

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO**

**AGRESSIVIDADE DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* EM  
PLÂNTULAS E SUA ESPORULAÇÃO EM DIFERENTES  
SUBSTRATOS**

**RAONI ANDRADE PIRES**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
JANEIRO - 2020**

**AGRESSIVIDADE DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* EM  
PLÂNTULAS E SUA ESPORULAÇÃO EM DIFERENTES  
SUBSTRATOS**

Raoni Andrade Pires  
Engenheiro Agrônomo  
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2017

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Francisco Ferraz Laranjeira  
Coorientador: Onildo Nunes de Jesus

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
JANEIRO - 2020**

## FICHA CATALOGRÁFICA

P667a	<p>Pires, Raoni Andrade. Agressividade de <i>Fusarium oxysporum</i> F. sp. Passiflorae em plântulas e sua esporulação em diferentes substratos / Raoni Andrade Pires. _ Cruz das Almas, Bahia, 2020. 76f.; il.</p> <p>Orientador: Francisco Ferraz Laranjeira. Coorientador: Onildo Nunes de Jesus.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Microbiologia Agrícola.</p> <p>1.Maracujá – Murcha do fusário. 2.Maracujá – Fitossanidade – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD: 634.425</p>
-------	--

Ficha elaborada pela Biblioteca Central de Cruz das Almas - UFRB.  
Responsável pela Elaboração - Antonio Marcos Sarmento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615).  
(os dados para catalogação foram enviados pelo usuário via formulário eletrônico).

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
RAONI ANDRADE PIRES**

---

Dr. Francisco Ferraz Laranjeira  
Embrapa Mandioca e Fruticultura

---

Dr. Harllen Sandro Alves Silva  
Embrapa Mandioca e Fruticultura

---

Dra. Leilane Silveira D'Ávila  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

“Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_conferindo o grau de Mestre em Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_.”

## Índice

<b>Resumo .....</b>	<b>5</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>7</b>
<b>Introdução Geral.....</b>	<b>9</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>11</b>
<b>Revisão de literatura .....</b>	<b>11</b>
A passicultura .....	12
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> agente causal da fusariose do maracujazeiro .....	12
Identificação de genótipos de <i>Passiflora</i> spp. resistentes à fusariose .....	16
Referências.....	18
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>24</b>
<b>Seleção de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> por agressividade para screening de germoplasma de <i>Passiflora</i> spp. ....</b>	<b>24</b>
Resumo .....	25
Abstract.....	26
Introdução.....	26
Material e Métodos .....	28
Resultados.....	32
Discussão .....	37
Referências.....	41
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>46</b>
<b>Esporulação de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> em diferentes proporções de substratos e pH para seleção de genótipos resistentes... ..</b>	<b>46</b>
Resumo .....	47
Abstract.....	48
Introdução.....	48
Materiais e Métodos.....	50
Resultados.....	55
Discussão .....	59
Agradecimentos.....	62
Referências.....	62
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>66</b>
<b>Anexo: Normas de Submissão do European Journal of Plant Pathology. ..</b>	<b>67</b>

## Resumo

Pires, R. A. **Agressividade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* em plântulas e sua esporulação em diferentes substratos**. Cruz das Almas, 2020. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

A variabilidade genética entre isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Fop), e o substrato utilizado para o crescimento podem influenciar no padrão de agressividade e assim devem ser considerados *a priori* quando se tem como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia eficiente para inoculação artificial de Fop. Assim, essa pesquisa foi conduzida com o objetivo de agregar estudos básicos de Fop visando sua incorporação futura em métodos de inoculação artificial de Fop por meio da seleção de isolados mais agressivos, e um substrato capaz de proporcionar a esporulação mais eficiente de Fop ao longo do tempo. Sabe-se que ciclo de déficit hídrico aumenta a incidência de Fop nas condições controladas e essa informação também será incorporada no estudo de agressividade. Assim, foram realizados dois experimentos sendo o primeiro para avaliar a agressividade de nove isolados de Fop, quanto a mortalidade provocada em *Passiflora edulis* utilizando o método de inoculação areia fubá de milho, com associação do déficit hídrico controlado e avaliados por meio da análise de sobrevivência. No segundo experimento, Fop foi cultivado em diferentes substratos compostos por misturas de solo e esterco bovino, ou solo e fibra de coco nas proporções 5:0, 5:2, 5:4 e 5:6 (v: v). Cada mistura teve seu pH ajustado para diferentes faixas variando de 4,2 a 8,0 (solo: esterco); e 4,2 a 9,7 (solo: fibra de coco). Foi contabilizada o número de unidades formadoras de colônias (UFC), produção de microconídios, macroconídios e clamidósporos aos 3, 7, 14, 21 e 28 dias após a infestação (DAI) dos substratos. Os resultados apontaram o isolado CMF3115 como o mais agressivo, com 90% de mortalidade de plantas até 70 DAI e com baixo número de plantas vivas não infectadas (3%). Já no segundo experimento, os substratos compostos por solo e esterco de modo geral favoreceram uma maior esporulação do patógeno em relação aos

substratos com solo e fibra de coco. Os tratamentos com maiores proporções de matéria orgânica proporcionaram maior UFC de Fop, com pH ideal na faixa de 6,0 a 7,0. A produção de microconídios foi favorecida pelo pH alcalino, e a formação de clamidósporos pelos pHs extremos. A metodologia de inoculação artificial pode ser testada utilizando o isolado CMF3115 e substrato de solo e esterco na proporção 5:4 em pH alcalino.

**Palavras-chave:** *Passiflora edulis* Sims, fusariose, severidade, protocolo de inoculação, pH, esporos.

## Abstract

Pires, R. A. **Aggressiveness of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* in seedlings and their sporulation on different substrates.** Cruz das Almas, 2020. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

The genetic variability among *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Fop), and the substrate used for growth can influence the pattern of aggressiveness and thus should be considered a priori when aiming at the development of an efficient methodology for artificial inoculation of Fop. Thus, this research was conducted with the objective of aggregating basic studies of Fop aiming at its future incorporation in artificial inoculation methods of Fop through the selection of more aggressive isolates, and a substrate capable of providing the most efficient sporulation of Fop throughout the time. It is known that the water deficit cycle increases the incidence of Fop in controlled conditions and this information will also be incorporated into the study of aggressiveness. Thus, two experiments were carried out, the first being to assess the aggressiveness of nine isolates of Fop, regarding mortality caused in *Passiflora edulis* using the cornmeal sand inoculation method, with association of controlled water deficit and evaluated through survival analysis. In the second experiment, the Fop was grown on different substrates composed of mixtures of soil and bovine manure, or soil and coconut fiber in the proportions 5: 0, 5: 2, 5: 4 and 5: 6 (v: v). Each mixture had its pH adjusted to different ranges varying from 4.2 to 8.0 (soil: manure); and 4.2 to 9.7 (soil: coconut fiber). The number of colonies forming units (CFU), production of microconidia, macroconidia and chlamydospores was counted at 3, 7, 14, 21 and 28 days after infestation (DAI) of the substrates. The results showed the CMF3115 isolate as the most aggressive with 90% plant mortality up to 70 DAI and with a low number of live plants without Fop (3%). In the second experiment, the substrates composed of soil and manure in general favoured the greater sporulation of the pathogen in relation to substrates with soil and coconut fiber. The treatments with higher proportions of organic matter provided greater CFU of Fop, with ideal pH in the range between 6.0 and 7.0. Microconidium



production was favoured by alkaline pH, and the formation of chlamydo spores by extreme pH values. The artificial inoculation methodology can be tested using the CMF3115 isolate and soil and manure substrate in the proportion 5: 4 in alkaline pH.

**Keywords:** *Passiflora edulis* Sims, Fusarium wilt, severity, inoculation protocol, pH, spores.

## Introdução Geral

O maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims) é explorado comercialmente principalmente para a produção de frutos, além disso, outras partes da planta podem ser utilizadas na fabricação de cosméticos e medicamentos. O Brasil lidera o ranking mundial de produção de maracujá amarelo, com produção de 593,429 t em 41,584 ha no ano de 2019 (IBGE, 2020), correspondendo de 50 a 60% da produção mundial (Wijeratnam, 2016).

A produção nacional da fruta se concentra principalmente na região Nordeste, com destaque para os estados da Bahia e do Ceará com 28 e 24% da produção nacional, respectivamente (IBGE, 2020). Nos últimos anos a produção de maracujá amarelo vem decrescendo de forma preocupante e dentre os fatores limitantes, destacam-se o ataque de pragas e doenças.

Uma das principais doenças do maracujazeiro é a fusariose, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Fop) tendo como sintoma característico a murcha da parte aérea, ocasionada pela obstrução dos vasos do xilema devido a multiplicação de hifas e produção de toxinas pelo patógeno, além da formação de gel e multiplicação de células parenquimáticas pelo hospedeiro, culminando na murcha e morte da planta (Lima et al., 2019). Em áreas infestadas com Fop a vida útil do pomar é reduzida em até dois anos (Lima et al., 2019). O surgimento dos sintomas ocorre a partir dos 150 dias após o plantio o que confere redução expressiva na produção da cultura (Pereira et al., 2019).

No que se refere ao controle da doença, o uso de agroquímicos e antagonistas não tem apresentado resultados satisfatórios (Fischer et al., 2010). Uma alternativa para o convívio com a fusariose é a utilização de cultivares resistentes (Lima et al., 2019). Além disso, a enxertia de *P. edulis* em espécies silvestres do gênero *Passiflora*, tem prolongado a sobrevivência das plantas em áreas infestadas com Fop (Santos et al., 2016; Lima et al., 2018).

O número de espécies de *Passiflora* spp. identificadas como resistentes a Fop é baixo, e não existem cultivares de *P. edulis* registradas como resistente à fusariose. A seleção de genótipos resistentes tem sido feita em condições de campo, no entanto, é uma prática onerosa, demorada e pode no processo se *screening* resultar em falsos negativos devido a irregularidade na distribuição do

patógeno na área (Pereira et al., 2019). Esses fatores são entraves para o programa de melhoramento genético do maracujazeiro, pois inviabilizam a avaliação e seleção de híbridos promissores para o desenvolvimento e cultivares com resistência ao Fop.

Os protocolos para a inoculação artificial de Fop ainda não foram estabelecidos, e os resultados observados por meio dessa prática, diferem dos obtidos em condições de campo apresentando falhas no surgimento dos sintomas, número de plantas sintomáticas e repetibilidade do método (Flores et al., 2012; Silva et al., 2013a; Preisigke et al., 2017; Melo et al., 2019). As causas para a divergência entre os resultados estão provavelmente associadas a diferença entre a agressividade de isolados de Fop, devido a variabilidade genética destas populações e os substratos empregados nas inoculações (Silva et al., 2013; Melo et al., 2019). Visto os problemas relacionados com a inoculação artificial de Fop no maracujazeiro, este trabalho teve como objetivo, diferenciar o padrão de agressividade de isolados de Fop, e selecionar um substrato eficaz para o desenvolvimento deste fitopatógeno que possa ser utilizado para seleção precoce de genótipos resistentes aos Fop.

---

# **CAPÍTULO 1**

## **Revisão de literatura**

---

## **A passicultura**

A produção mundial de maracujá é estimada em 1,5 milhões de toneladas, e os principais países produtores da fruta são Brasil, Colômbia e Indonésia (FAO, 2020). O Brasil lidera a produção mundial desta fruta, e sua produção é destinada ao mercado interno. Ferraz e Lot (2006) afirmam que a maior parte do maracujá consumido no território nacional acontece pela comercialização na modalidade fruta fresca.

Os pomares brasileiros são constituídos em sua maioria (95%) pelo maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims), devido às características de vigor, produtividade, rendimento e qualidade de seus frutos (Meletti e Bruckner, 2001). A passicultura também exerce importância social, pois incrementa na renda familiar do agricultor, possibilitando a fixação da mão de obra no campo, além de gerar em média três empregos diretos e cerca de oito indiretos (Meletti, 2011).

A produção nacional de maracujá se concentra no semiárido, e o estado da Bahia é responsável pela maior parcela desta produção (168 mil toneladas); uma das principais regiões produtoras da fruta está localizada entre as cidades de Livramento de Nossa Senhora e Dom Basílio, juntos esses municípios são responsáveis por 25% da produção baiana de maracujá (IBGE, 2019).

A alta susceptibilidade do maracujazeiro a doenças tem limitado a produtividade nacional (Meletti, 2011). Doenças causadas por vírus e por fungos do gênero *Fusarium* tem causado grandes prejuízos à atividade agrícola, inviabilizando a produção, por provocar a morte precoce das plantas (Fischer e Rezende, 2008). A dificuldade de se controlar as doenças do maracujazeiro favorecido a desistência em cultivar o maracujá ou migração das áreas de produção para novas regiões.

### ***Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* agente causal da fusariose do maracujazeiro**

A fusariose, tendo como agente causal o fungo *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, se destaca entre as principais doenças que acomete o maracujazeiro, sendo uma doença causada por um patógeno de solo cujo

controle é complexo. Conforme Fischer e Rezende (2008), Fop apresenta esporóquio e escleródios, além de, micro e macroconídios formados em fiálides, sendo que, o microconídio é oval uni ou bicelular, e o macroconídio apresenta tamanho variado, e possui dentre quatro a oito células, de forma côncava. Os clamidósporos podem ser encontrados intercalando hifas, e são células de resistência e apresentam modificações em sua parede celular, que ao se espessar garante maior resistência à desidratação (Leslie e Summerell, 2006).

O primeiro relato de fusariose em plantas de maracujá ocorreu na Austrália e foi descrito por Mcknight (1951), afetando o maracujazeiro roxo (*P. edulis* f. *edulis*), com incidência sobre diversas regiões produtoras daquele país. Desde então, relatos dessa doença têm sido descrito em diferentes continentes.

