



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**



**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Fusarium* spp. E MANEJO ALTERNATIVO  
DA FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO**

**WILZA CARLA OLIVEIRA DE SOUZA**

Areia-PB  
Fevereiro-2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA



DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Fusarium* spp. E MANEJO ALTERNATIVO  
DA FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO

WILZA CARLA OLIVEIRA DE SOUZA

Sob a orientação da Professora  
Luciana cordeiro do Nascimento

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **Doutora** em Agronomia, Área de concentração Agricultura Tropical.

Areia-PB  
Fevereiro-2016

*Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da  
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, Campus II, Areia – PB.*

S729d Souza, Wilza Carla Oliveira de.

***Diversidade genética de Fusarium spp. e Manejo Alternativo da Fusariose do  
abacaxizeiro / Wilza Carla Oliveira de Souza. - Areia: UFPB/CCA, 2016.***

92 f. : il.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade  
Federal da Paraíba, Areia, 2016.

Bibliografia.

Orientador: Luciana Cordeiro do Nascimento.

1. Abacaxi 2. Variação genética em plantas 3. Fusariose vegetal I. Nascimento,  
Luciana Cordeiro do II. Título.

UFPB/CCA

CDU: 634.774(043.2)

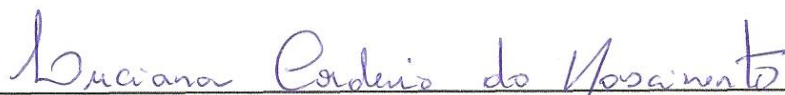
**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**


**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Fusarium* spp. E MANEJO ALTERNATIVO  
DA FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO**

**AUTOR (A): WILZA CARLA OLIVEIRA DE SOUZA**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR em AGRONOMIA (Agricultura Tropical) pela comissão EXAMINADORA:



\_\_\_\_\_  
Dra. Luciana Cordeiro do Nascimento  
Centro de Ciências Agrárias- Universidade Federal da Paraíba (CCA-UFPB)  
**Orientadora**



\_\_\_\_\_  
Dr. Francisco Miguel de Assis Filho  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
(MAPA – LANAGRO-PE)  
**Examinador**



\_\_\_\_\_  
Dra. Nivânia Pereira da Costa  
Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias- Universidade Federal da Paraíba  
(CCHSA-UFPB)  
**Examinadora**



\_\_\_\_\_  
Dra. Elida Barbosa Corrêa  
Universidade Estadual da Paraíba  
**Examinadora**

**Data da realização: 16 de Fevereiro de 2016**  
Presidente da Comissão Examinadora  
Dra. Luciana Cordeiro do Nascimento  
Orientadora

*O coração do homem planeja o seu caminho,  
mas o SENHOR lhe dirige os passos.*

Provérbios 16:9

*Ao meu pai José da Paz Souza (in memoriam)*

***DEDICO***

## AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar o meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

À minha orientadora Luciana Cordeiro do Nascimento que me concedeu a orientação necessária para a conclusão de mais essa etapa na minha vida acadêmica, sendo sempre uma fonte de tranquilidade e conhecimento.

À minha MÃE, Maria das Graças Souza, pelo amor incondicional, apoio e paciência.

Aos meus irmãos Jarbas, Cassiano e Yara pelo companherismo e amor dedicado a mim.

Aos meus sobrinhos, Bruno, Lucas, Ana Raquel e Artur, vocês chegaram para alegrar as nossas vidas.

À minha vó Maria (*in memoriam*), nosso exemplo de fortaleza.

Aos meus primos “irmãos” Camilla, Alexandre, Gabriel, Tácia e Sophia, aos momentos de convivência que tanto me ensinam e aos momentos de felicidade que passo ao lado de vocês.

A todos os meus familiares, vocês são muito importantes na minha caminhada.

Ao meu noivo Paulo Nogueira, por me encorajar quando preciso, por dividir comigo tanto os momentos de alegria quanto os de dificuldade, pela amizade, paciência e cumplicidade.

Às minhas irmãs do coração Priscila, Lindamara, Geisa, Ana Carolina e Juliane, pelas quais tenho imenso carinho. Agradeço a Deus por tê-las conhecido!

Aos meus queridíssimos amigos, Erlon, Kleyton, Anderson, Edna, Leonardo, Raquel, Aldérica, Miriam, Vaninha, Laiane, Márcia, Ana Cláudia, Mirelly, Suelane, Lene, Maga, pelos vários momentos inesquecíveis proporcionados.

Aos colegas do laboratório de Fitopatologia (LAFIT/UFPB), a vocês todo o meu carinho, por todos os momentos de aprendizado que a convivência nos proporcionou.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba, por conceder-me a oportunidade do aperfeiçoamento profissional.

À CAPES, pela concessão de bolsa de pesquisa científica para realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Fusarium</i> spp. E MANEJO ALTERNATIVO DA FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO.....	14
Resumo .....	15
Abstract.....	16
Introdução geral .....	17
Objetivo.....	18
Referencial teórico.....	19
Referências bibliográficas.....	31

### CAPÍTULO II

DIVERSIDADE EM ESPÉCIES DE <i>FUSARIUM</i> ASSOCIADOS À FRUTOS DO ABACAXIZEIRO ( <i>Ananas comosus</i> cv. Pérola) NOS ESTADOS DA PARAÍBA, PERNAMBUCO E RIO GRANDE DO NORTE .....	38
Resumo .....	39
Abstract.....	40
Introdução .....	41
Material e métodos.....	42
Resultados e discussão.....	51
Conclusões .....	70
Referencias bibliográficas.....	71

### CAPÍTULO III

ALTERNATIVAS DE MANEJO DA FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO ‘PÉROLA’ .....	75
Resumo .....	76
Abstract.....	77
Introdução .....	

Material e Métodos .....	79
Conclusão.....	88
Referências Bibliográficas .....	89

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo II

- Figura 1.** Árvore filogenética de máxima parcimônia para o gene RPB2 de espécies dos complexos *Gibberella fujikuroi* e *Fusarium oxysporum* incluindo isolados associados à fusariose do abacaxizeiro. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de bootstrap (1000 repetições) são indicados em porcentagem nos internódios. Esta árvore tem como raiz *F. redolens*. IC=0,54; IR=0,90; IH= 0,48. UFPB, Areia, PB, 2016 ..... 54
- Figura 2.** Árvore filogenética interferência bayesiana para o gene RPB2 de espécies dos complexos *Gibberella fujikuroi* e *Fusarium oxysporum* incluindo isolados associados à fusariose do abacaxizeiro. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de probabilidade são indicados em internódios. Esta árvore tem como raiz *F. redolens*. UFPB, Areia, PB, 2016..... 55
- Figura 3.** Árvore filogenética de máxima parcimônia para o gene RPB2 de espécies dos complexos *Gibberella fujikuroi* incluindo isolados associados à fusariose do abacaxizeiro. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de bootstrap (1000 repetições) são indicados em porcentagem nos internódios. Esta árvore tem como raiz *F. oxysporum*. IC=0,62; IR=0,75; IH= 0,40. UFPB, Areia, PB, 2016 ..... 56
- Figura 4.** Árvore filogenética interferência bayesiana para o gene RPB2 de espécies do complexo *Gibberella fujikuroi* incluindo isolados associados à fusariose do abacaxizeiro. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de probabilidade são indicados nos internódios. Esta árvore tem como raiz *F. oxysporum*. UFPB, Areia, PB, 2016 ..... 57

- Figura 5.** Árvore filogenética de máxima parcimônia para o gene RPB2 de espécies dos complexos *Fusarium oxysporum* incluindo isolados associados à fusariose do abacaxizeiro. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de bootstrap (1000 repetições) são indicados em porcentagem nos internódios. Esta árvore tem como raiz *F. redolens*. IC=0,93; IR=0,88; IH= 0,07. UFPB, Areia, PB, 2016 ..... 58
- Figura 6.** Árvore filogenética interferência bayesiana para o gene RPB2 de espécies do complexo *Fusarium oxysporum* incluindo isolados associados à fusariose do abacaxizeiro. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de probabilidade são indicados nos internódios. Esta árvore tem como raiz *F. fujikuroi*. UFPB, Areia, PB, 2016 ..... 59
- Figura 7.** Marcadores culturais dos isolados analisados. Coloração verso e reverso das colônias em BDA: branco a rosa (a e b) no verso – e branco a púrpura no reverso (c e d) – isolados em SNA adicionado de fragmento de folha de bananeira, micélio branco e flocoso (e). Detalhe dos esporodóquios (seta vermelha) em folha de bananeira (f)..... 61
- Figura 8.** Crescimento em BDA e SNA dos isolados representativos de FOOSC e GFSC. Areia, PB, UFPB, 2016 ..... 64
- Figura 9.** Esporulação dos isolados representativos do FOOSC e GFSC analisados nos meios BDA e SNA. Areia, PB, UFPB, 2016 ..... 65
- Figura 10.** Agressividade dos isolados representativos do FOOSC e GFSC analisados. Areia, PB, UFPB, 2016 ..... 67
- Figura 11.** Sintomas da fusariose em frutos de abacaxizeiro no Brasil. a. Fruto sem sintomas; b. Sintoma de coloração inicial translúcida com esporulação cor de rosa (seta vermelha); c. Em detalhe, esporulação cor de rosa (seta vermelha); d. Sintomas mais avançados exibindo esporulação cor de rosa (seta vermelha); e. Sintoma inicial menos severo em ‘V’ (seta azul), em detalhe, sintoma inicial menos severo em ‘V’ (seta azul); f. Sintoma em ‘V’ menos severo em estágio avançado

(seta verde), detalhe sintoma em ‘V’ menos severo em estágio avançado (seta verde); g. sintomas de manchas marrons claras sem forma definida; h. Sintomas de manchas marrons escuras sem forma definida e aspecto seco ..... 68

### Capítulo III

**Figura 1.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e porcentagem de proteção (%) em frutos de abacaxizeiro ‘Pérola’ submetidas aos tratamentos com extratos de *Caesalpinia férrea* (CF), *Anadenanthera colubrine* (AC), *Momordica charantia* (MC), Acibenzolar-S-methyl (ASM), fungicida tebuconazol e controle (água destilada). Areia-PB, 2016 ..... 83

**Figura 2.** Perda de massa de frutos de abacaxizeiro ‘Pérola’ tratados com extratos vegetais, indutores de resistência e fungicida. Areia, PB, UFPB, 2016 ..... 86

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo II

- Tabela 1.** Isolados de *Fusarium* spp. coletados em frutos de abacaxizeiro nos Estados de Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte para estudos de diversidade. UFPB, Areia, PB, 2016 ..... 44
- Tabela 2.** Sequências de referências do gene RPB2 utilizadas para estudo de diversidade genética de *Fusarium* spp. isolados coletados na Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte. Areia, PB, UFPB, 2016 ..... 48
- Tabela 3.** Marcadores morfológicos dos isolados representativos do FOOSC e GFSC analisados. Areia, PB, UFPB, 2016 ..... 63
- Tabela 4.** Regressão e índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) dos isolados representativos do FOOSC e GFSC. Areia, PB, UFPB, 2016 ..... 65

### Capítulo III

- Tabela 1.** Características físico-químicas de frutos de abacaxizeiro ‘Pérola’ tratados com extratos vegetais, fungicida e indutor de resistência acibenzolar-S-metil, 5<sup>o</sup> dia (vida de prateleira), UFPB, Areia-PB, 2016 ..... 85
- Tabela 2.** Atividade enzimática de polifenoloxidase (PPO), peroxidase (POX) e fenilalanina amônia-liase (FAL), em frutos de abacaxizeiro ‘Pérola’ tratados com extratos vegetais, fungicida e indutor de resistência acibenzolar-S-metil, UFPB, Areia-PB, 2016 ..... 87

## **CAPÍTULO I**

### **DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Fusarium* spp. E MANEJO ALTERNATIVO DA FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO**

SOUZA, W. C. O. (Tese de Doutorado em Agronomia). Universidade Federal da Paraíba (CCA/UFPB). Fevereiro de 2016. Diversidade Genética de *Fusarium* spp. e Manejo Alternativo da Fusariose do Abacaxizeiro. Orientador (a): Luciana Cordeiro do Nascimento.

## Resumo

O adequado manejo de doenças de plantas necessita da correta caracterização e identificação de agente(s) etiológico(s), tendo em vista a elevada heterogeneidade apresentada por espécies de um mesmo gênero. Assim como o manejo de doenças na agricultura com o uso de produtos químicos para o seu controle tem sido utilizado de forma convencional, tem sido também alvo de preocupação já que o uso exagerado oferece diversos riscos à saúde humana, bem como ao equilíbrio sustentável do meio ambiente. O objetivo da presente pesquisa foi identificar a diversidade genética de *Fusarium* spp. de populações da Paraíba (PB), Pernambuco (PE) e Rio Grande do Norte (RN) em abacaxizeiro 'Pérola' e avaliar extratos vegetais como controle alternativo da fusariose do abacaxizeiro. Foram coletados frutos de abacaxizeiro, cv. Pérola com sinais e sintomas da fusariose em áreas produtoras na PB, PE e RN. Os isolados foram caracterizados morfológicamente e a caracterização molecular foi realizada utilizando sequências do gene da segunda maior subunidade ribossômica - *RPB2*. Extratos vegetais de *Caesalpinia ferrea* (CF), *Anadenanthera colubrina* (AC), *Momordica charantia* (MC) foram usados nas concentrações de 500, 1000, 1500 e 2000 ppm; enquanto o indutor de resistência acibenzolar-S-metil (ASM) foi utilizado na dosagem de 2,0 g/ha. Como padrão de comparação, utilizou-se o fungicida tebuconazol (75 mL/ha) e a água destilada esterilizada (controle). A avaliação da severidade da doença foi realizada usando-se escala de notas e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD). As avaliações pós-colheita foram realizadas em frutos maduros através das medições de pH, teores de sólidos solúveis totais, acidez total titulável, firmeza e atividade das enzimas peroxidase (POX), polifenoloxidase (PPO) e fenilalanina amônia-liase (FAL). Concluiu-se que os isolados associados aos frutos de abacaxizeiro apresentaram ampla variabilidade determinada pelos marcadores fenotípicos e molecular analisados. Infere-se que podem existir pelo menos duas espécies de *Fusarium*, além de *F. guttiforme*, associadas à fusariose em frutos de abacaxizeiro entre os isolados coletados; os isolados desse estudo induziram sintomas, sinais e níveis diferentes de patogenicidade em frutos de abacaxizeiro. O extrato vegetal de *M. charantia* apresentou potencial para redução da severidade da fusariose em frutos do abacaxizeiro 'Pérola' através do mecanismo de ação fungitóxica; o extrato *M. charantia* nas concentrações mais elevadas, interferiu positivamente as características físico-químicas dos frutos.

**Palavras- Chave:** Variabilidade; Caracterização; Extrato vegetal.

## ABSTRACT

Whereas the proper management of plant diseases requires the correct characterization and identification of agent (s) etiological (s), in view of the high heterogeneity by species of the same genus. As well as the management of diseases in agriculture with the use of chemicals to control it has been used conventionally, considered economically viable for many, however, is also causing concern have been the overuse offers several health risks human and sustainable environmental balance. The objective of this research was to identify the genetic diversity of *Fusarium* spp. populations in states of Paraíba state, Pernambuco (PE) and Rio Grande do Norte (RN), Brazil and, evaluate plant extracts as an alternative to control *Fusarium* wilt of pineapple. It was collected fruit of pineapple, cv. Perola with signs and symptoms of *Fusarium* in producing areas in PB, PE and RN. The isolates were characterized morphologically and molecular characterization was performed using gene sequences of the second largest ribosomal subunit - RPB2. Plant extracts of *Caesalpinia ferrea* (CF), *Anadenanthera colubrina* (AC), *Momordica charantia* (MC) were used at concentrations of 500, 1000, 1500 and 2000 ppm; while the resistance inducer acibenzolar-S-methyl (ASM) was used at 2.0 g / ha. As a standard of comparison, it was used the fungicide tebuconazole (75 ml / h) and sterile distilled water (control). The assessment of the severity of the disease was performed using a i and the disease index to determine the area under disease progress curve (AUDPC). Post-harvest assessments were conducted in ripe fruits through the pH, total soluble solids, titratable acidity, firmness and activity of peroxidase (POX), polyphenol oxidase (PPO) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL). It was found that the isolates associated with pineapple fruits showed high and wide variability determined by phenotypic and molecular markers analyzed. There are at least two species of *Fusarium*, and *F. guttiforme*, associated with *Fusarium* in fruit pineapple among isolates collected; pathogens of this study showed symptoms, signs and different levels of pathogenicity in fruits of pineapple. The herbal extract of *M. charantia* presented with potential in reducing the severity of fusarium disease in fruits of pineapple 'Perola' through the fungitoxic mechanism of action; *M. charantia* extract at higher concentrations positively affected the physical and chemical characteristics of the fruits.

**Key-words:** Variability; Characterization; Plant Extract.

## INTRODUÇÃO GERAL

No cenário nacional do mercado frutícola, o abacaxizeiro (*Ananas comosus* L.) destaca-se por está entre as culturas mais rentáveis, visto que nas últimas cinco décadas foi observado o crescimento constante da área cultivada e da produção total refletindo a expansão do mercado consumidor (REETZ et al., 2015; IBGE, 2015).

Entretanto os abacaxicultores enfrentam problemas no campo, sobretudo de ordem fitossanitária, destacando-se as doenças que causam grandes prejuízos econômicos. Dentre elas, está a fusariose, que tem como agente etiológico o fungo *Fusarium guttiforme* (Nirenberg e O "Donnell), que causa problemas durante todo o ciclo da planta, porém é na pós-colheita que acarreta grandes prejuízos econômicos aos produtores, uma vez que as perdas podem atingir até 100% da produção (APARECIDO et al., 2010).

No Brasil a espécie *F. guttiforme* caracteriza-se por causar doença em abacaxizeiro, porém análises moleculares tem detectado que dentro deste gênero pode haver outras espécies causando a fusariose, assim a caracterização molecular é uma importante ferramenta para detectar a diversidade genética entre e dentro de populações para traçar estratégias de controle, o adequado manejo de qualquer doença passa, necessariamente, pela correta caracterização e identificação de agente(s) etiológico(s) (NIRENBERG; O'DONNELL, 1998; JACOBS et al., 2010; SOARES, 2011).

No manejo da fusariose, o uso de produtos químicos para o seu controle nos plantios de abacaxizeiro no Brasil tem sido utilizado de forma convencional pelos abacaxicultores. Essa prática ainda é, por muitos, considerada economicamente viável, em contrapartida, tem sido também alvo de preocupação, já que o uso exagerado oferece diversos riscos à saúde humana, bem como ao equilíbrio sustentável do meio ambiente, depositando altas taxas residuais nos frutos pós-colheita através de altas dosagens e desrespeito ao período de carência e pelo uso de princípios ativos não registrados para a cultura (NOGUEIRA et al., 2014; PARA, 2014).

Como fonte alternativa para o controle de doenças no abacaxizeiro, tem sido adotada nos últimos anos, o uso de extratos vegetais e óleos essenciais de plantas nativas, que vem surgindo como uma aceitável opção, com resultados promissores em pesquisas que comprovam ou validam a sua eficácia (NASCIMENTO et al., 2013; SOUZA et al., 2015; SALES et al., 2016).

Trabalhos têm constatado sua eficiência no controle de fitopatógenos, tanto pela ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de resistência, que indica a presença de compostos com características de elicitores (SOUSA et al., 2013; BRITO et al., 2015; SOUZA et al., 2015). Neste sentido, a procura por medidas alternativas no manejo de doenças, tem sido buscada como estratégia para redução do uso de agrotóxicos de alta toxicidade, visando conciliar a produção de alimentos seguros, a preservação ambiental e a viabilidade econômica dos plantios comerciais (FAROOQ et al., 2011; BETTIOL, 2014). Assim, plantas medicinais representam uma rica fonte de compostos naturais a serem explorados para identificar novos princípios de defesa (VILELA et al., 2013; FONSECA et al., 2015; SAROJ et al., 2015).

## **OBJETIVO**

Identificar a diversidade genética de *Fusarium* spp. em populações do fungo coletadas nos estados da Paraíba (PB), Pernambuco (PE) e Rio Grande do Norte (RN) e determinar extratos vegetais como controle alternativo da fusariose do abacaxizeiro.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### A cultura do abacaxizeiro

O abacaxizeiro é originário da América tropical e subtropical, com fortes indícios de ser o Brasil o seu local de origem, pois além de *Ananas comosus*, todas as espécies do gênero *Ananas* são encontradas nas formas silvestres ou cultivadas em várias regiões brasileiras. Em meados do século XVI, o abacaxi, em consequência de sua beleza e qualidade como alimento, tornou-se conhecido pelo mundo, ganhando importância como espécie cultivada (MEDINA et al., 1978; FERREIRA; CABRAL, 1999).

O abacaxizeiro pertence à família Bromeliaceae, que apresenta aproximadamente 2700 espécies, herbáceas, epífitas ou terrestres, distribuídas em 56 gêneros, originárias das Américas, predominantemente neotropicais (BENZING, 2000). Pertence à subfamília Bromelioideae, gênero *Ananas*, que compreende espécies cultivadas, bem como espécies silvestres (SIMÃO, 1998). A maioria das cultivares de abacaxizeiro pertence à espécie *Ananas comosus* (L.) Merrill. A planta caracteriza-se por ser do tipo monocotiledônea, com caule curto e grosso, ao redor do qual crescem folhas estreitas, compridas, flexíveis e resistentes, dispostas em rosetas. No caule, insere-se o pedúnculo que sustenta a inflorescência e depois o fruto. Cada planta produz um único fruto de aroma característico (COTIAS-DE-OLIVEIRA et al., 2000).

Atualmente o continente Asiático é considerado o maior produtor de abacaxi, chegando a 48,6% do total da produção mundial, em relação a 34,1% das Américas e 16,4 da África. Entre os países produtores, o Brasil aparece em segundo lugar, perdendo apenas para a Costa Rica em quantidade de frutos produzidos (FAOSTAT, 2016).

Nos últimos anos a área plantada com abacaxizeiro em território brasileiro quase que dobrou. Em 2010 era 60.016 ha e no ano de 2014 essa área chegou a 111.688ha, cujo rendimento médio obtido neste ano foi de 26.493 frutos/ha. Entre os estados produtores o Pará é o maior produtor nacional com um rendimento médio de 30.688 frutos/ha, seguido de Minas Gerais com 30.141 frutos/ha e Paraíba com 29.937 frutos/ha (IBGE, 2015).

A produção comercial de abacaxi é baseada nas cultivares Smooth Cayenne, Queen, Singapore Spanish, Española Roja e Pérola. Contudo, estima-se que cerca de 70% da produção mundial provém de Smooth Cayenne. Nacionalmente, as cultivares

Pérola e Smooth Cayenne são as mais cultivadas. No mercado interno a cultivar Pérola é a mais consumida, por suas características de maior quantidade de açúcares e polpa suculenta, atendendo a preferência dos brasileiros. Para a exportação, a cultivar Smooth Cayenne atende ao mercado europeu, que prefere polpa de cor mais intensa e sabor ácido (CABRAL, 1999; GRANADA et al., 2004).

A agroindústria do abacaxi tem tido amplo crescimento, sendo a fruta passível de ser consumida de várias formas como *in natura*, enlatada, congelada, em calda, cristalizada, em forma de passas e em pickles, como doces, compotas, polpas, sorvetes, cremes, trufas, bolos, xarope, licor, vinho, vinagre e aguardente e ainda serve de matéria prima para a extração de álcool e ração animal. Assim a importância econômica da cultura do abacaxizeiro merece destaque por ser altamente absorvedora de mão de obra no campo e na indústria, gerando fonte de renda no meio rural e urbano (REINHARDT; ALVES, 2003; PARENTE et al., 2014; PEREIRA et al., 2015).

No campo, a cultura do abacaxizeiro merece destaque, sobretudo no aspecto fitossanitário, uma vez que várias doenças acometem a planta, inviabilizando o plantio. Dentre os microrganismos patogênicos da cultura, destacam-se a *Phytophthora nicotiana* van Brenda de Haan var. *parasitica* (Dastur), causando perdas acentuadas, quando a infecção ocorre após a indução floral, sendo o agente causal da podridão-do-olho, principalmente em regiões onde se utiliza sistema de irrigação ou regiões que tem alta pluviosidade (MATOS, 2005). Outro fungo que merece destaque é *Chalara (Thielaviopsis) paradoxa* (De Seyn) Sacc., que causa a podridão negra do abacaxizeiro, que pode tanto infectar as mudas, provocando a sua morte, quanto causar podridão de frutos em pós-colheita, sendo considerada uma doença agressiva e de difícil controle (FERRARI, 2009).

A espécie *F. guttiforme*, agente causal da fusariose é considerada uma das principais doenças em plantas de abacaxizeiro. Seu principal agente de dispersão é a muda, que dissemina a doença para outros locais, provocando perdas elevadas na produção e pós-colheita de frutos (MATOS et al., 2009).

### **Gênero *Fusarium* e fusariose do abacaxizeiro**

O gênero *Fusarium* pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Subdivisão Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, subclasse Hypocremycetidae, ordem Hypocreales e família Nectriaceae (FUGURUM, 2015). Classificado e descrito, pela

primeira vez, pelo micologista alemão Link, em 1809. O gênero *Fusarium* apresenta-se com várias espécies capazes de causar doenças em plantas, como as podridões de raízes, caules e frutos, além das murchas vasculares. Algumas espécies são particularmente comuns no solo, onde podem persistir sob a forma de clamidósporos ou como hifas, enquanto outras espécies produzem conídios disseminados pelo ar, colonizando normalmente ramos, folhas, inflorescências e frutos (VENTURA, 1999; KVAS et al., 2009).

Este gênero foi por muitos anos avaliado apenas por caracteres morfológicos, para a identificação da espécie. Neste aspecto, técnicas moleculares de classificação e identificação estão contribuindo de forma significativa para o entendimento das relações filogenéticas entre as diferentes espécies, bem como contribuir para uma melhor classificação das novas espécies. Além disso, a utilização de métodos moleculares, como o sequenciamento de genes conservados, para a identificação de microrganismos, pode possibilitar ainda o desenvolvimento de métodos de diagnóstico e análises filogenéticas e de epidemiologia (NIRENBERG e O'DONNELL, 1988; LESLIE et al., 2007).

