilo, então
97 posteriormente transferida para tubo Eppendorf de 1,5 mL. Para a realização da extração
98 seguiu-se o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1990) com adaptações.

99 As amostras de DNA após a extração foram submetidas à Reação da Polimerase em
100 cadeia (P.C.R.), para amplificação das regiões: RPB2- segunda maior subunidade da RNA
101 polimerase II e fator de alongamento da tradução 1-alfa (TEF1), os primers utilizados foram
102 para RPB2-5f (GGGGWGAYCAGAAGAAGGC) e RPB2-7rb

103 (CCCATRGCTTGYTTRCCCAT), EF1T (ATGGGTAAGGARGACAAGAC e EF2T
104 (GGARGTACCAGTSATCATG) para TEF1, (O'DONNELL *et al.*, 2008). Executou-se as
105 reações da PCR em termociclador modelo AUT. CAP. 96X0, 2ML2720 da Applied
106 Biosystems®, sob as mesmas condições para ambos os primers: 95°C por 3 minutos, seguido
107 de 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, 53°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos e a
108 incubação final pelo período de 10 minutos na temperatura de 72°C. Os fragmentos
109 amplificados foram separados por gel de agarose a 1,5% em tampão (1-Tris- ácido acético
110 EDTA (TAE) corado com Sybr gold e fotografados sob luz ultravioleta. Para a purificação dos
111 produtos da PCR utilizou-se a precipitação com acetato de amônio e etanol, após a purificação,
112 as amostras foram novamente separadas em gel de agarose a 1,5% em tampão (1-Tris – ácido
113 acético EDTA (TAE) corado com Sybr gold e visualizadas sob luz ultravioleta com o objetivo
114 de confirmar a purificação. O sequenciamento foi realizado na Plataforma de Sequenciamento
115 do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco.

116 As sequências de nucleotídeos foram editadas manualmente no software BioEdith
117 (HALL, 2014) e foram submetidas a análise na Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)
118 do banco de dados Fusarium ID. Sequências que apresentaram alta similaridade para cada loco
119 foram retiradas juntamente com representantes de cada espécie para o complexo em estudo. As
120 sequências obtidas neste trabalho e as extraídas do GenBank - NCBI (National Center for
121 Biotechnology Information) foram alinhadas usando a ferramenta MUSCLE (EDGAR, 2004)
122 e corrigidas manualmente utilizando o programa MEGA X (KUMAR *et al.*,2018).

123 Para os isolados pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium oxysporum* foram
124 realizadas interferência bayesiana com uso de dados concatenados das regiões RPB2 e TEF1.
125 As análises filogenéticas foram realizadas no web portal CIPRES (MILLER *et al.*, 2010)
126 utilizando o MrBayes v 3.2 (RONQUIST *et al.*,2012), baseado na cadeia de Markov Monte
127 Carlo (MCMC) com 10.000.000 gerações, usando o modelo de substituição de nucleotídeo
128 informado por Akaike Information Criterion (AIC) no software MrModeltest v .2.3 (POSADA
129 & CRANDALL,1998). As árvores foram amostradas a cada 1000 gerações, descartando 25%
130 de todas as árvores obtidas. A probabilidade posterior (RANNALLA & YANG, 1996) foram
131 determinadas a partir da árvore de maior consenso entre as árvores remanescentes.

132

133 **2.3 Teste de Patogenicidade**

134

135 Para o teste de patogenicidade foram utilizadas sementes de duas cultivares de *P. edulis*
136 f. *flavicarpa*, a cultivar A (maracujá sol da marca comercial Feltrin®) e a cultivar B (maracujá

137 redondo amarelo da marca comercial Isla®), sementes de ambas as cultivares foram
138 escarificadas e depositadas em bandejas de 200 células contendo substrato previamente
139 autoclavado, em cada célula depositou-se uma semente e as mesmas foram irrigadas
140 diariamente para que o substrato se mantivesse úmido. As plantas foram consideradas aptas
141 para a inoculação após 30 dias de semeadura.

142 Isolados representativos foram selecionados para o teste de patogenicidade, onde
143 utilizou-se de dois métodos de inoculação *dipping* e palito de dente colonizado, em duas
144 cultivares diferentes, Sol e Redondo Amarelo.

145

146 2.3.1 Inoculação em Raízes por *Dipping*

147

148 Para a inoculação através de *dipping*, os isolados foram cultivados em erlenmeyers
149 contendo meio Batata Dextrose (B.D) por sete dias. Para a preparação da solução de conídios
150 filtrou-se o conteúdo dos erlenmeyers em quatro camadas de gaze esterilizada e utilizou-se a
151 câmara de Neubauer para contagem de conídios, ajustou-se a concentração de esporos para
152 3×10^5 conídios ml^{-1} . Em seguida, as plântulas tiveram suas raízes lavadas e com auxílio de uma
153 tesoura esterilizada cada raiz foi cortada com o intuito de padronizá-las ao tamanho de 5 cm.
154 Com uma esponja abrasiva realizou-se ferimentos nessas raízes e em seguida as mesmas foram
155 imersas na suspensão de conídios pelo período de 15 minutos e logo após transplantadas em
156 vasos de 0,5 L contendo substrato comercial autoclavado. O tratamento controle foi constituído
157 de raízes com ferimentos e corte mergulhadas apenas em água destilada, metodologia adaptada
158 de McKnight (1951).

159 A observação dos sintomas foi realizada a cada 96 horas, as plantas que apresentava
160 murchar e amarelecimento foram mensuradas, as mortas foram isoladas e as colônias fúngicas
161 obtidas comparadas com as originais.

162

163 2.3.2 Inoculação com Palito

164

165 Para a inoculação com palito, os isolados foram cultivados por sete dias em placas Petri
166 com meio BDA. Sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Os palitos foram
167 depositados em placas contendo Corn Meal Agar (C.M.A), em seguida, dez discos de 5 mm
168 retirados dos isolados cultivados em BDA foram depositados em cada uma das placas sobre as
169 extremidades dos palitos que assim permaneceram incubadas a temperatura ambiente até que
170 as extremidades do palito fossem colonizadas.

171 Após a colonização, alguns ferimentos foram realizados nas plantas com a ponta do
172 palito, o qual, em seguida, foi afincado ao colo das plantas e estas transplantadas em vasos de
173 0,5 L contendo substrato comercial autoclavado, procedimento adaptado de Klingelfuss *et al.*
174 (2002). O tratamento controle constituiu-se de palitos sem a colonização fúngica.

175 As avaliações foram realizadas a cada 96 horas para que a incidência da doença pudesse
176 ser mensurada, as plantas amarelas e murchas foram quantificadas e as plantas mortas foram
177 isoladas e as colônias obtidas comparadas à colônia original.