Na América do Sul, o primeiro relato de ocorrência da fusariose do maracujazeiro foi no Brasil por Carvalho e Carvalho (1968). Posteriormente, Esquivel e Labrador (1977) identificaram a doença no Panamá e na Venezuela. Na década de 90, Grech e Rijkenberg (1991) relataram a ocorrência desta fusariose na África do Sul. O autor Rooney-Latham (2011), também descreveu a presença de Fop em pomares de maracujazeiro no estado da Califórnia (E.U.A). Recentemente, Garcia et al. (2019) descreveram a ocorrência da fusariose no maracujazeiro em Portugal.

No Brasil, um levantamento realizado em 49 propriedades produtoras de maracujá nos municípios de Livramento de Nossa Senhora (BA) e Dom Basílio (BA), principais centros produtores da cultura, identificou que o índice médio de prevalência da fusariose do maracujazeiro é de 90% (Guimarães, 2015).

A reprodução de *F. oxysporum*, independentemente da *formae specialis*, ocorre exclusivamente por meio da produção de linhagens clonais, e embora não exista recombinação genética durante este processo, populações desta espécie apresentam variabilidade genética. A fusão entre células de diferentes indivíduos de *F. oxysporum*, permite que ocorra crossing over mitótico, processo importante para recombinação genética e evolução da espécie (Teunissen et al., 2002; Ma et al., 2010).

Estudos mostram que diferentes indivíduos de *F. oxysporum* podem ou não ser patogênicos (Waweru et al., 2014). O grau de patogenicidade entre isolados pode variar, entre infecções incapazes de provocar danos não aparente ao hospedeiro, ou infecções que culminam rapidamente na morte do hospedeiro (Miedaner et al., 2001).

Quando patogênico, Fop pode penetrar as raízes por aberturas naturais, que são decorrentes do atrito entre as partículas do solo e do crescimento radicular, ou por fissuras na epiderme da raiz, provocadas pela emissão de raízes secundárias (Amorim et al., 2011). Este patógeno também pode penetrar diretamente as raízes de seus hospedeiros, através da formação de apressórios e enzimas, que são capazes de degradar a parede celular do hospedeiro (Gordon, 2017).

Nas raízes, as hifas de Fop colonizam o hospedeiro em direção aos tecidos vasculares, liberando suas toxinas nos vasos xilemáticos (Agrios, 2005, Fischer e Rezende, 2008). De modo geral, durante a colonização do xilema por fungos, não há interrupção da cascata sinalizadora entre a raiz e os estômatos, que permanecem abertos, e como consequência ocorre a desidratação dos tecidos que compõem a parte aérea da planta, uma vez que, a colonização do fungo interrompe o transporte de água nos vasos do xilema (Agrios, 2005; Amorin et al., 2011).

O Fop é responsável por perdas superiores a 80% da produção de maracujá (Fischer e Rezende, 2008; Freitas et al., 2016). Na ausência de Fop, o maracujazeiro amarelo pode apresentar uma vida útil de três anos, mas a presença deste fungo, reduz a sobrevivência da planta para aproximadamente um ano (Lima et al., 2019).

Fischer e Rezende (2008), verificaram que a intensidade da fusariose do maracujazeiro é maior em ambientes que apresentam temperatura e umidade relativa elevada. A utilização de adubos orgânicos também pode favorecer o desenvolvimento da fusariose, pois pode fornecer abrigo e nutrição para fitopatógenos, que sobrevivem saprofiticamente sobre a matéria orgânica (Reis e Casa, 2004). O comportamento saprofítico ou patogênico de microrganismos habitantes de solo pode variar de acordo com o tipo de material orgânico

incorporado ao solo, o nível de decomposição do mesmo, assim como, a relação C:N (Hoitink e Fahy, 1986).

Além disso, o estresse hídrico pode contribuir para a manifestação dos sintomas provocados por Fop. Segundo Lima et al. (2019), o estresse provocado pela seca pode favorecer o surgimento de microfissuras nas raízes além de outras consequências fisiológicas e metabólicas. As microfissuras facilitam a penetração de isolados pouco eficientes na produção de enzimas de degradação da epiderme das raízes (Michielse e Rep, 2009).

Outro fator capaz de interferir no desenvolvimento da doença é o pH do solo, que pode afetar a sobrevivência, germinação e reprodução de patógenos edáficos (Maffia e Mizubuti, 2005). O pH atua diretamente no metabolismo, e permeabilidade das membranas dos microrganismos (Stamford et al., 2005). Pinheiro et al. (2016), identificaram que altos valores de pH do solo estão relacionados com a elevada incidência da fusariose no maracujazeiro no estado da Bahia. Experimentos laboratoriais comprovaram que níveis alcalinos de pH favorecem a microdisseminação de Fop (Lima, 2016). A variação no pH influencia o crescimento de Fop, quando alcalino, seu crescimento é favorecido, enquanto outras *formae speciales* apresentam comportamento variado (Cruz et al., 2019; Orr e Nelson, 2018; Pinheiro et al., 2016).

O controle da fusariose do maracujazeiro é complexo. A aplicação de agroquímicos aumenta o custo de produção e apresenta baixa eficiência, devido a capacidade de Fop de recolonizar rapidamente o ambiente (Fischer et al., 2010). A eficiência no uso de agentes de controle biológico, depende do estabelecimento do antagonista no solo. Em condições experimentais o uso de *Trichoderma* spp. para o controle de Fop apresentou resultados insatisfatórios (Fischer et al., 2010).

Medidas eficazes contra a fusariose do maracujazeiro, se baseiam na erradicação de plantas sintomáticas da área de plantio. Bem como, o uso de substrato desinfestado para a produção de mudas e a utilização de mudas sadias para o plantio. Também pode ser utilizado, o vazio sanitário ou o isolamento de áreas que apresentaram incidência da doença, assim como, a desinfestação de ferramentas e implementos agrícolas (Guimarães, 2015).



Segundo São José e Pires (2011), a resistência genética tem sido utilizada como ferramenta eficaz para o controle de doenças de solo, e se apresenta como alternativa prática e econômica, principalmente quando associada ao manejo adequado da cultura.

A utilização de enxertia em algumas espécies silvestres de *Passiflora* spp. apresenta resultado satisfatório no que se refere ao aumento da sobrevivência de plantas de *P. edulis* em áreas infestadas com Fop. Entretanto, a prática da enxertia em maracujazeiro-amarelo reduz o vigor vegetativo e produtivo em relação as plantas não enxertadas (Lima et al., 2019, Santos et al., 2013).

### **Identificação de genótipos de *Passiflora* spp. resistentes à fusariose**

O melhoramento genético é uma ferramenta importante para minimizar prejuízos provocados por patógenos de solo em maracujazeiro (Amorim et al., 2011), pois visa identificar genótipos capazes de retardar o desenvolvimento das doenças, através da seleção de genótipos com genes de resistência.

A avaliação e seleção de genótipos resistentes ao Fop é realizado em condições de campo (Araújo et al., 2012; Junqueira et al., 2005; Santos et al., 2016). Contudo, a seleção é onerosa, devido à quantidade de recursos necessários para a manutenção da cultura, e o tempo necessário para o surgimento dos sintomas, que ocorre entre 6 a 11 meses após o plantio, e é intensificado quando ocorre períodos de estiagem seguidos de fortes chuvas (Cavichioli et al., 2011; Silva et al., 2013; Silva et al., 2017).

Em condições naturais a microbiota local pode reduzir a concentração de inóculo de Fop, no campo a quantidade de inóculo desse patógeno é geralmente inferior à concentração utilizada nas inoculações artificiais (Ortiz et al., 2016). Segundo Jimenez Díaz et al. (2015), a baixa concentração de inóculo reduz a incidência da fusariose em grão de bico. Além disso, a distribuição do patógeno pode ser variada podendo ocorrer manchas de solo com ausência do patógeno, dificultado a seleção de materiais resistentes.

Os trabalhos envolvendo a inoculação artificial de Fop em *Passiflora* spp., como alternativa à seleção de genótipos em campo, tem envolvido, principalmente, duas metodologias: a imersão de raízes, com ou sem ferimento,

em suspensão de conídios; e o plantio de mudas de maracujazeiro em substrato infestado (Melo et al., 2019; Ortiz et al., 2016; Rooney-Latham et al., 2011; Silva et al., 2013).

Esses métodos de inoculação têm identificado materiais resistentes a fusariose, como acessos de *P. edulis* (Gardner, 1989; Preisigke et al., 2017; Silva et al., 2013). Entretanto, em condições de campo essa espécie apresenta susceptibilidade a Fop (Roncatto et al., 2004). Acredita-se que a incompatibilidade temporal para a manifestação dos sintomas, na severidade da doença, esteja associada a fatores como, a variabilidade genética das plantas, aos diferentes isolados utilizados e as condições ambientais (Melo, 2019).

A utilização do ciclo de estresse hídrico, favorece o surgimento de sintomas de murcha em plantas de *P. edulis* inoculadas com Fop (Lima et al., 2019). Entretanto, outros estudos com intuito de aprimorar os métodos de inoculação artificial de Fop em maracujazeiro são necessários, pois o protocolo de inoculação não é amplamente aceito e utilizado pelos programas de melhoramento genético.

A identificação de isolados agressivos favorece o melhoramento genético do maracujazeiro, reduzindo o tempo necessário para obtenção de resultados após a inoculação artificial, e expondo as plantas a um maior número de efetores (Marostega et al., 2019; Vleeshouwers e Oliver, 2014). A seleção de um substrato adequado para inoculação de Fop em maracujazeiro também pode interferir na fusariose, pois os nutrientes presentes no meio podem favorecer a resistência do hospedeiro, ou auxiliar a germinação, o desenvolvimento micelial e a infecção do patógeno (Yamada, 2002).

## REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. Diseases caused by fungal-like organisms. In: AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5 eds. São Paulo: Elsevier Academic Press, 2005. p. 404-414.
- AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. cap 7, p. 133-148.
- ARAUJO, C. A. T.; FALEIRO, F. G.; SEMPREBOM, M. S.; KRAUSE, W. Sobrevivência de plantas enxertadas de maracujazeiro em área com histórico de doenças causadas por *Fusarium* spp. no Mato Grosso. In: Congresso Brasileiro De Fruticultura, 22., 2012, Bento Gonçalves. **Anais do Congresso Brasileiro de Fruticultura**. Bento Gonçalves: SBF, 2012., 2012.
- BEDENDO, I. P. Murchas vasculares. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4.ed, v.1. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p. 451-458, 2011.
- CARVALHO, A. M. B.; CARVALHO, A. M. Nota preliminar sobre a ocorrência de *Fusarium* sp. em plantas de maracujá, no Estado de São Paulo. **Ciência e Cultura, São Paulo**, v. 20, n. 2, p. 265-266, 1968.
- CAVICHIOLO, J. C.; CORRÊA, L. D. S.; GARCIA, M. J. D. M.; FISCHER, I. H. Desenvolvimento, produtividade e sobrevivência de maracujazeiro-amarelo enxertado e cultivado em área com histórico de morte prematura de plantas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, p. 567-574, 2011.
- CONAB. Companhia Nacional De Abastecimento. Prohort - Programa Brasileiro de Modernização do Mercado de Hortigranjeiro. 2018. Disponível em: <http://www.ceasa.gov.br/precos.php?TIP=30&P01=2&P02=1&P03=30> . Acesso em fev.
- CRUZ, D. R.; LEANDRO, L. F. S.; MUNKVOLD, G. P. Effects of Temperature and pH on *Fusarium oxysporum* and Soybean Seedling Disease. **Plant disease**, v. 103, n. 12, p. 3234, 2019.
- ESQUIVEL, E.A.; LABRADOR, E. **Cultivo del maracuya**. Chiriqui, Panama, 1977. 44p.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food outlook: biannual report on global food markets. 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/3/CA0239EN/ca0239en.pdf>. Acesso em fev. 2020.

FERRAZ, J.V.; LOT, L. Fruta para consumo *in natura* tem boa perspectiva de renda. In: Agriannual 2007: anuário da agricultura brasileira. **Maracujá**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2006. p. 387-388.

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

FISCHER, I. H.; ALMEIDA, A. D.; FILETI, M. D. S.; BERTANI, R. D. A.; ARRUDA, M. D.; BUENO, C. J. Avaliação de passifloráceas, fungicidas e *Trichoderma* para o manejo da podridão-do-colo do maracujazeiro, causada por *Nectria haematococca*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 709-717, 2010.

FREITAS, J. C. O.; VIANA, A. P.; SANTOS, E. A.; PAIVA, C. L.; SILVA, F. H. D. L.; DO AMARAL, A. T.; SOUZA, M. M.; DIAS, V. M. Resistance to *Fusarium solani* and characterization of hybrids from the cross between *P. mucronata* and *P. edulis*. **Euphytica**, v. 208, n. 3, p. 493-507, 2016.

GARCIA, E.; PAIVA, D.; COSTA, J.; PORTUGAL, A.; ARES YEBRA, A. First Report of Fusarium Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* on Passion Fruit in Portugal. **Plant Disease**, n. ja, 2019.

GARDNER, D. E. Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* to banana poka and other *Passiflora* spp. in Hawaii. **Plant Disease**, v. 73, n. 6, p. 476-478, 1989.

GORDON, T. R. *Fusarium oxysporum* and the Fusarium wilt syndrome. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, p. 23-39, 2017.

GRECH, N. M.; RIJKENBERG, F. H. J. Laboratory and field evaluation of the performance of *Passiflora caerulea* as a rootstock tolerant to certain fungal root pathogens. **Journal of Horticultural science**, v. 66, n. 6, p. 725-729, 1991.

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

HOITINK, H .A. J.; Fahy, P. C. Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p. 93-114, 1986.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – **IBGE**. Culturas temporárias e permanentes. Produção Agrícola Municipal, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – **IBGE**. Culturas temporárias e permanentes. Produção Agrícola Municipal, 2019.

JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M.; CASTILLO, P.; DEL MAR JIMÉNEZ-GASCO, M.; LANDA, B. B.; NAVAS-CORTÉS, J. A. Fusarium wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. **Crop Protection**, v. 73, p. 16-27, 2015.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BERNACCI, L. C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: Faleiro, F. G.; Junqueira, N. T. V.; Braga, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B.A. **The Fusarium laboratory manual**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. 2006. p. 388

LIMA, G. S. **Modelagem da microdisseminação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* em ambientes heterogêneos simulados**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). 71 f. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, Cruz das Almas, 2016.