Estudos filogenéticos comprovaram que, na maioria das morfoespécies ou complexo de espécies, tais como *F. solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend. Snyder & Hansen, *F. graminearum* Schwabe, *F. oxysporum* Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen e *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw ocorre grande diversidade intraespecífica que podem chegar ao nível molecular de diferenciação específica (LESLIE et al., 2007; O'DONNELL et al., 2013), com a utilização de vários genes diferentes nas análises filogenéticas.

A espécie *F. guttiforme* está entre as espécies que fazem parte do Complexo *F. fujikuroi* e causa a fusariose do abacaxizeiro e a podridão dos frutos de abacaxi (PLOETZ, 2006). Provoca prejuízos nos plantios de abacaxizeiro por deteriorar a planta e inviabilizar a comercialização dos frutos na fase pós-colheita. Uma correta identificação de fungos que atacam pomares de abacaxizeiro se torna importante para traçar estratégias de manejo da doença (CRESPO, 2010; GARCIA et al., 2015).

Mais recentemente, uma nova espécie foi identificada infectando abacaxizeiro na África do Sul e caracterizada como *F. ananatum*, nova espécie patogênica que foi considerada intimamente relacionada com *F. guttiforme* (JACOBS et al., 2010). A incidência geográfica destas espécies, assim como as suas espécies hospedeiras estão bem determinadas. Demonstrou-se que, para estes agentes patogênicos, um considerável

nível de especificidade patógeno-hospedeiro foi desenvolvido (SUTHERLAND e PEGG 1992; LIEVENS et al., 2007)

Os sintomas associados a ambos, *F. guttiforme* e *F. ananatum* são bastante similares, porém, menos severos no caso de *F. ananatum*. Os sintomas de *F. guttiforme* nos frutos incluíam, inicialmente, descoloração dos tecidos infectados que se tornavam rebaixados com esporulação rosa e exsudação de goma. Similar descoloração dos tecidos ocorria com *F. ananatum*; a área rebaixada aparecia em forma de “V” e não era observada esporulação e nem exsudação de goma (JACOBS et al., 2010). Semelhantemente ao observado na África, diferentes espécies de *Fusarium* podem estar associadas a fusariose do abacaxizeiro no Brasil, visto elevada diversidade e diferentes linhagens filogenéticas detectadas pelos genes EF1- $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina e Calmodulina em populações brasileiras (CRESPO, 2010; SOARES, 2011; TSUJI, 2012). No entanto, estes estudos não foram conclusivos e assim, *F. guttiforme* parece ser o patógeno da fusariose do abacaxizeiro prevalecente no Brasil e o mais adaptado, porém não necessariamente o único.

### **Diversidade genética e molecular de fitopatógenos**

As interações hospedeiro-patógeno são marcadas por íntimas relações geneticamente controladas denominadas de coevolução, onde modificações genéticas na população de um dos componentes são acompanhadas por modificações genéticas na população do outro (CAMARGO, 1995). Essa relação estabelece que para cada gene de resistência no hospedeiro existe um gene correspondente de virulência no patógeno. Alterações nas populações de patógenos, em resposta aos genes de resistência no hospedeiro, geram variabilidade aumentando a diversidade genética e molecular de fitopatógenos (PASCHOLATI et al., 1998).

Assim a importância de se estudar detalhadamente o microrganismo e sua diversidade, caracterizando-o, implicando no correto manejo de dado patossistema, tendo conhecimento da identidade do fitopatógeno através de análises morfológica e molecular. Ao manejar determinada área sem o conhecimento real do microrganismo trás consequências reais como: não controlar a doença, contaminar o meio ambiente com introdução de agrotóxico inadequado e aumentar ainda mais a resistência do patógeno.

Na caracterização fenotípica o conceito de espécie morfológica é de grande importância para a classificação inicial da espécie. Caracteres estruturais têm sido

usados como marcadores morfológicos para diferenciar populações. Porém a quantidade de caracteres detectados é insuficiente ao considerar o número de espécies a se comparar. Dentro do gênero *Fusarium*, as chaves sinóticas de Nelson et al., (1983) para agrupamento em nível de seções, e Nirenberg e O'Donnel (1988) em nível de espécie, são os principais caracteres taxonômicos de classificação dentro do complexo *Gibberella fujikuroi*.

Na caracterização molecular, a identidade dos seres vivos é determinada pela composição e sequência do material genético. O uso de técnicas moleculares, através da análise de DNA, possui a vantagem de ser um processo rápido e altamente sensível. Essas técnicas não estão sujeitas a variações fenotípicas, à ação do ambiente, ao estágio de desenvolvimento do fungo e a outros fatores que possam alterar a morfologia do organismo (FUNGARO, 2000). A diferenciação genética entre populações de uma espécie constitui o primeiro estágio da divergência evolutiva. Essa diferenciação resulta, na maioria dos casos, da ação de diferentes ambientes a que cada população está sujeita sobre a variabilidade preexistente na espécie (MARQUES, 2003).

As técnicas conhecidas de diagnóstico molecular fundamentam-se na análise direta ou indireta da composição ou na sequência dos ácidos nucleicos para identificação e caracterização de organismos (MARQUES et al., 2002). Esses métodos moleculares baseados na análise do ácido desoxirribonucleico (DNA) são ferramentas muito úteis nos estudos de filogenia de fungos e na diferenciação de espécies, formas especiais, raças e isolados (KUMARAE; SOUZA, 2002), pois são capazes de determinar o polimorfismo existente entre as sequências de nucleotídeos dos organismos (KISTLER et al., 1987).

O conhecimento de sequências de nucleotídeos de pelo menos, uma parte da região alvo é necessário para se desenhar iniciadores específicos, que posteriormente poderão ser utilizados para a detecção de fungos, proporcionando a amplificação de um gene ou segmento específico da espécie que se deseja identificar. O DNA ribossomal (DNAr) é muito utilizado como marcador molecular na identificação e diferenciação de espécies (FUNGARO, 2000). Nos seres eucariotos estão presentes repetidas vezes e cada unidade consiste de genes codificadores dos RNAs ribossomais 18S, 5.8S e 28S e dois espaços internos (ITS 1 e ITS 2) que separam esses genes. A avaliação filogenética utilizando segmentos de DNA da segunda maior subunidade ribossômica ou 'RNA Polimerase II Gene' (*RPB2*) (O'DONNELL et al., 2013), tem sido reconhecida por sua

informatividade em análises de fungos diversificadas, incluindo *Fusarium* spp. (O'DONNELL et al., 2010).

### **Tratamento alternativo para o controle de doenças de plantas**

O manejo integrado da produção na agricultura propõe-se a associar métodos de controle de pragas e doenças, que precisam atender a padrões ecologicamente corretos assim como a procedimentos estabelecidos por normas técnicas. O monitoramento de pragas e doenças e verificação do estado nutricional das plantas são exemplos da redução significativa do uso de agrotóxicos contribuindo para a proteção ambiental e diminuição dos custos de produção, sem afetar a produtividade e qualidade dos frutos. (MATOS; REINHARDT, 2007).

O uso de agrotóxicos nos dias atuais tem crescido em números alarmantes e na maioria dos casos o produtor não respeita a carência estabelecida para a colheita do produto. O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) revela dados de monitoramento em amostras de algumas culturas apresentando resíduos de vários ingredientes ativos. Tal constatação pode reforçar a necessidade de melhoria na formação dos produtores rurais e o acompanhamento do uso de agrotóxicos na agricultura brasileira, de modo a garantir e, conseqüentemente, diminuir a exposição ocupacional a substâncias tóxicas (PARA, 2014).

É inegável a eficiência dos fungicidas no controle de doenças de plantas, entretanto esses geralmente contaminam o meio ambiente e traz efeitos maléficos sobre a saúde humana. Dessa forma tem aumentado nos últimos anos a busca no mercado por produtos agrícolas elaborados com substâncias naturais. Nesse sentido, a pesquisa tem recorrido a novas práticas de manejo integrado de pragas e doenças que consistam na integração do manejo convencional as técnicas alternativas de controle, ou até mesmo o controle alternativo atender a necessidade total de combate às doenças na agricultura (FAROOQ et al., 2011; BORGES et al., 2013)

Existe um histórico na área farmacêutica em que substâncias bioativas extraídas de plantas medicinais e nativas têm sido estudadas. Mais recentemente os estudos tem se expandido na agricultura visando o manejo sustentável de doenças em plantas. As plantas possuem mecanismos eficientes de resistência que podem ser acionados ou ativados quando em contato com indutores. A utilização deste grupo de compostos é

uma estratégia promissora já que a presença deste na planta estimula a produção de fitoalexinas, substâncias envolvidas na defesa natural das plantas (PINTO, 2013; MÉLO-FILHO; GUENTHER, 2015).

No metabolismo secundário os vegetais produzem uma variedade de compostos orgânicos que não tem função direta no seu crescimento e desenvolvimento, porém possuem funções ecológicas importantes nos vegetais entre os quais proteger contra o ataque de microrganismos (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os extratos vegetais possuem uma potencial atividade antimicrobiana e vêm sendo amplamente utilizados como medida alternativa no controle de doenças de plantas. Borges et al. (2013) ao avaliarem a ação do extrato vegetal aquoso e etanólico das cascas de *Mimosa tenuiflora* no controle da mancha-de-alternaria (*Alternaria cucumerina*) em melancia (*Citrullus lanatus*), verificou efeito potencial contra a doença, seja causando toxidez ao patógeno ou através da indução de resistência. Sales et al. (2016) utilizaram extrato de diversas espécies como *Glycyrrhiza glabra*, *Myroxylon balsamum*, *Aloe vera*, *Allium sativum*, *Protium heptaphyllum* e *Rhizophora mangle* no controle dos fungos *Fusarium guttiforme* e *Chalara paradoxa* em folhas de abacaxizeiro, obtendo potencial controle dos dois fungos avaliados com o extrato de *M. balsamum*.

O uso de extratos vegetais desponta como tecnologia eficiente, ecológica e econômica, possuindo grande potencial de aplicação em um programa integrado de manejo de doenças de plantas. Esta se apresenta inócua ao homem e ao meio ambiente, sintonizada com as atuais tendências agrícolas mundiais nas quais, a ecologia se alia cada vez mais à química no delicado processo de proteção de plantas contra pragas e doenças (PINTO et al., 2012).

Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto vegetal e óleos essenciais, obtidos a partir de plantas medicinais oriundas da flora nativa, têm indicado potencial controle de fitopatógenos por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos ou pela indução de fitoalexinas, indicando presença de composto(s) com característica de elicitor (es). O estudo dos metabólitos secundários das plantas, bem como a determinação da atividade biológica, com respeito à atividade elicitora ou antimicrobiana poderá contribuir para a aquisição de maiores conhecimentos que reforcem sua possível utilização como um método alternativo de controle de doença de plantas (PAES et al., 2013; SAROJ et al., 2015)

Espécies como *Momordica charantia* L, *Caesalpinia ferrea* Mart e *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, já foram testadas em alguns patossistemas e apresentaram-se como potenciais para o uso do seu extrato vegetal, no controle de doenças de plantas.

### ***Momordica charantia* L.**

Conhecida como melão-de-são-caetano, é uma planta daninha comestível e com grande importância econômica no Brasil devido às inúmeras propriedades medicinais. Na agricultura, foram relatados efeito inseticida no controle da lagarta *Spodoptera litura* Fabr. e para o pulgão *Aphis craccivora* Koch (AMNART; CHADIN, 1983); larvicida para o mosquito *Culex* sp. (SRIVASTAVA; NERALIYA, 1997) e até nematicida para o nematóide *Meloidogyne incognita* (DIAS et al., 2000). Além disto, essa planta possui atividade antibacteriana (ANWAR et al., 2000) e antifúngica já constatada sobre *Colletotrichum gloeosporioides* isolado do mamoeiro (*Carica papaya*) (CELOTO et al., 2008); *Cercosporidium personatum* de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) (SAXENA et al., 2002) e sobre outros fungos como *A. alternaria*, *Emericellopsis terricola*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Stemphylium helianthi*, que infectam o girassol (*Helianthus annuus*) (BHUTTA et al., 1999).

Alguns trabalhos comprovaram efeitos de indução de resistência e fungitoxicidade do extrato da *M. charantia* no manejo de doenças de plantas. No trabalho desenvolvido por Silva et al. (2011) foi demonstrado que extratos de folhas e galhos de melão-são-caetano nas concentrações de 5 e 10% inibiram o crescimento dos fungos tais como, *Penicillium* sp., *C. gloeosporioides*, *Sclerotium rolfsii* e *F. oxysporum* avaliados *in vitro*. Faria et al. (2009) ao avaliarem os 20 extratos hidroetanólicos e aquosos, *in vitro*, constataram o controle de 100% dos escleródios de *S. rolfsii* num período de 7 dias, no ensaio *in vivo*, o extrato hidroetanólico aplicado tanto em 6 ou 3 dias, antes do plantio, de forma preventiva, diminuiu a severidade da doença em 74%, os autores concluíram que o extrato de *M. charantia* apresentou atividade preventiva e antimicrobiana no controle do patógeno. Na pós-colheita, Celoto et al. (2011) avaliaram os extrato metanólico e aquoso de *M. charantia* em banana (*Musa* spp.) e obtiveram inibição de até 80% no desenvolvimento das lesões da antracnose, quando aplicados até dois dias antes da inoculação de *C. musae*.

### ***Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan**

Também conhecido como angico, tem ampla abrangência geográfica no Brasil e apresenta expressiva regeneração natural. É bastante explorada na produção de madeira e carvão além de ser indicada para reflorestamento em áreas degradadas (DHINGRA, et al., 2011).

Esta planta tem sido aplicada na medicina popular com diversas propriedades farmacológicas que são atribuídas a compostos bioativos, tais como, triterpenos, esteróis, polissacarídeos e compostos fenólicos como os flavonóides (GUTIERREZ-LUGO et al., 2004; ARAUJO et al., 2008), fenólicos e de taninos (MONTEIRO et al., 2005; PAES et al., 2013).

Apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias endodônditas (ROCHA et al., 2013) e também contra fungos fitopatogênicos como *Alternaria alternata* (CAMPOS, 2011). Em estudos de plantas da Caatinga no Nordeste (Brasil) Silva (2013) avaliou o potencial do extrato de folhas de *Anadenanthera colubrina*, coletadas nas estações seca e chuvosa contra espécies bacterianas, obtendo resultados satisfatórios.

### ***Caesalpinia ferrea* Mart. ex. Tul var. *leiostachya* Benth**

Popularmente conhecida como jucá ou pau-ferro, tem abrangência em várias regiões do Brasil. Sua ocorrência é mais comum em toda a região Nordeste, estendendo-se até o Espírito Santo e Rio de Janeiro na Floresta Pluvial Atlântica (GALDINO et al., 2008).

Na medicina popular sua utilidade é vasta. São inúmeras as propriedades terapêuticas descritas, que incluem o uso da entrecasca para o tratamento de feridas, cicatrização, contusões, combate à asma e à tosse crônica (BRAGA, 1976). Os frutos são comestíveis, atuam no tratamento das diarreias e as raízes, no combate à febre (MAIA, 2004). Apresenta propriedades do extrato aquoso contra úlceras gástricas, além das atividades anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana (THOMAS et al., 1988; CARVALHO et al., 1996).

Esta espécie tem sido bastante estudada devido aos compostos antimicrobianos contidos no seu extrato e que apresentam eficiência significativa no controle de doenças. Esses compostos caracterizam-se como importantes fontes de bioativos (fenólicos totais e ácido gálico) presentes na estrutura química dos mesmos, com propriedades biológicas. Apresentam inibição sobre a ação de diversos fungos, devido ao aumento da atividade antioxidante e ativação dos mecanismos de defesa (SOUSA et al., 2013).

Cavalcante (2013), avaliou a atividade antimicrobiana dos extratos de *Stryphnodendron adstringens* e de *Caesalpinia ferrea* contra as bactérias *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis*. Observado que as frações dos extratos em acetato de etila e n-butanol de *C. ferrea* apresentaram maior atividade contra as três bactérias estudadas. Bariani et al. (2012), avaliaram os efeitos do extrato de *C. ferrea* sobre os fungos fitopatogênicos *Colletotrichum guaranicola*, *Corynespora cassiicola*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotium rolfsii*, concluindo que o extrato vegetal apresentou potencial promissor como fungicida natural, uma vez que reduziu o crescimento micelial e a esporulação dos quatro fungos avaliados.

### **Indução de resistência de plantas a patógenos**

Indução de resistência consiste no aumento do nível de resistência por meio da ativação de genes que codificam diversas respostas da defesa vegetal sem alterar o genoma, através da utilização de agentes externos (indutores) bióticos ou abióticos. Seu efeito deve estar unicamente relacionado com a capacidade de sensibilizar a planta e ativar seus mecanismos de defesa. A resistência usualmente é complexa e tem como base a ação combinada de diversos fatores. Esse fenômeno se inicia com o reconhecimento do agente agressor e desencadeia uma cascata de eventos e sinais que culminam com a ativação dos mecanismos de defesa (BONALDO et al., 2005; SOARES; MACHADO, 2007).

As plantas medicinais possuem compostos secundários que tanto podem ter ação fungitóxica (ação antimicrobiana direta) como elicitora, ativando mecanismos de defesa nas plantas (ação indireta). O uso de medicamentos homeopáticos como controle alternativo tem demonstrado capacidade para induzir a produção de metabólitos

secundários como às proteínas relacionadas à patogênese. As proteínas RP são induzíveis no hospedeiro em resposta à infecção por um patógeno ou por estímulos abióticos, e podem estar correlacionadas com a resistência não específica do hospedeiro ao patógeno.

### **Enzimas relacionadas à patogênese**

A enzima peroxidase, presente nos tecidos das plantas, em certas células animais e em microrganismos, é conhecida por participar de vários processos fisiológicos de grande importância (HOAGLAND, 1990). Ela cataliza a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio, originando lignina. As peroxidases participam da biossíntese do hormônio vegetal etileno (ISIGHE et al., 1993); da oxidação de compostos fenólicos, os quais acumulam-se em resposta à infecção; oxidação do ácido indolil-3-acético (AIA) (HOAGLAND, 1990) e na biossíntese de lignina (INTRAPRUK et al., 1994.). Mudanças na atividade das peroxidases têm sido freqüentemente correlacionadas à resposta de resistência ou suscetibilidade em diferentes patossistemas.

A fenilalanina amônia-liase (FAL) é a enzima do metabolismo secundário mais intensivamente estudada em plantas, devido a importância nas reações do metabolismo dos compostos fenólicos e estabilidade e facilidade de preparação para os ensaios enzimáticos. Essa enzima é responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido trans-cinâmico e amônia. O ácido trans-cinâmico pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos (ácido 4-coumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico), os quais estão presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonóides e ligninas. A FAL já foi isolada de algas, fungos e principalmente de plantas superiores, não tendo sido ainda detectada em células bacterianas ou tecidos animais (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

Assim como a fenilalanina amônia-liase (FAL) a polifenol oxidase (PPO) é uma enzima envolvida na rota dos fenilpropanóides (STADNIK; BUCHENAUER, 2000), fazendo parte de um grande grupo de enzimas conhecidas como oxidoredutases que oxidam fenóis a o-quinonas na presença de oxigênio molecular. A PPO está amplamente distribuída na natureza, principalmente no reino vegetal, ocorrendo também em bactérias, fungos, plantas, mamíferos, artrópodes e crustáceos, tais como camarão, lagosta e caranguejo. A PPO é uma enzima que contém cobre no sítio ativo e atua como oxidase de função mista, catalisando dois tipos diferentes de reações, ambas

na presença de oxigênio molecular: hidroxilação de monofenóis para o-difenóis e a oxidação de o-difenóis em o-quinonas.

Estas três enzimas têm sido utilizadas em experimentos para testes de confirmação de indução de resistência com a utilização de elicitores (ITAKO et al., 2009; BORGES et al., 2013; SOUZA et al., 2015)

## REFERÊNCIAS

- AMNART, T.; CHADIN, D. Insecticidal activity of organic substance in *Momordica charantia* L. Bangkok: Kasetsart University, p. 220-221, 1983.
- ANWAR, Z.; AYUB, N.; KHHAN, A. G. Antibacterial ability of extracts from arbuscular mycorrhizal roots of *Allium sativum* L. and *Momordica charantia* L. **Hamdard Medicus**, 43, 1, 29-33, 2000.
- APARECIDO, C. C.; PIRES, G. C. C.; FINATTI, D.; VALE, S. L. Diferenciação de Podridões causadas em Frutos de Abacaxi por Fungos. Instituto Biológico—APTA Documento Técnico 008, p.1-7. 2010.
- ARAUJO, T.A.S.; ALENCAR, N.L.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, 120, 72 – 80, 2008.
- BARIANI, A., DE CARVALHO GONÇALVES, J. F., CHEVREUIL, L. R., PEREIRA, J. R. Purificação parcial de inibidores de tripsina de sementes de *Caesalpinia ferrea* e *Swartzia polyphylla* e o efeito dos extratos protéicos sobre fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, 38, 131-138. 2012.
- BENZING, D.H. **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation**. New York: Cambridge University, 690p. 2000.
- BETTIOL, W. Productos alternativos para el manejo de enfermedades en cultivos comerciales. **Fitosanidad**, v. 10, 2, p. 85-98, 2014.
- BHUTTA, A. R.; BHATTI, M. H. R.; IFTIKHAR, A. Effect of seed diffuse atesongrowthon seed-borne fungi of sunflower. **Helia**, 22, 31, 143-150, 1999.
- BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F., ROMEIRO, R. S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: FEALQ, p. 11-28. 2005.
- BORGES, I. V., PEIXOTO, A. R., CAVALCANTI, L. S., LIMA, M. A. G., & SILVA, M. Extratos de jurema preta no controle de mancha-de-alternaria em melancia. *Revista Caatinga*, 26, 3, 36-45. 2013.
- BRAGA, R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. Mossoró: Editora Universitária da UFRN, 540p., 1976.
- BRITO, N.M; NASCIMENTO, L.C. Potencial fungitóxico de extratos vegetais sobre *Curvularia eragrostidis* (P. Henn.) Meyer *in vitro*. **Revista brasileira de plantas medicinais** [online]. n. 17, ed. 2, p. 230-238. 2015.
- CABRAL, J. R. S. Cultivares de abacaxi. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, Cruz das Almas, 20p, 1999. (Circular técnica, 33).
- CABRAL, J.R.S. et al. Imperial, a new pineapple cultivar resistant to fusariosis. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.822. 1999.

- CAMARGO, L. E. A. Mecanismos de variabilidade genética de agentes fitopatogênicos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, p.455-469. 1995.
- CAMPOS, V. A. C. Purificação e identificação das substâncias ativas contra o fungo *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler produzidas por *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Fabaceae). 2011. 85 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- CARVALHO, J.C.T.; TEIXEIRA, J.R.M.; SOUZA, P.J.C.; BASTOS, J.K.; SANTOS FILHO, D.; SARTI, S.J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, 53, 175-178, 1996.
- CASELA, C. R.; GUIMARÃES, F. B. Especialização fisiológica de fungos fitopatogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, 4, 75-93, 1996.
- CAVALCANTE, Gilcianny Pignata et al. Extratos de *Stryphnodendron adstringens* e *Caesalpinia ferrea* no controle de bacterioses do tomateiro. Universidade Federal de Viçosa-UFV. Tese de Doutorado. 2013.
- CELOTO, M. I. B.; PAPA, M. F. S.; SACRAMENTO, L. V. S.; CELOTO, F. J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum Agronomy**, 30, 1, 1-5, 2008.
- CELOTO, M.I.B.; PAPA, M.F.S.; SACRAMENTO, L.V.S.; CELOTO, F.J. Atividade antifúngica de extratos de *Momordica charantia* L. sobre *Colletotrichum musae*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 13, 3, 337-341, 2011.
- COTIAS-DE-OLIVEIRA, A.L.P. et al. Chromosome numbers in Bromeliaceae. **Genetics and Molecular Biology**, 23, 1, 173-177, 2000.
- CRESPO, N. C. Diversidade genética de isolados do agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro no Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras. UFLA. 36p. 2010.
- DAVIS, B. D.; DULBECCO, R.; EISEN, H. N.; GINSBERG, H. S.; WOOD JR., W. B. **Microbiologia**. São Paulo: EDART. 1973.
- DHINGRA OD; SINCLAIR JB. Basic plant pathology methods. Boca Raton: Lewis. 434p. Documentos on-line-ISSN-1808-9 9992/238. 2011. Effect of anacidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. **Immunology Letters**, 89, 175 – 185, 2003.
- DIAS, C. R.; SCHWAN, A. V.; EZEQUIEL, D. P.; SARMENTO, M. C.; FERRAZ, S. Efeito de extratos aquoso de plantas medicinais na sobrevivência de juvenis de *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, 24, 2, 203-210, 2000.
- FAOSTAT - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICAL DATABASE 2011. **Crops database**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Online. Acesso em: 22 Jan. 2016.
- FARIA, F. A.; BUENO, C. J. STRADIOTO PAPA, M. F. Atividade fungitóxica de *Momordica charantia* L. no controle de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Acta Sciece Agronomica**. 31, 3, 2009.