178 O experimento foi conduzido em esquema fatorial 2x2x6, sendo 2 cultivares, 2 métodos
179 de inoculação e 6 isolados, sob delineamento inteiramente casualizado. O(s) tratamento(s)
180 controle consistiu de plantas com ferimentos e mergulhadas em água destilada para o teste de
181 *dipping*. E para o teste com o palito utilizou-se palitos não colonizados, sendo considerado(s)
182 tratamento(s) adicional para fins de análises dos dados. Cada tratamento apresentou quatro
183 repetições, sendo cada parcela constituída por 10 plantas.

184 Os dados de incidência obtidos foram informados em porcentagem e os dados de
185 tamanho de lesão foram informados em centímetros, utilizou-se da transformação (raiz
186 quadrada de $Y + 0,5 - \text{raiz quadrada}(Y+0,5)$), então submetidos à análise de variância,
187 comparando as médias pelo teste de Tukey ($p = 0,05$) no software Sisvar (FERREIRA, 2019).

188 As variáveis incidência e tamanho de lesão foram submetidas a ANAVA (análise de
189 variância), os dados foram expressos em porcentagem para a incidência e em centímetro para
190 o tamanho de lesão, as médias foram transformadas pela fórmula (raiz quadrada de $Y + 0,5 -$
191 raiz quadrada ($Y + 0,5$)). Os fatores que apresentaram significância em ambas variáveis foram
192 submetidos ao teste de Tukey ao nível de 0,05 de probabilidade.

193

194 **3 RESULTADOS**

195

196 Com a realização do *Blotter* teste para seis lotes distintos de sementes, detectou-se no
197 tratamento Sementes com Arilo (SCA) sete gêneros distintos, três gêneros são considerados
198 como fungos de armazenamento: *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Penicillium*, três gêneros que
199 possuem espécies patogênicas a cultura: *Fusarium*, *Cladosporium* e *Colletotrichum* e um
200 gênero tido como saprofítico: *Paecilomyces*. No tratamento Sementes sem Arilo e
201 Desinfestadas (SAD) foram encontrados os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, e no
202 tratamento Sementes Sem Arilo e Sem Desinfestar (SSD), encontrou-se *Aspergillus*,
203 *Penicillium*, *Rhizopus* e *Cladosporium*. Nos lotes identificados por SCA foram observadas a
204 presença de *Fusarium* spp. em 25% das amostras, já no tratamento SAD, observou-se a

205 ocorrência de 5% de *Fusarium* spp. ao total foram obtidos 24 isolados deste gênero. Os
206 percentuais de ocorrência dos fungos assim como em quais tratamentos eles foram encontrados
207 estão presentes na Tabela 1.

208

209 **3.1 Identificação dos Isolados *Fusarium*-like**

210

211 Fragmentos de DNA de aproximadamente 619 pb e 820 pb foram obtidos para as
212 regiões TEF1 e RPB2, respectivamente. Os resultados do BLAST para RPB2 e TEF1 utilizando
213 o banco Fusarium ID estão expostos na Tabela 2.

214 Dos isolados obtidos neste trabalho, FSDr7, FS03, FS05, FS02, F6, FRC01 e F19,
215 agruparam-se como pertencentes ao complexo de espécies de *Fusarium oxysporum*. Já os
216 216 isolados FS10, FS08, FS06, FS14, FS04, FS09, F20, F22, FS15, FS04, F14, FS12 e F16
217 se agruparam como pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti*.

218 Os modelos de substituição gerados para as análises filogenéticas foram HKY+G para
219 TELF1 e GTR+G para RPB2. Na árvore filogenética gerada a partir de inferência Bayesiana,
220 os isolados FSDr7, FS05, F6 e F19 se agruparam no mesmo clado com isolados pertencentes
221 as espécies *F. callistephi* e *F. fabacearum* com probabilidade posterior de 0,99. Já os isolados
222 FS02 e FS03 se agruparam com *F. contaminatum*, *F. pharetrum* e *F. veterinarum*, com a
223 probabilidade posterior de 0,98 (Figura 1). Os dados utilizados para a construção da árvore
224 filogenética estão organizados na Tabela 3.

225

226 **3.2 Teste de Patogenicidade**

227

228 Quando analisamos os resultados de Incidência nota-se que o isolado FS01 (pertencente
229 ao complexo de espécies *Gibberella fujikuroi*), quando inoculado nas plântulas pela
230 metodologia *dipping* diferiu dos demais isolados. As médias dos isolados F22, FRC01, FS09 e
231 FSDr7 são estatisticamente iguais, já o isolado FS15 (pertencente ao complexo de espécies de
232 *F. incarnatum-equiseti*) não foi patogênico as plântulas.

233 Quando se comparou as médias dos isolados que foram inoculados via palito colonizado
234 observou-se que os isolados não diferem estatisticamente entre si. Os resultados das análises
235 para a variável Incidência se encontram na Tabela 4.

236 A cultivar Redondo Amarelo apresentou maior incidência da doença que a cultivar Sol,
237 as plântulas de ambas as cultivares apresentaram maiores lesões quando inoculadas com palito
238 colonizado. Os resultados estão presentes na Tabela 5 e Tabela 6.

239 Para a variável Tamanho de lesão os isolados F22, FRC01, FS01, FS09 e FS15 são
240 estatisticamente, o isolado FSDr7 (*F. callistephi/F. fabacearum*) causou as maiores lesões às
241 plântulas e diferiu estatisticamente dos demais. Os dados obtidos estão na Tabela 7.

242

243 **4 DISCUSSÃO**

244

245 As sementes são componentes essenciais na produção de alimento em todo o planeta, e
246 grande parte dos cultivos agrícolas depende dessa forma de propagação.

247 Muitos patógenos podem estar associados as sementes, esta associação pode ser uma
248 colonização interna e transmitida como uma infecção, caso ocorra uma colonização externa
249 essa associação é nomeada como infestação (AGARWAL & SINCLAIR,1997). A associação
250 com as sementes pode fornecer ao patógeno um modo de sobreviver a longo prazo, esporos de
251 muitas espécies fúngicas podem permanecer protegidos no tegumento da semente ortodoxa,
252 propágulos fúngicos podem também sobreviver em condições de baixa umidade e baixas
253 temperaturas como as utilizadas no armazenamento das sementes (INGLIS 1980;
254 MACLAUGHLIN & MARTYN, 1982).

255 A elucidação da associação de organismos patogênicos com as sementes é crucial, pois
256 os microrganismos podem estas veiculados internamente a semente, em micélio dormente ou
257 em esporos aderidos externamente.

258 A sanidade das sementes é crucial, pois os riscos na produção e produtividade podem
259 ser minimizados, assim como o transporte de sementes com a presença de fitopatógenos para
260 novas áreas.