LIMA, L. K. S.; DE JESUS, O. N.; SOARES, T. L.; DE OLIVEIRA, S. A. S.; HADDAD, F.; GIRARDI, E. A. Water deficit increases the susceptibility of yellow passion fruit seedlings to Fusarium wilt in controlled conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 243, p. 609-621, 2019.

MA, L. J.; VAN DER DOES, H. C.; BORKOVICH, K. A.; COLEMAN, J. J.; DABOUSSI, M. J.; DI PIETRO, A.; DUFRESNE, H.; FREITAG, H.; GRABHERR, H.; HENRISSAT, B.; HOUTERMAN, P. M.; KANG, S.; SHIM, W. B.; WOLOSHUK, C.; XIE, X.; XU, J. R.; ANTONIW, J.; BAKER, S. E.; BLUHM, B. H.; LANÇA, A.; MARROM, D. W.; BUTCHKO, R. A.; CHAPMAN, S.; COULSON, R.; COUTINHO, P. M.; DANCHIN, E. G.; DIENER, U. M.; GALE, L. R.; GARDINER, D. M.; GOFF, S.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; HILBURN, K.; HUA-VAN, A.; JONKERS, W.; KAZAN, K.; KODIRA, C. D.; KOEHRSEN, H.; KUMAR, L.; LEE, Y. H.; LI, L.; MANNERS, J. M.; MIRANDA-SAAVEDRA, D.; MUKHERJEE, M.; PARQUE, G.; PARQUE, J.; PARQUE, S. Y.; PROCTOR, R. H.; REGEV, U. M.; RUIZ-ROLDAN, M. C.; SAIN, D.; SAKTHIKUMAR, S.; SYKES, S.; SCHWARTZ, D. C.; TURGEON, B. G.; WAPINSKI, I.; YODER, Ó.; NOVA, S.; ZENG, Q.; ZHOU, S.; GALAGAN, J.; CUOMO, C. A.; KISTLER, H. C.; REP, M. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. **Nature**, v. 464, n. 7287, p. 367, 2010.

MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Epidemiologia de doenças radiculares. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. Recife: UFRPE, Imprensa Univertária, p.125-148, 2005.

MAROSTEGA, T. N.; LARA, L. P.; DE OLIVEIRA, D. D. S.; CHIMELLO, A. M.; GILIO, T. A. S.; PREISIGKE, S. D. C.; ARAUJO, K. L.; SERAFIM, M. E.; NEVES, L. G. Molecular and Aggressiveness Characterization of Isolates of

*Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* Associated to Passion Fruit Wilting. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 3, 2019.

MCKNIGHT, T. A wilt disease of the passion vine (*Passiflora edulis*) caused by a species of *Fusarium*. **Queensland Journal of Agricultural Science**, v. 8, p. 1-4, 1951.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 33, n. spe1, p. 83-91, 2011.

MELETTI, L. M. M.; BRUCKNER, C. H. Melhoramento genético. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado. Porto Alegre: Cinco**

MELO, N. J. D. A.; NEGREIROS, A. M. P.; MEDEIROS, H. L. D. S.; SALES JÚNIOR, R. Evaluation of *Fusarium* wilt disease in passion fruit species inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*. **Journal of Phytopathology**, v. 168, n. 2, p. 81-87, 2019.

MICHIELSE, C. B.; Rep, M. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 3, p. 311-324, 2009.

MIEDANER, T.; SCHILLING, A. G.; GEIGER, H. H. Molecular genetic diversity and variation for aggressiveness in populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* sampled from wheat fields in different countries. **Journal of Phytopathology**, v. 149, n. 11-12, p. 641-648, 2001.

ORR, R.; NELSON, P. N. Impacts of soil abiotic attributes on *Fusarium* wilt, focusing on bananas. **Applied Soil Ecology**, v. 132, p. 20-33, 2018.

ORTIZ, E.; HOYOS-CARVAJAL, L. Standard methods for inoculations of *F. oxysporum* and *F. solani* in *Passiflora*. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 17, p. 1569-1575, 2016.

PEREIRA, P. P. A.; LIMA, L. K. S.; SOARES, T. L.; LARANJEIRA, F. F.; DE JESUS, O. N.; GIRARDI, E. A. Initial vegetative growth and survival analysis for the assessment of *Fusarium* wilt resistance in *Passiflora* spp. **Crop Protection**, 121, 195-203. 2019.

PINHEIRO, G. S.; CAJUHI, L. F., DE SOUZA GUIMARÃES; Â. L.; ROSA; R. C. C.; LARANJEIRA, F. F. Identificação e modelagem do risco de fatores químicos e físicos à incidência da fusariose do maracujazeiro na Bahia. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 9, n. 4, p. 1168-1182, 2016.

PREISIGKE, S. D. C.; SILVA, L. P. D.; SERAFIM, M. E.; BRUCKNER, C. H.; ARAÚJO, K. L.; NEVES, L. G. Early selection of *Passiflora* species resistant to fusariosis. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 4, p. 321-325, 2017.

REIS, E. M.; CASA, R.T. Sobrevivência de fitopatógenos. In: VALE, F. X. R.; CINTRA De JESUS, V.; ZAMBOLIM, L. (Org.). **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Perfil, v. 1, p. 335-364, 2004.

RONCATTO, G.; OLIVEIRA, J. C. D.; RUGGIERO, C.; NOGUEIRA FILHO, G. C.; CENTURION, M. A. P. D. C.; FERREIRA, F. R. Comportamento de maracujazeiros (*Passiflora* spp.) quanto à morte prematura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, p. 552-554, 2004.

ROONEY-LATHAM, S.; BLOMQUIST, C. L.; SCHECK, H. J. First Report of Fusarium Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* on Passion Fruit in North America. **Plant Disease**, v. 95, n. 11, p. 1478-1478, 2011.

SÃO JOSÉ, A. R.; PIRES, M. De M. Aspectos gerais da cultura do maracujá no Brasil. In: PIRES, M. De M.; SÃO JOSÉ, A. R.; CONCEIÇÃO, A. O. (Org). **Maracujá: avanços tecnológicos e sustentabilidade**. Ilhéus: Editus, 2011. cap. 1, p. 13-19

SANTOS, C. H. B.; OLIVEIRA, E. J. D.; LARANJEIRA, F. F.; JESUS, O. N. D.; GIRARDI, E. A. Growth, Fruit Set, and Fusariosis Reaction of Yellow Passion Fruit Grafted Onto *Passiflora* spp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 38, n. 3, 2016.

SILVA, A. D. S.; OLIVEIRA, E. J. D.; HADDAD, F.; LARANJEIRA, F. F.; JESUS, O. N. D.; OLIVEIRA, S. A. S. D.; COSTA, M. A. P. De C.; FREITAS, J. P. X. Identification of passion fruit genotypes resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 3, p. 236-242, 2013.

SILVA, R. M. D.; AMBRÓSIO, M. M. D. Q.; AGUIAR, A. V. M. D.; FALEIRO, F. G.; CARDOSO, A. M. S.; MENDONÇA, V. Reação de cultivares de maracujazeiro em áreas com fusariose. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 2, p. 98-102, 2017.

STAMFORD, N. P.; STAMFORD, T. L. M.; ANDRADE, D. E. G. T.; MICHEREFF, S. J. Microbiota dos solos tropicais. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. Recife: UFRPE, Imprensa Univertária, p. 61-91, 2005.

TEUNISSEN, H.; VERKOOIJEN, J.; CORNELISSEN, B.; HARING, M. Genetic exchange of avirulence determinants and extensive karyotype rearrangements in parasexual recombinants of *Fusarium oxysporum*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 268, n. 3, p. 298-310, 2002.

VLEESHOUWERS, V. G. A. A.; OLIVER, R. P. Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant

pathogens. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 27, n. 3, p. 196-206, 2014.

WAWERU, B; TUROOP, L.; KAHANGI, E.; COYNE, D.; DUBOIS, T. Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* endophytes provide field control of nematodes, improving yield of banana (*Musa* sp.). **Biological Control**, v. 74, p. 82-88, 2014.

YAMADA, T. **Melhoria na eficiência da adubação aproveitando as interações entre os nutrientes**. Informações Agronômicas, Piracicaba, n. 100, p. 1-5, 2002.



---

## **CAPÍTULO 2**

**Seleção de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*  
por agressividade para *screening* de germoplasma de  
*Passiflora* spp.**

---

**Seleção de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* por agressividade para *screening* de germoplasma de *Passiflora* spp.**

Raoni Andrade Pires<sup>a</sup>; Onildo Nunes de Jesus<sup>b</sup>; Lucas Kennedy Silva Lima<sup>b</sup>;  
Luana Nascimento da Silva<sup>a</sup>; Francisco Ferraz Laranjeira<sup>b\*</sup>

<sup>b</sup>Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, Bahia. Box 007, CEP 44380-000, Brazil. E-mail; onildo.nunes@embrapa.br, lucas18kennedy@gmail.com

<sup>a</sup>Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, UFRB, Cruz das Almas, Bahia, CEP 44380-000, Brazil E-mail: piresraoni@gmail.com, luahnascimento@outlook.com

\*Corresponding author e-mail: francisco.laranjeira@embrapa.br

**Resumo:** A variabilidade genética entre isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (*Fop*) modifica o padrão de agressividade em condições controladas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a agressividade de isolados de *Fop* por meio de análise de sobrevivência e análise anatômicas nas raízes de plantas de *P. edulis* infectadas. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com uso de nove isolados de *Fop* para as inoculações de 30 mudas *P. edulis*. Os dados foram submetidos a análise de sobrevivência utilizando curvas de Kaplan-Meier. O número de clamidósporos nas raízes foi contabilizado por meio da clarificação de raízes e microscopia. A incidência variou entre os isolados de 20 a 90% com média de 50%. O isolado CMF3115 foi o mais agressivo, pois causou morte de 90% das plantas até os 70 DAI; baixo número de plantas vivas não infectadas por *Fop* (3%) e, embora não tenha sido verificada correlação com a incidência de plantas, esse isolado também apresentou elevado número de clamidósporos nas raízes. Assim, o CMF3115 apresenta potencial para utilização em *screening* de germoplasma de *Passiflora* em condições controladas e poderá contribuir para a seleção de cultivares resistentes ao *Fop*.

**Palavras-chave:** fusariose, *Passiflora edulis* Sims, inoculação, patogenicidade de isolados.

## **Selection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* isolates based on aggressiveness for *Passiflora* spp. germplasm resistance screening**

**Abstract:** Genetic variability among *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (*Fop*) isolates changes the aggressiveness pattern under controlled conditions. The aim of the current study was to assess the aggressiveness of *Fop* isolates through survival and anatomic analyses applied to the roots of infected plants. The study followed a completely randomized design with nine *Fop* isolates used to inoculate 30 *P. edulis* seedlings. Data were subjected to survival analysis based on Kaplan-Meier curves. The number of chlamydospores in the roots was counted through root clarification and microscopy. The incidence of it has ranged from 20% to 90% of isolates 50%, on average. Isolate CMF3115 was the most aggressive one, since it killed 70% of plants up to 70 DAI and left a small number of living plants without *Fop* (3%). Although this outcome is likely not correlated to plant incidence, this isolate also recorded a large number of chlamydospores in the roots. Thus, CMF3115 has the potential to be used for *Passiflora* germplasm screening under controlled conditions and may contribute to the selection of cultivars resistant to *Fop*.

**Keywords:** Fusarium wilt, *Passiflora edulis* Sims, inoculation, isolate pathogenicity.

### **Introdução**

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá amarelo (*P. edulis* Sims) com produção de 602,651 t em 47,731 ha (IBGE, 2020). Apesar da importância socioeconômica da passicultura para diversos segmentos da fruticultura nacional, problemas fitossanitários estão inviabilizando a expansão dos pomares causando perdas econômicas e abandono da atividade por muitos produtores.

Dentre as doenças ocasionadas por patógenos de solo, a murcha de *Fusarium* causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (*Fop*) é considerada a de maior impacto para cultura do maracujá, pois não existe controle curativo ou estratégia eficaz de manejo (Lima et al., 2018, 2019; Melo et al., 2019; Pereira et al., 2019). O controle da doença é complexo, pois o patógeno sobrevive por longos períodos no solo na forma de clamidósporos

(Bennett e Davis, 2013) inviabilizando o plantio por décadas e a mortalidade pode chegar a mais de 90% das plantas em áreas com histórico da doença (Pereira et al., 2019).

O patógeno penetra nas raízes através de pequenos ferimentos ou aberturas naturais. As hifas colonizam o tecido do xilema, produzindo microconídios, macroconídios, clamidósporos, e liberando toxinas. Esse processo causa obstrução dos vasos, impossibilitando o transporte de água e nutrientes, culminando na murcha e morte das plantas (Ortiz et al., 2014; Ferreira et al., 2015; Lima et al., 2019; Pereira et al., 2019). Dentre as estratégias de manejo desta complexa doença a utilização de variedades melhoradas geneticamente é a mais aceita pelos produtores, pois é de fácil implementação e não adiciona custo à produção. Contudo, não existe cultivar de *P. edulis* resistente à doença. Assim, é necessário explorar a ampla diversidade do gênero *Passiflora* para utilização em hibridações interespecíficas visando a transferência de alelos de resistência ao patógeno (Freitas et al., 2016; Preisigke et al., 2017; Pereira et al., 2019).

A identificação de genótipos resistentes ao *Fop* é primordial para condução das fases posteriores de cruzamento e seleção de indivíduos com resistência genética ao patógeno, pois se realizada de maneira ineficiente pode comprometer as demais etapas do melhoramento. A seleção em campo tem sido o método tradicionalmente utilizado (Pereira et al., 2019), porém é demorada, onerosa e pode ser influenciada por manchas de solo e a heterogeneidade na distribuição do patógeno (Lima et al., 2018; Pereira et al., 2019). A seleção de um método de inoculação vem sendo buscada por diferentes grupos, havendo relato do cultivo *in vitro* utilizando filtrados de *Fop* (Flores et al., 2012) e inoculação artificial por meio de suspensão de esporos (Silva et al., 2013a; Preisigke et al., 2017; Melo et al., 2019). Contudo, as respostas variam conforme o método de inoculação e isolado utilizado. Lima et al. (2019) realizaram inoculação por suspensão de esporo e área + fubá de milho infestado com *Fop* em associação ao déficit hídrico e alcançaram resultados relevantes. Porém, o tempo até o surgimento dos sintomas (60 dias) e o período de avaliação das

plantas (150 dias) foi longo, sendo necessário ajustes na metodologia de inoculação.