- FAROOQ, M.; JABRAN, Z.A; CHEEMA, A.; WAHID, K.H.M. The role of allelopathy in agricultural pest management. *Pest Management Science*, 67, 493-506, 2011.
- FERRARI, J.T. Podridão negra do abacaxi. *Divulgação Técnica. Biológico*, 71, 1, 49-51. 2009.
- FERREIRA, F.R.; CABRAL, J.R.S. Pineapple germplasm in Brazil. *Acta Horticulturae*, Hague, 334, 23-26, 1993.
- FONSECA, M., LEHNER, M., GONÇALVES, M., PAULA JÚNIOR, T. J., SILVA, A., BONFIM, F., PRADO, A. Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. *Revista brasileira de plantas medicinais*, 17, 1, 45-50. 2015.
- FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. *Revista Biotecnologia, Ciências e Desenvolvimento*, ano III, 14, 12-16, 2000.
- FUNGORUM, Index. On line [www.indexfungorum.org.names.Names.asp](http://www.indexfungorum.org.names.Names.asp), accessed on, v. 10, 2015. Acesso em: 10 de dez. de 2015.
- GALDINO, G.; MESQUITA, M. R.; FERRAZ, I. D. K.. Descrição morfológica da plântula e diásporos de *Caesalpinia ferrea* Mart. *Revista Brasileira de Biociências*, 5, 1, 747-749, 2008.
- GARCIA, W. A.; KRAUSE, W.; ARAÚJO, D. V.; SILVA, C. A. ; MIRANDA, A. F. Comportamento *In Vitro* Do Agente Etiológico Da Fusariose E Avaliação De Métodos De Inoculação Em Abacaxizeiro. *Revista Caatinga*, 28, 3, 263 – 268, 2015.
- GRANADA, G. G.; ZAMBIAZI, R. C.; MENDONÇA, C. R. B. **Abacaxi**: produção, mercado e subprodutos. *Boletim do centro de pesquisa e processamento de alimentos*, 22, 2, 405-422. 2004.
- GUTIERREZ-LUGO, M.T., DESCHAMPS, J.D.; HOLMAN, T.R.; SUAREZ; TIMMERMANN, B.N. Lipoxygenase inhibition by anadantho flavone, a new flavonoid from the aerial parts of *Anadenanthera colubrina*. *Planta Medicinal*, 70, 263 – 265, 2004.
- HOAGLAND, R. E. Biochemical responses of plants to pathogens. In: HOAGLAND, R.E. (Ed.). *Microbes and microbial products as herbicides*. Washington, American Chemical Society, p.87-113. 1990.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Levantamento Sistemático Da Produção Agrícola Pesquisa Mensal De Previsão E Acompanhamento Das Safras Agrícolas No Ano Civil 2015. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa\\_resultados.phpid\\_pesquis15](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa_resultados.phpid_pesquis15).
- INTRAPUK, C. I.; TAKANO, M.; SHINMYO, A. Nucleotide sequence of a new cDNA for peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. 104, 285-286, 1994.
- ITAKO, K.R.F.; SCHWAN-ESTRADA, J.R.; STANGARLIN, J.B.; TOLENTINO JÚNIOR, M.E.S. Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais. *Arq. Inst. Biol.* 76:75-83. 2009.
- ISHIGE, F.; MORI, H.; YAMAZAKI, K.; IMASEKI, H. Identification of a basic glycoprotein induced by ethylene in primary leaves of azuki bean as a cationic peroxidase. *Plant Physiology*. 101, 193-199, 1993.

JACOBS, A., VAN WYK, P. S., MARASAS, W. F., WINGFIELD, B. D., WINGFIELD, M. J., & COUTINHO, T. A. *Fusarium ananatum* sp. nov. in the *Gibberella fujikuroi* species complex from pineapples with fruit rot in South Africa. *Fungal biology*, 114 (7), 515-527, 2010.

KISTLER, H.C.; BOSLAND, P.W.; BENNY, U.; LEONG, S.; WILLIAMS, P.H. Relatedness of strains of *Fusarium oxysporum* from crucifers measured by examination of mitochondrial and ribosomal DNA. *Phytopathology*, 77, 9, 1289-1293, 1987.

KURAMAE, E.E.; SOUZA, N.L. Variabilidade genética entre formaes speciales de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA. *Acta Scientiarum*, 24, 5, 1481-1485, 2002.

KVAS, M., MARASAS, W. F. O., WINGFIELD, B. D., WINGFIELD, M. J., STEENKAMP, E. T. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal divers*, 34, 1-21. 2009.

LESLIE, J.F.; ANDERSON, L.L.; BOWDEN, R.L.; LEE, Y.W. Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. *Int. J. Food Microbiol*, 119, 25–32. 2007.

LIEVENS, F.; ANSEEL, F.. Creating Alternate In-Basket Forms Through Cloning: Some preliminary results. *International Journal of Selection and Assessment*, 15, 4, p. 428-433, 2007.

MAIA, G.N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: D&Z Computação Gráfica, **Leitura & Arte**, 413 p, 2004.

MARQUES, E.K. **Diagnóstico genético molecular**. Canoas: ULBRA, 370p. 2003.

MARQUES, E.K.; IKUTA, N.; LUNGE, V.R.; FONSECA, A.S.K. Diagnóstico molecular e biotecnologia. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. de; AZEVEDO, J.L. de. **Biociência**: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p.101-129.

MATOS, A. P. de; REINHARDT, D. H. R. C. Abacaxi no Brasil: características, pesquisa e perspectivas. In: VI Simpósio Internacional do Abacaxi, 6. João Pessoa. **Resumos...** p. 26, 2007.

MATOS, A. P. de; SANCHES, N. F.; TEIXEIRA, F. A.; SIMÃO, A. H.; GOMES, D. C.; ELIAS JÚNIOR, J. **Monitoramento da fusariose em plantios de abacaxi 'Pérola' conduzidos em sistema de produção integrada no Estado do Tocantins**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2009. 37p.

MATOS, A. P. Manejo integrado da podridão-do-olho do abacaxizeiro. **Abacaxi em foco**, n. 33, 2005.

MEDINA, J.C. A cultura do abacaxi. In: MEDINA, J.C. et al. **Frutas tropicais 2**. São Paulo: Canton, p.06-68. 1978.

MÉLO-FILHO, L. R.; GUENTHER, M.. A resistência sistêmica induzida como alternativa sustentável ao uso de agrotóxicos/induced systemic resistance as a sustainable alternative to agricultural pesticides. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, 8, 27, 2015.

MONTEIRO, J.M.; LINS NETO, E.M.F.; AMORIM, E.L.C.; STRATTMANN, R.R.; ARAUJO, E.L.; ALBUQUERQUE, U.P. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da Caatinga. **Revista Árvore**, 29, 999 – 1005, 2005.

NASCIMENTO, L. C., SILVA, H., PINTO, K., ARAÚJO, A. 14431-Efeitos de Extratos Vegetais Sobre a Germinação e Esporulação de *Fusarium gutiforme*. *Cadernos de Agroecologia*, 8, 2, 2013.

NELSON, PAUL E.; TOUSSOUN, TEWFIK ADIL; MARASAS, W. F. O. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. 1983.

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

NOGUEIRA, S. R., LIMA, F. S., ROCHA, E. M., ARAÚJO, D. H. Fungicidas no controle de fusariose do abacaxi no estado de Tocantins. Brasil. *Revista de ciências agrárias*, 37, 4, 447-455. 2014.

O'DONNELL, K., ROONEY, A. P., PROCTOR, R. H., BROWN, D. W., MCCORMICK, S. P., WARD, T. J., ... ROBERT, V. A. Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genetics and Biology*, 52, 20-31. 2013.

O'DONNELL, K., SUTTON, D. A., RINALDI, M. G., SARVER, B. A., BALAJEE, S. A., SCHROERS, H. J., ... AOKI, T. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(10), 3708-3718. 2010.

PAES, J. B., DINIZ, C. E. F., DE LIMA, C. R., DE MELO BASTOS, P., DE MEDEIROS NETO, P. N. Taninos condensados da casca de angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) extraídos com soluções de hidróxido e sulfito de sódio. *Revista Caatinga*, 26, 3, 22-27. 2013.

PARA- PROGRAMA DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS. **Relatório de Atividades**. Gerência Geral de Toxicologia. ANVISA. 2014.

PARENTE, G. D. L., DE ALMEIDA, M. M., DA SILVA, J. L., DA SILVA, C. G., & ALVES, M. F. Cinética da produção do fermentado alcoólico de abacaxi 'pérola' e caracterização da bebida. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 9(2), 230-247. 2014.

PASCHOLATI, S., STANGARLIN, J., L., B., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Mecanismos de patogenicidade em fungos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 6, 1-47. 1998.

PEREIRA, E. M., LEITE FILHO, M. T., DOS SANTOS, Y. M. G., PEREIRA, B. B. M., & MARACAJÁ, P. B. Elaboração e qualidade de geleia e compota de abacaxi "Pérola. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 10, 1, 149-153. 2015.

PINTO, K. M. S. **Substâncias bioativas de extratos vegetais no manejo da mancha marrom de alternaria** (*Alternaria alternata* f.sp. *citri*). Areia: CCA/UFPB, 119p. (Tese de Doutorado em Agronomia). 2013.

PINTO, K.M.S.P; NASCIMENTO, L.C.; GOMES, E.C.S.; SILVA, H.F.; MIRADA, J.R. Efficiency of resistance elicitors in the management of grapevine downy mildew *Plasmopara viticola*: epidemiological, biochemical and economic aspect. *European Journal of Plant Pathology*, 134, 745–754, 2012.

- PLOETZ, R. C. Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Phytopathology*, 96, 6, 653-656, 2006.
- REETZ, E. R.; KIST, B. B.; SNATOS, C. E. *Ánuário brasileiro da Fruticultura*. Editora Gazeta Santa Cruz, 104 p. ISSN 1808-4931 Frutas – Cultivo – Brasil. I. 2015.
- REINHARDT, D.; ALVES, A. O perfil atual do agronegócio do abacaxi em Itaberaba-BA. 06 ago. 2003. Disponível em: Acesso em: 25 jan. 2007.
- ROCHA, E.A.L.S.S.; CARVALHO, A.V.O.R.; ANDRADE, S.R.A.; MEDEIROS, A.C.D.; TROVAO, D.M.B.M.; COSTA, E.M.M.B. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 34, 3, 351-355, 2013.
- SALES, M. D. C., COSTA, H. B., FERNANDES, P. M. B., VENTURA, J. A., MEIRA, D. D. Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in pineapple. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6, 1, 26-31. 2016.
- SAROJ, A., PRAGADHEESH, V. S., YADAV, A., SINGH, S. C., SAMAD, A., NEGI, A. S., CHANOTIYA, C. S. Anti-phytopathogenic activity of *Syzygium cumini* essential oil, hydrocarbon fractions and its novel constituents. *Crops and Products*, 74, 327-335. 2015.
- SAXENA, A. R.; YADAV, R. K.; YADAV, H. L.; SAHANI, R.; SAXENA, M.; KIRTI, R. Investigation of antifungal activity in higher plants for in vitro control of *Cercosporidium personatum*, the casual organism of tikka disease of groundnut. *Neo Botânica*, 10, 21-30, 2002.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). *Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular*. Piracicaba: FEALQ, p. 227-248. 2008.
- SILVA, C. M. A. da. Metabólitos secundários de plantas do semi-árido de pernambuco-uma inovação no controle de fitopatógenos. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2013.
- SILVA, J. G.; MELO, R. P.; ARAÚJO, J.D. M.; PESSOA, M. N. G.; ALBIERO, D.; MONTEIRO, L. A. Avaliação de extrato de melão-são-caetano (*Momordica charantia* L.) como medida alternativa de controle a fungos fitopatogênicos. *Cadernos de Agroecologia*, 6, 2, Dez. 2011.
- SIMÃO, S. O abacaxizeiro. In: SIMÃO, S. *Tratado de fruticultura*. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.249-288.
- SOARES, A. M DOS S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 1. p. 9-19, 2007.
- SOARES, J. M. Caracterização morfológica, molecular e patogênica do agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro no Brasil. 58 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- SOUSA, B. C. M.; LUSTOSA, D. C.; VIEIRA, T.A.. 14335-Atividade antifúngica de óleos vegetais artesanais e industrializados sobre fitopatógenos de espécies florestais. *Cadernos de Agroecologia*, 8, 2, 2013.

- SOUZA, W. C. O., DO NASCIMENTO, L. C., VIEIRA, D. L., DOS SANTOS, T. S., & DE ASSIS FILHO, F. M. Alternative control of *Chalara paradoxa*, causal agent of black rot of pineapple by plant extract of *Mormodica charantia*. *European Journal of Plant Pathology*, 142, 3, 481-488. 2015.
- SRIVASTAVA, U. S.; NERALIYA, S. Larvicidal activity of plant extracts on filaria mosquito *Culexquinque fasiatus*. Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B Biological Sciences, 67, 2, p. 111-115, 1997.
- STADNIK, M. J.; BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57, 25-34. 2000.
- SUTHERLAND, M. L.; PEGG, G. F. The basis of host recognition in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological and molecular plant pathology*, 40, 6, p. 423-436, 1992.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 819p. 2009.
- THOMAS, G.; ARAÚJO, C.C.; SOUZA, O. S. Avaliação das atividades antiinflamatória, analgésica e antipirética dos extratos aquosos de *Caesalpinia ferrea*, *Plantago major*, *Polygonum macrae* e *Pterodonpolygae florus*. Tenth Brazilian Symposium in Medicinal Plants. São Paulo, Brasil. 1988.
- TSUJI, S. S. Análise Filogenética e Patogênica Do Agente Causal Da Fusariose Do Abacaxizeiro. 2012.
- VENTURA, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados: I–História, meios e procedimentos de cultivo. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 7, 271-297, 1999.
- VILELA, G. F., MING, L. C., MARQUES, M. O., DA SILVA, S. M., MONTANARI JUNIOR, Í. Agronomical and phytochemical aspects of fafia. *Horticultura Brasileira*, 31, 1, 133-138. 2013.

## **CAPÍTULO II**

### **DIVERSIDADE EM ESPÉCIES DE *Fusarium* ASSOCIADOS A FRUTOS DO ABACAXIZEIRO (*Ananas comosus*) cv. Pérola NOS ESTADOS DA PARAÍBA, PERNAMBUCO E RIO GRANDE DO NORTE**

SOUZA, W. C. O. Diversidade em espécies de *Fusarium* associados a frutos do abacaxizeiro (*Ananas comosus*) cv. Pérola nos estados da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte. Areia. Centro de Ciências Agrárias/Universidade Federal da Paraíba (CCA/UFPB), 2016. (Tese de Doutorado em Agronomia).

## Resumo

Considerando que o adequado manejo de doenças de plantas necessita da correta caracterização e identificação de agente(s) etiológico(s) e tendo em vista a elevada heterogeneidade apresentada por espécies de patógenos de um mesmo gênero, objetivou-se com este trabalho, caracterizar, morfológica, molecular e patogenicamente, isolados de populações de *Fusarium* spp. dos estados da Paraíba (PB), Pernambuco (PE) e Rio Grande do Norte (RN) associados à fusariose em frutos de abacaxizeiro. Foram coletados frutos de abacaxizeiro, cv. Pérola com sinais do patógeno e sintomas da fusariose em áreas produtoras na PB, PE e RN. Um total de 40 isolados monospóricos foram obtidos, preservados até o momento das caracterizações. Todos os isolados foram caracterizados morfológicamente utilizando os meios de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e Syntetic Nutrient-Poor Ágar (SNA), adicionado de fragmento de folha de bananeira com 5mm<sup>2</sup>. Assim, os seguintes marcadores morfológicos foram avaliados: coloração do verso e reverso das colônias; diâmetro micelial; índice de velocidade de crescimento micelial; capacidade de esporulação e tamanho dos conídios. A caracterização molecular foi realizada utilizando sequências do gene da segunda maior subunidade ribossômica - *RPB2*. Para tal, foram realizadas análises de Máxima parcimônia e Bayesiana de haplótipos dos isolados. Dois tipos de substratos, folhas destacadas e frutos de abacaxizeiro foram utilizados na caracterização da patogenicidade por meio da agressividade dos isolados monospóricos obtidos. As análises dos resultados fenotípicos foram em DIC com quatro repetições e utilizou-se 'bootstrap' e probabilidade para quantificar a confiabilidade dos agrupamentos formados pela análise molecular dos isolados. Nas condições de realização do trabalho concluiu-se que os isolados associados aos frutos de abacaxizeiro apresentaram ampla variabilidade determinada pelos marcadores fenotípicos e molecular analisados. Podem existir pelo menos duas espécies de *Fusarium*, além de *F. guttiforme*, associadas à fusariose em frutos de abacaxizeiro nos estados da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte. Os patógenos desse estudo causaram sintomas de fusariose e apresentaram sinais e níveis diferentes de agressividade em folhas e frutos de abacaxizeiro cv. Pérola, inoculados artificialmente.

**Palavras- Chave:** Variabilidade; Gene *RPB2*; Agressividade; Fusariose.

SOUZA, W. C. O. *Fusarium* spp. diversity associated with pineapple fruits 'Pérola' in Paraíba, Pernambuco and Rio Grande do Norte, Brazil. Centro de Ciências Agrárias/Universidade Federal da Paraíba (CCA/UFPB), 2016 (Thesis in Agronomy).

## **Abstract**

Where as the proper management of plant diseases requires the correct characterization and identification of etiologicals agents, and due the high heterogeneity by species of the same genus, the objective of this study was to characterize, morphological, molecular and pathogenetically, isolates of *Fusarium* spp. populations in the states of Paraíba (PB), Pernambuco (PE) and Rio Grande do Norte (RN), Brazil, associated with fruits of pineapple. It was collected pineapple fruits, cv. 'Pérola', with pathogen signs and fusariosis symptoms in producing areas in PB, PE and RN. A total of 40 monosporic isolates were obtained, preserved and deposited until characterizations analysis. All isolates were characterized morphologically using culture media Potato Dextrose Agar (PDA) and Syntetic Nutrient-Poor Agar (SNA), added banana leaf fragment of 5mm<sup>2</sup>. For this, the morphological markers were evaluated: color of the back and back of the colony; mycelial diameter; mycelial growth rate index; ability of sporulation and size of conidia. Molecular characterization was performed using gene sequences of the second largest ribosomal subunit - *RPB2*. To do so, analyzes were performed Maximum Parsimony and Bayesian Inference haplotypes of the isolates. Two types of substrates, detached leaves and pineapple fruits were used for characterization of the aggressiveness by monosporic isolates obtained. The analysis of phenotypic results were in Completely Randomized Design with four replications and used 'bootstrap' and likely to quantify the reliability of the groups formed by molecular analysis of the isolates. At this work conditions it was concluded that the isolates associated with the pineapple fruits showed high and wide variability determined by phenotypic and molecular markers analyzed. It was found that, there are at least two species of *Fusarium*, in addition *F. guttiforme* associated with *Fusarium* in pineapple fruit between isolates collected; pathogens of this study showed symptoms of fusariosis, signs and different levels of aggressiveness in leafs and fruits of pineapple 'Pérola'. Different phylogenetic lineages of *Fusarium oxysporum* Species Complex FOOSC are associated with *Fusarium* wilt or rot in fruit pineapple from different plant populations in Paraíba, Pernambuco and Rio Grande do Norte. Pathogens of this study caused symptoms of fusarium wilt and showed signs and different levels of aggressiveness in leaves and fruits of pineapple cv. Pérola, inoculated artificially.

**Key-words:** Variability; *RPB2* gene; Aggressiveness; Fusariosis.

## INTRODUÇÃO

A expansão da abacaxicultura da região Nordeste do Brasil está passando por um processo de organização. Nos últimos anos, a Paraíba esteve entre os três estados brasileiros com maior volume de produção e, a estimativa para 2016, é que lidere a produção de abacaxi no país. Estima-se que a colheita desse ano alcance 280 milhões de frutas, seguido do Pará com 260 milhões de unidades e Minas Gerais com 245 milhões (IBGE, 2016).

Os principais problemas enfrentados pela cultura ainda são as doenças nas fases de produção e pós-colheita e para o correto e efetivo manejo faz-se necessária à caracterização e identificação dos agentes. A doença mais importante do abacaxizeiro continua sendo a fusariose, devido à capacidade de dizimar plantações inteiras, sendo encontrada em todos os estados produtores no país, acarretando limitação da expansão da cultura (MATOS et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2014; VERZIGNASSI et al., 2014), e, de acordo com Ploetz (2006), é causada por *Fusarium guttiforme*.

A espécie *F. guttiforme* é bem definida morfológica e filogeneticamente. É pertencente ao complexo de espécies denominado ‘*Gibberella fujikuroi* Species Complex’ (GFSC) (LESLIE et al., 2007) que inclui espécies com características morfológicas em comum. Porém, nem sempre os marcadores morfológicos são evidentes, evolutivos, conservados e confiáveis para agrupamento de espécies como as do gênero *Fusarium*. Além disso, podem não existir marcadores morfológicos suficientes para a discriminação de espécies ou eles são muito sutis que dificultam a observação de diferenças e, ainda, pode ocorrer sobreposição dessas características que dificultam sua diferenciação (KVAS et al., 2009; AOKI et al., 2014).

Na década de 1980 foram registradas muitas espécies de *Fusarium*, descritas com base na morfologia, porém com populações genéticas distintas. Para identificar essas populações, faz-se necessária avaliação de outras características com base nos conceitos de espécie filogenética e biológica (LESLIE et al., 2007). Apesar de inúmeras tentativas, para muitas espécies do GFSC, não foi evidenciada produção de peritécios férteis em cruzamentos (DESJARDINS, 2003) e assim, a espécie biológica de *F. guttiforme* não foi observada e caracterizada biologicamente, como foram às espécies morfológicas.

Dessa forma, existe pouco conhecimento sobre o comportamento biológico e genético desse patógeno, exceto por uma elevada diversidade genética e de micotoxinas contaminando os frutos de abacaxizeiro, que foram observadas em diferentes populações de *Fusarium* spp. por Stepień; Koczyk; Waśkiewicz (2013), utilizando a filogenia do gene fator de alongação 1- $\alpha$  (*EFI- $\alpha$* ) e cromatografia líquida de alta performance. Eles detectaram dez diferentes espécies de *Fusarium* infectando o abacaxi (*Ananas comosus* var. *comosus*) nesses países.

Assim, considerando que o adequado manejo de doença passa, necessariamente, pela correta caracterização e identificação de agentes etiológicos e tendo em vista a elevada heterogeneidade apresentada por espécies de *Fusarium*, objetivou-se caracterizar, morfológica, molecular e patogenicamente, isolados de populações de *Fusarium* spp., associados ao frutos de abacaxizeiro 'Pérola' nos estados da Paraíba (PB), Pernambuco (PE) e Rio Grande do Norte (RN) do Brasil.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### Localização do experimento

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia (LAFIT) e na área de biologia molecular do Laboratório de Produtos de Origem de Animal (LAPOA) do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Areia, Paraíba.

### Coleta do material vegetal

Foram coletados frutos de abacaxizeiro, cv. Pérola com sintomas da fusariose dos quais foram obtidos os isolados. As coletas foram realizadas em áreas produtoras da Paraíba/PB: Sapé (7°05'42.2"S 35°13'48.9"W), Alhandra (7°25'56.1"S 34°54'42.3"W), Mari (7°03'04.7"S 35°19'12.8"W) e Araçaji (6°51'12.6"S 35°22'53.6"W); Pernambuco/PE: Pombos (8°08'21.2"S 35°23'49.9"W) e Rio Grande do Norte/RN: Touros (5°11'41.8"S 35°27'49.1"W).

Os frutos sintomáticos foram coletados, aleatoriamente, entre agosto e novembro de 2014 e transportados em caixas contentoras, identificadas e acondicionadas à baixa temperatura, até o momento das análises.

## Obtenção e preservação dos isolados de *F. guttiforme*

Um total de 40 isolados monospóricos foi obtido a partir de frutos lesionados (Tabela 1). Logo após coleta dos frutos, o tecido da região limítrofe entre lesionado e sadio foi desinfestado por meio de lavagens em etanol 70% por 30 segundos, hipoclorito a 1% por 1 minuto, seguido de duas lavagens sucessivas em água destilada esterilizada (ADE) e seco em papel de filtro esterilizado. Em seguida, foi transferido para o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e incubado a temperatura ambiente de  $25 \pm 2$  °C durante sete dias (ALFENAS; MAFIA, 2007).

Os esporos foram coletados com o auxílio de uma espátula, por meio do corte de fragmentos do meio de cultura com esporos que foram transferidos para tubos de ensaio contendo 9 mL de ADE, seguindo diluição em série com a transferência de 1mL ( $10^{-1}$  conídios/ml) da suspensão de esporos do tubo anterior para outro tubo com o mesmo volume de ADE, até o quarto tubo. No quarto tubo, 1mL da suspensão de esporos obtida ( $10^{-4}$  conídios/ml) foi distribuído em duas placas de Petri contendo 20 mL de ágar-água (AA) em cada placa, que foram incubadas a temperatura ambiente  $25 \pm 2$  °C por no máximo 12 horas ou até a germinação dos esporos. As culturas monospóricas foram obtidas por meio da coleta de um conídio ao microscópio de luz. O conídio foi coletado pelo corte de um fragmento circular, correspondente ao foco de luz do microscópio, com peça confeccionada a partir de tarugo de bronze, especificamente desenvolvida para este fim. Os isolados foram transferidos para tubos de ensaio contendo BDA e incubados por sete dias a temperatura ambiente  $25 \pm 2$  °C até o momento do uso ou preservação (SOUZA, 2009; SOUZA, et al., 2013).

A preservação dos isolados monospóricos foi pelo método Castelanni (CASTELLANI, 1939). Discos de BDA com 4 mL de diâmetro, colonizados recentemente por *Fusarium* spp. foram adicionados a recipientes de vidro com, aproximadamente, 4 mL de ADE, vedados com rolha de borracha previamente esterilizada, identificados e armazenados a temperatura ambiente  $25 \pm 2$  °C.

**Tabela 1.** Isolados monospóricos de *Fusarium* spp. coletados em frutos de abacaxizeiro nos Estados da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte para estudos de diversidade. UFPB, Areia, PB, 2016.

<b>Número</b>	<b>Denominação</b>	<b>Haplótipo</b>	<b>Origem</b>
01	CMA01	H1	Touros-RN
02	CMA02	H2	Touros-RN
03	CMA03	-	Touros-RN
04	CMA04	H3	Touros-RN
05	CMA05	H4	Touros-RN
06	CMA06	H5	Touros-RN
07	CMA07	H6	Touros-RN
08	CMA08	H7	Touros-RN
09	CMA09	H8	Touros-RN
10	CMA10	H9	Touros-RN
11	CMA11	H10	Touros-RN
12	CMA12	H11	Touros-RN
13	CMA13	H12	Touros-RN
14	CMA14	-	Touros-RN
15	CMA15	-	Touros-RN
16	CMA16	-	Touros-RN
17	CMA17	H13	Pombos-PE
18	CMA18	H14	Pombos-PE
19	CMA19	H15	Pombos-PE
20	CMA20	-	Pombos-PE
21	CMA21	-	Pombos-PE
22	CMA22	-	Pombos-PE
23	CMA23	H17	Pombos-PE
24	CMA24	H18	Pombos-PE
25	CMA25	H19	Pombos-PE
26	CMA26	H20	Pombos-PE

27	CMA27	-	Araçaji-PB
28	CMA28	H21	Araçaji-PB
29	CMA29	H22	Sapé-PB
30	CMA30	-	Sapé-PB
31	CMA31	H24	Mari-PB
32	CMA32	-	Araçaji-PB
33	CMA33	-	Mari-PB
34	CMA34	H26	Araçaji-PB
35	CMA35	H27	Mari-PB
36	CMA36	H28	Sapé-PB
37	CMA37	-	Alhandra-PB
38	CMA38	-	Araçaji-PB
39	CMA39	H29	Alhandra-PB
40	CMA40	H30	Alhandra-PB

---

CMA - Coleção Micológica de Areia.