261 Parisi *et al.* (2018), encontram os gêneros *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium* (duas espécies
262 diferentes), *Cladosporium* e *Lasiodiplodia* em lotes de sementes de *Passiflora alata*. Fischer e
263 Rezende (2008) detectaram diversos gêneros em sementes de *Passiflora* spp., dentre eles
264 *Fusarium* e *Cladosporium*. Cerqueira *et al.* (2019), ao investigar os fungos associados as
265 sementes de *P. edulis* f. *flavicarpa* encontraram importantes gêneros fitopatogênicos a cultura
266 como *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Cladosporium* e também fungos de armazenamento como
267 *Penicillium* e *Aspergillus*. Os resultados obtidos por *Blotter* teste neste trabalho são semelhantes
268 aos encontrados por outros pesquisadores, dentre os gêneros destaca-se *Fusarium* que possui
269 pelo menos dois complexos de espécies que são grandes limitantes a passicultura, ressalta-se
270 também que o gênero possui muita diversidade genética e de patogenicidade.

271 Em maracujazeiro a fusariose ataca os sistemas radicular e vascular, podendo resultar
272 em morte precoce das plantas, ocasionando assim a redução no número de plantas no campo e
273 consequentemente a produtividade (DARIVA *et al.*,2015).

274 Segundo Leslie e Summerell (2006), independente do local de cultivo da cultura, a
275 fusariose é devastadora, pois se trata de uma doença com elevado potencial destrutivo. Após a
276 entrada de *Fusarium* spp., as áreas de cultivo permanecerão infestadas por longos períodos,
277 uma vez que ainda não há uma forma eficaz de erradicação do patógeno (LARANJEIRA *et al.*,
278 2018).

279 O complexo de espécies de *Fusarium oxysporum* (FOSC), é extremamente importante
280 economicamente, trata-se de espécies que vivem no solo e possuem isolados patogênicos para
281 plantas, animais e humanos e também isolados não-patogênicos e está presente na lista dos
282 patógenos mais importantes econômica e cientificamente, o complexo é composto por mais de
283 144 *formae speciales* distintas somente filogeneticamente. Existem algumas evidências da
284 existência de um possível ciclo sexual (DEAN *et al.*, 2012; GEISER *et al.*, 2013; GORDON,
285 2017; LESLIE & SUMMERELL, 2006). Em estudos recentes sobre este complexo, Lombardi
286 *et al.* (2019) propuseram 15 novas espécies, a descrição foi baseada em diferenças morfológicas
287 e no alinhamento das sequências das regiões gênicas calmodulina (CmdA), RPB2, fator de
288 alongação (TEF1) e β -tubulina (Tub2). No presente estudo, apesar dos isolados FS05, F6,
289 FSDr7 e F19 se agruparem no mesmo clado com *F. fabacearum*, *F. callistephi*. e os isolados
290 FS02, FS03 agruparem no mesmo clado com *F. veterinarum*, *F. contaminatum*, *F. pharetrum*,
291 não podemos inferir que os isolados pertencem a essas espécies, pois o emprego das regiões
292 TEF1 e RPB2 não foram suficientes para resolver as relações dentro deste complexo.

293 O complexo de espécies de *Fusarium incarnatum-equiseti* - FIESC, historicamente foi
294 considerado como patógeno fraco ou secundário de plantas, porém recentemente foram
295 relatados como agentes causais com potencial para causar prejuízos em algumas culturas
296 importantes, alguns isolados são produtores de micotoxinas e são responsáveis por doenças em
297 humanos e animais, além de possuir isolados associados a insetos, com potencial para controle
298 biológico (AYOUBI & SOLEIMANI, 2016; BARROS *et al.*, 2012; IGNJATOV *et al.*, 2015;
299 LESLIE & SUMMERELL, 2011; O'DONNELL *et al.*, 2016; RAMDIAL *et al.*, 2016;
300 SUMMERELL *et al.*, 2003; TORBATI *et al.*, 2019; VILLANI *et al.*, 2016).

301 Testes de patogenicidade são cruciais pois o fato de apenas isolar e identificar fungos
302 não comprova de fato a patogenicidade e nem a agressividade dos mesmos, sendo assim
303 necessários testes que comprovem a ocorrência da doença (ELLIOTT, 2018). De acordo com
304 Bertin *et al* (2003), a atração química entre as raízes e os microrganismos ocorre através de
305 mecanismos que envolvem sinais entre ambos, os exsudatos liberados pelas plantas atraem os
306 microrganismos habitantes do solo. Diversos fitopatógenos permanecem no solo em estado de
307 dormência e podem ser despertados após o contato deste propágulo com as moléculas

308 provenientes dos exsudados liberados pelas sementes e raízes (NELSON, 1990).

309 A colonização de algumas espécies de *Fusarium*, posteriormente a atração e penetração
310 nas raízes do hospedeiro obstruem o xilema e esta obstrução tem como resultante a produção
311 de metabólitos nos tecidos vasculares que ao se acumularem provocam o escurecimento da
312 região, que são indícios da infecção pelo patógeno e característica da doença (PEGG, 1981).

313 Apesar de o floema ser rico em açúcares, os patógenos radiculares maioritariamente
314 colonizam os vasos do xilema, que são pobres em nutrientes. Isso ocorre devido a acessibilidade
315 distinta de ambos os vasos. O floema possui células vivas e alta pressão osmótica, dificultando
316 a penetração. Enquanto o xilema é composto por traqueídeos mortos, apresentando baixa
317 pressão osmótica, facilitando assim a penetração (YADETA; THOMMA, 2013). No presente
318 trabalho temos indícios que o processo infeccioso envolveu a produção de metabólitos e
319 oxidação de fenóis pois ocorreu a presença de escurecimento dos tecidos vasculares.

320 Os resultados obtidos neste experimento mostram que a incidência de *Fusarium*, quando
321 procedida a inoculação por palito não obteve nenhuma diferença entre os isolados, já com a
322 inoculação por *dipping* o isolado FS01 apresentou os melhores resultados. A inoculação via
323 palito colonizado é muito utilizada para teste de patogenicidade (PAULINO *et al.*, 2020;
324 SCANDIANI *et al.*, 2011). Na literatura são encontrados alguns estudos sobre o emprego do
325 *dipping* para a inoculação de *Fusarium* em *Passiflora* (MELO *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2013;
326 ORTIZ; CARVAJAL, 2016).