Parte da inconsistência está associada à patogenicidade dos isolados de *Fop*. Sua variabilidade genética é ampla (Silva et al., 2013b; Carvalho et al., 2015) e vários fatores determinam a agressividade do patógeno. Entre esses fatores, pode-se citar a produção de enzimas extracelulares que interagem com as raízes do hospedeiro (Masachis et al., 2016; Galeana-Sánchez et al., 2017; Mezzomo et al., 2019; Ding et al., 2020; Lima et al., 2020; Singh et al., 2020), a localização geográfica do isolado, variações genéticas e fatores ambientais como estresse hídrico (Silva et al., 2013b; Lima et al., 2019).

A seleção de isolados fitopatogênicos para realização de *screening* em germoplasma de *Passiflora* tem sido pouco explorada (Melo et al., 2019). Há a necessidade de aprofundar a seleção de isolados mais agressivos para subsidiar o desenvolvimento de cultivares resistentes a esse patógeno. Este trabalho partiu da hipótese de que a agressividade de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* é ampla e poderia ser caracterizada por meio de análise de sobrevivência e modificações anatômicas nas raízes de plantas de *P. edulis* infectadas. O objetivo foi selecionar ao menos um isolado com destacada agressividade para uso em programa de melhoramento de *P. edulis* para resistência a esse patógeno.

## **Material e Métodos**

### ***Local do experimento***

O experimento foi conduzido em condições de laboratório e casa de vegetação na Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia, Brasil (12° 39' 25" S, 39° 07' 27" W, 222 m). Foram avaliados nove isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (*Fop*), da micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Os isolados foram obtidos de plantas de *P. edulis* com sintomas típicos da fusariose, provenientes de cinco municípios produtores de maracujá (Tabela 1). Após a obtenção dos isolados foi realizado testes preliminares de patogenicidade. A confirmação dos isolados foi

realizada por meio das características morfológicas do microrganismo seguindo a descrição de Leslie e Summerell (2008) e Lombard et al. (2019).

**Tabela 1.** Identificação dos isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* e origem geográfica de coleta.

Código	Isolado	Local de coleta	Coordenadas	Coleta
CMF0301	Colo/raiz	Guanambi-BA	14°13'S, 42°46'W	02/2018
CMF0308	Colo/raiz	Livramento de Nossa Senhora – BA	Indisponível	07/2014
CMF0310	Colo/raiz	Livramento de Nossa Senhora – BA	Indisponível	07/2014
CMF0381	Colo/raiz	Dom Basílio – BA	13°42'33,5"S 41°50'42,8"W	01/2012
CMF3124	Colo/raiz	Porto Seguro – BA	Indisponível	03/2017
CMF0399	Colo/raiz	Livramento de Nossa Senhora – BA	13°40'45,7"S 41°47'16,5"W	01/2012
CMF3114	Colo/raiz	Cruz das Almas – BA	12°40'39"S 39°06'23"W	03/2017
CMF3115	Colo/raiz	Cruz das Almas – BA	12°40'39"S 39°06'23"W	03/2017
CMF3116	Colo/raiz	Cruz das Almas – BA	12°40'39"S 39°06'23"W	03/2017

#### **Preparo da fonte de inóculo com Fop**

O substrato utilizado para produção do inóculo foi composto por mistura de areia (250 mL) e fubá de milho (50 mL), na proporção 5:1 (v:v). Após mistura, foram armazenados em sacos de polietileno com capacidade para 5 L e autoclavados por duas vezes, sob pressão de 1,1 atm durante 20 minutos, com intervalo de 24 h. Após a esterilização do substrato, em câmara de fluxo laminar foi adicionado 20 mL de água destilada autoclavada (ADE) e dez discos de micélio por isolado (Lima et al., 2019). Os substratos contendo os discos de micélio dos isolados foram armazenados em incubadora tipo B.O.D por 21 dias a temperatura de 28 °C ( $\pm 1$  °C), com fotoperíodo de 12 h.

O ajuste da concentração de esporos foi realizado utilizando 1.0 g do substrato infestado, diluindo-se em água destilada estéril, até a concentração de  $10^{-6}$ . Desta solução, 100  $\mu$ L foi plaqueada em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e incubados em B.O.D. por dois dias a temperatura de 25 °C ( $\pm 1$  °C), com fotoperíodo de 12 h. Cada amostra foi executada em triplicata e o número médio de unidades formadoras de colônia (UFC) foi utilizado para o ajuste na concentração de inóculo no substrato.

### **Produção das mudas de *P. edulis* e inoculação de *Fop***

A produção das mudas e avaliação do experimento foi realizada em telado antiafídeo com temperatura mínima, média e máxima de 20, 25 e 35 °C, respectivamente.

As mudas a serem inoculadas foram produzidas a partir de sementes do acesso BGP418 de *P. edulis* oriundas do Banco Ativo de Germoplasma de Passiflora da Embrapa Mandioca e Fruticultura. As sementes foram distribuídas em bandejas de polietileno com 162 células, capacidade de 60 mL, preenchidas com substrato comercial Vivato<sup>®</sup> e fibra de coco (3:1; v:v). As inoculações foram realizadas quando as plantas atingiram três folhas verdadeiras completamente expandidas e foram transplantadas para copos plásticos com capacidade de 200 mL utilizando mistura estéril de areia lavada e fubá (4:1; v:v), como substrato. A inoculação foi realizada acrescentando areia e fubá (5:1; v:v) previamente colonizado com *Fop*, na concentração de  $1 \times 10^6$  UFC de *Fop* por grama de substrato, inoculando-se 30 plantas com cada isolado. Como controle, 30 plantas receberam apenas areia e fubá estéril (5:1; v:v). Cinco dias após inoculação, as plantas foram submetidas a estresse hídrico com turno de rega ajustado para dois dias (Lima et al., 2019). A suplementação nutricional foi realizada por meio de pulverizações semanais de adubo foliar Forth Solúvel<sup>®</sup> ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ). O experimento foi realizado por duas vezes, visando obter informações robustas do comportamento da espécie submetida a diferentes isolados.

### **Avaliação de mortalidade**

A mortalidade das plantas foi avaliada a cada dois dias, após ciclos de déficit hídrico controlado. Plantas com sintomas característicos de murcha provocada por *Fop* foram submetidas a reisolamento para confirmação do diagnóstico. As plantas controle também foram submetidas ao déficit hídrico para confirmar se a morte esteve associada ao *Fop* e não ao déficit hídrico (Lima et al., 2019).

No reisolamento, fragmentos do caule na região do epicótilo foram retirados com auxílio de um bisturi e submersos em soluções de álcool etílico hidratado a 70%, hipoclorito de sódio (0,5%) e lavadas por três vezes em ADE,

por 2 min. Os fragmentos desinfestados foram colocados em placas de Petri com meio de cultura B.D.A. e incubados em B.O.D. por dois dias a temperatura de 28 °C ( $\pm 1$  °C) com fotoperíodo de 12 h (Alfnas et al., 2007). Após sete dias de incubação, fragmentos de micélio foram observados em microscópio ótico (LEICA 550M com câmera LEICA ICC50E acoplada) para confirmação morfológica da presença de *Fop* (Leslie e Summerell, 2008; Lombard et al., 2019).

Plantas mortas para as quais o reisolamento não detectou presença de *Fop* foram registradas como mortas por outras causas. Aos 100 dias após inoculação (DAI), todas as plantas assintomáticas foram submetidas ao processo de reisolamento. Quando confirmada a presença de estruturas de *Fop* as plantas foram classificadas como assintomáticas com presença do *Fop*. Plantas assintomáticas para as quais o reisolamento não detectou *Fop* foram classificadas como assintomáticas sem presença de *Fop*.

#### **Clarificação das raízes e contagem de clamidósporos**

As raízes das plantas foram coletadas, conservadas em álcool etílico hidratado (70%), e submetidas ao processo de clarificação para confirmação de *Fop* no tecido hospedeiro e para quantificação do número de clamidósporos nas raízes.

Para clarificação, as raízes coletadas foram previamente lavadas em água corrente e detergente neutro e imersas em hidróxido de potássio (KOH) 10% e aquecidas a 90 °C por 30 min. As raízes foram lavadas com água destilada e imersas em ácido clorídrico (HCl) 1% por 4 min. e então embebidas em solução de azul de trypan (0,05%). Após 24h, as raízes foram lavadas para remover o excesso de corante, e conservadas em solução de ácido láctico glicerol e água destilada (2:2:1 v:v) (Phillips e Hayman, 1970). Dez raízes secundárias de cada tratamento foram recolhidas aleatoriamente, e fixadas em lâminas para microscopia. As regiões superior, inferior e mediana das raízes foram observadas em microscópio ótico (LEICA 550M com câmera LEICA ICC50E acoplada). A quantificação do número de clamidósporos foi realizada em dez segmentos fotografados da raiz. Em cada imagem, cinco quadrados de 200 x



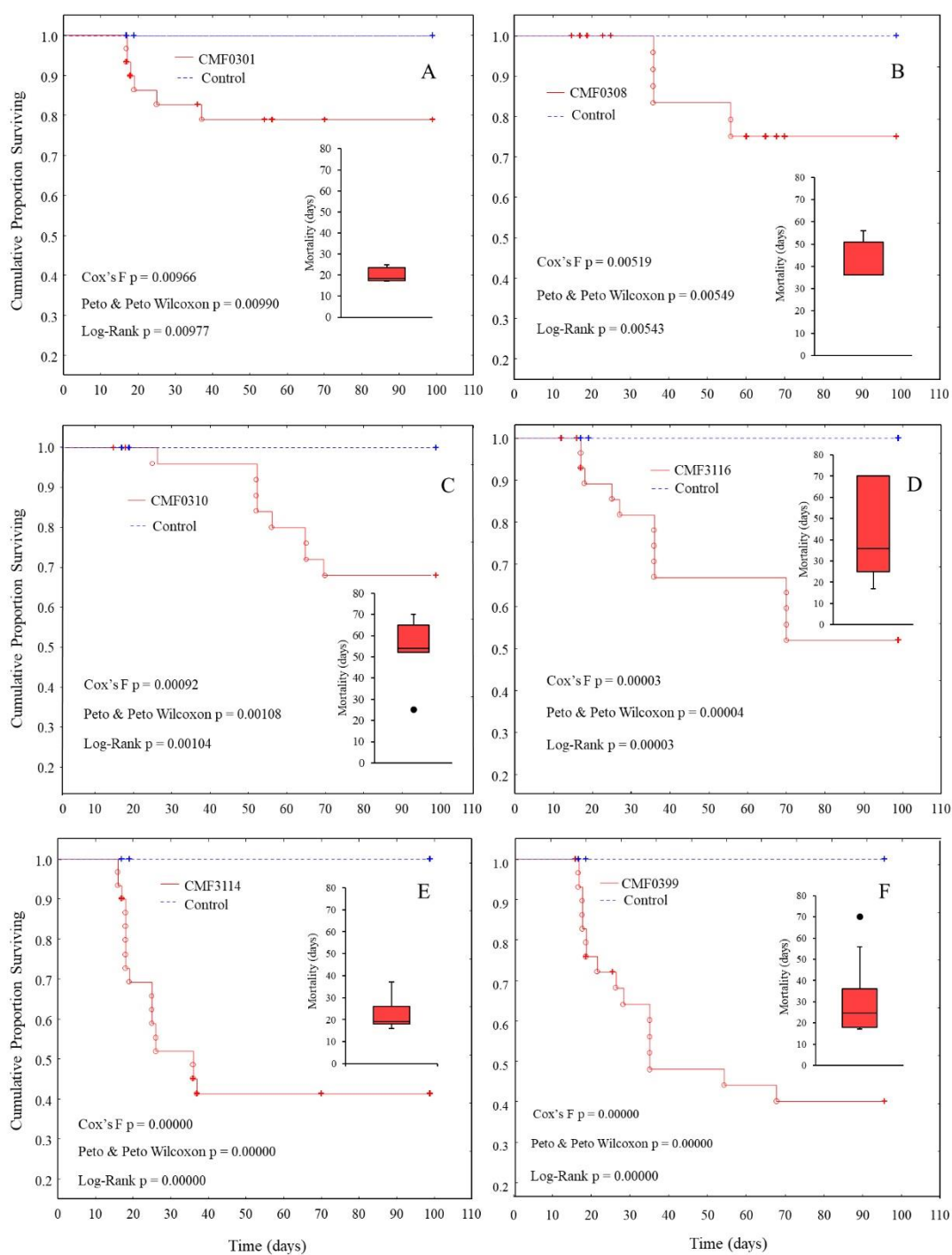
200  $\mu\text{m}$  foram distribuídos aleatoriamente na imagem e o número de clamidósporos foi contado com o software ImageJ (2016).

### ***Delineamento experimental e análise estatística***

Para ambos os ensaios o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado constituído de nove isolados e o tratamento controle (não inoculado). A análise de sobrevivência foi conduzida usando a curva não paramétrica de Kaplan-Meier (KM) (Kaplan e Maier, 1958). Neste estudo, o evento de interesse foi a morte da planta causada pelo *Fop* e confirmada após isolamento do patógeno. Diferenças nas curvas de sobrevivência foram comparadas pelo teste Log-rank, Peto & Peto Wilcoxon, e F de Cox ( $p \leq 0,05$ ) com auxílio do software Statistica (TIBISCO, 2018). Os dados de incidência da doença determinada pela confirmação da morte através do reisolamento do patógeno ao longo do período de avaliação foram submetidos à análise de agrupamento utilizando a distância Euclidiana e agrupamento UPGMA (grupo de pares não ponderados com média aritmética). A análise comparativa da quantidade de clamidósporos presentes nas raízes foi realizada pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ) com auxílio do software R (2020) e os dados apresentados em gráficos Box plot.