#### Caracterização morfológica dos isolados

Todos os isolados foram caracterizados morfológicamente utilizando os meios nutritivos Batata Dextrose Ágar (BDA) e Syntetic Nutrient-Poor Ágar (SNA) (NELSON, 1987), adicionado de fragmento de folha de bananeira cortada no tamanho de 5mm<sup>2</sup>, esterilizado e inserido ao lado do disco do fungo formando um ângulo de 45° a este, para visualização da formação de esporódóquios e macroconídios desenvolvidos sobre fragmentos dessas folhas. Os seguintes caracteres morfológicos foram avaliados:

#### Coloração das colônias

Os isolados cultivados em BDA a temperatura ambiente 25 ± 2 °C foram observados após 10-14 dias de idade. A coloração do verso e reverso das colônias foi comparada as descritas por Leslie e Summerell (2006).

#### Diâmetro micelial

O diâmetro final das colônias dos isolados foi mensurado com paquímetro digital aos sete dias de idade. Esses isolados foram cultivados em BDA e SNA à

temperatura ambiente  $25 \pm 2$  °C. Foram avaliadas, para cada isolado, quatro placas com colônias do fungo nos meios BDA e SNA. Uma placa de Petri foi considerada como uma repetição.

#### Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM)

O crescimento das colônias fúngicas dos isolados foi quantificado em BDA e SNA sob temperatura ambiente  $25 \pm 2$  °C, diariamente, até o sétimo dia, com o uso de paquímetro digital graduado em milímetros. O IVCM foi estimado utilizando a fórmula de Oliveira (1991):

$$\text{IVCM} = (D - D_a) / N$$

Sendo: IVCM=índice de velocidade de crescimento micelial; D=diâmetro médio atual da colônia;  $D_a$ =diâmetro médio da colônia do dia anterior; N=número de dias após a inoculação na placa de Petri.

#### Capacidade de esporulação de conídios

A avaliação da esporulação foi realizada em isolados crescidos sobre os meios de cultura BDA e SNA a temperatura ambiente  $25 \pm 2$  °C no período de 10-14 dias de idade dos isolados. A contagem de esporos foi realizada em suspensão aquosa adicionada de Tween 20. Essa suspensão foi obtida pela adição de 20 mL de ADE às placas de Petri contendo as colônias dos isolados, para a liberação dos esporos com o auxílio de um pincel de cerdas macias. A suspensão de esporos foi filtrada em dupla camada de gaze esterilizada e a contagem dos esporos foi realizada em câmara de Newbauer (ALFENAS; MAFIA, 2007).

#### Tamanho dos conídios

O tamanho dos conídios foi avaliado nos isolados crescidos em SNA adicionado de fragmentos de folha de bananeira de  $5\text{mm}^2$ . Foram mensurados o comprimento e a largura de 25 macroconídios e 25 microconídios, de cada isolado, em lâminas de microscopia coradas com azul de bromofenol. Cada conídio mensurado foi considerado como uma repetição. As médias do comprimento e largura e a relação comprimento pela largura dos conídios foram obtidas (NELSON, 1998; LESLIE; SUMMERELL, 2006). Os conídios foram mensurados utilizando ocular micrométrica tipo Bresser<sup>®</sup> acoplada ao microscópio óptico Opton<sup>®</sup> na objetiva de 40x.

## Caracterização molecular dos isolados

Os isolados monospóricos foram cultivados em meio de cultura líquido a base de batata e dextrose (BD) durante sete dias, sob agitações de 30 minutos de doze em doze horas a 100 g em temperatura ambiente  $25 \pm 2$  °C. A biomassa fúngica obtida foi filtrada em gaze esterilizada e macerada com nitrogênio líquido e polivinilpirrolidone (PVP), usado como antioxidante. A pulverização da biomassa fúngica foi realizada em cadinhos de porcelana e o micélio pulverizado de cada isolado foi transferido para minitubos de 1,5 mL. Em microcentrífuga, a extração do DNA dos isolados foi realizada utilizando o método CTAB (LESLIE; SUMMERELL, 2006), adaptado pelo kit de extração UltraClean<sup>®</sup> Microbial DNA com protocolo descrito pelo fabricante MO BIO laboratories Inc Carlsbad, CA., EUA. O DNA total extraído foi analisado em gel de agarose a 1% utilizando o corante GelRed Biotium<sup>®</sup> para visualização em luz ultravioleta (UV) e quantificação no espectrofotômetro NanoDrop 2000 da Thermo Scientific. As concentrações de DNA total extraído dos isolados variaram de 8 a 20 ng/μL e foram ajustadas a 7 ng/μL para as reações PCR.

Dos 40 isolados de *Fusarium* spp. associados aos frutos do abacaxizeiro, foram selecionados 27 para análise do gene da segunda maior subunidade ribossômica ou 'RNA Polimerase II Gene' - *RPB2* (O' DONNELL et al., 2013). Os 27 isolados foram selecionados com base nos haplótipos gerados pelo programa 'DNA Sequence Polymorphism' ou DNASP<sup>®</sup>. Os 'primers' 5F2, 5'-GGGGWGAYCAGAAGAAGGC-3' (O'DONNELL et al., 2007) e 7cR, 5'-CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT-3 (LIU et al., 1999) foram utilizados nas reações PCR do gene *RPB2*. As reações PCR foram realizadas utilizando o kit Platinum<sup>®</sup> PCR SuperMix da Invitrogen<sup>™</sup> em termociclador da BIO-RAD como descritas por O' Donnell et al. (2013) para *RPB2*, a saber, desnaturação inicial a 94°C por 90 segundos; seguidos de 40 ciclos: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 90 segundos, extensão a 68°C por 2 minutos e extensão final a 68° C por 5 minutos. Os produtos PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%, com Gel Red Biotium<sup>®</sup> para posterior visualização realizada em fotodocumentador MiniBis Pro da Uniscience. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o kit PureLink<sup>®</sup> da Invitrogen<sup>™</sup> e posteriormente sequenciados.

Os produtos da PCR foram sequenciados na Macrogen Korea e os eletroferogramas gerados foram analisados pelos programas PreGap4 e Gap4 (Staden

Package) (BONFIELD; WHITWHAM 2010). Sequências de referência das linhagens filogenéticas do ‘*Gibberella Fujikuroi* Species Complex’ (GFSC) e ‘*Fusarium Oxysporum* Species Complex’ (FOSC), correspondentes ao gene *RPB2* e previamente depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), também foram acrescentadas as análises filogenéticas (Tabela 2).

Foram utilizadas 27 sequências de *RPB2* dos 40 isolados desse estudo mais 28 sequências *RPB2* de referência depositadas no GeneBank (Tabela 2). Dessa forma, análises filogenéticas foram realizadas com as sequências *RPB2* dos isolados de aproximadamente 800 pb. Para isso, alinhamentos múltiplos foram obtidos utilizando a ferramenta CLUSTAW (THOPMSON et al., 1994), implementada pelo programa MEGA6 – ‘Molecular Evolutionary Genetics Analysis’. Os alinhamentos foram corrigidos manualmente e sequências de *Fusarium oxysporum*, *F. fujikuroi* e *F. redolens* foram utilizadas como *outgroups*, com base nos resultados de O’Donnell et al. (2013) (Tabela 2).

As análises filogenéticas foram realizadas pelo método máxima parcimônia, por meio do algoritmo heurístico utilizando o programa PAUP versão 4.0 b10 e inferência bayesiana utilizando o programa MrBayes<sup>®</sup> – ‘Bayesian Inference of Phylogeny’.

**Tabela 2.** Sequências de referência do gene *RPB2* utilizadas para estudo de diversidade genética de *Fusarium* spp. coletados na Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte, Brasil. UFPB, Areia, PB 2016.

Número	Espécie filogenética	Complexo	Acesso GenBank	Referência
01	<i>Fusarium acutatum</i>	<sup>1</sup> GFSC	HM347214.1	O’Donnell et al., 2010
02	<i>F. fujikuroi</i>	GFSC	JX171570.1	O’Donnell et al., 2013
03	<i>F. ananatum</i>	GFSC	HM347213.1	O’Donnell et al., 2010
04	<i>F. bulbicola</i>	GFSC	KF466404.1	Proctor et al., 2013
05	<i>F. circunatum</i>	GFSC	JX171623.1	O’Donnell et al., 2013
06	<i>F. globosum</i>	GFSC	KF466406.1	Proctor et al., 2013
07	<i>F. guttiforme</i>	GFSC	JX171618.1	O’Donnell et al., 2013
08	<i>F. mangiferae</i>	GFSC	KP753442.1	Crespo et al., 2015
09	<i>F. musae</i>	GFSC	KM582789.1	Triest et al., 2015
10	<i>F. napiforme</i>	GFSC	EF470117.1	O’Donnell et al., 2007

11	<i>F. proliferatum</i>	GFSC	JX171617.1	O'Donnell et al., 2013
12	<i>F. ramigenum</i>	GFSC	KF466412.1	Proctor et al., 2013
13	<i>F. sacchari</i>	GFSC	JX171580.1	O'Donnell et al., 2013
14	<i>F. tupiense</i>	GFSC	KP071327.1	Melo et al., 2014
15	<i>Gibberella moniliformis</i>	GFSC	FN552103.1	Van Hove et al., 2011
16	<i>F. phylophylum</i>	GFSC	KF466410.1	Proctor et al., 2013
17	<i>F. tapersinum</i>	GFSC	JX171600.1	O'Donnell et al., 2013
18	<i>F. subglutinans</i>	GFSC	JX171599.1	O'Donnell et al., 2013
19	<i>F. subglutinans1</i>	GFSC	HM347216.1	O'Donnell et al., 2010
20	<i>F. oxysporum</i>	<sup>2</sup> FOSC	JX171625.1	O'Donnell et al., 2013
21	<i>F. oxysporum1</i>	FOSC	HQ646389.1	Laurence et al., 2011
22	<i>F. oxysporum2</i>	FOSC	HQ646388.1	Laurence et al., 2011
23	<i>F. oxysporum3</i>	FOSC	KC808367.1	Laurence et al., 2011
24	<i>F. oxysporum4</i>	FOSC	JX171625.1	O'Donnell et al., 2013
25	<i>F. oxysporum5</i>	FOSC	KJ397251.1	Laurence et al., 2014
26	<i>F. oxysporum6</i>	FOSC	KJ397250.1	Laurence et al., 2014
27	<i>F. oxysporum7</i>	FOSC	KJ397249.1	Laurence et al., 2014
28	<i>F. redolens</i>	FOSC	JX171616.1	Laurence et al., 2014

<sup>1</sup>GFSC, refere-se ao Complexo de espécies, '*Gibberella fujikuroi* Species Complex'.

<sup>2</sup>FOSC, refere-se ao complexo de espécies, '*Fusarium oxysporum* Species Complex'.

#### Patogenicidade dos isolados

A patogenicidade dos isolados foi quantificada pela agressividade em folhas destacadas e frutos de abacaxizeiro cv. Pérola.

#### Agressividade em folhas destacadas

Folhas sadias de abacaxizeiro foram selecionadas em estágio de maturação padronizado (GARCIA, 2015). As folhas foram coletadas em área de produção de abacaxizeiro, localizada no município de Sumé-Paraíba (7°05'42.2"S 35°13'48.9"W), transportadas em embalagens plásticas até o Laboratório de Fitopatologia (LAFIT), da

UFPB, sanitizadas com hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos, secas em temperatura ambiente  $25 \pm 2$  °C, feridas na base com peça esterilizada que foi desenvolvida especificamente para este fim e inoculadas com discos de BDA de 4 mm de diâmetro que estavam colonizados pelos isolados monospóricos (CAMARGO; BARACHO, 1977). Posteriormente, os discos de micélio inoculados nas folhas foram envolvidos por algodão umedecido para propiciar ambiente de câmara úmida e as folhas foram acondicionadas em câmara de crescimento tipo B.O.D a 25 °C por 24 horas.

Após remoção da câmara as folhas permaneceram em B.O.D por sete dias, após os quais foram mensuradas as lesões em sentido diametralmente opostos, com paquímetro graduado em milímetros. Foram utilizadas quatro folhas por isolado e uma folha inoculada foi considerada como uma repetição.

Agressividade de *Fusarium* spp. em frutos de abacaxizeiro cv. Pérola

Frutos sadios de abacaxizeiro, em estágio 2 de maturação (MONTENEGRO, 1964) foram adquiridos no mercado local. Os frutos foram sanitizadas com hipoclorito de sódio a 1% por 3 min, secos em temperatura ambiente  $25 \pm 2$  °C, feridos com instrumento esterilizado desenvolvido especificamente para este fim, inoculadas com discos de BDA, de 4 mm de diâmetro, colonizados pelos isolados monospóricos para serem acondicionadas em temperatura ambiente de  $25 \pm 2$  °C.

A parte mediana do fruto, em locais opostos e equidistantes foi inoculada duas vezes. Cada disco de colônia fúngica inoculado foi considerado como uma repetição. Os discos nos frutos foram envoltos por algodão umedecido para propiciar ambiente de câmara úmida e os frutos, assim inoculadas, foram acondicionadas em B.O.D a 25°C por 24 horas. Posteriormente, os frutos permaneceram em temperatura ambiente  $25 \pm 2$  °C até a avaliação final de severidade, ocorrida aos sete dias após inoculação dos isolados.

A agressividade dos isolados foi avaliada por meio da mensuração, em milímetros, com paquímetro digital, das lesões internas formadas nos frutos pelos isolados inoculados. Os dados foram registrados e transformados em porcentagem (%) e severidade de área lesionada pelo isolado.

Análise dos resultados e delineamento estatístico

## Caracterização morfológica

O diâmetro micelial, IVCN, capacidade de esporulação e tamanho dos conídios foram analisados em delineamento inteiramente casualizado, DIC. Os dados de capacidade de esporulação foram transformados para raiz quadrada de  $x + 0,1$ . O crescimento micelial foi analisado em DIC com parcelas subdivididas no tempo. Foi realizada uma análise de regressão do crescimento das colônias em função do tempo em dias. As análises estatísticas foram realizadas no programa SAS<sup>®</sup>. As médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade pelo SISVAR<sup>®</sup>.

## Caracterização molecular

A confiabilidade dos clados ou agrupamentos filogenéticos formados pelas análises das sequências *RPB2* em máxima parcimônia foram exibidas em *bootstrap* pelo programa PAUP 4.0 b10 e utilizando inferência bayesiana ou probabilidade, exibida pelo programa MrBayes<sup>®</sup>. Os resultados de *bootstrap* foram expressos em porcentagem (0-100%) de confiabilidade dos agrupamentos formados e foram adicionados as bases dos agrupamentos ou clados, nas árvores de máxima parcimônia geradas. O índice de consistência (IC), índice de retenção (IR) e índice de homoplasia (IH) foram obtidos para as árvores de máxima parcimônia pelo PAUP 4.0 b10.

## Agressividade dos isolados

A análise de variância da agressividade dos isolados foi realizada em DIC com quatro repetições pelo SAS<sup>®</sup> e o teste de médias Scott-Knott a 5% de probabilidade foi utilizado na comparação entre médias pelo programa SISVAR<sup>®</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização molecular de isolados de *Fusarium* spp.

Inicialmente, verificou-se baixa identidade de alguns isolados utilizados nesse estudo com espécies do GFSC, depositadas no GeneBank. Alguns isolados apresentaram elevada identidade de sequências, acima de 90%, com espécies do FOSSC. Todas as sequências foram comparadas pela ferramenta *on line* BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Fragmentos gênicos

*RPB2* sequenciados apresentaram, aproximadamente, 1000pb após a correção manual no programa MEGA6<sup>®</sup>. Os haplótipos, H1, H2, H4, H6, H8, H11, H12, H22, H26, H27, H24, H28, H29 e H30 apresentaram identidade de 95-99% com sequências *RPB2* de linhagens filogenéticas do FOOSC. Os haplótipos, H3, H5, H7, H9, H10, H13, H14, H15, H17, H18, H19, H20, H21, H24 tiveram 94-99% de identidade com espécies do GFSC pela ferramenta BLAST. Assim, as sequências desses haplótipos foram inseridas alinhamentos com todas as espécies filogenéticas do GFSC e linhagens filogenéticas do FOOSC de referência (Tabela 2) e analisadas pelos métodos, máxima parcimônia e inferência bayesiana.

Topologias de árvores semelhantes foram encontradas para todas as análises filogenéticas realizadas. Na análise de máxima parcimônia com todos os haplótipos, as buscas heurísticas identificaram 52 árvores, das quais, apenas uma, a que mais se aproximava da filogenia dos isolados foi apresentada. No geral, as árvores diferiram sutilmente nos pontos onde não foram apoiados pelo *bootstrap* (abaixo de 50%) (Figura 1). Já na inferência bayesiana, a partir de um milhão de árvores geradas, a que apresentou melhor topologia foi apresentada (Figura 2).

Verificou-se clados bem suportados em probabilidade para praticamente todos os agrupamentos formados. Em ambas as análises, dois grupos bem distintos foram formados: um grupo de espécies do GFSC com 99% de *bootstrap* e 78% de probabilidade e outro do FOOSC com 97% de *bootstrap* e 100% de probabilidade (Figuras 1 e 2). Catorze haplótipos, H3, H5, H7, H9, H10, H13, H14, H15, H17, H18, H19, H20, H21, H24 formaram um grupo parafilético com as espécies monofiléticas *F. guttiforme* e *F. ananatum* com 77% de *bootstrap* (Figura 1) e 98% de probabilidade (Figura 2). Treze haplótipos, H1, H2, H4, H6, H8, H11, H12, H22, H26, H27, H28, H29, H30 agruparam-se com linhagens filogenéticas do FOOSC. A partir de então, foram realizadas análises, em separado, com os haplótipos pertencentes a cada complexo e suas respectivas sequências de referência para verificar a consistência dos agrupamentos formados nas análises em conjunto.

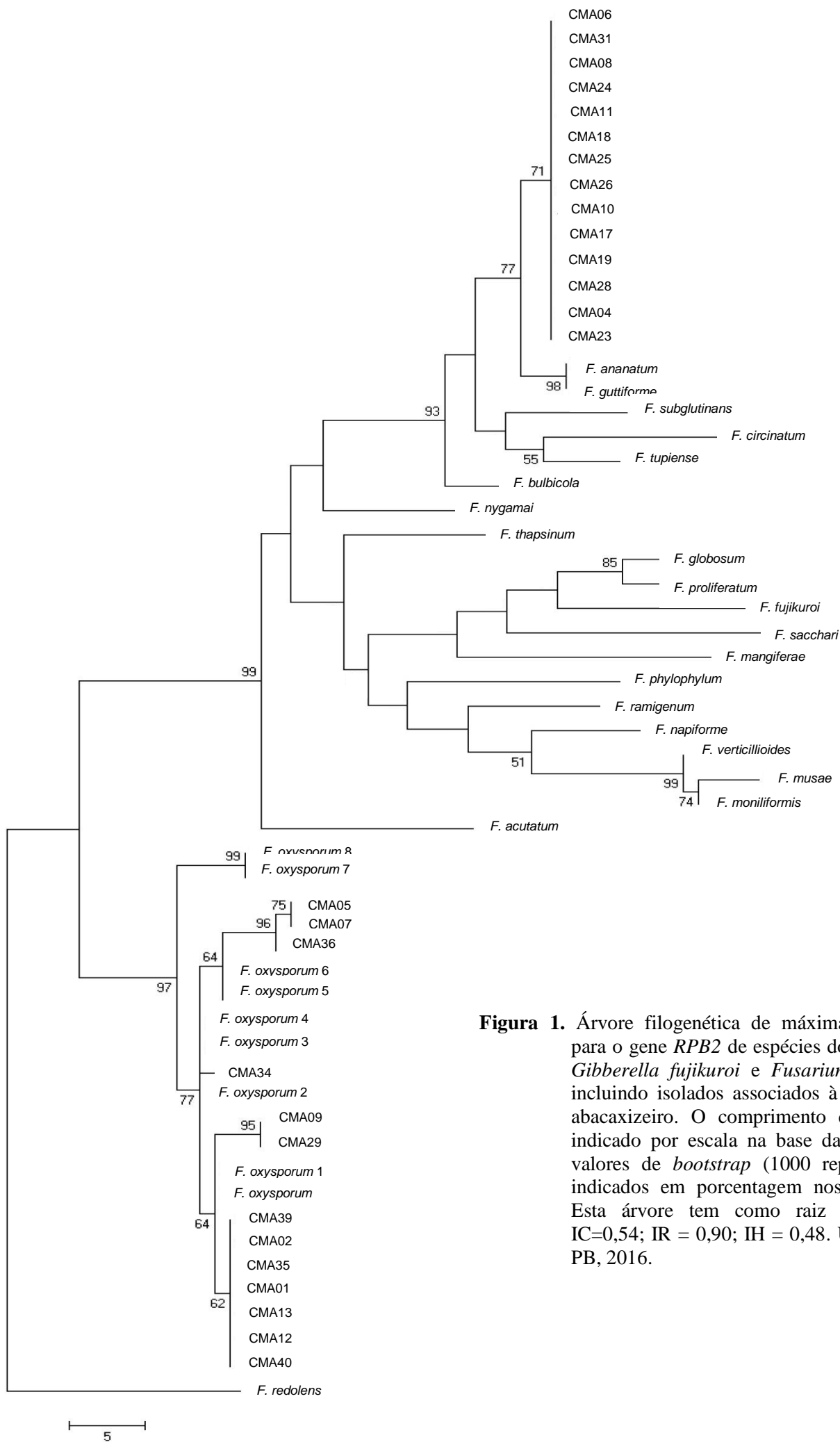
Na análise de máxima parcimônia do GFSC e H3, H5, H7, H9, H10, H13, H14, H15, H17, H18, H19, H20, H21, H24, das 26 árvores mais parcimoniosas geradas, uma representou a história filogenética dos isolados analisados. Os isolados permaneceram formando um grupo parafilético com as espécies irmãs *F. guttiforme* e *F. ananatum*, no

entanto, não foi possível distinguir a qual ou quais espécie(s) o grupo de isolados pertence. A inferência bayesiana gerou a árvore de maior probabilidade, dentre as analisadas (Figura 2). Nessas árvores, os clados dos haplótipos analisados nesse estudo, mais *F. guttiforme* e *F. ananatum* foram altamente suportados, com 82% de *bootstrap* (Figura 3) e 91% de probabilidade (Figura 4) para as análises de máxima parcimônia e inferência bayesiana, respectivamente.

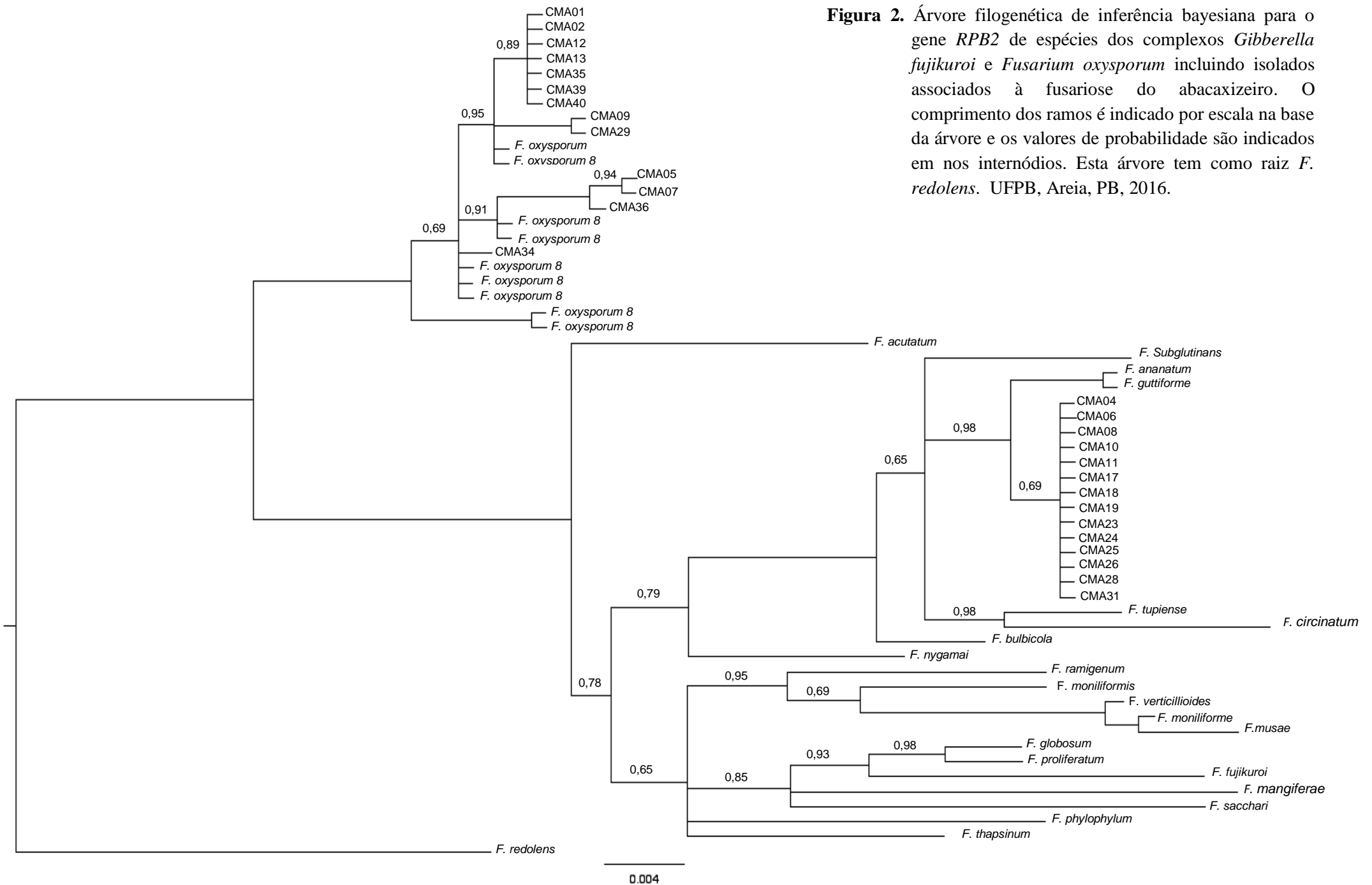
Os haplótipos H1, H2, H4, H6, H8, H11, H12, H22, H26, H27, H28, H29, H30 também foram analisados separadamente com sequencias de referência do FOSC para confirmação dos agrupamentos gerados nas árvores com todos os haplótipos. Para essa análise, em máxima parcimônia, 250 árvores mais parcimoniosas foram geradas e uma, de melhor topologia, apresentada (Figura 5). Pela inferência bayesiana, esses haplótipos permaneceram agrupados no FOSC com 99% de probabilidade (Figura 6). Todos os agrupamentos formados entre os haplótipos analisados e os de referência do FOSC foram altamente suportados por *bootstrap* e probabilidade (Figuras 5 e 6).