327 Existem quinze cultivares de *P. edulis* f. *flavicarpa* registradas no Ministério de
328 Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2020), porém nenhuma delas apresenta
329 resistência a *Fusarium* spp. Em nosso estudo foram utilizadas cultivares comerciais, a cultivar
330 Redondo Amarelo apresentou maior incidência da doença do que a cultivar Sol, sabe-se que a
331 emissão do tubo germinativo de *Fusarium* spp. é influenciada pela produção e liberação de
332 exsudatos via raízes do hospedeiro, sendo esta emissão crucial para que se estabeleça a
333 infecção. Este processo pode ter sido menos eficiente para a cultivar Sol, o que pode explicar o
334 menor índice de plantas com a doença, uma vez que as condições ambientais, idade de planta e
335 demais fatores foram iguais para ambas cultivares.

5 REFERÊNCIAS

- 336
337
338 AGARWAL, V.K.; SINCLAIR, J.B. **Principles of Seed Pathology**. 2th ed, CRC Press/Lewis
339 Publishers: Boca Ratón, 1997. AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5th ed. Amsterdam The
340 Netherlands: Elsevier Academic 345Press, 2005, p. 922.
- 341
342 AGUIAR, R. H.; FANTINATTI, J.B.; GROTH, D.; USBERTI, E.R. Qualidade física,
343 fisiológica e sanitária de sementes de girassol de diferentes tamanhos. **Revista Brasileira de**
344 **Sementes**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 134-139, 2001. DOI: 10.17801/0101-3122/rbs.v23n1p134-
345 139.
- 346
347 AYOUBI, N.; SOLEIMANI, M.J. Morphological and molecular identification of pathogenic
348 *Fusarium* spp. on strawberry in Iran. **Sydowia**.v.68. p.163-171, 2016.
349 DOI: 10.12905/0380.sydowia68-2016-0163.
- 350
351 BARROS, G.; ZANON, M. A.; PALAZZINI, J.M.; HAIDUKOWSKI, M.; PASCALE, M.;
352 CHULZE, S. Trichothecenes and zearalenone production by *Fusarium equiseti* and *Fusarium*
353 *semitectum* species isolated from Argentinean soybean. **Food Additives & Contaminants**
354 **Part A**, v. 29.p.1436–1442,2012. DOI: 10.1080/19440049.2012.698397.
- 355
356 BENETTI, S.C.; SANTOS, A.F. DOS; MEDEIROS, A.C.; JACCOUD FILHO, D.S.
357 Levantamento de fungos em sementes de cedro e avaliação da patogenicidade de *Fusarium* sp.
358 e *Pestalotia* sp. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n.58, p.81-85, 2009. DOI:
359 10.4336/2009.pfb.58.79.
- 360
361 BOTELHO, L.S.; MORAES, M.H.D.; MENTEN, J.O.M. Fungos associados às sementes de
362 ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*): incidência, efeito na
363 germinação e transmissão para as plântulas. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.4, p.343-348,
364 2008. DOI: 10.1590/S0100-54052008000400008.
- 365
366 BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da
367 Agricultura, 395p. 2009.
- 368
369 DEAN, R.; KAN, J.; PRETORIUS, Z.; HAMMOND-KOSACK, K.; PIETRO, A.; SPANU, P.;
370 RUDD, J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G. The top 10 fungal
371 pathogens in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**. 2012. DOI:
372 10.1111/j.1364-3703.2011.00783. x.
- 373
374 DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15,
375 1990.
- 376
377 EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high
378 throughput. **Nucleic Acids Research**. v.32, n.5. p.1792-1797, 2004. DOI: 10.1093/nar/gkh340.
- 379
380 ELLIOTT, M. L. Standardizing pathogenicity assays for *Fusarium* wilt pathogens of
381 ornamental palms. **Plant Disease**, St. Paul, v. 102, n. 8, p. 1541-1548, 2018. DOI:
382 10.1094/PDIS-10-17-1525-RE.
- 383
384 FERREIRA, D.F. SISVAR: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs.
385 **Revista Brasileira de Biometria**, v. 37, n. 4, p. 529-535, dec 2019. DOI:
386 10.28951/rbb.v37i4.450.

- 387 FIGUEIREDO, M. B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de
388 fungos patógenos em plantas. **O Biológico**, São Paulo, v. 33, n. 1, pag. 9-13, 1967.
389
- 390 FISCHER, I.H.; LOURENÇO, S.A.; MARTINS, M. C.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Seleção
391 de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da podridão do colo do maracujazeiro
392 causada por *Nectria haematococca*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 3, 2005. DOI:
393 0.1590/S0100-41582005000300006.
394
- 395 FISCHER, I.H.; REZENDE, J.A.M. Diseases of passion flower (*Passiflora* spp.). **Pest**
396 **Technology**, Chaveland, v.2, n.1, p.1-19. 2008.
397
- 398 GEISER, D.; AOKI, T.; BAKER, S.; BHATTACHARYYA, M.; BRANDT, M.; BROWN, D.;
399 BURGESS, L.; CHULZE, S.; COLEMAN, J.; CORRELL, J. C.; COVERT, S.; CROUS, P.;
400 CUOMO, C.; HOOG, S.; PIETRO, A.; ELMER, W.; EPSTEIN, L.; FRANDSEN, R.; ZHANG,
401 N. One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that
402 preserves longstanding use. **Phytopathology**. 2013. DOI: 10.1094/PHYTO-07-12-0150-LE.
403
- 404 HALL, T. 2014 — BioEdit v7.0.9: Biological sequence alignment editor for
405 Win95/98/2K/XP/7. Available at: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit.html>.
406
- 407 INGLIS, D.A. Contamination of asparagus seed by *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* and
408 *Fusarium moniliforme*. **Plant Disease** v. 6. p. 74–76,1980. DOI: 10.1094/PD-64-74.
409
- 410 IGNJATOV, M.; MILOŠEVIĆ, D.; NIKOLIC, Z.; TAMINDZIC, G.; GVOZDANOVIĆ-
411 VARGA, J.; IVANOVIĆ, Ž.; POPOVIĆ, T. First report of *Fusarium* sp. FIESC3 on onion
412 seed in Serbia. **Plant Disease**, n.99, 2015. DOI: 10.1094/PDIS-01-15-0082-PDN.
413
- 414 KLINGELFUSS, L.H.; YORINORI, J.T.; ARIAS, C.A.A.; DESTRO, D. Reaction of soybean
415 cultivars to sudden death syndrome and disease scoring methods for screening resistance. **Crop**
416 **Breeding and Applied Biotechnology**, p.257-264.2002.
417 DOI: 10.12702/1984 -7033.v02n02a12.
418
- 419 KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular
420 evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and**
421 **Evolution**.v.35. n. 6, p. 1547–1549,2018. DOI: 10.1093/molbev/msy096.
422
- 423 LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M.F.B.; SANTOS, A.F. Detecção, transmissão, patogenicidade e
424 controle químico de fungos em sementes de paineira (*Ceiba speciosa*). **Summa**
425 **Phytopathologica**, Botucatu,0 v.36, n.2, p.105-112, 2010. DOI: 10.1590/S0100
426 54052010000200005.
427
- 428 LISBÔA-PADULLA, T.; MORAES, M.H.D.; BARBEDO, C.J.; BORGES, I.F.; MENTEN,
429 J.O.M.; PASCHOLATI, S.F. **Revista Brasileira de Sementes**, Jaboticabal, v.32, n.2, p.154-
430 159, 2010.DOI: 10.1590/S0101-31222010000200019.
431
- 432 LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. **The Fusarium laboratory manual**. 1st ed. Blackwell
433 Publishing Ltd; Oxford, London: 2006.
434
- 435 LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. In search of new *Fusarium* species. **Plant Breeding and**
436 **Seed Science**.v. 63.p.94–101,2011. DOI: 10.2478/v10129-011-0020-3.
437