### **Resultados**

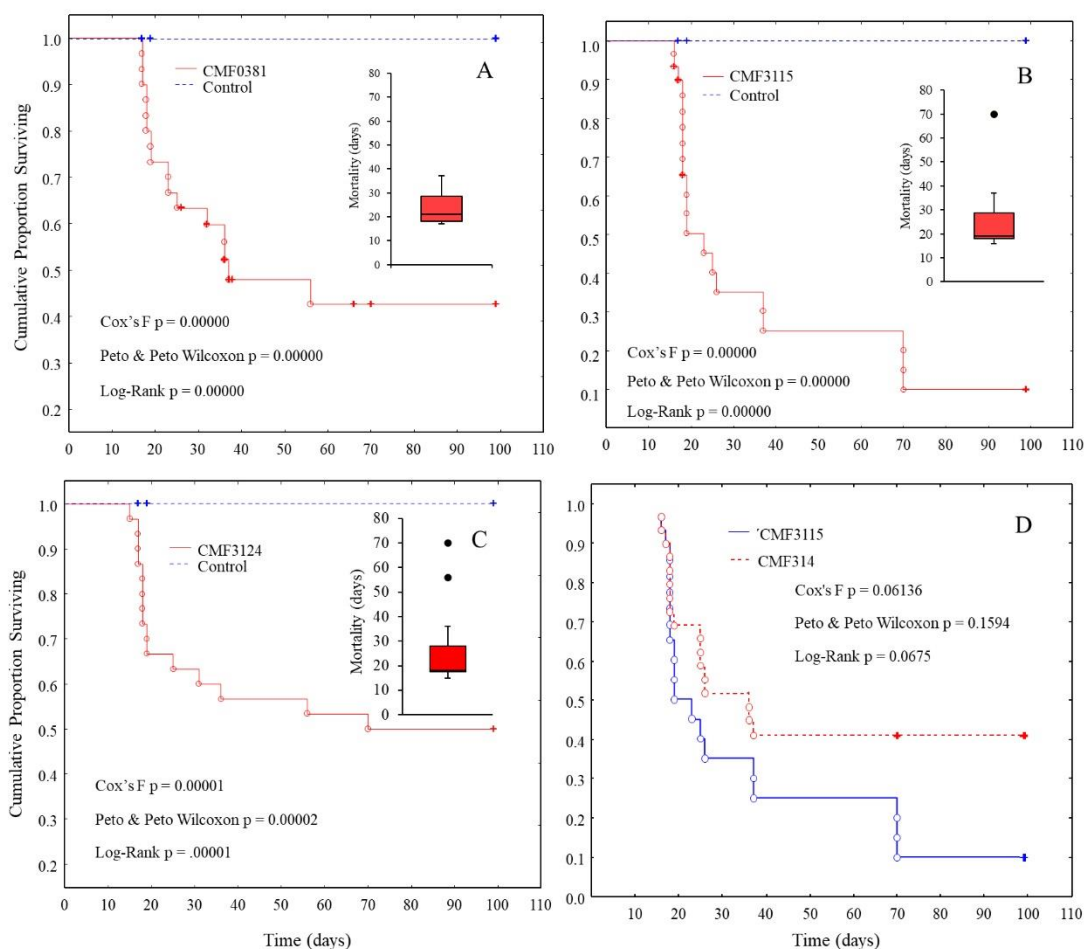
Todos os isolados foram fitopatogênicos. As curvas de Kaplan & Mayer para o tratamento controle diferiu das curvas para os tratamentos com inoculação, analisados pelos testes F de Cox's, Peto & Peto Wilcoxon e Log-Rank ( $p < 0.001$ ). A incidência, refletida no perfil das curvas KM, variou conforme o isolado, com menor mortalidade de *P. edulis* ( $< 30\%$ ) induzida pelos isolados CMF0301, CMF0308 e CMF0310. O período de incubação para CMF0310 foi de 54 DAI, sendo 36 e 18 dias mais prolongado do que os de CMF0301 e CMF0308, respectivamente (Figura 1A-C).



**Figure 1.** Proporção cumulativa de sobrevivência de plantas de *P. edulis* inoculadas com diferentes isolados de *F. oxysporum* f sp. *passiflorae* (*Fop*) e submetidas ao déficit hídrico controlado. A: isolado CMF0301 e controle (não inoculada). B: isolado CMF0308 e controle (não inoculada); C: isolado CMF0310 e controle (não inoculada); D: isolado CMF3116 e controle (não inoculada); E:

isolado CMF3114 e controle (não inoculada); F: isolado CMF0399 e controle (não inoculada). Boxplots das plantas mortas por *Fop* em cada isolado até 80 DAI.

As curvas de Kaplan-Mayer para os isolados CMF3116, CMF3114 e CMF0399 variaram entre 43 e 57% de incidência da doença. O CMF3114 provocou murcha em 57% das plantas precocemente com período de incubação de 19 DAI, variando entre 16 e 37 DAI, enquanto os isolados CMF3116 e CMF0399 manifestaram sintomas até os 70 DAI com tempo médio de incubação de 36 e 25 DAI, respectivamente (Figura 1D, E, F). O CMF0381 e CMF3124, foram semelhantes com incidência 53 e 50% das plantas inoculadas e tempo médio de incubação de 21 e 18 DAI, respectivamente, com maior incidência até 38 DAI (Figura 2A, C).



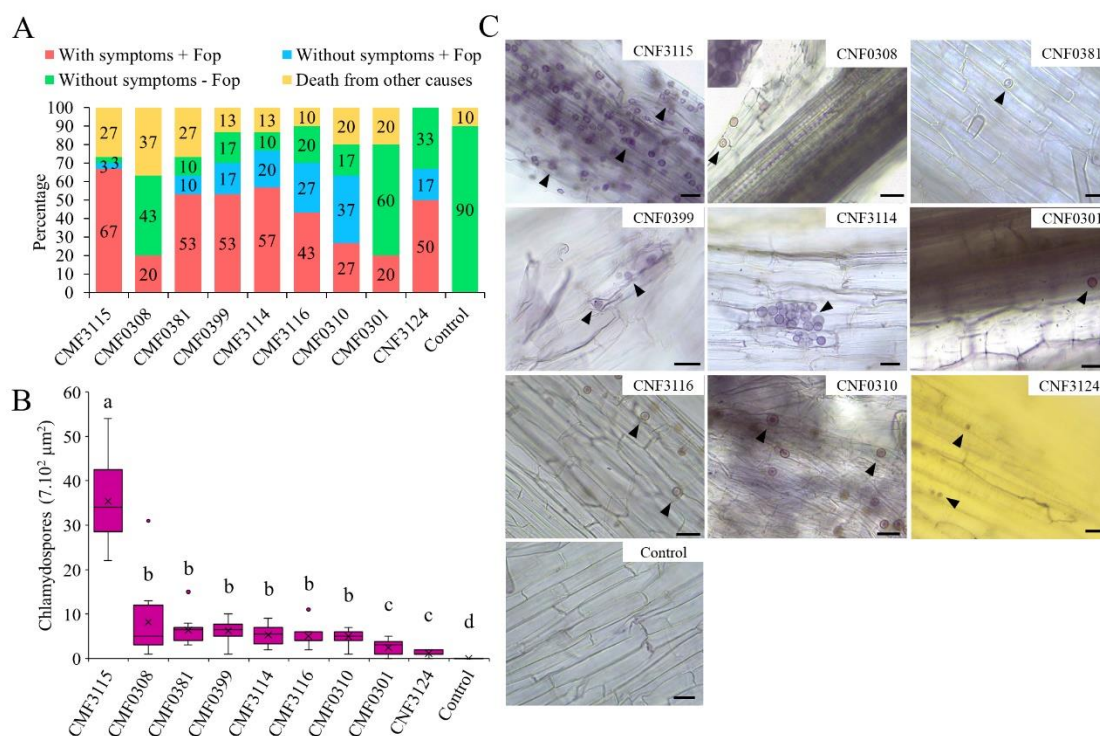
**Figure 2.** Proporção cumulativa de sobrevivência de plantas de *P. edulis* inoculadas com diferentes isolados de *F. oxysporum* f sp. *passiflorae* (*Fop*) e submetidas ao déficit hídrico controlado. A: Isolado CMF0381 e controle (não inoculada); B: isolado CMF3115 e controle (não inoculada); C: Isolado CMF3124 e controle (não inoculada); D: comparação da proporção cumulativa de sobrevivência entre os isolados mais agressivos CMF3115 e CMF0399. Boxplots das plantas mortas por *Fop* em cada isolado até 80 DAI.

O CMF3115 apresentou resultados promissores com capacidade de induzir sintomas em 90% das plantas inoculadas até 70 DAI, sendo que 65% da mortalidade ocorreu precocemente entre 16 a 26 DAI com tempo de incubação de 19 dias, destacando-se em relação aos demais (Figura 2B).

Com a finalidade verificar a agressividade do isolado CMF3115, foi realizada comparação entre esse e o segundo mais agressivo (Figura 1E e 2B), sendo verificada variação entre as curvas pelos testes F de Cox's, e Log-Rank, com destaque para o CMF3115, que promoveu maior incidência da doença ao longo do tempo, já com base no teste Peto & Peto Wilcoxon não houve diferença (Figura 2D).

Até 100 DAI foi verificada elevada variação (3 a 60%) de plantas assintomáticas, mas com presença do patógeno nos isolados CMF0381, CMF0399, CMF3114, CMF3116, CMF0310 e CMF3124 (Figura 3A).

O isolado oriundo de plantas com sintomas de *Fop* de Guanambi-BA (CMF0301) foi menos agressivo, com 60% das plantas assintomáticas sem presença do patógeno. Esse resultado foi semelhante para o CMF0308 obtido de plantas cultivadas em Livramento de Nossa Senhora-BA, com 80% de plantas assintomáticas. O CMF0399 foi obtido da mesma localidade, porém apresentou maior capacidade de promover doença com 53% de incidência. Isso indica que a origem geográfica apenas não determina a agressividade do patógeno. Já os isolados de Cruz das Almas, BA (CMF3115, CMF3114 e CMF3116) foram mais eficientes em induzirem sintomas da doença em *P. edulis* com resultados semelhantes ao CMF0381 obtido de Dom Basílio, BA (Figura 3A).

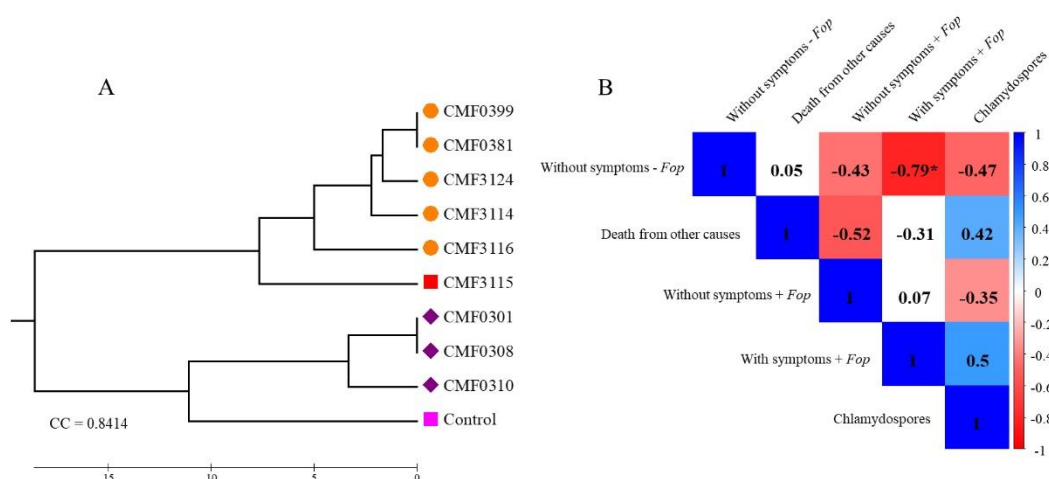


**Figure 3.** Reação de mudas de *P. edulis* inoculadas com nove isolados de *F. oxysporum* f sp. *passiflorae* (*Fop*) aos 100 DAI. A: gráfico de coluna empilhada para porcentagem de plantas mortas com reisolamento positivo para *Fop* (vermelho), plantas assintomáticas com presença de *Fop* no reisolamento (azul), plantas assintomáticas com ausência de *Fop* no reisolamento (verde) e plantas mortas com ausência de *Fop* no reisolamento (amarelo); B: Número médio de clamidósporos observados nas raízes de *P. edulis* inoculadas; C: Segmentos de raízes de mudas de *P. edulis* que foram inoculadas com isolados de *Fop* e raiz de planta controle (não inoculadas). Setas indicam clamidósporos nos segmentos de raízes, barra = 25 μm. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 0.05$ ); x corresponde à média de clamidósporos em cada isolado.

O número de clamidósporos nas raízes foi expressivamente maior nas plantas inoculadas com CMF3115, sendo 15 e 30 vezes maior do que o número registrado para CMF0301 e CMF3124, com 2.41 e 1.16, respectivamente (Figura 3B). Os demais isolados apresentaram resultados intermediários (Figura 3B, C). Não foi observada alteração na disposição das células inoculadas com *Fop*. No

entanto, mudanças na conformação das raízes com avanço da doença foram observadas quando as plantas foram inoculadas com CMF0399 e CMF0301 (Figura 3C).

O dendrograma com base na incidência da doença permitiu a visualização de quatro grupos. O controle (não-inoculado) formou grupo isolado dos tratamentos inoculados. O segundo grupo alocou os isolados menos agressivos CMF0310, CMF0308 e CMF0301 com incidência variando de 20 a 27%. O terceiro grupo foi formado pela maior parte dos isolados, aqueles que levaram a incidências entre 43 e 57% (Figura 4A). A correlação entre os caracteres foi baixa de modo geral, com ressalva para as plantas com sintomas de *Fop* e as plantas sem sintomas e ausência do *Fop* com  $r = -0.89$  (Figura 4B).