O gene *RPB2* acessou tamanha variabilidade nos isolados analisados, permitindo identificar que linhagens filogenéticas do FOSC podem estar associada à fusariose no Brasil pelo menos na pós-colheita. Populações de *F. guttiforme* brasileiras foram descritas causando a fusariose em abacaxizeiro (SOARES, 2011; TSUJI, 2012, PLOETZ, 2006), visto a observação de diferentes linhagens filogenéticas formadas, que deram indícios de elevada diversidade populacional, mas não a definição de espécie filogenética. Anteriormente, em 1998, Nirenberg e O' Donnell associaram a fusariose do abacaxizeiro a *F. guttiforme*, no entanto, as suas descrições restringiram-se a alguns isolados brasileiros.

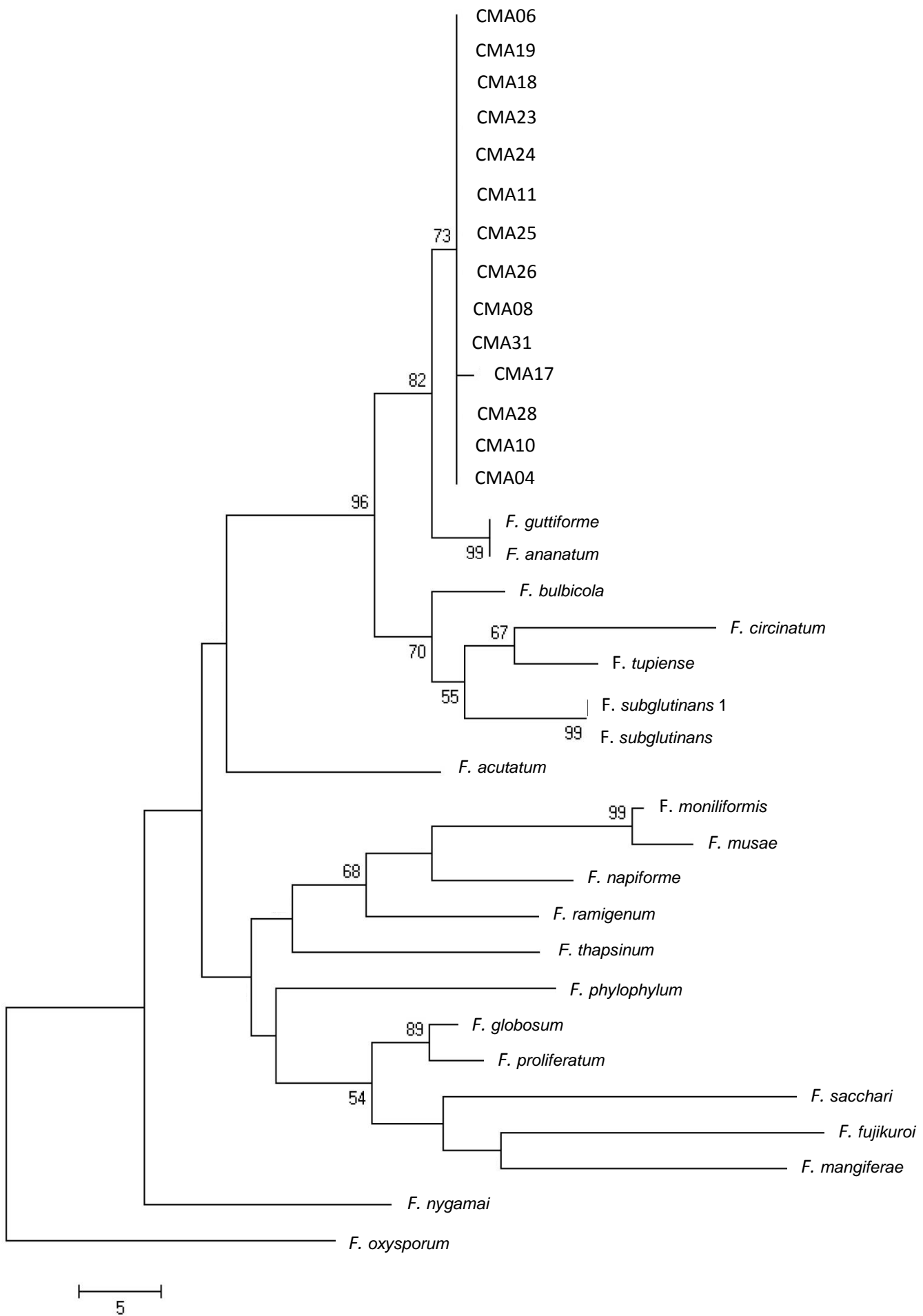
Posteriormente, Jacobs et al. (2010) descreveram uma nova espécie causando fusariose em frutos de abacaxizeiro na África do Sul e a denominaram *Fusarium ananatum*. Essa espécie é filogeneticamente distinta de *F. guttiforme* pela análise dos genes,  $\beta$ -tubulina, fator de alongação 1- $\alpha$  e calmodulina. Esses pesquisadores também realizaram comparações morfológicas e de patogenicidade entre *F. ananatum* e *F. guttiforme* e conseguiram associar marcadores fenotípicos consistentes ao *F. ananatum*, separando-o completamente de *F. guttiforme*.



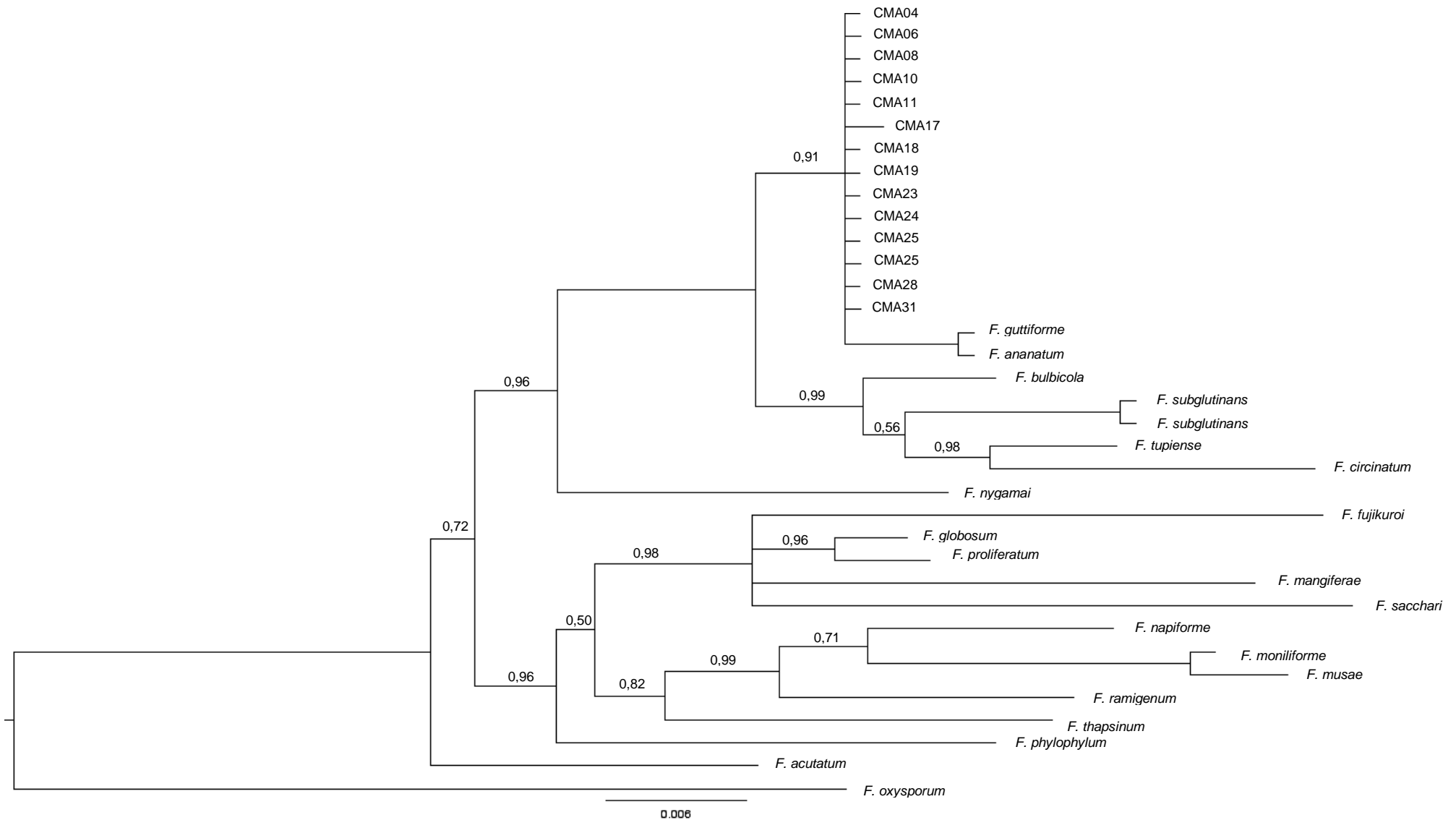
**Figura 1.** Árvore filogenética de máxima parcimônia para o gene *RPB2* de espécies dos complexos *Gibberella fujikuroi* e *Fusarium oxysporum* incluindo isolados associados à fusariose do abacaxizeiro. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de *bootstrap* (1000 repetições) são indicados em porcentagem nos internódios. Esta árvore tem como raiz *F. redolens*. IC=0,54; IR = 0,90; IH = 0,48. UFPB, Areia, PB, 2016.



**Figura 2.** Árvore filogenética de inferência bayesiana para o gene *RPB2* de espécies dos complexos *Gibberella fujikuroi* e *Fusarium oxysporum* incluindo isolados associados à fusariose do abacaxizeiro. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de probabilidade são indicados em nos internódios. Esta árvore tem como raiz *F. redolens*. UFPB, Areia, PB, 2016.



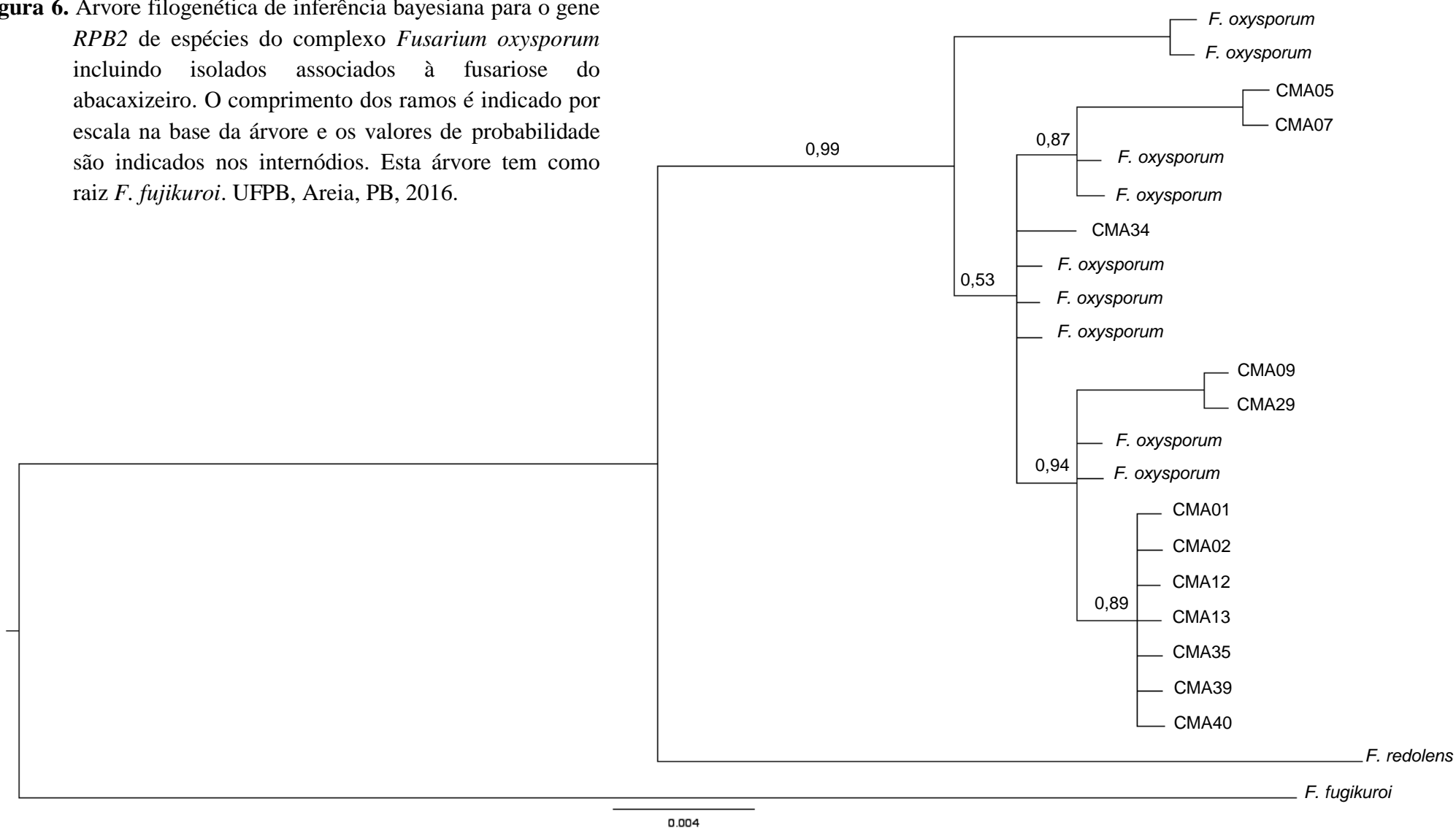
**Figura 3.** Árvore filogenética de máxima parcimônia para o gene *RPB2* de espécies do complexo *Gibberella fujikuroi* incluindo isolados associados à fusariose do abacaxizeiro. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de *bootstrap* (1000 repetições) são indicados em porcentagem nos internódios. Esta árvore tem como raiz *F. oxysporum*. IC=0,62; IR=0,75; IH=0,40. UFPB, Areia, PB, 2016.



**Figura 4.** Árvore filogenética de inferência bayesiana para o gene *RPB2* de espécies do complexo *Gibberella fujikuroi* incluindo isolados associados à fusariose do abacaxizeiro. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de probabilidade são indicados nos internódios. Esta árvore tem como raiz *F. oxysporum*. UFPB, Areia, PB, 2016.



**Figura 6.** Árvore filogenética de inferência bayesiana para o gene *RPB2* de espécies do complexo *Fusarium oxysporum* incluindo isolados associados à fusariose do abacaxizeiro. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de probabilidade são indicados nos internódios. Esta árvore tem como raiz *F. fujikuroi*. UFPB, Areia, PB, 2016.



Em relação às espécies de *Fusarium* identificadas no Brasil para a cultura do abacaxizeiro, todos os isolados descritos e identificados como *F. guttiforme* são oriundos de plantas (NIRENBERG; O' DONNELL, 1998; PLOETZ, 2006; SOARES, 2011; TSUJI, 2012), não tendo sido descrito isolado do patógeno em frutos. Com essa constatação é possível inferir, pelos resultados observados no presente estudo, que outras populações de *Fusarium* spp. podem estar associadas à fusariose do abacaxizeiro no Brasil, mas *F. guttiforme*, aparentemente é a que prevalece. Possivelmente, populações de isolados associadas à fusariose em plantas sejam distintas ou mais prevalentes que outras e podem causar sintomatologias diferentes em frutos (JACOBS et al., 2010) ou, simplesmente, não causarem sintomas aparentes (STEPIEŃ; KOCZYK; WAŚKIEWICZ, 2013). No entanto, para uma maior identificação de novas espécies de *Fusarium* spp. novos genes, juntos ao *RPB2*, devem ser adicionados às análises (O' DONNELL et al., 2013).

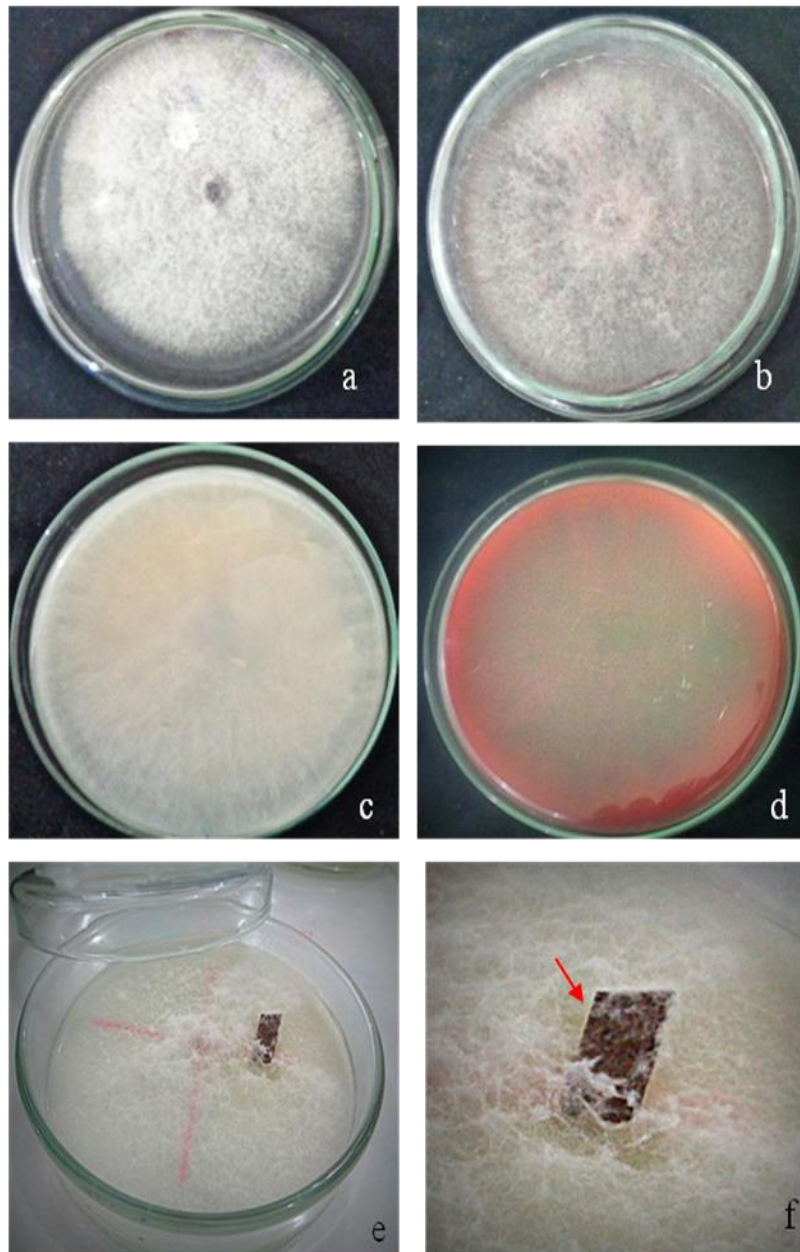
Recentemente, dez espécies de *Fusarium* spp. da Costa Rica, Equador, Honduras, Hawaí, Indonésia e Vietnã foram identificadas infectando frutos de abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*) (STEPIEŃ; KOCZYK; WAŚKIEWICZ, 2013), *Fusarium ananatum*, *F. concentricum*, *F. fujikuroi*, *F. guttiforme*, *F. incarnatum*, *F. oxysporum*, *F. polyphialidicum*, *F. proliferatum*, *F. temperatum* e *F. verticillioides* foram identificados utilizando o gene do fator de alongação 1 $\alpha$  (*EF1- $\alpha$* ) a partir de 44 isolados monospóricos de abacaxizeiros desses países. Semelhantemente ao ocorrido nesses países, é provável que os isolados do presente estudo, associados aos frutos de abacaxizeiro 'Pérola' na Paraíba, Rio Grande do Norte e Pernambuco possam ser de pelo menos, duas espécies diferentes de *Fusarium*.

Notavelmente, a filogenia de *F. guttiforme* como agente etiológico da fusariose em abacaxizeiro no Brasil não está resolvida. Os isolados do GFSC, identificados, compartilham características comuns com ambas às espécies irmãs *F. guttiforme* e *F. ananatum* pelo gene *RPB2*. Além disso, outros isolados no presente estudo agruparam-se com linhagens filogenéticas diferentes de *F. oxysporum*.

Caracterização morfológica de isolados de *Fusarium* spp.

Os isolados avaliados apresentaram ampla e significativa variabilidade morfológica para todos os marcadores avaliados. Os isolados produziram micélio

flocoso, esparso, de coloração branca ao rosa no verso e do branco à púrpura no reverso (Figura 7).



**Figura 7.** Marcadores culturais dos isolados analisados. Coloração verso e reverso das colônias em BDA: branco ao rosa (a e b) no verso – e branco ao púrpura no reverso (c e d) – Isolados em SNA adicionado de fragmento de folha de bananeira, micélio branco e flocoso (e). Detalhe dos esporodóquios (seta vermelha) em folha de bananeira (f).

Microconídios unicelulares obovóides, até elípticos em alguns isolados, hialinos, abundantes e asseptados, ocasionalmente com um ou dois septos foram produzidos em todo micélio. Eles são formados em mono e polifíalides ou sobre falsas cabeças em hifas curtas e pouco ramificadas. Entre os representantes do FOOSC e GFSC, os isolados apresentaram microconídios com (1,77-)1,0-3,0  $\mu\text{m}$  de comprimento por (0,99-)1,0-2,0  $\mu\text{m}$  de largura e relação comprimento/largura de 1,86  $\mu\text{m}$  (Tabela 3).

Macroconídios foram produzidos nos fragmentos de folhas de bananeira sobre o meio SNA. Eles são elipsoides, levemente curvados a quase retos, de paredes delgadas com (6,74-)15,0-4,0  $\mu\text{m}$  de comprimento por (1,09-)1,0-2,0  $\mu\text{m}$  de largura e a relação comprimento pela largura variou de 5,40 a 6,50  $\mu\text{m}$ . O número de septos nos macroconídios variou de zero a três, sendo mais frequente encontrar macroconídios com três septos. Macroconídios foram produzidos em esporodóquios que formaram pontuações acinzentadas a negras sobre as folhas de bananeira em alguns isolados analisados. Em outros isolados, esporodóquios não foram observados. Não foi observada a formação de clamidósporos nos isolados analisados (Tabela 3).

O diâmetro das colônias variou significativamente de 3,45 a 9,00 cm em meio BDA e 6,90 a 9,00 cm em meio SNA (Figura 8), sendo superior ao descrito para isolados de *F. guttiforme* em estudos anteriores no Brasil, em que, Tsuji (2012), ao avaliar isolados de *F. guttiforme* de diferentes populações, observou que estes variaram de 1,86 a 3,1 cm de diâmetro das colônias crescidas. Já Soares (2011), informou que o diâmetro médio das colônias de 43 isolados após quatro dias em BDA no escuro a 20 °C variou de 3,5 a 5,5 cm e os isolados de referência apresentaram crescimento superior a 4,0 cm de diâmetro. O diâmetro da colônia 'in vitro' é muito variável em espécies de *Fusarium*, sendo muito influenciado pelas condições ambientais de cultivo (PLOETZ, 2006; STEPIEŃ; KOCZYK; WAŚKIEWICZ, 2013).

As equações de regressão lineares em relação ao crescimento micelial em BDA e SNA nos números de dias após semeadura dos isolados nas placas de Petri, em cada dia de avaliação e os IVCM estão apresentados na Tabela 4.

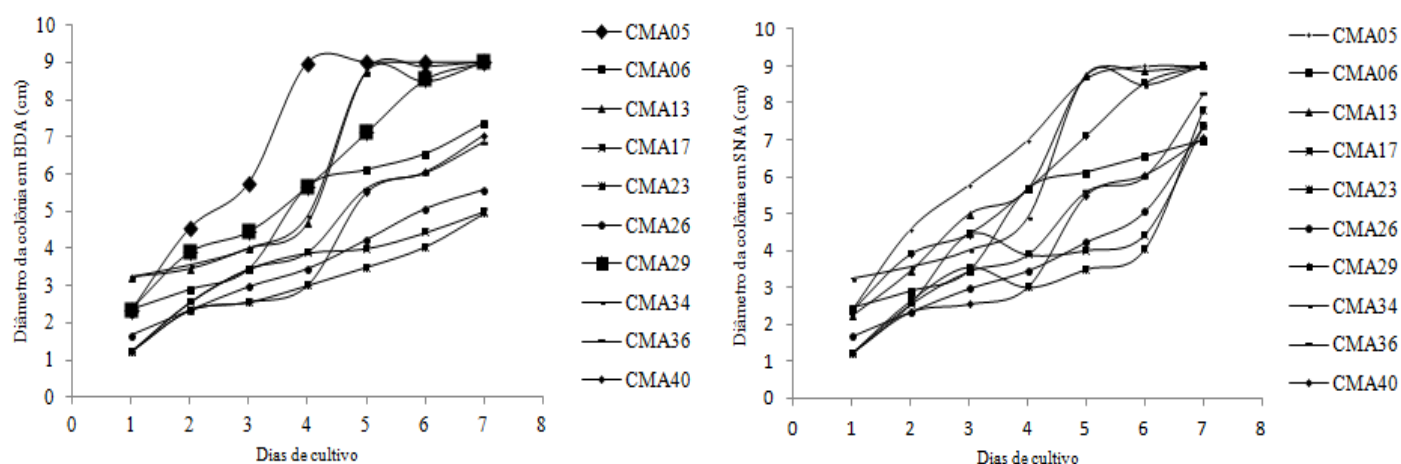
Constataram-se que os coeficientes de determinação foram elevados, todos acima de 0,90, evidenciando que as equações lineares explicam o crescimento micelial dos isolados nas condições analisadas.