- 438 LOMBARD, L.; SANDOVAL-DENIS, M.; LAMPRECHT, S.C., CROUS, P.W.
 439 Epitypification of *Fusarium oxysporum* – clearing the taxonomic chaos. **Persoonia**.v.43, p. 1–
 440 47,2019. DOI: 10.3767/persoonia.2019.43.01.
 441
- 442 MACHADO, J. C. Podridões de tolerância de patógenos associados a sementes. **Revisão Anual**
 443 **de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, n. 1, p. 229-263, 1994.
 444
- 445 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Registro
 446 Nacional de Cultivares – RNC. Disponível em:
 447 <http://http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php> Acesso
 448 em: 14.out.2020.
 449
- 450 MARCOS FILHO, J. **Pesquisa sobre vigor de sementes de hortaliças**. Informativo Abrates,
 451 Londrina, v. 11, n. 1, 2001, p. 63-75.
 452
- 453 MCLAUGHLIN, R.; MARTYN, R.D. Identification and pathogenicity of *Fusarium* species
 454 isolates from surface disinfested watermelon seed. **Journal of Seed Technology**. v.7.p. 97-
 455 107,1982.
 456
- 457 McKNIGHT, T. A wilt disease of the passion vines (*Passiflora edulis*) caused by a species of
 458 *Fusarium*. **The Queensland Journal of Agricultural Science**, v.8, p.1-4, 1951.
 459
- 460 MELO, N.J.A.; NEGREIROS, A.M.P.; MEDEIROS, H.L.S.; JUNIOR, R.S. Evaluation of
 461 Fusarium wilt disease in passion fruit species inoculated with *Fusarium oxysporum* f.sp.
 462 *passiflorae*. **Journal of Phytopathology**.v.8, p. 1-7, 2019. DOI: 10.1111/jph.12871.
 463
- 464 MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES science gateway for
 465 inference of large phylogenetic trees" in Proceedings of the Gateway Computing Environments
 466 Workshop (GCE). p.1 – 8, 2010.DOI: 10.1109/GCE.2010.5676129.
 467
- 468 NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: The MacMillan Press, 1977.
 469
- 470 NELSON, E. B. Exudate molecules initiating fungal responses to seeds and roots. **Plant and**
 471 **Soil**, v. 129, n. 1, p. 61-73, 1990.DOI: 10.1007/BF00011692.
 472
- 473 O'DONNELL, K.; SUTTON, D.A.; FOTHERGILL, A.; MCCARTHY, D.; RINALDI, M.G.;
 474 BRANDT, M.E.; ZHANG, N.; GEISER, D.M. Molecular phylogenetic diversity, multilocus
 475 haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species
 476 complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46. p. 2477-2490, 2008.
 477 DOI: 10.1128/JCM.02371-07.
 478
- 479 O'DONNELL, K.; SUTTON, D.A.; WIEDERHOLD, N.; ROBERT, V.A.; CROUS, P.W.;
 480 GEISER, D.M. Veterinary fusarioses within the United States. **Journal of Clinical**
 481 **Microbiology**. v. 54. p. 2813–2819, 2016. DOI: 10.1128/JCM.01607-16.
 482
- 483 OSIPI, E.A.F.; LIMA, C.B.; COSSA, C.A. Influência de métodos de remoção do arilo na
 484 qualidade fisiológica de sementes de *Passiflora alata* Curtis. **Revista Brasileira de**
 485 **Fruticultura**, Jaboticabal. Volume Especial, p. 680-685, 2011. DOI: 10.1590/S0100-
 486 29452011000500095.
 487
- 488 ORTIZ, E.; CARVAJAL, L.H. Standard methods for inoculations of *F. oxysporum*

- 489 and *F. solani* in *Passiflora*. **African Journal Agricultural Research**.v.11.p.1569-1575,2016.
490 DOI: 10.5897/AJAR2015.10448.
- 491
- 492 PARISI, J.J.; FISCHER, I.H.; MEDINA, P.F.; FIRMINO, A.C.; MELETTI, L.M.
493 Pathogenicity and transmission of fungi detected on *Passiflora alata* seeds. **Arquivo do**
494 **Instituto Biológico**, v.85.p. 1-8,2018. DOI: 10.1590/1808-1657000702017.
- 495
- 496 PAULINO, J.F.C.; ALMEIDA, C.P.; GONÇALVES, G.M.C.; BUENO, C.J.; CARBONELL,
497 A.M.; CHIORATO, A.F.; BECHIMOL-REIS, L.L. Assessment of resistance in common bean
498 to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* using different inoculation and evaluation methods.
499 **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.20, p.1-5, 2020. DOI: 10.1590/1984-
500 70332020v20n3n45.
- 501
- 502 PEGG, G.F. Biochemistry and physiology of pathogenesis. *In*: MACE M.E; BELL, A. A.;
503 BECKMAN, C. H. **Fungal Wilt Diseases of Plants**. 1 ed. New York: Academic Press, 1981,
504 p.193- 253.
- 505
- 506 POSADA, D.; CRANDALL, K. MODELTEST: Testing the Model of DNA Substitution.
507 **Bioinformatics**. v.14.p. 817-818,1998. DOI: 10.1093/bioinformatics/14.9.817.
- 508
- 509 RAMDIAL, H.; LATCHOO, R.K.; HOSEIN, F.N.; RAMPERSAD, S.N. Phylogeny and
510 haplotype analysis of fungi within the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex.
511 **Phytopathology**, v. 107, p.109–120,2016. DOI: 10.1094/PHYTO-05-16-0209-R.
- 512
- 513 RANNALLA, B.; YANG, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new
514 method of phylogenetic inference. **Journal of Molecular Evolution**, v 43. p. 304 -311, 1996.
515 DOI: 10.1007/BF02338839.
- 516
- 517 REGO, S.S.; SANTOS, A.F.; MEDEIROS, A.C. Fungos associados aos frutos e sementes de
518 capororoca (*Myrsine ferruginea*) *Myrsinaceae*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n.58,
519 p.85-88, 2009. DOI: 10.4336/2009.pfb.58.85.
- 520
- 521 RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; Van Der MARK, P.; AYRES, D.L.; ARLING, A.; HÖHNA,
522 S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M.A.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3.2: Efficient
523 bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space,
524 **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539–542,2012. DOI: 10.1093/sysbio/sys029.
- 525
- 526 SCANDIANI, M.M.; RUBERTI, D.S.; GIORDA, L.M.; PIOLI, R.N.; LUQUE, A.G.;
527 BOTTAI, H.; IVANCOVICH, J.J.; AOKI, T.; O'DONNELL, K. Comparison of inoculation
528 methods for characterizing relative aggressiveness of two soybean sudden-death syndrome
529 pathogens *Fusarium virguliforme* and *F. tucumaniae*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p. 133-
530 140, 2011. DOI: 10.1590/S1982-56762011000300001.
- 531
- 532 SILVA, A.N.; AZEVEDO, G.B.; ROCHA SOBRINHO, G.G.; NOVAES, Q.S. Efeito de
533 produtos químicos e de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium solani* do maracujazeiro.
534 **Interciencia**, v. 39, n. 6, p. 398, 2014.
- 535
- 536 SILVA, A.S.; OLIVEIRA, E.J.; HADDAD, F.; LARANJEIRA, F.F.; JESUS, O.N.;
537 OLIVEIRA, S.A.S.; COSTA, M.A.P.C.; FREITAS, J.P.X. Identification of passion fruit
538 genotypes resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*. **Tropical Plant Pathology**, v.
539 38, p.236-242, 2013. DOI: 10.1590/S1982-56762013005000008.