**Figure 4.** Dendrograma com base na severidade (plantas mortas pelo *Fop* e confirmadas pelo reisolamento) de nove isolados de *F. oxysporum* f sp. *passiflorae*, mais o tratamento controle (não inoculado). Correlação de Pearson entre plantas sem sintomas e ausência de *Fop*, morte por outras causas, sem sintomas e presença de *Fop* nas raízes, com sintomas e presença de *Fop* e número de clamidósporos. \* indica significância a 5% pelo teste T.

## Discussão

No processo de *screening* de germoplasma para identificação de fontes de resistência a doenças é interessante que o isolado seja capaz de provocar sintomas característicos, a fim de economizar tempo e recursos para

identificação de plantas resistentes. Neste estudo, todos os isolados foram patogênicos. Contudo, a incidência final de plantas mortas, período de incubação, número de plantas assintomáticas e número de clamidósporos presentes nas raízes variou expressivamente entre os isolados (Figura 1-4). Isso indica ampla variabilidade na agressividade dos isolados (Michielse, 2009; Silva et al., 2013b; Masachis et al., 2016).

A agressividade de diferentes isolados pode estar associada a produção de toxinas que facilitam a penetração e colonização do patógeno (Miedaner et al., 2004; Nirmaladevi et al., 2016); eficiência no reconhecimento e infecção do hospedeiro (Singh et al., 2020), ou através do reconhecimento do exsudatos radiculares do hospedeiro (Masachis et al., 2016); genes associados a patogenicidade (Nirmaladevi et al., 2016; Ding et al., 2020); compostos para neutralizar mecanismos de reconhecimento à infecção (Masachis et al., 2016; Galeana-Sánchez et al., 2017) ou condições ambientais favoráveis (Arias et al., 2013; Lima et al., 2020).

Além desses fatores, o local de origem dos isolados pode resultar em respostas diferentes de virulência de *F. oxysporum*. Nesse estudo, os isolados mais agressivos (CMF3115, CMF3114, CMF3116) foram obtidos de plantas cultivadas em Cruz das Almas, Bahia, Brasil. Contudo, em Livramento de Nossa Senhora Bahia, Brasil, houve isolados com baixa (CMF0308 e CMF0310) e alta agressividade (CMF0399), indicando que apenas o local de origem não é um fator determinante da agressividade (Figura 1, 2). Esse resultado tem paralelo com os de Nirmaladevi et al. (2016) que obtiveram diferentes níveis de agressividade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolados da mesma região. Espécies patogênicas do complexo *F. oxysporum* são capazes de transferir genes, e até mesmo cromossomos inteiros, para espécies não patogênicas de *F. oxysporum* (Glenn et al., 2008; Ma et al., 2010), indicando a possibilidade de isolados pouco agressivos se tornarem mais virulentos.

Dentre os nove isolados, CMF3115 foi classificado como mais agressivo, pois foi capaz de promover doença em 90% das plantas até 70 DAI (Figura 2C) (Figura 3A). Além disso, esse isolado apresentou elevado número de clamidósporos nas raízes, como observado em outros estudos (Akhter et al.,

2016; Ding et al., 2019) e formou grupo separado dos outros isolados (Figura 4A). Isso é particularmente importante, pois estudos posteriores poderão ser conduzidos utilizando o isolado CMF3115 em associação ao estresse hídrico (Lima et al., 2019) para *screening* em germoplasma e identificação de fontes de resistência ao *Fop*. Em condições controladas isso implica com menor custo e tempo em relação aos estudos em condições de campo (Pereira et al., 2019).

A utilização de isolado pouco agressivo ou avirulento pode incorrer em seleção equivocada de genótipos resistentes, comprometendo assim as demais etapas dos programas de melhoramento. Espécies do complexo *F. oxysporum* podem ser não patogênicos devido a comportamento endofítico, sem danos macroscópicos, similar a outros fungos que infectam raízes sem provocar doença, obtendo nutrientes diretamente das vias apoplásticas (Gordon, 2017). Além disso, há estudos que reportam a utilização de isolados não patogênicos no controle biológico da fusariose no tomateiro (Kavroulakis et al., 2007).

Por outro lado, isolados como CMF0399, CMF3114 e CMF3116 podem ser responsáveis pelo aumento da densidade de propágulos ao longo do tempo em áreas com histórico da doença. Isso levaria a alta incidência logo no primeiro plantio, conforme estudo realizados por Pereira et al. (2019), enquanto em áreas com populações menos agressivas o tempo para afetar muitas plantas é prolongado e associado a fatores genéticos (Nirmaladevi et al., 2016; Ding et al., 2020).

A incidência de fusariose causada por 13 isolados de *Fop* em *P. edulis* foi avaliada por Melo et al. (2019). Eles também observaram variação no período de incubação, oscilando de 17 a 52 DAI. Apesar da analogia, o período de incubação reportado nesse estudo foi menor (18 a 36 DAI) com exceção de CMF0310 com 54 DAI. Isso se deve provavelmente à metodologia de inoculação, com emprego de ciclo de estresse hídrico controlado antecipando a manifestação dos sintomas. Os mecanismos envolvidos não estão claros. Uma possibilidade seria a formação de microfissuras nas raízes, que facilitariam a penetração do patógeno (Lima et al., 2019). Além disso, o estresse hídrico pode promover alterações fisiológicas, anatômicas, moleculares e bioquímicas afetando diretamente o crescimento da planta e acúmulo de massa (Pereira et



al., 2018; Liu et al., 2019) acarretando prejuízos no sistema de defesa da planta e favorecendo o surgimento da doença.

A análise de sobrevivência mostrou-se uma ferramenta importante na classificação da agressividade de isolados. Nessa análise é possível considerar dados censurados (morte por outras causas), observar a proporção cumulativa de sobrevivência ao longo do tempo e comparar as curvas por diferentes testes. As diferenças entre os testes (Figura 2F) pode estar associada a maior sensibilidade do teste de Peto & Peto Wilcoxon nos tempos de sobrevivência precoce em relação ao teste F de Cox's e Log-Rank (Peto e Peto, 1972; Kalbfleisch e Prentice, 1980; Kleinbaum e Klein, 2010). A utilidade e eficiência da técnica também vem sendo reportada em outros estudos (Masachiset al., 2016; Lima et al., 2018, 2019; Pereira et al., 2019).

Os resultados obtidos nesses estudo são promissores. Foi possível selecionar um isolado fitopatogênico e agressivo com associação do estresse hídrico, em curto período de avaliação, sendo o primeiro estudo reportando essa combinação de fatores em *P. edulis*. Isso abre perspectiva para utilização do CMF3115 utilizando areia mais fubá de milho como inóculo para *screening* em germoplasmas de *Passiflora* visando selecionar genótipos resistentes dentro da ampla variabilidade conservada em bancos de germoplasma (Cerqueira-Silva et al., 2014). Os genótipos resistentes poderão ser utilizados em ciclos de cruzamentos e retrocruzamentos para introgressão de genes de resistência e as progênies poderão ser selecionada ainda na fase de mudas acelerando assim as etapas de identificação de genótipos e a obtenção no futuro da primeira cultivar de maracujá amarelo (*P. edulis*) resistente ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*. Além disso, a utilização desse isolado em estudos de ciclo de vida permitirá aprofundar os estudos nesse campo, possibilitando a resolução de novas estratégias de manejo da doença.

## **Conclusões**

1. Todos os isolados avaliados foram fitopatogênicos com maior incidência da doença entre 20 e 30 dias após a inoculação de *P. edulis*.

2. O isolado CMF3115 destacou-se como o mais agressivo, sendo assim recomendado para realização de *screening* em germoplasma de *Passiflora*;
3. A análise de sobrevivência pode ser utilizada para seleção de isolados agressivos e como ferramenta estatística para *screening* em germoplasma de *Passiflora* spp.;
4. As fotomicrografias apresentaram elevada presença de clamidósporos nas raízes das plantas inoculadas com *Fop*, com destaque para o CMF3115.

## Referências

- AKHTER, A.; HAGE-AHMED, K.; SOJA, G.; STEINKELLNER, S. Potential of *Fusarium* wilt-inducing chlamydospores, in vitro behaviour in root exudates and physiology of tomato in biochar and compost amended soil. **Plant and Soil**, 406(1-2), 425-440, 2016.
- ALFENAS, A. C.; FERREIRA F.A.; MÁFIA R. G., GONÇALVES R. C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS A. C.; MÁFIA R.G. Editora UFV, Viçosa, p. 53–91. **Métodos em Fitopatologia**, Ed. 1 Viçosa: UFV, p. 53-90, 2007.
- ARIAS, M. M. D., LEANDRO, L. F., & MUNKVOLD, G. P. Aggressiveness of *Fusarium* species and impact of root infection on growth and yield of soybeans. **Phytopathology**, 103(8), 822-832, 2013.
- BENNETT, R.S.; DAVIS, R.M. Method for rapid production of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* chlamydospores. **J Cotton Sci**. 17:52-59, 2013.
- CAVALCANTI, L. S.; COELHO, R. S. B.; PEREZ, J. O. Utilização de dois métodos de inoculação na avaliação da resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Ciência Rural**, 32, 1–5, 2002.
- CUNHA, C. M.; HINZ, R. H.; PEREIRA, A.; TCACENCO, F. A; STADNIK, M. J. Aggressiveness and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* from Santa Catarina, southern Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, n. 5, p. 326-334, 2015.
- DING, Z.; XU, T.; ZHU, W.; LI, L.; FU, Q. (2020). MADS-box transcription factor FoRlm1 regulates aerial hyphal growth, oxidative stress, cell wall biosynthesis and virulence in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Fungal Biology**, 2020.FERREIRA, R. B., RODRIGUES, A. A. C., MORAES, F. H. R., CANDIDO,

- E. K.; de OLIVEIRA NASCIMENTO, I. Resíduos orgânicos no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* em maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Acta Biológica Colombiana**, 20(3), 111-120, 2015.
- FREITAS, J.C.O.; VIANA, A.P.; SANTOS, E.A.; PAIVA, C.L.; SILVA, F.H.L.; AMARAL JR. A.T.; SOUZA, M.M.; DIAS, V.M. Resistance to *Fusarium solani* and characterization of hybrids from the cross between *P. mucronata* and *P. edulis*. **Euphytica**. 208, 493–507, 2016.
- GALEANA-SÁNCHEZ, E.; SÁNCHEZ-RANGEL, D.; de la TORRE-HERNÁNDEZ, M. E.; NÁJERA-MARTÍNEZ, M.; RAMOS-VILLEGAS, P.; PLASENCIA, J. Fumonisin B1 produced in planta by *Fusarium verticillioides* is associated with inhibition of maize  $\beta$ -1, 3-glucanase activity and increased aggressiveness. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 100, p. 75-83, 2017.
- GLENN, A. E.; ZITOMER N.C.; ZIMERI, A.M.; WILLIAMS, L.D.; RILEY, R.T.; PROCTOR, R.H. Transformation-mediated complementation of a FUM gene cluster deletion in *Fusarium verticillioides* restores both fumonisin production and pathogenicity on maize seedlings. **Molecular plantmicrobe interactions**, v. 21, n. 1, p. 87-97, 2008.
- GORDON, T. R. *Fusarium oxysporum* and the Fusarium wilt syndrome. **Annual Review of Phytopathology**, v.55, p.23-39, 2017.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – **IBGE**. Culturas temporárias e permanentes. Produção Agrícola Municipal, 2020.
- KALBFLEISCH, J.D.; PRENTICE, R.L. Statistical Analysis of Failure Time Data. New York: Wiley 1980.
- KAPLAN, E. L., MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J. Am. Stat. Assoc.** 53, 457–481, 1958.
- KAVROULAKIS, N.; NTOUGIAS, S.; ZERVAKIS, G.I.; EHALIOTIS, C., HARALAMPIDIS, K.; PAPADOPOULOU, K. K. Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. **J. Exp. Bot.** 58 (14), 3853-3864, 2007.
- KLEINBAUM, D. G.; KLEIN, M. **Survival analysis** (Vol. 3). New York: Springer. 2010.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium laboratory manual**. John Wiley & Sons, 2008.

LIMA, L. K. S.; de JESUS, O. N.; SOARES, T. L.; de OLIVEIRA, S. A. S.; HADDAD, F.; GIRARDI, E. A. Water deficit increases the susceptibility of yellow passion fruit seedlings to *Fusarium* wilt in controlled conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 243, p. 609-621, 2019.

LIMA, L. K.; SANTOS, I. S.; GONCALVES, Z. S.; SOARES, T. L.; JESUS, O. N.; GIRARDI, E. A. Grafting height does not affect *Fusarium* wilt control or horticultural performance of *Passiflora gibertii* NE Br. rootstock. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n. AHEAD, 2018.

LOMBARD, L.; SANDOVAL-DENIS, M.; LAMPRECHT, S. C.; CROUS, P. W. Epitypification of *Fusarium oxysporum* clearing the taxonomic chaos. **Persoonia**, v. 43 p. 1-47, 2019.

MA, L.J.; VAN DER DOES, H.C.; BORKOVICH, K.A.; COLEMAN, J.J.; DABOUSSI, M.J.; DI PIETRO, A.; DUFRESNE, H.; et al. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. **Nature**, v. 464, n. 7287, p. 367, 2010.

MASACHIS, S., SEGORBE, D., TURRÀ, D., LEON-RUIZ, M., FÜRST, U., EI GHALID, M., et al. A fungal pathogen secretes plant alkalizing peptides to increase infection. **Nature Microbiology**, 1(6), 1-9, 2016.

MELO, N. J. D. A.; NEGREIROS, A. M. P.; MEDEIROS, H. L. D. S.; SALES JÚNIOR, R. Evaluation of *Fusarium* wilt disease in passion fruit species inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*. **Journal of Phytopathology**, v. 168, n. 2, p. 81-87, 2019.

MEZZOMO, R.; ROLIM, J. M.; SANTOS, Á. F. D.; POLETTO, T.; WALKER, C.; MACIEL, C. G.; MUNIZ, M. F. B. Aggressiveness of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* isolates to yerba-mate and production of extracellular enzymes. **Summa Phytopathologica**, 45(2), 141-145, 2019.