**Tabela 3.** Marcadores morfológicos dos isolados representativos do FOSC e GFSC analisados. Areia, PB, UFPB, 2016.

Acesso	Complexo	Cor da colônia		Dimensões conidiais ( $\mu\text{m}$ )			
		Verso	Reverso	Macroconídio	Relação C/L	Microconídio	Relação C/L
CMA13	FOSC	Branco	Branco	4,0-15,0 x 1,0-2,0	6,50	1,0-3,0 x 1,0-2,0	1,86
CMA29	FOSC	Branco	Branco	5,0 - 8,0 x 1,0-2,0	5,40	1,0-3,0 x 1,0-2,0	1,86
CMA40	FOSC	Branco	Rosa	4,0-14,0 x 1,0-2,0	5,50	1,0-3,0 x 1,0-2,0	1,86
CMA05	FOSC	Branco	Púrpura	5,0-14,0 x 1,0-2,0	6,30	1,0-3,0 x 1,0-2,0	1,86
CMA34	FOSC	Branco	Púrpura	5,0-15,0 x 1,0-2,0	6,50	1,0-3,0 x 1,0-2,0	1,86
CMA36	FOSC	Branco	Rosa	4,0-14,0 x 1,0-2,0	5,50	1,0-3,0 x 1,0-2,0	1,86
CMA17	GFCS	Branco	Rosa	5,0-14,0 x 1,0-2,0	6,30	1,0-3,0 x 1,0-2,0	1,86
CMA06	GFCS	Branco	Rosa	4,0-14,0 x 1,0-2,0	5,60	1,0-3,0 x 1,0-2,0	1,86
CMA23	GFCS	Branco	Púrpura	4,0-14,0 x 1,0-2,0	5,60	1,0-3,0 x 1,0-2,0	1,86
CMA26	GFCS	Branco	Rosa	4,0-14,0 x 1,0-2,0	5,60	1,0-3,0 x 1,0-2,0	1,86

\*Relação C/L - Relação comprimento pela largura dos conídios mensurados em  $\mu\text{m}$ .

Apenas alguns isolados apresentaram marcadores culturais semelhantes a *F. guttiforme*, como a coloração do verso e reverso das colônias que variavam do branco ao púrpura, microconídios obovóides ou ovóides, geralmente sem septos, ocasionalmente com um ou dois e produzidos no micélio aéreo (NIRENBERG e O' DONNELL, 1998). Entretanto, algumas características não se assemelharam as descritas para essa espécie, tais como, menor tamanho dos conídios, maior diâmetro e velocidade de crescimento micelial e ausência de espororodóquios, em alguns isolados.



**Figura 8.** Crescimento micelial em meio de cultura BDA e SNA dos isolados representativos de GFSC e FOSS analisados. Areia, PB, UFPB, 2016.

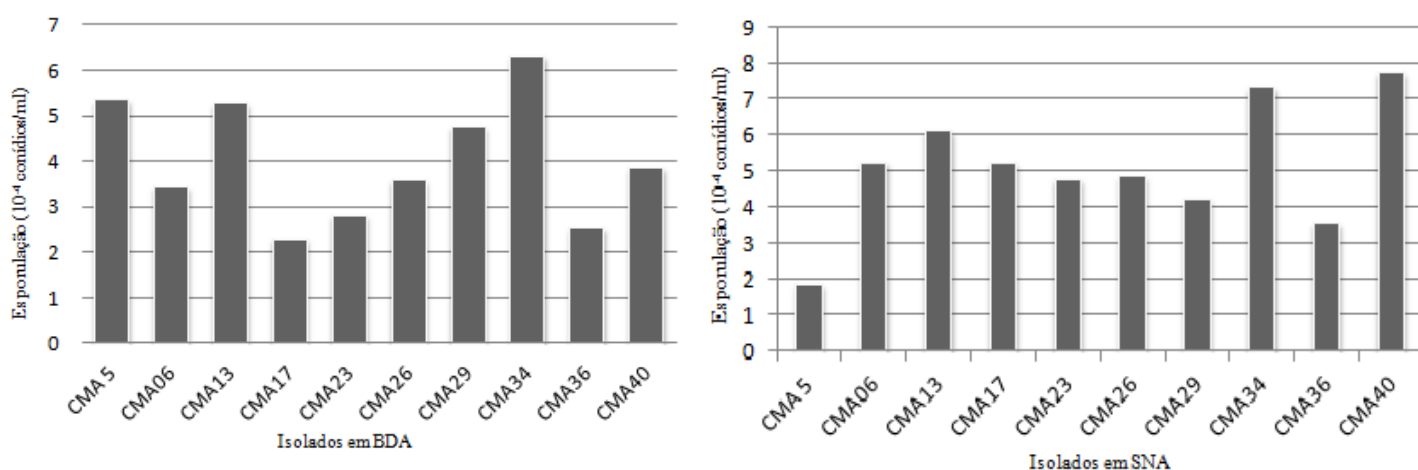
Alguns isolados, não apresentaram características morfológicas, dentro da variação descrita, similares às observadas em *F. guttiforme*, conforme descrições de estudos anteriores com populações de isolados do Brasil por Nirenberg e O' Donnell, (1998); Soares (2011); Tsuji (2012); Ploetz (2006). De 49 isolados utilizados na caracterização, 21 coletados recentemente em Minas Gerais e no Espírito Santo apresentaram marcadores morfológicos típicos de *F. guttiforme* (SOARES, 2011). Tsuji (2012), afirmou que os isolados de plantas de abacaxizeiro analisados, apresentavam características morfológicas condizentes com *F. guttiforme*, comparando-os com isolados de referência.

**Tabela 4.** Regressão e índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) dos isolados representativos do FOOSC e GFSC analisados. Areia, PB, UFPB, 2016.

Isolado	BDA				IVCM	SNA				IVCM
	b0	b1	P<0,005	R <sup>2</sup>		b0	b1	P<0,005	R <sup>2</sup>	
CMA05	0.723	1.205	**	99.70%	9.230 a	0.0125	1.251	*	98.77%	7.920 b
CMA06	-0.55	1.107	*	98.52%	5.662 b	0.0928	0.895	*	91.01%	5.810 b
CMA13	1.053	1.234	**	97.52%	10.23 a	0.688	1.143	*	99.39%	8.780 a
CMA17	0.632	0.629	*	99.26%	5.345 b	0.193	1.036	*	99.23%	6.755 b
CMA23	-0.158	0.722	*	91.38%	4.307 b	0.019	1.072	*	98.87%	6.867 b
CMA26	0.850	0.677	**	98.74%	6.330 b	0.998	0.902	**	99.70%	7.865 b
CMA29	1.275	1.218	**	96.77%	10.675 a	0.969	1.094	**	99.12%	9.167 a
CMA34	0.802	1.206	**	98.96%	9.530 a	0.887	1.243	**	98.15%	9.787 a
CMA36	0.848	0.816	**	94.71%	7.645 b	0.207	1.157	*	99.63%	7.702 b
CMA40	0.041	0.997	*	99.70%	6.255 b	-0.071	1.237	*	98.65%	7.592 b

\*\*altamente significativo, pelo teste F, a 5% de probabilidade; \*significativo, pelo teste F, a 5% de probabilidade. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade. CMA - Coleção micológica de Areia, Areia/PB. Batata Dextrose Agar (BDA) e Syntetic Nutrient-Poor Agar (SNA). IVCM - Índice de Velocidade de Crescimento Micelial.

Quando se comparou a capacidade de esporulação entre os meios BDA e SNA observou-se que, em qualquer dos meios utilizados, não se produziram macroconídios no micélio aéreo, corroborando com descrito por Nirenberg e O' Donnell (1998) para *F. gutiforme*. Houve grande variação na capacidade de esporulação entre os isolados analisados que não formaram agrupamentos entre Estados ou complexos diferentes (Figura 9).



**Figura 9.** Esporulação dos isolados representativos do FOOSC e GFSC analisados nos meios BDA e SNA. Areia, PB, UFPB, 2016.

Para todas as características morfológicas analisadas, os isolados não formaram agrupamentos morfológicos bem definidos por Estado de origem. A forma de disseminação da fusariose do abacaxizeiro ou o fluxo gênico dos isolados podem estar relacionados a essa

constatação. O patógeno, por ser um fungo invasor do solo, é de difícil controle e dissemina-se por dispersão aérea ou pelo vento, no entanto, diferentes isolados podem se propagar em mudas e frutos contaminados. Isolados de *Fusarium* spp. do abacaxizeiro podem ser transportados nessas condições (BENFICA et al., 2011). Os resultados do presente trabalho constataram grandes e significativas diferenças morfológicas entre todos os isolados analisados.

Diferentes variantes do patógeno ou até mesmo espécies diferentes de *Fusarium*, associadas ao abacaxizeiro poderiam surgir a partir de uma pequena população de isolados que evoluiu em relação a determinadas respostas ambientais características de cada local de coleta, ou até mesmo pela virulência desses isolados nesses locais, de acordo com a prevalência de variedades de abacaxizeiro cultivadas ou quantidade de agrotóxicos utilizados nos plantios. Sendo algumas espécies de *Fusarium* do GFSC com reprodução sexuada rara ou desconhecida, em condições naturais e induzidas (LESLIE; SUMMERELL, 2006), dentre elas *F. guttiforme*, à ausência de recombinação genética devido a presença de determinados mecanismos de recombinação, tais como, parassexualidade e paramiose (AZEVEDO, 2009) poderiam influenciar essa elevada variabilidade detectada nos isolados avaliados.

#### Agressividade dos isolados de *Fusarium* spp.

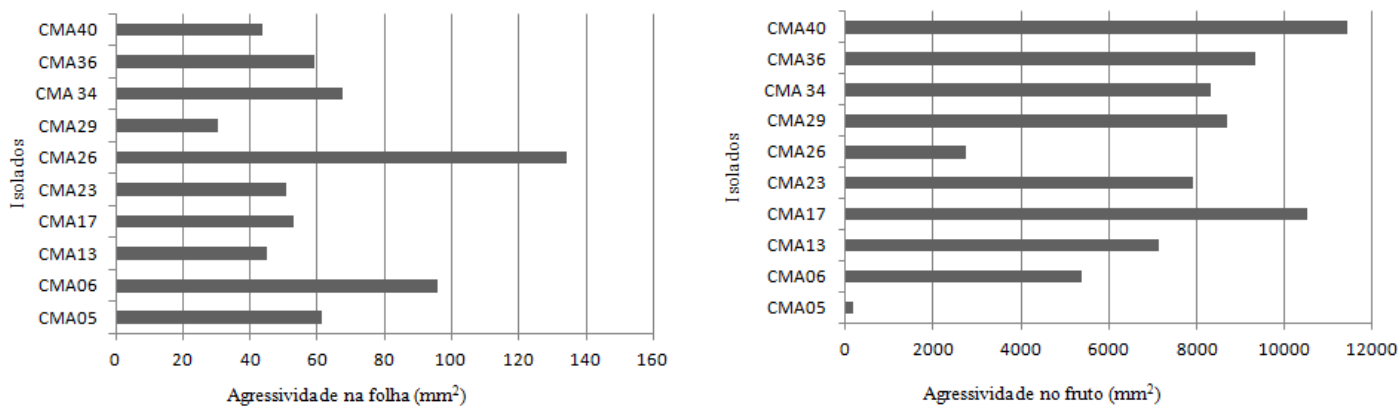
Os isolados apresentaram elevada patogenicidade demonstrada pela quantificação da agressividade, tanto em frutos, quanto em folhas destacadas. Apesar da agressividade dos isolados serem iguais entre si em folhas destacadas, foram diferentes entre esses substratos analisados. Em folhas destacadas, a maior lesão foi do CMA26, e a menor do CMA 29. As lesões nos frutos variaram de 11.425 mm<sup>2</sup> no isolado CMA40 ou até isolados que foram menos agressivos (7,4%), CMA05 (Figura 10).

É interessante relatar que as diferenças de agressividade entre substratos utilizados e entre isolados dentro de frutos fornecem indícios de que os patógenos, nesse estudo, estão mais adaptados aos frutos do que as folhas. Apenas testes de patogenicidade, positivo ou negativo, de isolados associados à fusariose do abacaxizeiro já foram realizados (PLOETZ, 2006; JACOBS et al., 2010; SOARES, 2011; TSUJI, 2012; STEPIEŃ; KOCZYK; WAŚKIEWICZ, 2013). Esse estudo levantou uma nova abordagem para acessar a patogenicidade em isolados associados à fusariose no abacaxizeiro e assim foi possível, além

de detectar, também quantificar a patogenicidade desses isolados. De forma geral, todos os haplótipos foram mais agressivos aos frutos do que as folhas do abacaxizeiro sendo mais um indício de melhor adaptação do patógeno aos frutos.

É possível que existam populações distintas de *Fusarium* que são mais adaptadas às plantas, das que causam podridão em frutos ou vice-versa. No entanto, para que essa inferência seja confirmada, testes cruzados devem ser realizados com folhas e frutos de abacaxizeiro não destacados da planta.

É importante relatar que, apesar dos isolados analisados terem sido coletados de frutos com sintomas característicos da fusariose como a produção de resina, sintoma típico da fusariose causada por *F. guttiforme*, alguns frutos inoculados para avaliação da agressividade não apresentaram a formação desse sintoma. É possível que a resina seja um produto do metabolismo secundário da planta produzido contra a infecção de *F. guttiforme*. Esses produtos de resistência são formados em frutos não destacados da planta mãe (APARECIDO et al., 2010; MATOS; CORDEIRO, HADDAD, 2012) ou seriam especificamente produzidos para *F. guttiforme* (JACOBS et al. 2010).



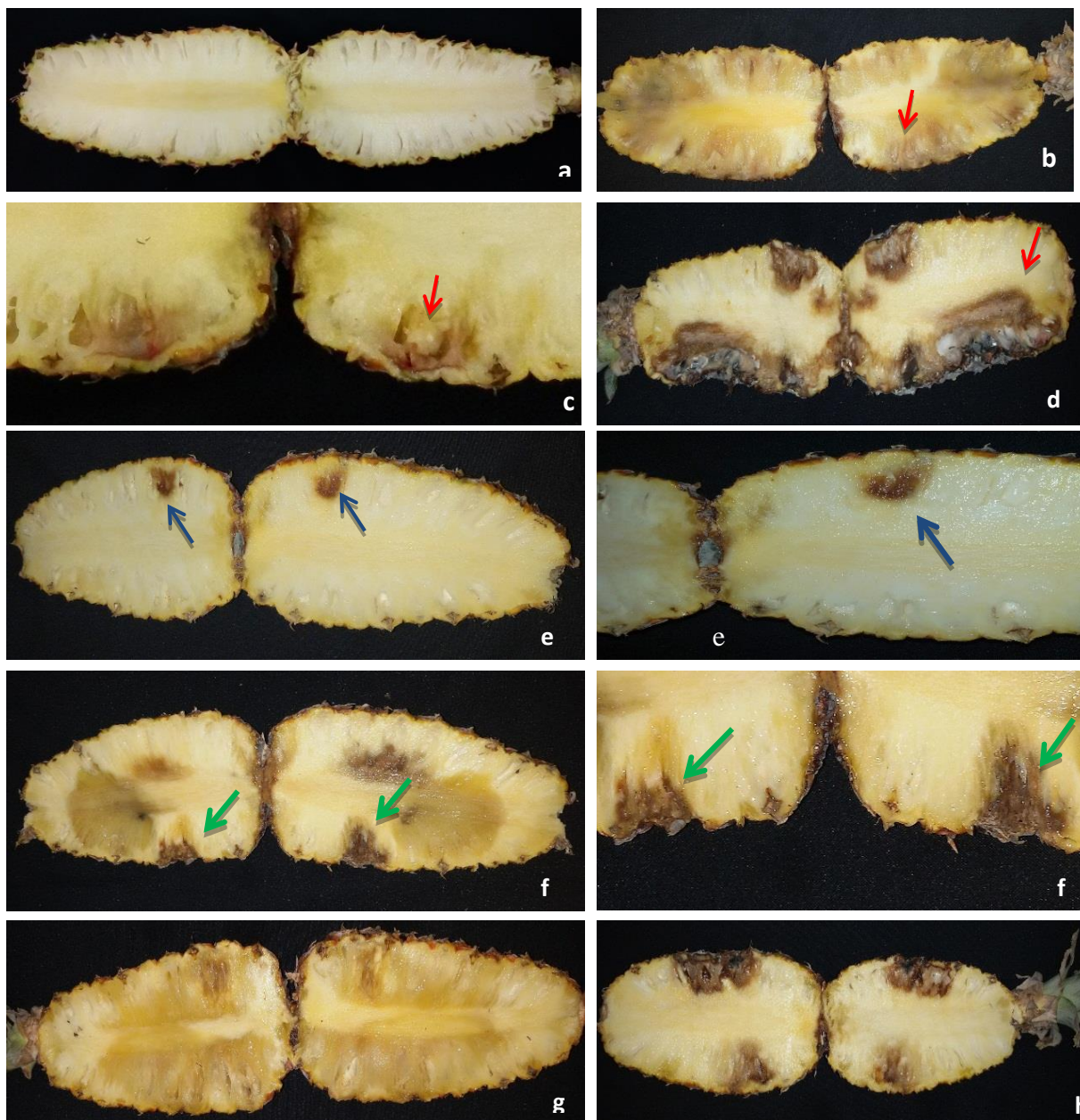
**Figura 10.** Agressividade dos isolados representativos do FOOSC e GFSC analisados. Areia, PB, UFPB, 2016.

Todas as avaliações de agressividade dos isolados foram realizadas em folhas e frutos destacadas da planta mãe. De maneira geral, fungos do gênero *Fusarium*, causadores de

podridões pós-colheita são considerados patógenos fracos que necessitam de um fator de predisposição no hospedeiro, como por exemplo, ferimentos na epiderme para iniciar infecção (NISHIJIMA, 1998). Por esta razão podem ser considerados invasores secundários de lesões causadas por outros agentes bióticos ou abióticos. Entretanto, o fato de diversas espécies de *Fusarium* serem capazes de sobreviver saprofiticamente por longos períodos de tempo e muitas espécies produzirem micotoxinas (STEPIEŃ; KOCZYK; WAŚKIEWICZ, 2013), torna estes grupos de fungos potencialmente importantes como agentes causais de doenças em várias culturas agrícolas (MATOS et al., 2012).

A espécie *F. ananatum* descrita na África do Sul causando fusariose em abacaxi foi descrita por Jacobs et al. (2010) que compararam as lesões formadas em frutos por *F. guttiforme* e *F. ananatum* e perceberam que as lesões nos frutos são similares entre as duas espécies, porém os tecidos infectados por *F. ananatum* apresentam-se mais escuros, não exsudam resina, são mais rebaixados e tem aparência em forma de ‘V’. Sintomas similares aos causados por *F. ananatum* e *F. guttiforme* em abacaxi na África do Sul foram observados em frutos de abacaxizeiro avaliados nesse estudo. Os patógenos formaram grupo parafilético com *F. ananatum* em todas as análises filogenéticas realizadas. Assim, pode ser possível que esta espécie e/ou, pelo menos, uma nova espécie, próxima de *F. guttiforme* ou de outro morfogrupo ocorram no Brasil causando a fusariose, sendo mais adaptada aos frutos de abacaxizeiro, do que às plantas. Alguns patógenos apresentaram sintomas de fusariose e sinais do patógeno similares aos descritos para *F. guttiforme* em frutos (Figura 11). Esses são de coloração inicial translúcida e esporulação cor de rosa (JACOBS et al., 2010). Esses patógenos foram coletados a partir de populações dos três estados analisados nesse trabalho.

Os sintomas causados nos frutos pelos isolados agrupados nas análises filogenéticas ao FOOSC também são semelhantes aos descritos para *F. guttiforme* por Jacobs et al. (2010). No entanto, esses isolados causaram manchas marrons claras a marrons escuras de aspecto seco, sem forma definida (Figura 11) e de uma forma geral, foram os menos agressivos dentre os patógenos analisados.



**Figura 11.** Sintomas da fusariose em frutos de abacaxizeiro no Brasil. a. Fruto sem sintomas; b. Sintoma de coloração inicial translúcida com esporulação cor de rosa (seta vermelha); c. Em detalhe, esporulação cor de rosa (seta vermelha); d. Sintomas mais avançados exibindo esporulação cor de rosa (seta vermelha); e. Sintoma inicial menos severo em 'V' (seta azul), em detalhe, sintoma inicial menos severo em 'V' (seta azul); f. Sintoma em 'V' menos severo em estágio avançado (seta verde), detalhe sintoma em 'V' menos severo em estágio avançado (seta verde); g. Sintomas de manchas marrons claras sem forma definida; h. Sintomas de manchas marrons escuras sem forma definida e aspecto seco.

A fusariose em plantios de abacaxizeiro é encontrada, praticamente, em todas as regiões produtoras da fruta no mundo. Ela pode apresentar variações de severidade dentro de uma mesma região, de acordo com a época de colheita. Em regiões quentes e de baixa

umidade relativa, a doença apresenta maior intensidade. Os frutos são levados ao mercado de fruta 'in natura' e internamente apresentam lesões, inicialmente, de coloração marrom clara que passam a marrom escura, ocasionando uma podridão seca (APARECIDO et al., 2010), como as observadas no presente trabalho para isolados do FOOSC identificados.

Portanto, isolados do FOOSC e GFSC coletados nesse trabalho que foram identificados nas análises filogenéticas e confirmados patogenicidade pela agressividade quantificada podem estar presentes nas populações de *Fusarium* spp. associados aos plantios comerciais de abacaxizeiro na Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte do Brasil.

## **CONCLUSÕES**

Os isolados associados aos frutos de abacaxizeiro apresentaram ampla variabilidade, determinada pelos marcadores fenotípicos e moleculares analisados.

É possível a existência de pelo menos duas espécies de *Fusarium*, além de *F. guttiforme*, associadas à fusariose em frutos de abacaxizeiro nos estados da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte.

Os patógenos desse estudo causaram sintomas típicos de fusariose e apresentaram níveis diferentes de agressividade em folhas e frutos de abacaxizeiro cv. Pérola, quando inoculados artificialmente.

## REFERÊNCIAS

- ALFENAS A. C, MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. Ed. UFV. 2007.
- AOKI, T.; O'DONNELL, K.; GEISER, D. M. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, n. 3, p. 189-201, 2014.
- APARECIDO, C. C. PIRES, G. C. C., FINATTI, D. VALE, S. L. Diferenciação de Podridões causadas em Frutos de Abacaxi por Fungos Instituto Biológico—APTA Documento Técnico 008—Dezembro—p.1-7. 2010.
- AZEVEDO, JOÃO L.. **Genetica de microrganismos**. 02. ed. Goiania: Editora UFG, v. 01. 536p. 2009.
- BENFICA A. F, (2011). *Sistema de Produção de Abacaxi para o Extremo Sul da Bahia* Embrapa Mandioca e Fruticultura Sistema de Produção, 19 ISSN 1678-8796 Versão eletrônica Set/2011.
- BONFIELD, J. K. E WHITWHAM, A. Gap5—editing the billion fragment sequence assembly. *Vol. 26 no. 14 2010, pages 1699–1703 doi:10.1093/bioinformatics/btq268*. 2010.
- BOOTH, Colin et al. **The genus fusarium**. The genus *Fusarium*. 1971.
- CAMARGO, L. M. P. C. A.; BARACHO, I. R. Virulencia de linhagens de *Fusarium moniliforme* Sheld. var. *subglutinans* Wr. e Rg. **Summa Phytopatologica**, v. 3, n. 3, p. 2015-220, 1977.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 42(225), 65-72. 1939.
- DE OLIVEIRA ROCHA, L.; REIS, G. M.; DA SILVA, V. N.; BRAGHINI, R.; TEIXEIRA, M. M. G.; CORRÊA, B. Molecular characterization and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* isolated from corn grains of diferente geographic origins in Brazil. *International Journal Food Microbiology*, v. 145, p. 9-21, 2011.
- DESJARDINS, A. E. *Gibberella* from A (venaceae) to Z (eae) 1 2. **Annual review of phytopathology**, v. 41, n. 1, p. 177-198, 2003.
- FERREIRA, D. F.. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. **Reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria**, v. 45, p. 235, 2000.
- FREITAS, S; MORALES, AC; LAVAGNINI, TC; BAGGIO, MV. **O significado da expressão “haplótipo” em estudos populacionais. Um estudo de caso com *Chrysoperla externa* (Hexapoda: Neuroptera: Chrysopidae)**. Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia-SP Brasil www.sbg.org.br - ISBN 978-85-89109-06-2. 2009.
- GARCIA, W. A.; KRAUSE, W.; ARAÚJO, D. V.; 3, SILVA, C. A. ; MIRANDA, A. F. Comportamento *In Vitro* Do Agente Etiológico Da Fusariose E Avaliação De Métodos De Inoculação Em Abacaxizeiro. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 28, n. 3, p. 263 – 268, 2015.

HOVE, V. F, WAALWIJK C, LOGRIECO A, MUNAUT F, MORETTI A. *Gibberella musae* (*Fusarium musae*) sp. nov., a recently discovered species from banana is sister to *F. verticillioides*. 2011.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Levantamento Sistemático Da Produção Agrícola Pesquisa Mensal De Previsão E Acompanhamento Das Safras Agrícolas No Ano Civil 2015. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa\\_resultados.phpid\\_pesquis](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa_resultados.phpid_pesquis). 2015.

JACOBS, A., VAN WYK, P. S., MARASAS, W. F., WINGFIELD, B. D., WINGFIELD, M. J., & COUTINHO, T. A. (2010). *Fusarium ananatum* sp. nov. in the *Gibberella fujikuroi* species complex from pineapples with fruit rot in South Africa. **Fungal biology**, v. 114, n.7, p. 515-527, 2010.

KVAS, M., MARASAS, W. F. O., WINGFIELD, B. D., WINGFIELD, M. J., & STEENKAMP, E. T. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. **Fungal diversity**, 34, 1-21. 2009.