- 540 SUMMERELL, B.A.; SALLEH, B.; LESLIE, J.F. A utilitarian approach to *Fusarium*
541 identification. **Plant Disease**.v.87. p.117–128, 2003. DOI: 10.1094/PDIS.2003.87.2.117.
542
- 543 TORBATI, M.; ARZANLOU, M.; SANDOVAL-DENIS, M.; CROUS, P.W. Multigene
544 phylogeny reveals new fungicolous species in the *Fusarium tricinctum* species complex and
545 novel hosts in the genus *Fusarium* from Iran. **Mycological Progress**, v.18, p. 119–133, 2019.
546 DOI: 10.1007/s11557-018-1422-5.
547
- 548 VIANA, F.M.P.; COSTA, A.F. Doenças do maracujazeiro. *In*: Freire, F.C.O; Cardoso, J.E.;
549 Viana, F.M.P. (eds) **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília:
550 EMBRAPA, 2013, p.269–322.
551
- 552 VILLANI, A.; MORETTI, A.; SAEGER, S.; HAN, Z.; MAVUNGU, J.D.; SOARES, C.M.G.;
553 PROCTOR, R.H.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N.; STEA, G.; PACIOLLA, C.; LOGRIECO, A.F.;
554 SUSCA, A. A polyphasic approach for characterization of a collection of cereal isolates of the
555 *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex. **International Journal of Food**
556 **Microbiology**. v.234. p.24–35,2016. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.023.
557
- 558 YADETA, K.; THOMMA, B. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt
559 pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 97, 2013. DOI: 10.3389/fpls.2013.00097.
560
- 561 YOCTENG, R.; D'EECKENBRUGGE, G. C.; SOUZA-CHIES, T. T. Passiflora. *In*: KOLE,
562 C. (Ed.). **Wild crop relatives: genomic and breeding resources -tropical and subtropical fruits**.
563 Heidelberg: Springer, 2011, p. 129-171.

6 APÊNDICE

TABELA 1: Gêneros fúngicos associados a sementes de maracujá.

Gêneros Encontrados	Tratamentos Utilizados		
	SAD*	SSD**	SCA***
<i>Aspergillus</i>	14	25	59
<i>Penicillium</i>	5	5	2
<i>Cladosporium</i>	-	5	5
<i>Colletotrichum</i>	-	-	4
<i>Rhizopus</i>	-	15	4
<i>Paecilomyces</i>	-	-	1
<i>Fusarium</i>	5	-	25

*Sementes sem Arilo e Desinfestadas; **Sementes Sem arilo e Sem Desinfestar; ***Sementes Com Arilo.

TABELA 2: Blast das regiões RPB2 e TEF1.

Isolado	RPB2	TEF1	BLAST RPB2	Similaridade	BLAST TEF1	Similaridade
FS10	-	OK	-		<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex	99,53% (NRRL34070)
FS08	OK	OK	<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex	100% (NRRL20423)	<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex	99,82% (NRRL20423)
FS01	-	OK	-		<i>Gibberella fujikuroi</i> species complex	98,61% (NRRL31631)
FS03	-	OK	-		<i>F. oxysporum</i> species complex	100% (NRRL28367)
FS05	-	OK	-		<i>F. oxysporum</i> species complex	100% (NRRL25420)
FSDr7	OK	OK	<i>F. oxysporum</i> species complex	99,37% (NRRL38302)	<i>F. oxysporum</i> species complex	100% (NRRL25420)
FS06	OK	-	<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex	100% (NRRL20423)	-	
FS14	OK	-	<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex	100% (NRRL20423)	-	
FS04	OK	-	<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex	100% (NRRL20423)	-	
FS02	-	OK	-		<i>F. oxysporum</i> species complex	100 % (32512NRRL)
F6	OK	OK	-		<i>F. oxysporum</i> species complex	100% (NRRL38514)
FS09	OK	OK	<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex	99,52% (NRRL26417)	<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex	98,85% (NRRL36575)
F20	OK	OK	<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex	99,27% (NRRL26417)	<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex	99,47% (NRRL36575)

TABELA 2: (Continua)

Isolado	RPB2	TEF1	BLAST RPB2	Similaridade	BLAST TEF1	Similaridade
F22	-	OK	-		<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex	99,81% (NRRL34059)
F19	-	OK	-		<i>F. oxysporum</i> species complex	100% (NRRL25420)
FS15	OK	OK	<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex	100% (NRRL20423)	<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex	99,81 % (NRRL20423)
FS04	-	OK	-		<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex	99,83% (NRRL20423)
FS12	-	OK	-		<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex	99,83 (NRRL34070)
FRC01	OK	-	<i>F. oxysporum</i> species complex	99,1% (NRRL38302)	-	
F16	OK	OK	<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex	99,7 % (NRRL26417)	<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex	99,64% (NRRL36575)

Tabela 3: Isolados utilizados na análise filogenética de *F. oxysporum*.