MIEDANER, T.; SCHILLING, A. G. Competition effects among isolates of *Fusarium culmorum* differing in aggressiveness and mycotoxin production on heads of winter rye. **European Journal of Plant Pathology**, 110(1), 63-70, 2004.

NIRMALADEVI, D., VENKATARAMANA, M., SRIVASTAVA, R. K., UPPALAPATI, S. R., GUPTA, V. K., YLI-MATTILA, T., et al.(2016). Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Scientific reports**, 6(1), 1-14, 2016.

ORTIZ, E.; CRUZ, M.; MELGAREJO, L. M.; MARQUÍNEZ, X.; HOYOS-CARVAJAL, L. I. Características hispatológicas da infecção causada por *Fusarium oxysporum* e *F. solani* em maracujá-roxo (*Passiflora edulis* Sims). **Summa Phytopathologica**. . vol.40, n.2, pp.134-140, 2014.

PEREIRA, P. P. A.; LIMA, L. K. S.; SOARES, T. L.; LARANJEIRA, F. F.; de JESUS, O. N.; GIRARDI, E. A. Initial vegetative growth and survival analysis for the assessment of *Fusarium* wilt resistance in *Passiflora* spp. **Crop Protection**, 121, 195-203, 2019.

PETO R, PETO J. Asymptotically efficient rank invariant procedures. **Journal of the Royal Statistical Society**, 1972.

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British mycological Society**, v. 55, n. 1, 1970.

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

PRUSKY, D.; YAKOBY, N. Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH? **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 6, p. 509-516, 2003.

R Development Core Team, 2016. **R: a Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for statistical computing, 2016, Vienna. Available in: <https://cran.r-project.org/>. (Accessed 20.02.2020).

Rasband, (2016), **ImageJ**, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA <http://imagej.nih.gov/ij/> Accessed 10 August 2019.

SILVA J. S.; COIMBRA J. L.; TAVARES D. G.; AFONSO, G. O. Inibição in vitro do crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* utilizando isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de plantas nativas do cerrado baiano. **Natureza on line** 11, 15-19, 2013.

SILVA, A. D. S.; OLIVEIRA, E. J. D.; HADDAD, F.; LARANJEIRA, F. F.; JESUS, O. N. D.; OLIVEIRA, S. A. S. D.; FREITAS, J. P. X. D. Identification of passion fruit genotypes resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*. **Tropical Plant Pathology**, 38(3), 236-242, 2013.

SINGH, N.; MUKHERJEE, S. K.; RAJAM, M. V. (2020). Silencing of the Ornithine Decarboxylase Gene of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by Host-Induced RNAi Confers Resistance to Fusarium Wilt in Tomato. **Plant Molecular Biology Reporter**, 1-11, 2020.

TIBISCO Software Inc. (2018). **Statistica** (data analysis software system), version 13. <http://tibco.com>.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; JESUS, O. N.; SANTOS, E. S.; CORRÊA, R. X.; SOUZA, A. P. Genetic breeding and diversity of the genus *Passiflora*: progress and perspectives in molecular and genetic studies. **International Journal of Molecular Sciences**, 15(8), 14122-14152, 2014.

Carvalho, A. B.; Coelho, V. J. E.; Araújo, K. L.; de Siqueira, K. A. A.; da Silva Neves, S. M. A.; Soares, M. A.; Neves, L. G. Genetic variability of *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* isolates from Pantanal, Amazon and Cerrado biomes of Mato Grosso, Brazil. **African Journal of Agricultural Research**, 10(53), 4990-4997, 2015.

Souza, P. U.; Lima, L. K. S.; Soares, T. L.; de Jesus, O. N.; Coelho Filho, M. A.; Girardi, E. A. Biometric, physiological and anatomical responses of *Passiflora* spp. to controlled water deficit. **Scientia Horticulturae**, 229, 77-90, 2018.

LIU, B., LIANG, J., TANG, G., WANG, X., LIU, F., & ZHAO, D. Drought stress effects on growth, water use efficiency, gas exchange and chlorophyll fluorescence of *Juglans* rootstocks. **Scientia Horticulturae**, 250, 230-235, 2019.

---

## **CAPÍTULO 3**

**Esporulação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* em diferentes proporções de substratos e pH para seleção de genótipos resistentes**

---

## **Esporulação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* em diferentes proporções de substratos e pH para seleção de genótipos resistentes**

Raoni Andrade Pires<sup>a</sup>; Onildo Nunes de Jesus<sup>b</sup>; Lucas Kennedy Silva Lima<sup>b</sup>;  
Luana Nascimento da Silva<sup>a</sup>; Francisco Ferraz Laranjeira<sup>b\*</sup>

<sup>b</sup>Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, Bahia. Box 007, CEP 44380-000, Brazil.  
E-mail; onildo.nunes@embrapa.br, lucas18kennedy@gmail.com

<sup>a</sup>Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, UFRB, Cruz das Almas, Bahia, CEP 44380-000, Brazil E-mail: piresraoni@gmail.com, luahnascimento@outlook.com

\*Corresponding author e-mail: francisco.laranjeira@embrapa.br

### **Resumo**

Este trabalho teve por objetivo avaliar a esporulação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Fop), em diferentes proporções de solo:fibra de coco e solo:esterco ajustados em diferentes pHs. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, utilizando as proporções de 5:0, 5:2, 5:4, 5:6 (v: v) de solo: esterco bovino, e solo: fibra de coco, cada mistura teve o pH ajustado aos níveis de pH: variando de 4,2 a 8,0 (solo: esterco); e 4,2 a 9,7 (solo: fibra de coco). Por meio de diluições seriadas, plaqueamento e microscopia, foi contabilizada a produção de microconídios, macroconídios, clamidósporos e unidades formadoras de colônias (UFC) aos 3, 7, 14, 21 e 28 dias após a infestação (DAI) dos substratos. Independente da mistura utilizada o número de microconídios foi maior em pH alcalino, e a formação de clamidósporos foi maior nos pHs extremos. A quantidade de macroconídios foi ínfima para a maioria dos tratamentos. A adição de esterco ao solo, ao invés de fibra de coco, permitiu maior produção de esporos de Fop. O uso de solo adicionado a esterco bovino nas proporções 5:4 e 5:6 com pH entre 6,50 e 8,0 foi que favoreceu melhor o desenvolvimento do Fop. Essas misturas e isolado serão utilizados em conjunto futuramente para validar um método de inoculação artificial de Fop para identificação de fontes de resistência no melhoramento genético do maracujazeiro.



**Palavras-chave:** Solo, esterco, fibra de coco, UFC, clamidósporos.

**Sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* in different proportions of substrates and pH for selection of resistant genotypes**

**Abstract**

This study aimed to evaluate the sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Fop), in different soil proportions: coconut fiber and soil: manure adjusted at different pHs. The experiment was conducted in a completely randomized design, using the proportions of 5: 0, 5: 2, 5: 4, 5: 6 (v: v) of soil: bovine manure, and soil: coconut fiber, each mixture had the pH adjusted to pH levels: ranging from 4.2 to 8.0 (soil: manure); and 4.2 to 9.7 (soil: coconut fiber). Through serial dilutions, plating and microscopy, the production of microconidia, macroconidia, chlamydo spores and colony forming units (CFU) at 3, 7, 14, 21 and 28 days after infestation (DAI) of the substrates was counted. Regardless of the mixture used, the number of microconidia was higher in alkaline pH, and the formation of chlamydo spores was higher in extreme pHs. The amount of macroconidia was negligible for most treatments. The addition of manure to the soil, instead of coconut fiber, allowed greater production of Fop spores. The use of soil added to bovine manure in the proportions 5: 4 and 5: 6 with pH between 6.50 and 8.0 was the one that favored the development of Fop better. These mixtures and isolates will be used together in the future to validate a method of artificial Fop inoculation to identify sources of resistance in the genetic improvement of passion fruit.

**Keyword:** Soil, manure, coconut fiber, UFC, conidia, chlamydo spores.

**Introdução**

O complexo de espécies de *Fusarium oxysporum* é capaz de sobreviver no solo por prolongados períodos por meio dos clamidósporos e, na ausência do hospedeiro, o patógeno sobrevive na matéria orgânica do solo (Gordon, 2017). Quando esses microrganismos parasitam seu hospedeiro, o fungo penetra as

raízes e provoca o colapso do xilema, resultando em murcha da parte aérea (Fischer e Rezende, 2008; Gordon, 2017).

A espécie *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* Gordon (Fop), causa a fusariose do maracujazeiro, considerada uma das principais doenças que acometem o maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims) (Oliveira et al., 2013). As plantas infectadas por Fop têm sua vida útil reduzida para um ano, enquanto plantas saudáveis podem permanecer produtivas por até seis anos (Pinheiro et al., 2016; Lima et al., 2019).

O controle do Fop é complexo, pois a aplicação de defensivos agrícolas apresenta baixa eficiência. O uso de agentes de controle biológico como *Trichoderma* spp. não resulta na supressão da doença, devido a influência de fatores ambientais (Fischer et al., 2010). A utilização de mudas de *P. edulis* enxertadas em espécies silvestres de *Passiflora* resistentes tem resultado em uma maior sobrevivência das plantas em áreas infestadas por Fop. Porém, esta prática resulta em redução no vigor vegetativo e produtivo das plantas (Santos et al., 2016; Lima et al., 2018).

Ainda são escassas as espécies do gênero *Passiflora* identificados como resistentes à fusariose. Em sua maioria, as avaliações são conduzidas em condições de campo o que dificulta a seleção precoce de genótipos resistentes para subsidiar os programas de melhoramento genético da espécie (Santos et al., 2016; Lima et al., 2018; Pereira et al., 2019). A metodologia de inoculação artificial de Fop ainda não foi validada. Em condições de casa de vegetação os resultados não são satisfatórios, devido à baixa repetibilidade e confiabilidade da técnica na seleção de genótipos resistentes (Silva et al., 2013; Flores e Bruckner, 2014; Lima et al., 2019).

Dentre os fatores que favorecem a incidência da fusariose, pode-se citar a quantidade e o tipo de matéria orgânica no solo, e o pH do solo (Orr e Nelson, 2018). A decomposição da matéria orgânica fornece energia para a sobrevivência do patógeno, e o pH é um potente regulador de crescimento e esporulação (Fernandes et al., 2017). Contudo, essas informações até então foram pouco exploradas na interação *Fop* x *P. edulis*, podendo estar entre os

fatores limitantes para o estabelecimento de protocolos de inoculação e seleção precoce de genótipos resistentes ao Fop.

A correção da acidez do solo tem reduzido a incidência de *F. oxysporum* em diferentes hospedeiros vegetais (Orr e Nelson, 2018). *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* difere das demais *forma speciales* (f. sp.), e aparentemente, se beneficia de solos com pH > 8,0. Níveis alcalinos de pH do solo favorecem a incidência da fusariose do maracujazeiro na principal região produtora de maracujá amarelo no estado da Bahia (Pinheiro et al., 2016). Demonstrou-se em cultivo *in vitro* de Fop que pH alcalino favorece seu crescimento micelial e a expansão de suas colônias (Lima, 2016). Portanto, estudos buscando maior compreensão da atividade de Fop no solo em função de diferentes faixas de pH são necessários não apenas para melhor compreensão, mas também para subsidiar estratégias de manejo e método efetivo de inoculação em casa de vegetação.

Os estudos de inoculação não têm considerado a importância do substrato e pH para a incidência da fusariose do maracujazeiro. No entanto, é fundamental ajustar esses componentes para produção de maior número de estruturas infectivas de Fop, e assim antecipar a manifestação de sintomas em genótipos de *Passiflora* susceptíveis. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um substrato favorável à esporulação de Fop, com base na seleção de uma fonte de matéria orgânica, e sua proporção, considerando ainda o pH ideal para a multiplicação do patógeno visando adequar as condições para maior eficiente das inoculações artificiais.

## **Materiais e Métodos**

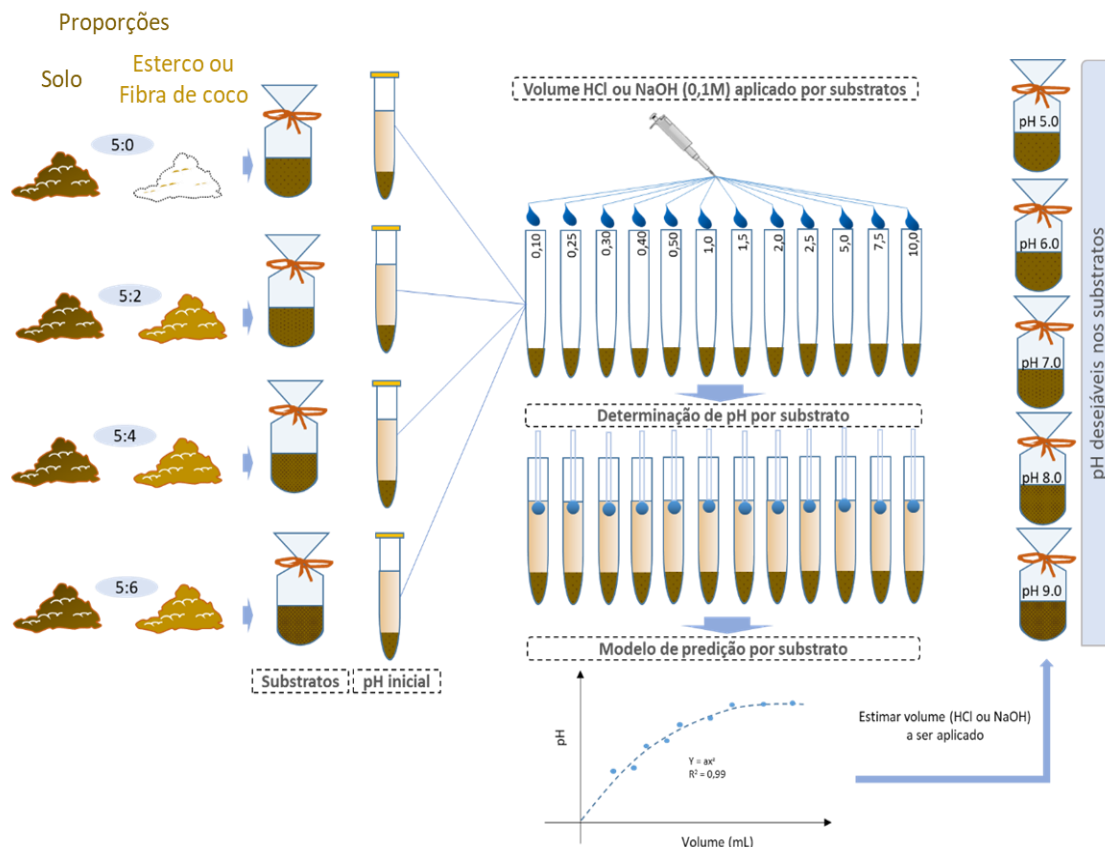
### ***Produção das diferentes misturas de substratos para inoculação com Fop***

Os substratos foram compostos por combinações de solo e esterco, ou solo e fibra de coco, nas proporções: 5:0; 5:2; 5:4; 5:6 (v: v). O solo foi oriundo de uma área para produção de maracujá com histórico de ocorrência de fusariose, sendo classificado como LATOSSOLO AMARELO Distrófico álico. Para coleta do solo a camada de serapilheira foi removida, e o solo recolhido encontrava-se na faixa de 0-20 cm de profundidade.