LESLIE, J.F.; ANDERSON, L.L.; BOWDEN, R.L.; LEE, Y.W. Inter - and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. **Int. J. Food Microbiol.** V.119, p. 25–32. 2007.

LESLIE, JOHN F.; SUMMERELL, BRETT A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Ames, IA, USA: Blackwell Pub., 2006.

LIU, YAJUAN J.; WHELEN, SALLY; HALL, BENJAMIN D. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 12, p. 1799-1808, 1999.

MATOS, A. P.; CORDEIRO, Z. J. HADDAD, F. **Fusariose em Fruteiras**. XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura. Bento Gonçalves - RS. ANAIS DE CONGRESSO. 2012.

MONTENEGRO, H. W. S. **A maturação do abacaxi**. Piracicaba – SP. v. 31, ANAIS ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUÍZ DE QUEIROZ. 1964.

NECHET, K. DE L. Caracterização biológica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum* sp. em cafeeiro (*Coffea arabica* L.). 1999. 73p. 1999. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

NELSON P. E.; TOUSSOUN T. A.; BURGESS L. W Characterization of *Fusarium-beomiforme* Sp - Nov. **Mycologia**, v. 79, p. 884–889, 1987.

NELSON, PAUL E.; TOUSSOUN, TEWFIK ADIL; MARASAS, W. F. O. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. 1983.

NIRENBERG, HELGARD I; O'DONNELL, Kerry. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, p. 434-458, 1998.

NOGUEIRA, S. R., LIMA, F. S., ROCHA, E. M., ARAÚJO, D. H. Fungicidas no controle de fusariose do abacaxi no estado de Tocantins, Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 447-455. 2014.

O'DONNELL, K., ROONEY, A. P., PROCTOR, R. H., BROWN, D. W., MCCORMICK, S. P., WARD, T. J., ... & ROBERT, V. A.. Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle

Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. **Fungal Genetics and Biology**, v. 52, p. 20-31. 2013.

O'DONNELL, K., SARVER, B. A., BRANDT, M., CHANG, D. C., NOBLE-WANG, J., PARK, B. J.; GEISER, D. M.. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic fusaria, including isolates from the multistate contact lens-associated US keratitis outbreaks of 2005 and 2006. **Journal of clinical microbiology**, v. 45; n.7, p. 2235-2248. 2007.

O'DONNELL, K., SUTTON, D. A., RINALDI, M. G., SARVER, B. A., BALAJEE, S. A., SCHROERS, H. J., ... & AOKI, T. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n.10, p. 3708-3718. 2010.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.). 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 1991.

PLOETZ, R. C. *Fusarium*-induced diseases of tropical, perennial crops. **Phytopathology**, v. 96, p. 648-652, 2006.

PROCTOR, R. H., VAN HOVE, F., SUSCA, A., STEA, G., BUSMAN, M., LEE, T. & WARD, T. J. . Birth, death and horizontal transfer of the fumonisin biosynthetic gene cluster during the evolutionary diversification of *Fusarium*. **Molecular microbiology**, v. 90, n.2, p. 290-306. 2013.

ROHRBACH, K. G.; PFEIFFER, J. B. Susceptibility of pineapple cultivars to fruit diseases incited by *Penicillium funiculosum* and *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, v. 66, p. 1386-1390. 1976.

SOARES, J. M. Caracterização morfológica, molecular e patogênica do agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro no Brasil. 2011. 58 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

SOUZA, B. O. de. Manejo da antracnose do sorgo por meio da diversificação da resistência genética na população do hospedeiro. 2009. 96 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SOUZA, B. O.; CASELA, C. R.; NUNES, J. A.; CASTRO, H. A. Management of sorghum anthracnose through diversification of genetic resistance in host population. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 1, p. 020-027. 2013.

STEPIEŃ, L.; KOCZYK, G.; WAŚKIEWICZ, A. Diversity of *Fusarium* species and mycotoxins contaminating pineapple, **Journal Applied Genetics**, v. 54, p. 367-380, 2013.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J.. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22 n. 22, p. 4673-4680. 1994.

TRiest, D., STUBBE, D., DE CREMER, K., PIÉRARD, D., DETANDT, M., & HENDRICKX, M. Banana infecting fungus, *Fusarium musae*, is also an opportunistic human pathogen: Are bananas potential carriers and source of fusariosis?. **Mycologia**, v. 107, n. 1, p. 46-53, 2015.

TSUJI, S. S. Análise Filogenética e Patogênica Do Agente Causal Da Fusariose Do Abacaxizeiro. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2012.

VERZIGNASSI, J. R., SANTOS, M. D. F., MATOS, A. P. D., BENCHIMOL, R. L., & POLTRONIERI, L. S. Fusariose do abacaxizeiro no Pará. *Summa Phytopathologica*, 35(4), 329-330. 2009.

VON BARGEN, S.; MARTINEZ, O.; SCHADOCK, I.; EISOLDA, M.; GOSSMANN, BÜTTNER, C. Genetic Variability of phytopathogenic *Fusarium proliferatum* associated with crown rot in *Asparagus officinalis*. *Journal of Phytopathology*, v. 157. p. 446-456, 2009.

WEBER, Z.; KOSTECKI, M.; VON BARGEN, S.; GOSSMANN, M., WASKIEWICZ, A.; BOCIANOWSKI, J.; KNAFLEWSKI, M.; BOCIANOWSKI, J.; KNAFLEWISK, M.; BÜTTNER, C., GOLINSKI, P. *Fusarium* species colonizing spears and forming mycotoxins in field samples of *Asparagus* from Germany and Poland. **Journal of Phytopathology**, v. 154. p. 209-216, 2006.

### **CAPÍTULO III**

#### **ALTERNATIVAS DE MANEJO DA FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO ‘PÉROLA’**

SOUZA, W. C. O. Alternativas de manejo da fusariose do abacaxizeiro 'Pérola'. Areia. Centro de Ciências Agrárias/Universidade Federal da Paraíba (CCA/UFPB), 2016. (Tese de Doutorado em Agronomia).

## RESUMO

Avaliou-se a eficácia do controle da fusariose do abacaxizeiro com extratos de três espécies vegetais e um indutor de resistência, disponível comercialmente. Extratos vegetais de *Caesalpinia ferrea* (CF), *Anadenanthera colubrina* (AC), *Momordica charantia* (MC) foram usados nas concentrações de 500, 1000, 1500 e 2000 ppm; enquanto o indutor de resistência acibenzolar-S-metil (ASM) foi utilizado na dosagem de 2,0 g/ha. Como padrão de comparação, utilizou-se o fungicida tebuconazol (75 mL/ha) e a água destilada esterilizada (controle). Os frutos foram pulverizados quatro vezes ao longo de 6 meses desde o início da floração, seguindo o calendário de pulverizações recomendada para o fungicida. A avaliação da severidade da doença foi realizada usando-se uma escala de notas e os dados foram utilizados para determinação da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD). As avaliações pós-colheita foram realizadas em frutos maduros através das medições de pH, teores de sólidos solúveis totais, acidez total titulável, firmeza e atividade das enzimas peroxidase (POX), polifenoloxidase (PPO) e fenilalanina amônia-liase (FAL). O extrato vegetal de *M. charantia* apresentou-se com potencial na redução da severidade da fusariose em frutos do abacaxizeiro 'Pérola'; o extrato *M. charantia* nas concentrações mais elevadas, afetou positivamente as características físico-químicas dos frutos.

**Palavras Chaves:** *Ananas comosus* L.; *Fusarium guttiforme*; Extrato vegetal.

SOUZA, W. C. O. Alternatives of Fusariosis management in pineapple 'Perola'. Areia. Centro de Ciências Agrárias / Universidade Federal da Paraíba (CCA / UFPB), 2016 (Thesis in Agronomy).

## **ABSTRACT**

It was evaluated the effectiveness of the control of fusarium wilt in pineapple plants with three plant species extracts and a resistance inductor, commercially available. Plant extracts of *Caesalpinia ferrea* (CF), *Anadenanthera colubrina* (AC), *Momordica charantia* (MC) were used at 500, 1000, 1500 and 2000 ppm; while resistance inducer acibenzolar-S-methyl (ASM) was used at 2.0 g / ha. As a standard of comparison, it was used the fungicide tebuconazole (75 mL / h) and sterile distilled water (control). The fruits were sprayed four times, over 6 months, since the start of flowering, following the pulverization schedule for the recommended fungicide. The assessment of the disease severity was performed using a disease index and the data were used to determine the area under disease progress curve (AUDPC). Post-harvest were reached in ripe fruit ratings through the pH, total soluble solids, titratable acidity, firmness and activity of peroxidase (POX), polyphenol oxidase (PPO) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL). The vegetal extract of *M. charantia* showed potential in reducing the severity of fusariosis in fruits of pineapple 'Perola'; *M. charantia* extract at higher concentrations positively affected the physical and chemical characteristics of fruits.

**Key words:** *Ananas comosus* L.; *Fusarium guttiforme*; Plant extract.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de abacaxi (*Ananas comosus* L.) com produção de frutos inferior apenas a quantidade da Costa Rica (FAOSTAT, 2015). A abacaxicultura brasileira, no ano de 2015, ocupou uma área em torno de 67.380 ha, atingindo uma média de 26.365 frutos/ha, resultando numa produção total de 1.777.292 toneladas (IBGE, 2016).

A fusariose do abacaxizeiro é uma das mais importantes doenças da cultura. Relatada na Argentina em 1954 e dez anos mais tarde no Brasil (LAVILLE, 1980; ROHRBACH, 1983), a doença ocorre na Bolívia, Paraguai e Uruguai (PLOETZ, 2003). Causada pelo fungo *Fusarium guttiforme* (Nirenberg; O'Donnell), é considerada a mais importante doença nas áreas de produção de abacaxi no Brasil. O fungo infecta folhas, caules e raízes, porém a sua importância econômica é maior quando infecta a infrutescência, causando podridão pós-colheita (NIREMBERG et al., 1998; PLOETZ, 2006), podendo resultar em perdas superiores a 80% da produção de frutos quando a floração e a frutificação ocorrem em períodos chuvosos e de baixas temperaturas (BENFICA et al., 2011).

O manejo da fusariose do abacaxizeiro envolve o uso de variedade resistente, plantio de material de propagação livre do patógeno, controle de inseto e proteção da inflorescência e frutos pelo uso de fungicida (PLOETZ, 2006). No Brasil, o controle é preventivo, normalmente feito pelo uso de produtos químicos (BENFICA et al., 2011). O uso intensivo dos fungicidas apresenta alguns inconvenientes, entre eles o desenvolvimento de resistência microbiana; contaminação ambiental (água, solo, produtor); riscos aos consumidores, representados por possíveis efeitos carcinogênicos e teratogênicos; elevação dos custos de produção e impossibilitar a exportação para países onde os resíduos deixados pelos produtos químicos nos frutos não são aceitáveis (PARA, 2014).

Neste contexto, há um número crescente de pesquisas utilizando métodos alternativos de controle, que não apresentem risco a saúde humana e ambiental e atendam à demanda crescente de produtos orgânicos e livres de resíduos de agrotóxicos (CARVALHO et al., 2009; FAROOQ et al., 2011; SALES et al., 2016).

Entre os métodos alternativos de controle de doenças, destacam-se os extratos vegetais e os óleos essenciais de plantas. Várias pesquisas indicam a eficiência destas alternativas de controle de fitopatógenos, seja pela ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos; seja pela indução de resistência, que sugerem a presença de compostos com características de elicitores (SINGH; RAI, 2000; SINGH et al., 2002;

BONALDO et al., 2004; BRITO et al. 2005; BALBI-PENÑA et al., 2006; SOUZA et al., 2015). As espécies têm sido relatadas no manejo de doenças em diversos patossistemas.

O objetivo do presente trabalho foi determinar a eficiência do manejo da fusariose do abacaxizeiro em área produtora no Estado de Pernambuco com o uso de extratos vegetais e indutor de resistência disponível comercialmente.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Preparação do extrato vegetal**

Folhas de *Momordica charantia*, *Caesalpinia ferrea* e *Anadenanthera colubrina* foram coletadas no município de Areia-PB (Latitude: 6° 58' 1,83''S e Longitude: 35° 42' 52,48''O). As folhas foram acondicionadas em sacos de papel e postas para secagem em estufa à 40 °C até a obtenção de peso contínuo ( $\approx 72$ h).

Posteriormente, foram trituradas em moinho de facas e armazenadas em sacos de polietileno à temperatura ambiente ( $25\text{ °C} \pm 5$ ) durante 5 dias. O triturado foi transferido para recipientes de 5 L contendo etanol absoluto na proporção de 1g de tecido foliar seco para 4mL do solvente. Após este procedimento, a preparação foi acondicionada em evaporador rotativo com pressão reduzida, durante 6 horas, a 42 °C para eliminação do solvente. O extrato bruto etanólico foi transferido para recipientes de vidro sem tampa e mantido por 7 dias, a temperatura ambiente, para completa eliminação do solvente.

### **Condução do experimento em campo**

O experimento foi conduzido em plantio comercial na zona rural do município de Pombos – PE, (Latitude: 08°08'29"S e Longitude: 35°23'45" W). A área foi escolhida pelo histórico de alta incidência e severidade de fusariose em anos anteriores de produção, sendo a ocorrência da doença confirmada durante a instalação e avaliação do presente experimento.

Os extratos vegetais de *M. charantia* (MC), *C. ferrea* (CF) e *A. colubrina* (AC), foram utilizados para tratamento de inflorescência e frutos nas seguintes concentrações: 500, 1000, 1500 e 2000 ppm. Os demais tratamentos foram o indutor de resistência acibenzolar-S-metil (ASM) (2,0 g/ha), o fungicida tebuconazol (750 mL/ha) e a testemunha (água destilada). O delineamento experimental foi em blocos ao acaso (DBC), totalizando 15 tratamentos, sendo quatro repetições por tratamento, onde cada repetição foi composta por quatro plantas.

As pulverizações foram realizadas de acordo com o calendário recomendado para o fungicida, com quatro pulverizações, sendo a primeira no início da floração. Utilizou-se pulverizador costal manual (Jacto modelo PJH) com 20L de capacidade máxima, pressão máxima de 6 kgf/cm<sup>3</sup>, bico de jato de cone. Os frutos foram colhidos no estágio de maturação número 2 - início da coloração amarela no centro dos frutinhos (DANTAS Jr. et al., 2009), conduzidos ao Laboratório de Fitopatologia (LAFIT-CCA/ UFPB) e separados para utilização nas avaliações de severidade da doença, análise pós-colheita e análise enzimática.

Os dados foram analisados no programa estatístico SISVAR utilizando o teste de Sckott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

### **Avaliação da severidade da doença**

As avaliações de severidade da doença foram realizadas durante cinco dias consecutivos, sendo a primeira avaliação realizada no dia da colheita, utilizando escala de notas de Ventura (2002), em que: (- ou 0) ausência de tecidos necróticos; (+ ou 1) lesões limitadas ao local da penetração do fungo, menores que 2mm; (++) ou 2) lesões abrangendo extensão de 3 a 9 mm; (+++ ou 3) lesões que se estendem de 10 até 15 mm; (++++ ou 4) lesões com mais de 15 mm. Os dados foram utilizados para determinação da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD).

### **Avaliação pós-colheita dos frutos**

As avaliações pós-colheita foram realizadas cinco dias após a colheita dos frutos, através da medição de pH por potenciometria em eletrodo de vidro; teores de sólidos solúveis totais, por meio da refratometria, com compensação de temperatura automática; acidez total titulável, determinada por titulação com NaOH 0,1N, expressa em porcentagem de ácido cítrico; firmeza, determinada individualmente em dois pontos distintos entre as malhas na região equatorial da infrutescência, com penetrômetro na região de inserção. Os dados foram transformados para Newtons (AOAC, 1997).

Diariamente, foram realizadas medições de perda de peso dos frutos, com o auxílio de balança digital de precisão para quantificação da massa individual.

### **Análise enzimática**

Para a extração da peroxidase (POX), 3,0 g de polpa do fruto foram homogeneizados em 6 mL de tampão de extração fosfato 0,1M, pH 6,0. A suspensão resultante foi centrifugada

por 15 minutos a 12000 g coletando-se o sobrenadante. As reações para determinação da atividade enzimática foram preparadas com a adição de 0,25 mL do sobrenadante ao meio de reação contendo 0,25 mL de guaiacol a 1,7%, 0,75 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0 e 0,25 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 1,8%. As reações foram monitoradas com auxílio de espectrofotômetro, observando-se a variação da absorbância no comprimento de onda de 470 nm, a 25 °C, imediatamente após a mistura e a atividade expressa em Unidades de Absorbância (UA).min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína.

Para a extração da polifenoloxidase (PPO), 3,0 g de polpa foram homogeneizados em 6 mL de tampão de extração acetato a 0,1M, pH 5,0 e a suspensão resultante centrifugada por 15 minutos a 12000 g, coletando-se o sobrenadante. Para a determinação da atividade da PPO, 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado ao meio de reação contendo 0,25 mL de S-metilcatecol 0,6 M e 0,75 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 6,8. A solução foi incubada por 15 minutos a 40 °C e a reação paralisada com adição de 2 mL ácido perclórico 2N. As reações foram monitoradas com auxílio de espectrofotômetro, observando-se a variação da absorbância, no comprimento de onda de 395 nm, a 25 °C, imediatamente após a retirada da incubadora e a atividade da PPO expressa em Unidades de Absorbância (UA). min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína.

Para a extração da fenilalanina amônia-liase (FAL) 3,0 g de polpa foram homogeneizados em 6 mL de tampão de extração acetato a 0,1M, pH 5,0 e a suspensão resultante centrifugada por 15 minutos a 12000 g, coletando-se o sobrenadante. Para a determinação da atividade da FAL 0,5 mL do sobrenadante foram transferidos para tubos de ensaio e aliquotas de 1,5 mL de solução tampão TRIS-EDTA 0,01M, pH 8,8, 0,5 mL de solução de fenilalanina (30 µM) e 0,5 mL de água destilada foram adicionados. Após a incubação em banho-maria a 40 °C, por uma hora, a reação foi paralisada com 2 mL de ácido clorídrico 5M e as leituras espectrofotométricas realizadas a 290 nm 25°C. Os resultados foram expressos em Unidades de Absorbância (UA).min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína.

A prova em “branco” foi preparada usando 1,5 mL de solução tampão TRIS 0,01M. pH 8,8, 0,5 mL de extrato enzimático e 1,0 mL de água destilada, para cada tratamento testado. As análises foram realizadas em triplicata. As determinações da quantidade de proteína presente nos referidos extratos foram feitas pelo método de Bradford (1976), usando Soroalbumina Bovina (BSA) como padrão.

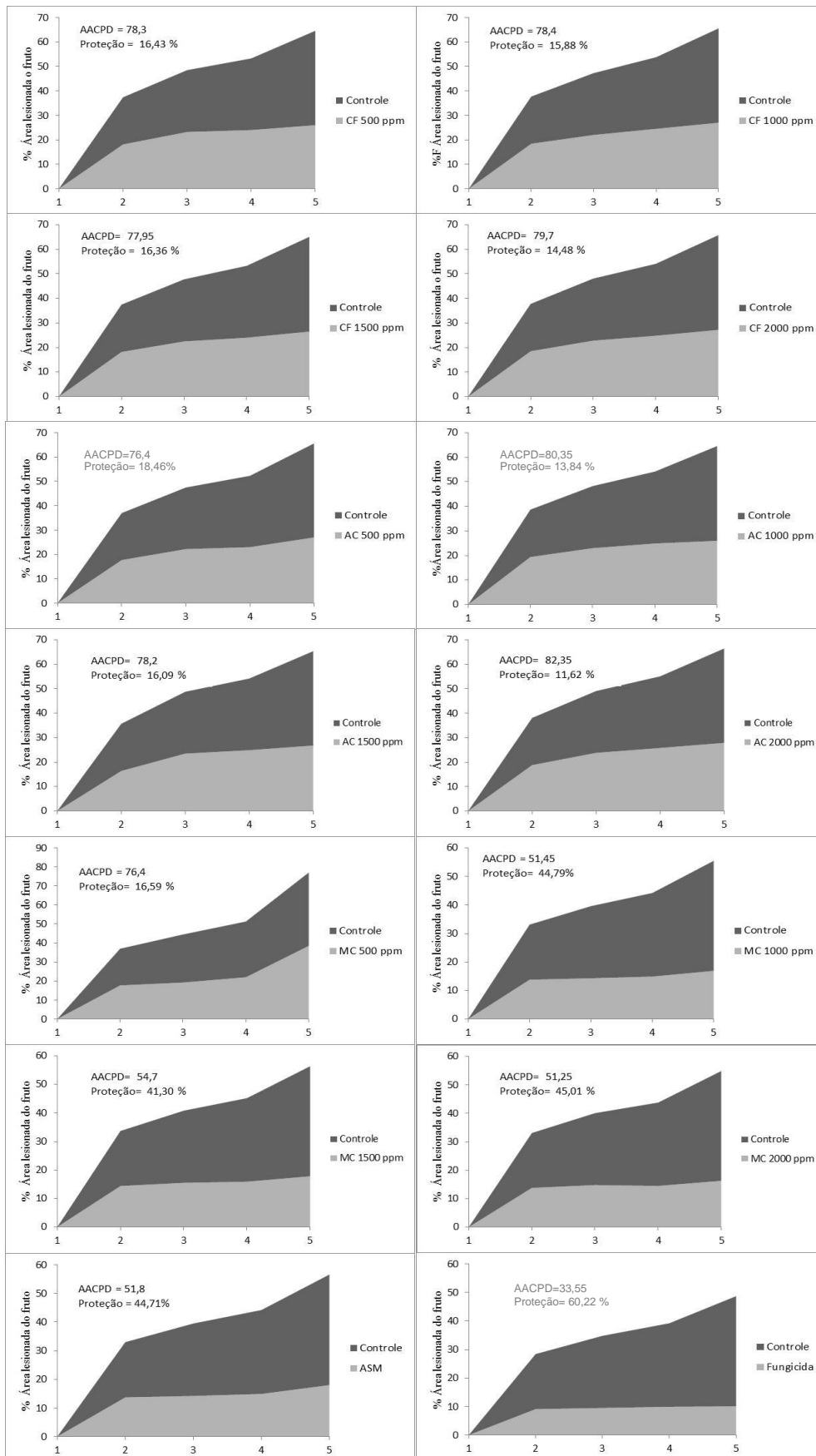
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos dados, da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Figura 1), indicou nível de controle da fusariose superior a 60% em plantas tratadas com o fungicida tebuconazol durante o ciclo do abacaxizeiro na área avaliada. Entre os tratamentos alternativos, verificou-se uma severidade da doença maior nos tratamentos com o extrato CF e o extrato AC, conferindo proteção menor que 20%, o indutor de resistência ASM o extrato vegetal MC retardaram o desenvolvimento da fusariose nos frutos de abacaxizeiro (Figura 1).

A utilização de extratos de plantas constitui-se numa alternativa ecológica promissora, no controle de patógenos de plantas, podendo ser associada às demais práticas de manejo integrado de doenças, contribuindo para atender à crescente demanda nacional e internacional por produtos orgânicos. Neste trabalho, o extrato vegetal de *M. charantia* nas concentrações de 1000, 1500 e 2000 ppm, diminuiu a severidade da fusariose, ao contrário aos extratos das espécies *C. ferrea* e *A. colubrina*, nas concentrações avaliadas, que não exibiram qualquer efeito de retardamento sobre o desenvolvimento da doença que os diferenciasse do tratamento testemunha com água destilada (Figura 1).

Apesar de não oferecer proteção igual àquela do tratamento com o fungicida, o extrato MC tem potencial como uma alternativa viável no manejo integrado da fusariose do abacaxizeiro, por associar um razoável nível de proteção ao baixo custo financeiro, minimizar os efeitos negativos dos fungicidas no que diz respeito ao desenvolvimento de resistência microbiana, risco a saúde humana e ambiental, e principalmente atender à demanda por produtos orgânicos e livres de resíduos de agrotóxicos (MOGLE, 2013; SUKORINI, 2013).

Souza et al. (2012) utilizaram o extrato de MC nas concentrações 1000 e 1500 ppm e observaram menor severidade da antracnose causada pelo fungo *C. gloesporioides* em frutos de mamoeiro (*Carica papaya*) comparando as demais concentrações utilizadas. Celoto et al. (2011) avaliaram o extrato de MC no controle da antracnose (*Colletotricum musae*) em frutos de bananeira (*Musa* sp.) e verificaram que quando aplicados os extratos, até dois dias antes da inoculação do fungo, houve redução em torno de 80% no desenvolvimento das lesões nos frutos, considerando-se assim, a hipótese que possa existir a presença de substância antifúngica nos extratos de MC. Oliveira e Nascimento (2009) avaliando a severidade da podridão-negra (*Chalara paradoxa*) em abacaxizeiro 'Pérola', verificaram que, no sexto, sétimo e oitavo dias após a inoculação, os frutos de abacaxizeiro tratados com extrato de MC apresentaram resultados de retardamento da podridão-negra.



**Figura 1.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e porcentagem de proteção (%) em frutos de abacaxizeiro 'Pérola' submetidos aos tratamentos com extratos de *Caesalpinia ferrea* (CF), *Anadenanthera colubrina* (AC), *Momordica charantia* (MC), Acibenzolar-S-metil (ASM), fungicida tebuconazol e controle (água destilada) Areia-PB, 2016.

A avaliação da qualidade pós-colheita, os frutos tratados previamente em campo, com os extratos vegetais o acibenzolar-S-metil e o fungicida, foi realizada cinco dias após a colheita.

Para o parâmetro firmeza observou-se um destaque para o indutor ASM, que exibiu desempenho similar ao fungicida. Entre os extratos vegetais, apenas o MC, foi superior a testemunha neste mesmo parâmetro, mas estatisticamente inferior aos tratamentos fungicida e indutor de resistência. O tratamento com os extratos de AC e CF proporcionaram os menores valores de firmeza, que pode ser explicado pela deterioração avançada, maior severidade causada pela fusariose nos frutos tratados (Tabela 1).