Espécie	Acesso à cultura	Acesso ao GenBank	
		RPB2	TEF1
<i>Fusarium callistephi</i>	CBS 187.53T	MH484875	MH484966
	CBS 144739 = CPC 25792	MH484934	MH485025
<i>F. carminascens</i>	CBS 144740 = CPC 25793	MH484935	MH485026
	CBS 144741 = CPC 25795	MH484936	MH485027
	CBS 144738 = CPC 25800T	MH484937	MH485028
	CBS 111552	MH484900	MH484991
<i>F. contaminatum</i>	CBS 114899T	MH484901	MH484992
	CBS 117461	MH484911	MH485002
	CBS 620.72 = DSM 11271 = NRRL 36520	MH484879	MH484970
<i>F. cugenangense</i>	CBS 130304 = BBA 69050 = NRRL 25433	MH484921	MH485012
	CBS 130308 = ATCC 26225 = NRRL 25387	MH484920	MH485011
	CBS 131393	MH484928	MH485019
	CBS 247.61 = BBA 8398	MH484876	MH484967
	= DSM 2308 = NRRL 22545		
<i>F. curvatum</i>	CBS 238.94 = NRRL 26422 = PD 94/184T	MH484893	MH484984
	CBS 141.95 = NRRL 36251 = PD 94/1518	MH484894	MH484985
<i>F. duoseptatum</i>	CBS 102026 = NRRL 36115	MH484896	MH484987
	CBS 217.49 = NRRL 36358	MH484870	MH484961
<i>F. elaeidis</i>	CBS 218.49 = NRRL 36359	MH484871	MH484962
	CBS 255.52 = NRRL 36386	MH484874	MH484965
	CBS 144742 = CPC 25801	MH484938	MH485029
<i>F. fabacearum</i>	CBS 144743 = CPC 25802T	MH484939	MH485030
	CBS 144744 = CPC 25803	MH484940	MH485031
<i>F. foetens</i>	CBS 120665	MH484918	MH485009

TABELA 3: (Continua)

Espécie	Acesso à cultura	Acesso ao GenBank	
		RPB2	TEF1
<i>F. glycines</i>	CBS 176.33 = NRRL 36286	MH484868	MH484959
	CBS 214.49 = NRRL 36356	MH484869	MH484960
	CBS 200.89	MH484888	MH484979
	CBS 144745 = CPC 25804	MH484941	MH485032
	CBS 144746 = CPC 25808T	MH484942	MH485033
<i>F. gossypinum</i>	CBS 116611	MH484907	MH484998
	CBS 116612	MH484908	MH484999
	CBS 116613T	MH484909	MH485000
<i>F. hoodiae</i>	CBS 132474T	MH484929	MH485020
	CBS 132476	MH484930	MH485021
<i>F. languescens</i>	CBS 132477	MH484931	MH485022
	CBS 645.78 = NRRL 36531T	MH484880	MH484971
	CBS 646.78 = NRRL 36532	MH484881	MH484972
	CBS 413.90 = ATCC 66046 = NRRL 36465	MH484890	MH484981
	CBS 300.91 = NRRL 36416	MH484891	MH484982
	CBS 302.91 = NRRL 36419	MH484892	MH484983
	CBS 872.95 = NRRL 36570	MH484895	MH484986
	CBS 119796 = MRC 8437	MH484917	MH485008
	CBS 144748 = CPC 25782	MH484932	MH485023
	CBS 144747 = CPC 25788	MH484933	MH485024
<i>F. libertatis</i>	CBS 144749 = CPC 28465T	MH484944	MH485035
	CBS 129.24	MH484864	MH484955
	CBS 149.25 = NRRL 36261	MH484865	MH484956
	CBS 181.32 = NRRL 36303	MH484867	MH484958
	CBS 758.68 = NRRL 36546	MH484877	MH484968
	CBS 744.79 = BBA 62355 = NRRL 22549	MH484882	MH484973
	CBS 127.81 = BBA 63924 = NRRL 36229	MH484883	MH484974
	CBS 129.81 = BBA 63926 = NRRL 22539	MH484885	MH484976
	CBS 196.87 = NRRL 26219	MH484886	MH484977
	CBS 840.88T	MH484887	MH484978
	CBS 115416 = CPC 5307	MH484902	MH484993
	CBS 115417 = CPC 5306	MH484903	MH484994
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 115419 = CPC 5308	MH484904	MH484995
	CBS 115424 = CPC 5312	MH484906	MH484997
	CBS 123062 = GJS 91-17	MH484919	MH485010
	CBS 130300 = NRRL 26368	MH484925	MH485016
	CBS 130301 = NRRL 26374	MH484926	MH485017
	CBS 130303	MH484923	MH485014
	CPC 30807	MH484950	MH485041
	CBS 794.70 = BBA 11103 = NRRL 22550	MH484878	MH484969
	CBS 102030	MH484898	MH484989
	CBS 130310 = NRRL 25603	MH484922	MH485013
<i>F. odoratissimum</i>			

TABELA 3: (Continua)

Espécie	Acesso à cultura	Acesso ao GenBank	
		RPB2	TEF1
<i>F. oxysporum</i>	CBS 221.49 = IHEM 4508 = NRRL 22546	MH484872	MH484963
	CBS 144134ET	MH484953	MH485044
<i>F. pharetrum</i>	CBS 144135	MH484954	MH485045
	CBS 144750 = CPC 30822	MH484951	MH485042
<i>F. trachichlamydosporum</i>	CBS 144751 = CPC 30824T	MH484952	MH485043
	CBS 102028 = NRRL 36117	MH484897	MH484988
<i>F. triseptatum</i>	CBS 258.50 = NRRL 36389T	MH484873	MH484964
	CBS 116619	MH484910	MH485001
<i>F. triseptatum</i>	CBS 119665	MH484916	MH485007
	CBS 130302 = NRRL 26360 = FRC 755	MH484924	MH485015
<i>F. veterinarianum</i>	CBS 109898 = NRRL 36153T	MH484899	MH484990
	CBS 117787	MH484912	MH485003
<i>F. veterinarianum</i>	CBS 117790	MH484913	MH485004
	CBS 128.81 = BBA 63925 = NRRL 36233	MH484884	MH484975
<i>Fusarium sp</i>	CBS 680.89 = NRRL 26221	MH484889	MH484980
	CBS 130323	MH484927	MH485018
FS05	-	-	-
FSDr7	-	-	-
F6	-	-	-
F19	-	-	-
FS02	-	-	-
FS03	-	-	-

TABELA 4: Incidência da doença nos modos de inoculação.

Isolados	Incidência			
	<i>Dipping</i>		Palito	
F22	1,25*	1,66 ABa**	17,5*	3,76Ab**
FRC01	1,25*	1,03 ABa**	12,5*	3,21Ab**
FS01	12,5*	3,00 Ba**	3,75*	2,13Aa**
FS09	1,25*	1,03 ABa**	11,25*	2,93Ab**
FS15	0*	0,70 Aa**	10*	2,99Ab**
FSDr7	3,75*	1,97 ABa**	17,5*	3,88Ab**
CV (%)	61,48			

As letras maiúsculas foram utilizadas para a comparação entre as médias dos isolados, as médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05, as letras minúsculas foram utilizadas para a comparação das médias dos modos de inoculação e são comparadas entre as linhas pelo teste de Tukey a 0,05. * Dados originais e ** dados transformados pela fórmula (raiz quadrada de $Y+0,5 - \text{SQRT}(Y+0,5)$).

TABELA 5: Incidência de doença nas cultivares utilizadas.

Incidência	
Cultivar Sol	2,05 A
Cultivar Redondo Amarelo	2,66 B
CV (%)	61,48

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente de acordo com o teste t-Student (P = 0,05).

TABELA 6: Tamanho de lesão nos métodos de inoculação.

Tamanho De Lesão	
Dipping	0,79 A
Palito	0,89 B
CV (%)	14,27

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente de acordo com o teste t-Student (P = 0,05).

TABELA 7: Tamanho médio de lesão causado pelos isolados

Tamanho De Lesão	
Isolados	Medida
F22	0,83 AB
FRC01	0,80 AB
FS01	0,86 AB
FS09	0,79 A
FS15	0,81 AB
FSDr7	0,92 B
CV (%)	14,27

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem significativamente de acordo com o teste Tukey (P = 0,05).

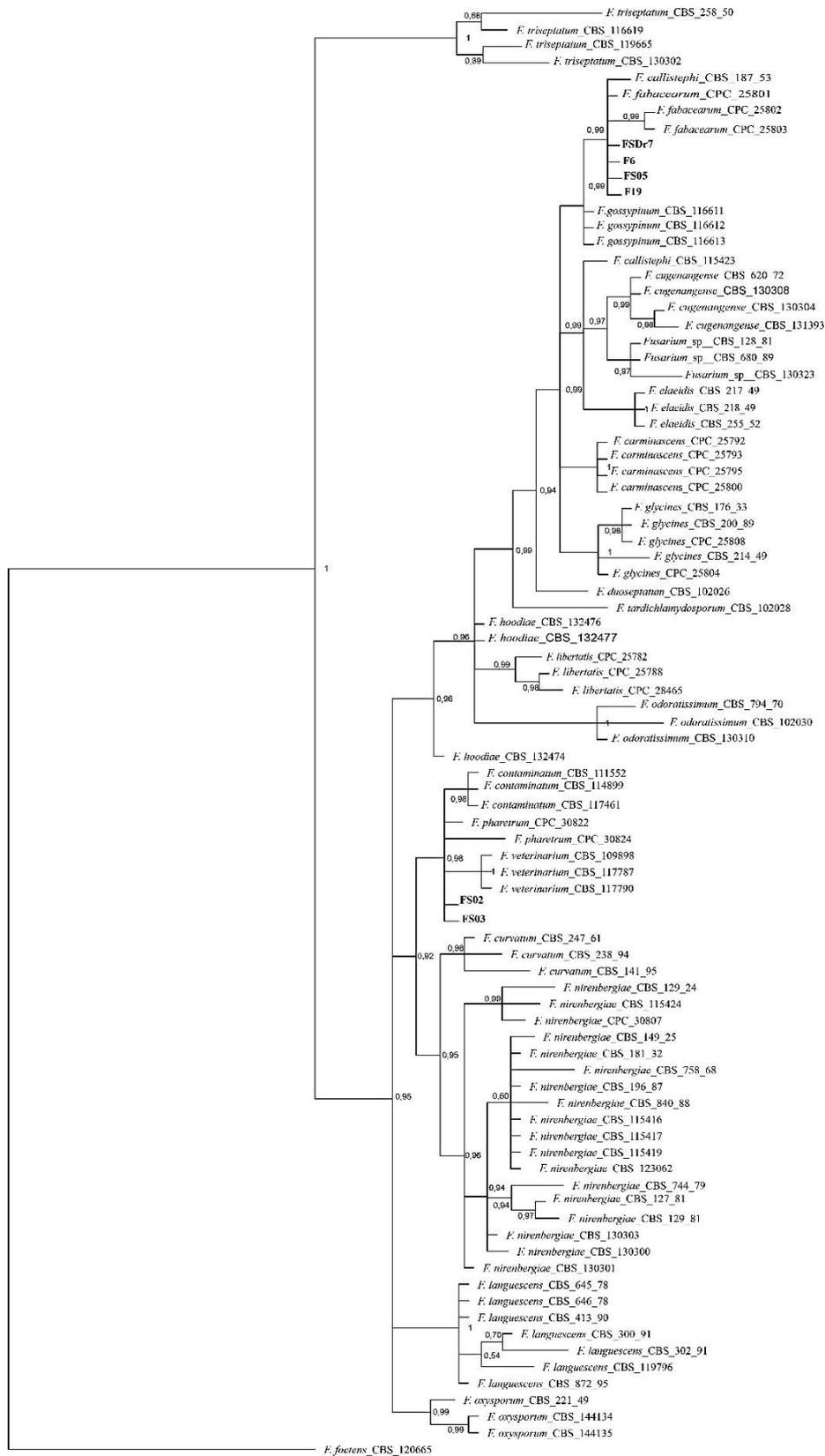
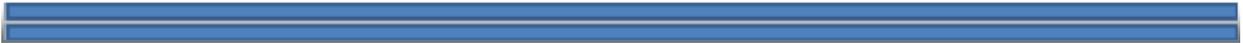


Figura 1: Espécies do complexo *Fusarium oxysporum*. Árvore gerada por interferência Bayesiana, os isolados obtidos neste estudo estão em negrito, os valores de probabilidade posterior se encontram nos nós. *Fusarium foetens* foi usado como outgroup.

CAPÍTULO III



Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

1. Foi detectada a presença dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Paecilomyces*, *Colletotrichum*, *Cladosporium* e *Fusarium*;
2. Através de análises moleculares, identificou-se a presença de isolados pertencentes aos complexos *F. oxysporum* e *F. incarnatum-equiseti*;
3. O isolado FS01 (complexo de espécies de *Gibberella fujikuroi*) quando inoculado por dipping, apresentou a maior incidência nas plantas e o isolado FSDr7 (espécie do complexo *F. oxysporum*) causou o maior tamanho de lesão nas plantas quando inoculado via palito colonizado;
4. A cultivar Redondo Amarelo apresentou o maior número de plantas com incidência da doença, e a inoculação via palito apresentou maior tamanho de lesão.