Souza et al. (2012) verificaram que com o uso de extrato de MC para o controle da antracnose em frutos de mamoeiro (*Carica papaya*), a firmeza foi maior nos frutos tratados com o extrato vegetal nas concentrações de 500, 1000 e 1500 ppm e proporcionaram efeito significativo em comparação aos demais tratamentos. A firmeza do fruto é uma das características mais importantes do ponto de vista comercial, pois afeta a qualidade e a resistência ao transporte e causa de apodrecimento (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Para a avaliação de sólidos solúveis, observou-se que os tratamentos com os extratos de CF, AC e MC na concentração de 500 ppm e a testemunha apresentaram as maiores taxas em relação aos demais tratamentos. Essas maiores taxas de açúcar foram obtidas nos frutos em que os valores de firmeza foram os menores em decorrência da podridão avançada causada pelo fungo (Tabela 1). Oliveira et al., (2006) explicaram que em alguns casos, quanto maior a podridão causada pelo fungo, o fruto tende a acumular maiores quantidades de sólidos solúveis, uma vez que o fruto está reagindo contra o microrganismo, aumentando seu metabolismo e consequentemente ficando mais adocicado.

O ASM foi o menos eficiente, onde atuou negativamente, causando mumificação da casca e podridão da polpa, nesta, o teor de sólidos solúveis ficou na faixa de 3,0° Brix, inaceitável para o consumo. O extrato vegetal de MC nas concentrações de 1000, 1500 e 2000 ppm obtiveram valores de sólidos solúveis semelhantes ao fungicida. Estes valores são aceitáveis pois variaram entre 10.96 a 11.60 °Brix, e o resultado está dentro da faixa aceitável de acordo com as exigências do Mercado Brasileiro para o consumo *in natura* do fruto do abacaxizeiro. (MIGUEL et al., 2007; WARDY et al. 2009).

**Tabela 1.** Características físico-químicas de frutos de abacaxizeiro ‘Pérola’ tratados com extratos vegetais, fungicida e indutor de resistência acibenzolar-S-metil, ao 5º dia (vida de prateleira), UFPB, Areia-PB, 2016.

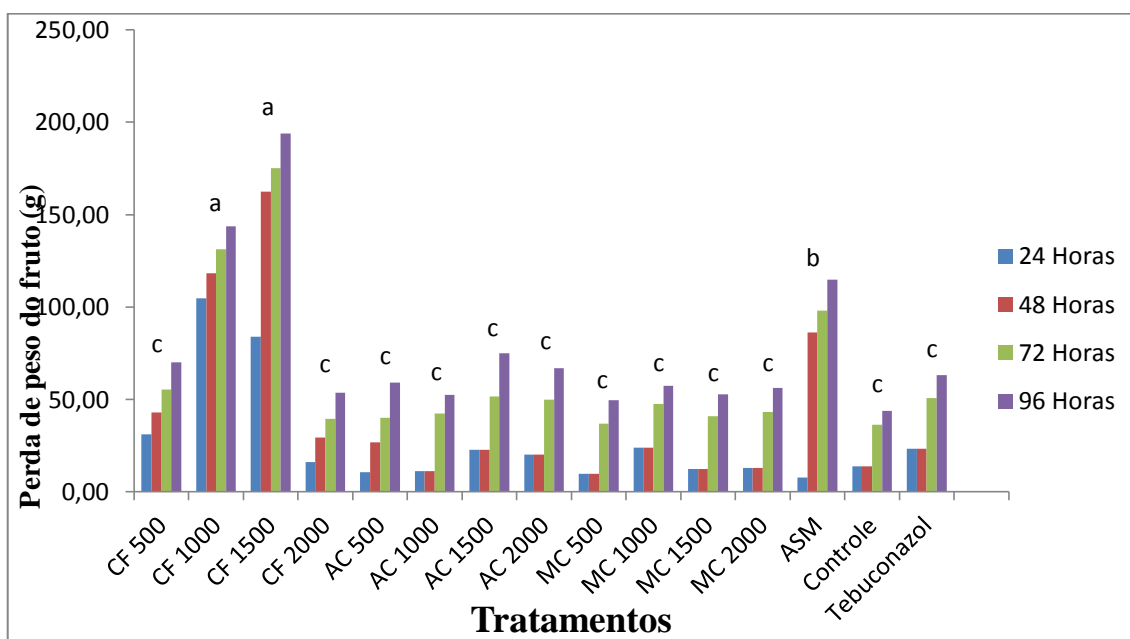
Tratamentos	Firmeza de polpa (N)	Sólidos solúveis (°Brix)	Acidez total (g ác. cítrico 100g <sup>-1</sup> )	pH
CF 500 ppm	0.80 d	13.76 a	5.76 c	8.03 a
CF 1000 ppm	1.06 d	13.16 a	6.86 c	8.13 a
CF 1500 ppm	1.56 d	12,83 a	6.93 c	8.26 a
CF 2000 ppm	0.80 d	12.10 a	5.46 c	7.83 a
AC 500 ppm	0.70 d	13.73 a	5.63 c	7.86 a
AC 1000 ppm	0.73 d	12.80 a	5.20 c	7.17 a
AC 1500 ppm	0.90 d	13.33 a	4.56 c	8.54 a
AC 2000 ppm	0.86 d	12.96 a	4.96 c	8.14 a
MC 500 ppm	7.56 b	12.56 a	4.86 c	8.40 a
MC 1000 ppm	9.03 b	11.10 b	7.46 b	5.75 b
MC 1500 ppm	8.30 b	11.60 b	7.40 b	5.50 b
MC 2000 ppm	9.66 b	10.96 b	7.96 b	4.13 b
ASM	11.66 a	3.30 c	11.43a	2.16 c
Controle	3.66 c	13.86 a	4.30 c	8.60 a
Fungicida	12.33 a	10.66 b	6.9 b	4,63 b
DMS	4,05	3,09	2,89	2,39
CV (%)	14.64	8.90	12,09	12,39

Médias comparadas pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si. CF (ppm) Diluição do extrato de *Caesalpinia ferrea* em partes por milhão (ppm); AC (ppm) Diluição do extrato de *Anadenanthera colubrina* em partes por milhão (ppm); MC (ppm): Diluição do extrato de *Momordica charantia* em partes por milhão (ppm); ASM: acibenzolar-S-methyl; Fungicida (Tiabendazol).

A acidez total titulável foi menor nos frutos tratados com os extratos de AC e CF, confirmando nestes tratamentos os maiores valores de pH. Estes valores se assemelharam a testemunha. Para as maiores doses do extrato de MC a acidez variou entre 7 e 8 obtendo valores de pH em torno de 4 e 5 compatíveis com os resultados obtidos por Pinheiro et al., (2006), que os consideram dentro dos padrões aceitáveis.

Quanto à perda de massa de frutos, não se observou efeito positivo de qualquer dos tratamentos. O fungicida e o indutor de resistência, o extrato CF nas concentrações 1000 e 1500 ppm e o tratamento ASM, exibiram as piores performances, inferiores até mesmo ao tratamento controle (Figura 2). Resultados diferentes do presente trabalho foram obtidos por Pila et al., (2010), com a utilização de indutores de resistência em frutos de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) indicando um atraso significativo na perda de peso. Ribeiro et al. (2010) utilizando extratos vegetais no controle da podridão (*F. subglutinans*) em frutos de abacaxizeiro da variedade ‘Pérola’ constataram perdas de massa pouco significativas quando tratados com extrato vegetal *Pimpinella anisum* L.

A perda de peso dos frutos resulta no enrugamento e murchamento, comprometendo as qualidades texturais e nutricionais, acarretando prejuízos na qualidade pós-colheita (PARSONS, 2012).



**Figura 2.** Perda de massa de frutos de abacaxizeiro ‘Pérola’ tratados com extratos vegetais, indutores de resistências e fungicida, UFPB, Areia-PB, 2016.

Os extratos CF e AC em todas as concentrações avaliadas não exibiram qualquer efeito significativo na atividade da peroxidase (POX) fenilalanina amônia-liase (FAL) e polifenoloxidase (PPO). O extrato MC exibiu performance superior aos demais extratos, particularmente nas concentrações mais altas, porém significativamente inferior ao indutor ASM, utilizando como padrão para a atividade enzimática (Tabela 2).

Tratamento de frutos com indutores bióticos ou abióticos intensifica a indução de resistência antes da invasão do patógeno, retardando o processo de infecção e prolongando a vida dos frutos armazenados (FORBES-SMITH, 1999). O ASM é um análogo do ácido salicílico ligado à ativação de genes codificadores de proteínas-RP e enzimas associadas à produção de fitoalexinas e lignina que confere à parede celular maior resistência aos patógenos, possibilitando a proteção do hospedeiro contra um amplo espectro de doenças (COLE, 1999; OOSTENDORP et al., 2001; NAKAZAWA et al., 2001; RESENDE et al., 2002). O ASM não possui ação antifúngica direta (YAMAGUSHI, 1998).

Nenhum dos tratamentos com extrato vegetal estimulou a atividades das enzimas relacionadas com o mecanismo de indução de resistência característico do ASM, sugerindo

que nas concentrações utilizadas os extratos não apresentaram propriedades elicitoras. O tratamento com ASM apresentou correlação direta entre percentuais de controle da doença e o aumento da atividade de todas as enzimas avaliadas (Tabela 2). Valores altos de atividade enzimática no tratamento ASM são esperados, uma vez que se trata de um indutor de resistência, ativando o metabolismo secundário do fruto. Aumento da atividade enzimática e consequente resistência ao patógeno pela aplicação de eliciadores foram observados em frutos de pêssigo (*Prunus persica*) e plantas de trigo (*Triticum vulgare* Vill) (STADNIK e BUCHENAUER, 2000; DANNER et al. , 2008).

**Tabela 2.** Atividade enzimática de polifenoloxidase (PPO), peroxidase (POX) e fenilalanina amônia-liase (FAL), em de frutos de abacaxizeiro ‘Pérola’ tratados com extratos vegetais, fungicida e indutor de resistência acibenzola-S-metil, UFPB, Areia-PB, 2016.

Tratamento	Atividade Enzimática		
	PPO	POX	FAL
	(U.A. min. <sup>-1</sup> mg proteína <sup>-1</sup> )		
CF 500 ppm	0.0189 c	0.155 c	0.048 d
CF 1000 ppm	0.0225 c	0.228 c	0.141 c
CF 1500 ppm	0.0670 c	0.111 c	0.281 c
CF 2000 ppm	0.0698 c	0.199 c	0.217 c
AC 500 ppm	0.0034 c	0.106 c	0.235 c
AC 1000 ppm	0.0545 c	0.224 c	0.392 c
AC 1500 ppm	0.0168 c	0.227 c	0.447 c
AC 2000 ppm	0.0395 c	0.170 c	0.048 d
MC 500 ppm	0.0465 c	0.128 c	0.140 c
MC 1000 ppm	0.1320 b	0.271 c	0.283 c
MC 1500 ppm	0.1649 b	3.989 b	0.218 c
MC 2000 ppm	0.2030 b	4.506 b	2.132 b
Acibenzolar-S-methyl	0.9345 a	8.324 a	5.164 a
Testemunha	0.0320 c	0.130 c	0.132 c
Fungicida	0.0649 c	0.149 c	3.164 b
C.V. (%)	18,07	21,32	14,44

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. CF- Extrato vegetal de *Caesalpinia ferrea*; AC- Extrato vegetal de *Anadenanthera colubrina*; MC Extrato vegetal de *Momordica charantia*; ASM: Acibenzolar-S-methyl; Fungicida (Tiabendazol); Testemunha (Água destilada).

Ao contrário dos resultados aqui relatados, Souza et al. (2015) demonstraram que a utilização do extrato vegetal MC induziu resistência em frutos de abacaxizeiro infectados pelo fungo *Chalara paradoxa*, detectando entre outras enzimas o aumento da polifenoloxidase. Esta enzima oxida difenóis, transformando-os em quinonas na presença do oxigênio molecular, reduzindo a ação de microrganismos invasores e induzindo resistência no hospedeiro, uma vez que as quinonas são altamente tóxicas (NELSON; COX, 2006; ALVARENGA et al. 2011). Borges et al. (2013) obtiveram aumento da atividade de peroxidase utilizando extrato vegetal de *Mimosa tenuiflora* em frutos de melancia (*Citrullus lanatus*) no controle da mancha-de-alternaria (*Alternaria cucumerina*) associando a potencial ação indutora de resistência à formação da lignina.

A ação da peroxidase sobre o patógeno está ligada à oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio, originando lignina, conseqüentemente dificultando o estabelecimento de fitopatógeno (STANGARLIN et al. 2011). Já Itako et al. (2009) avaliaram o efeito protetor dos extratos vegetais de *Achillea millefolium*, *Artemisia camphorata*, *Cymbopogon citratus* e *Rosmarinus officinalis* contra *Cladosporium fulvum* agente da cladosporiose em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*), concluindo que para qualquer dos extratos a atividade de peroxidase não teve incrementos significativos em relação à testemunha, no tempo analisado.

## CONCLUSÃO

O extrato vegetal de *M. charantia* apresentou potencial na redução da severidade da fusariose em frutos de abacaxizeiro ‘Pérola’;

O extrato vegetal de *M. charantia*, nas concentrações mais elevadas, afetou positivamente as características físico-químicas dos frutos;

Os extratos vegetais de *C. ferrea* e *A. colubrina* apresentaram menor efeito de indução de resistência em relação ao extrato vegetal de *M. charantia*.

## REFERÊNCIAS

ALVARENGA, T. C., NETO, H. F. S., OGASSAVARA, F. O., ARANTES, F. C., MARQUES, M. O.; FRIGIERI, M. C. Polifenoxidase: uma enzima intrigante. **Ciência & Tecnologia** 3:83-93. 2013.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. (1997). Official methods of analysis of AOAC International. 16 ed. Gaitheersburg: AOAC, 1997.

BALBI-PEÑA, M. I., BECHER, A., STANGARLIN, J. R., FRANZENER, G; LOPES, M. C., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina – I. Avaliação in vitro. *Fitopatologia Brasileira* 31:310-314. 2006.

BARROS, S. T.; OLIVEIRA, N. T.; MAIA, L. C. Efeito do extrato de alho (*Allium sativum*) sobre o crescimento micelial de *Curvularia* spp. e *Alternaria* spp. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, São Paulo, v.21, p.168-170, 1995.

BENFICA, A. F., OLIVEIRA, A. M. G., CARDOSO, C. E. L., JUNGHANS, D. T., REINHARDT, D. H., CUNHA, G. A. P., JESUS, G. S., OLIVEIRA, J. L., CABRAL, J. R. S., SOUZA, L. F. S., SANCHES, J. F. (2011). Sistema de Produção de Abacaxi para o Extremo Sul da Bahia. EMBRAPA-CNPMPF. Sistema de Produção, 19. ISSN 1678-8796 Versão eletrônica Set/2011.

BONALDO, S. M., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., STANGARLIN, J. R., TESSMANN, D. J., SCAPIM, C. A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira** 29:128-134. 2004.

BORGES, I. V., PEIXOTO, A. R., CAVALCANTI, L. S., LIMA, M. A. G., SILVA, M. Extratos de jurema preta no controle de mancha-de-alternaria em melancia. **Revista Caatinga** 26: 36-45. 2013.

BOWERS, J. H.; LOCKE, J. C. Effect of formulated plant extracts and oils on population density of *Phytophthora nicotianae* in soil and control of *Phytophthora* blight in the greenhouse. **Plant Dis.** 88:11-16. 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254. 1976.

BRITO, N. M. DE; NEVES, C. M. L.; VERAS, V.; NASCIMENTO, L. C. DO; SOUTO, F. M.; ARAÚJO, E.; NERY, A. R. Controle pós-colheita de Thielaviopsis paradoxa em abacaxizeiro. In: Simpósio Brasileiro de Pós-Colheita de Frutos Tropicais, 1. João Pessoa. Anais... João Pessoa: SBPCFT. 1 CD-ROM. 2005.

CARVALHO, V. L., CUNHA, R. L., CHALFUN, N. N. J., MOURA, P. H. A. (2009). Alternativas de controle pós-colheita da podridão-parda e da podridão-mole em frutos de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura** 31: 78-83.

CELOTO, M.I.B.; PAPA, M.F.S.; SACRAMENTO, L.V.S.; CELOTO, F.J. Atividade antifúngica de extratos de *Momordica charantia* L. sobre *Colletotrichum musae*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 13: 337-341. 2011.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras: Ed UFLA, 785 p. 2005.

- COLE, D.L. (1999). The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal disease of tobacco. **Crop Protection** 18: 267-273.
- DAGOSTIN, S., FORMOLO, T., GIOVANNINI, O., PERTOT, I., & SCHMITT, A. (2010). *Salvia officinalis* extract can protect grapevine against *Plasmopara viticola*. **Plant Disease**. 94:575-580.
- DANNER, M. A., SASSO, S. A. Z., MEDEIROS, J. G. S, MARCHESE, J. A., MAZARO, S. M. (2008). Indução de resistência à podridão-parda em pêssegos pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 43:793-799.
- DANTAS JR., O.R.; SILVA, S.M.; ALVES, R.E.; SILVA, E. O. Suscetibilidade a dano pelo frio em abacaxi 'Pérola' tratado com 1-metilciclopropeno. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.31, n.1, p.134-144, 2009.
- FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Online. Acesso em: 22 Mar. 2015.
- FAROOQ, M.; JABRAN, Z.A; CHEEMA, A.; WAHID, K.H.M. The role of allelopathy in agricultural pest management. **Pest Management Science** 67:493-506. 2011.
- FORBES-SMITH, M. Induced resistance for the biological control of postharvest diseases of fruit and vegetables. Food Australia, North Sidney, v.51, p.382-385, 1999.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Banco de dados agregados. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 22 nov. 2014.
- ITAKO, K.R.F.; SCHWAN-ESTRADA, J.R.; STANGARLIN, J.B.; TOLENTINO JÚNIOR, M.E.S. Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Arq. Inst. Biol.** 76:75-83. 2009.
- KAGALE, S., MARIMUTHU, T., THAYUMANAVAN, B., NANDAKUMAR, R., AND SAMIYAPPAN, R. Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 65:91-100. 2004.
- LAVILLE, E. *Fusarium* disease of pineapple in Brazil. Review of current knowledge. **Fruits** 35:101-113. 1980.
- MIGUEL, A. C. A.; SPOTO, M. H. F.; ABRAHÃO, C.; SILVA, P. P. M. Aplicação do método QFD na avaliação do perfil do consumidor de abacaxi 'Pérola'. **Ciência Agrotécnica** 31:563-569. 2007.
- MOGLE, UMESH P. Effect of medicinal plant extracts against the post harvest fungal pathogens of cowpea legumes. **Trends Life Sci**, v. 2, p. 22-27, 2013.
- MOREIRA, L. M.; MAY-DE MIO, L. L., ALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; LIMA, M. L. R. Z.; POSSAMAI, J. C. Controle em pós-colheita de *Monilia fructicola* em pêssegos. **Fitopatologia Brasileira** 27:395-398. 2002.
- NAKAZAWA, A.; NOZUE, M.; YASUDA, H.; TAKEDA, G.; KUBO, H. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. **Journal of Plant Research** 114:323-328. 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Enzimas. In: Lehninger: principios de bioquímica. 4.ed. São Paulo: Sarvier, cap.6, p. 190-235. 2006.

NIRENBERG, HELGARD I.; O'DONNELL, KERRY. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, p. 434-458, 1998.

NOWAK, A., KONSTANTINIDOU-DOLTSINIS, S., SEDDON, B., & SCHMITT, A. (2009). Möglichkeiten der Bekämpfung des Falschen Mehltaus an Gurke (*Pseudoperonospora cubensis*) mit alternativen Präparaten. 10. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Zürich. Published online at <http://orgprints.org/14653/01/-Nowak-14653.pdf>.

OLIVEIRA, M. A.; TERAPO, D.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. H. Brasília-DF. *Embrapa Informações Tecnológicas*, 885p. ISBN 85-783.351-3. CDD 631.56. 2006.

OLIVEIRA, M. D. M.; NASCIMENTO, L. C. Avaliação da atividade de indutores de resistência abiótica, fungicida químico e extratos vegetais no controle da podridão-negra em abacaxi 'Pérola'. *Revista Brasileira de Fruticultura* 31:84- 89. 2009.

OOSTENDORP, M.; KUNZ, W.; DIETRICH, B.; STAUB, T. Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology* 107:19-28. 2001.

PARA- PROGRAMA DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS. Relatório de Atividades . Gerência Geral de Toxicologia. ANVISA. 2014.

PARSONS, EUGENE P. Fruit cuticle lipid composition and fruit post harvest water loss in an advanced backcross generation of pepper (*Capsicum* sp.). *Physiologia plantarum*, v. 146, n. 1, p. 15-25, 2012.

PILA, NIRUPAMA; GOL, NEETA B.; RAO, TV RAMANA. Effect of post harvest treatments on physicochemical characteristics and shelf life of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits during storage. *American-Eurasian J Agric Environ Sci*, v. 9, n. 5, p. 470-479, 2010.

PINHEIRO, A. M., FERNANDES, A. G., FAI, A. E. C., PRADO, G. D., SOUSA, P. D., & MAIA, G. A. Avaliação química, físico-química e microbiológica de sucos de frutas integrais: abacaxi, caju e maracujá. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26(1). 2006.

PLOETZ, R. C. (ed.) *Diseases of Tropical Fruit Crops*. CABI Publishing, Wallingford, UK. 43,45). 2003.

PLOETZ, R. C. *Fusarium*-induced diseases of tropical, perennial crops. *Phytopathology* 96:648-652. 2006.

RESENDE, M.L.V.; NOJOSA, G.B.A.; CAVALCANTI, L.S.; AGUILAR, M.A.G.; SILVA, J.O.; PEREZ, L.H.C.P.; ANDRADE, G.C.G.; CARVALHO, G.A.; CASTRO, R.M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar- S-methyl (ASM). *Plant Pathology* 51: 621- 628. 2002.

RIBEIRO, W. S., DE LUCENA, H. H., ALMEIDA, E. I. B., & BARBOSA, J. A. Utilização de Extratos Naturais no Controle do Fungo Peduncular em Abacaxi Pérola Oriundos de Sapé-PB. *Revista Agropecuária Técnica* 31:11-16. 2010.

ROHRBACH, K.G. Pineapple diseases and pests and their potential for spread. In: Singh, K.G. (ed.) *Exotic Plant Quarantine Pests and Procedures for Introduction of Plant Materials*. ASEAN Plant Quarantine Centre and Training Institute, Serdang, Selangor, Malaysia, pp. 145–171. 1983.

SALES, M. D. C., COSTA, H. B., FERNANDES, P. M. B., VENTURA, J. A., MEIRA, D. D. Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in pineapple. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**,6(1), 26-31. 2016.

SCHAFFRATH, U.; THIERON, M.; SCHEINPFLUG, H.; REISENER, H.J. Biochemical and cytological aspects of genetical and acquired resistance in the rice blast interaction. Cahiers Options Méditerranéennes, Paris, v.15, p.125-130, 1996.

SING, G., SINGH, O. P., MAURYA, S. Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian *Curcuma* species. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials 45: 75-81. 2002.

SING, G., SINGH, O. P., MAURYA, S. Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian *Curcuma* species. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials 45: 75-81. 2002.

SINGH, R., RAI, B. Antifungal potential of some higher plants against *Fusarium udum* causing wilt disease of *Cajanus cajan*. **Microbios** 102:165-173. 2000.

SINGH, R., RAI, B. Antifungal potential of some higher plants against *Fusarium udum* causing wilt disease of *Cajanus cajan*. **Microbios** 102:165-173. 2000.

SOUZA, W. C. O. ; NASCIMENTO, L. C.; VIEIRA, D. L. ; SANTOS, T. S.; ASSIS FILHO, F. M. Alternative control of *Chalara paradoxa*, causal agent of black rot of pineapple by plant extract of *Mormodica charantia*. **European Journal of Plant Pathology**. 141. 2015.

SOUZA, W. C. O., DO NASCIMENTO, L. C., VIEIRA, D. L., DOS SANTOS, T. S., & DE ASSIS FILHO, F. M. Alternative control of *Chalara paradoxa*, causal agent of black rot of pineapple by plant extract of *Mormodica charantia*. **European Journal of Plant Pathology**, 142(3), 481-488. 2015.

SOUZA, W. C. O.; VIDAL, J. M.; SANTOS, T. S; SOUZA, W. J. S.; MARINHO, C. O.; NASCIMENTO, L.C. Controle da Antracnose e Qualidade Pós-Colheita de Mamão com a Utilização de Extrato Vegetal, Indutor de Resistência e Fungicida. Bento Gonçalves-RS. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura. 2012.

STADNIK, M. J., BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 57: 25-34. 2000.

STANGARLIN, J. R., KUHN, O. J., TOLEDO, M. V., PORTZ, R. L., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatogenos. **Scientia Agraria Paranaensis** 10:18-46. 2011.

SUKORINI, HENIK . Plant crude extracts and yeast as alternative to synthetic fungicide for controlling postharvest green mould on citrus fruit. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, v. 61, n. 3, p. 795-801, 2013.

VENTURA, J. A. & ZAMBOLIM, L. Controle das doenças do abacaxizeiro. In: Zambolim, L.; Vale, F. X. R. do; monteiro, A. J. A.; Costa, H. **Controle de doenças de plantas: fruteiras**. Viçosa: UFV, p. 445-510. 2002.

WANG, W. Q., BEN-DANIEL, B. H., COHEN, Y. (2004). Control of plant diseases by extracts of *Inula viscosa*. **Phytopathology** 94:1042-1047.

WARDY, W.; SAALIA, F. K.; ASIEDU, M. S.; BUDU, A. S.; DEDEH, S. S. A comparison of some physical, chemical and sensory attributes of three pineapple (*Ananas comosus*) varieties grown in Ghana. *African Journal of Food Science* 3:22-25. 2009.

WIDMER, T. L., & LAURENT, N. Plant extracts containing caffeic acid and rosmarinic acid inhibit zoospore germination of *Phytophthora* spp. pathogenic to *Theobroma cacao*. *Eur. J. Plant Pathol.* 115:377-388. 2006.

WILSON, C. L., SOLAR, J. M., EL GHAOUTH, A., & WISNIEWSKI, M. E. Rapid evaluation of plant extracts and essential oil for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 81:204-210. 1997.

YAMAGUCHI, I. Activators for systemic acquired resistance. In: Hutson, D., Myamamoto, J. *Fungicidal Activity*, p. 193-219. 1998.