O esterco utilizado no experimento foi do tipo bovino, e a fibra de coco utilizada foi o produto Golden Mix 47<sup>®</sup>. Os componentes dos substratos foram peneirados com peneira de crivo de 2 mm, e em seguida o solo foi misturado ao esterco, ou à fibra de coco, nas proporções citadas. O pH inicial das diferentes proporções de substratos foi quantificado em água com auxílio de um pHmetro (pH21 Hanna Instruments<sup>®</sup>). Para isso, utilizou-se a metodologia de análise de solo descrita por Teixeira et al. (2017).

#### ***Ajuste do pH dos substratos avaliados***

Os substratos tiveram seu pH ajustado para as seguintes faixas 4,2-5,0; 5,1-6,0; 6,1-7,0; 7,1-8,0 (solo: esterco), e 4,2-5,0; 5,1-6,0; 6,1-7,0; 7,1-8,0; 8,1-9,0; 9,1-9,7 (solo: fibra de coco). O ajuste foi realizado utilizando modelo de regressão, a fim de prever o volume de ácido (HCl) ou base (NaOH) a ser adicionado às diferentes proporções de solo: esterco, ou solo: fibra de coco (Figura 1). Para evitar diferenças marcantes na umidade dos substratos, um volume final de 90 mL de solução (ácida ou básica) foi estabelecido, para ser adicionado em cada 300 mL substrato, com intuito de umedecer os substratos igualmente. Quando o volume de ácido ou base se encontrava abaixo do limite estabelecido, água deionizada foi adicionada. Após o ajuste de pH, o volume de 300 mL de cada substrato foi distribuído em sacos de polietileno de alta densidade, e autoclavados a 121 °C pelo período de 30 minutos, repetindo-se o processo após 24 horas. Posteriormente, a infestação dos substratos foi realizada.



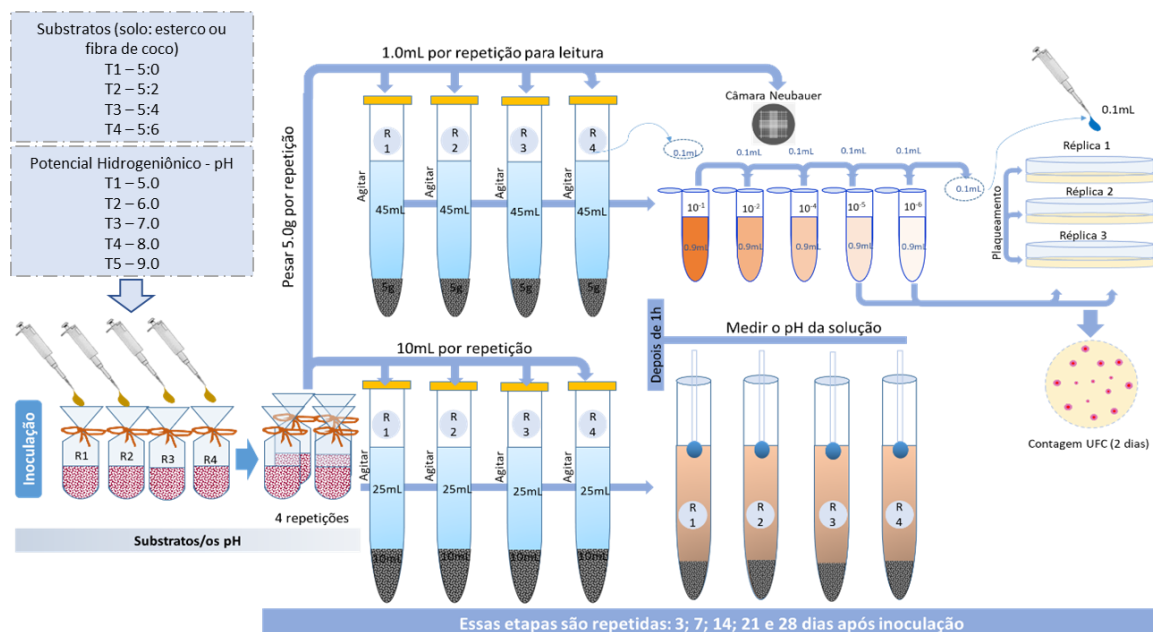
**Figura 1.** Obtenção de equações de predição para cálculo do volume de NaOH ou HCl a ser adicionado às diferentes proporções (solo: esterco, ou solo: fibra de coco) visando à obtenção do pH desejado nos substratos. Ilustração: Onildo Nunes de Jesus

### **Cultivo de *F. oxysporum f. sp. passiflorae* e infestação dos substratos**

O isolado CMF – 3115 *F. oxysporum f. sp. passiflorae* da micoteca da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas – BA, foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), a 25 °C, fotoperíodo de 12 horas, por 11 dias. Após o período de incubação, 20 mL de água destilada estéril (ADE) foi adicionada à placa, e em seguida o micélio foi raspado com auxílio de alça de Drigalski. Posteriormente, a suspensão de micélio e ADE foi filtrada com gaze estéril, e a concentração de conídios foi quantificada por microscopia com auxílio de câmara de Neubauer. Os substratos foram infestados pela adição da suspensão de esporos para obtenção de densidade final de  $10^5$  conídios por mililitro de substrato. Aos controles, água destilada estéril foi adicionada (Figura 2).

***Avaliação da esporulação de Fop***

O número de unidades formadoras de colônias (UFC), microconídios, macroconídios e clamidósporos produzidos nos substratos, foram avaliados aos 3, 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação (DAI) (Figura 2). Para avaliação do número de UFC, aplicou-se a técnica de diluição seriada e plaqueamento (Yan et al., 2015). O número de UFC foi contado dois dias após plaqueamento. Para diferenciar as estruturas de Fop e partículas do substrato, durante a diluição seriada, 1,0 mL da diluição  $10^{-1}$  foi recolhido em microtubo, acrescentando-se 200 $\mu$ L de solução de azul de Trypan (87,5 mL de ácido láctico; 6,3 mL de glicerol; 0,1 g de azul de Trypan; e 6,2 mL de água destilada). Esse procedimento otimizou a contagem de microconídios, macroconídios, e clamidósporos utilizando câmara de Neubauer e microscópio (LEICA® 550M com câmera LEICA® ICC50E acoplada).



**Figura 2.** Metodologias adotadas para estimar pH, contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e estruturas do fungo nos diferentes substratos e pH nas avaliações realizadas aos 3; 7, 14; 21 e 28 dias após a infestação nas diferentes proporções de substratos. Ilustração: Onildo Nunes de Jesus

### **Análise experimental dos dados**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 4 x 5 sendo quatro proporções de solo e esterco ou solo e fibra de coco avaliados em quatro faixas de pH variando do ácido ao alcalino avaliados aos 3, 7, 14, 21 e 28 dias após infestação, distribuídos em quatro repetições por tratamento. Cada tratamento consistiu de uma mistura de solo e esterco, ou solo e fibra de coco, em diferentes faixas de pH, e um tratamento controle não infestado foi utilizado para cada substrato. A produção de esporos em cada proporção de solo: esterco, ou solo: fibra foi comparada utilizando o teste Tukey (5%). A influência do pH na produção de esporos de *Fop* foi avaliada pela análise de regressão. As análises foram realizadas utilizando o software R (R Development, 2016).

## Resultados

### ***Esporulação de Fop no substrato solo: esterco bovino***

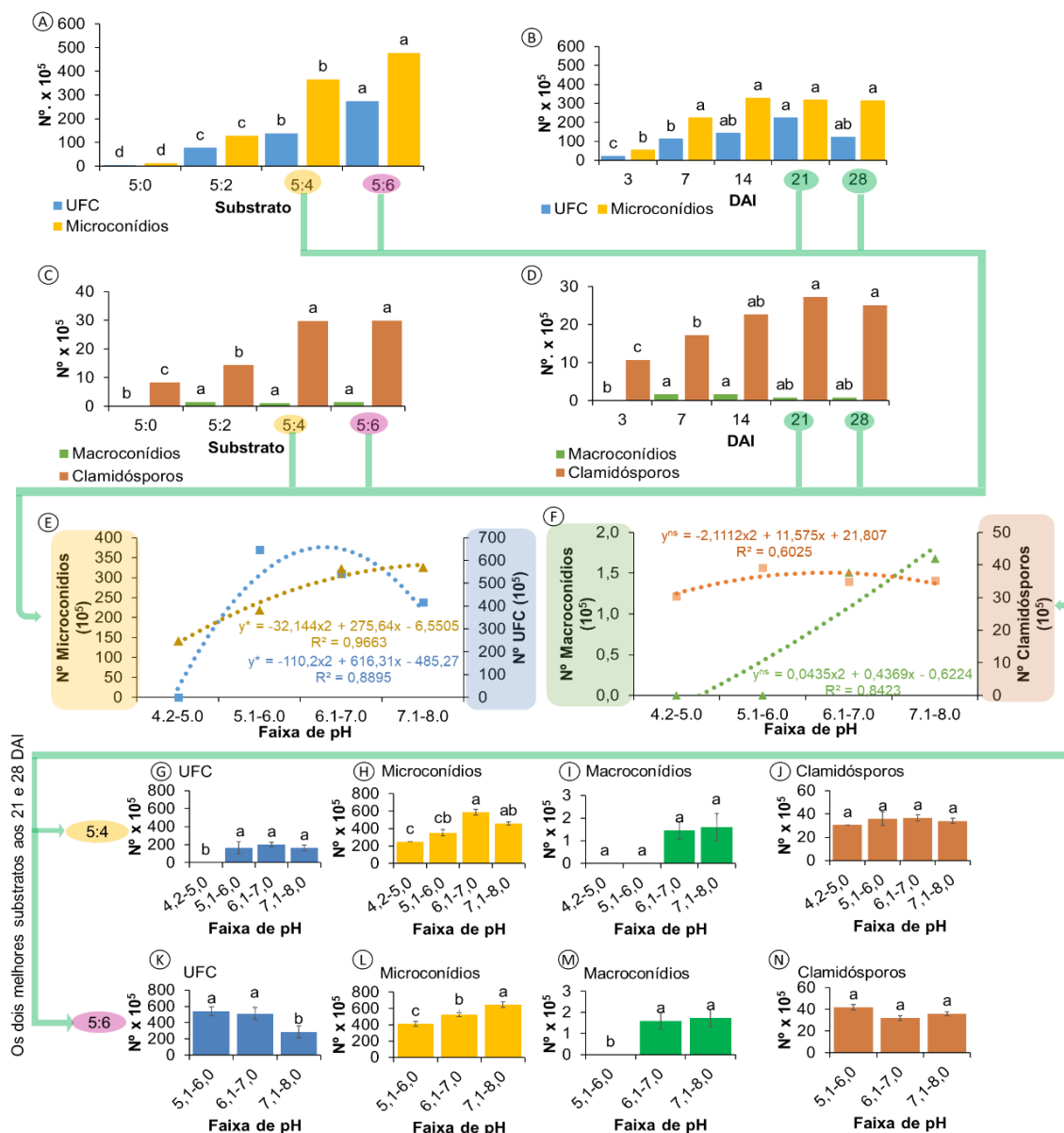
A mistura com a maior dose de esterco (5:6), proporcionou os maiores números de unidade formadora de colônias (UFC) e microconídios (Figura 3a). A segunda maior proporção de esterco (5:4), foi semelhante à proporção 5:6 para formação de macroconídios e clamidósporos (Figura 3c). A produção de microconídios estabilizou-se a partir do sétimo dia após infestação do substrato, enquanto a UFC registrou pico aos 21 DAI, não diferindo dos 14 e 28 DAI (Figura 3b).

O número de macroconídios foi pouco afetado ao longo do período de avaliação. O número de clamidósporos foi incrementado gradativamente com estabilização aos 14 DAI não diferindo das avaliações realizadas aos 7, 21 e 28 DAI (Figura 3d).

A análise de regressão realizada com a média dos caracteres obtidos nos substratos 5:4 e 5:6 aos 21 e 28 DAI, aponta uma tendência para o acúmulo de microconídios com elevação de pH. Já o ajuste do modelo para UFC foi quadrático com pico próximo ao pH 6,0 (Figura 3e). Para o número de macroconídios e clamidósporos, não houve ajuste aos modelos de regressão testados (Figura 3f).

As avaliações realizadas com os dois melhores substratos (5:4; 5:6) considerando os valores de 21 e 28 DAI em função das faixas de pH, apontam para uma baixa relação do pH do substrato com a atividade do Fop, com ressalva para a produção de microconídios que foi maior na faixa neutra e alcalina do pH (Figura 3g-n).





**Figura 3.** Quantidade de propágulos produzidos por *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* nos diferentes substratos (solo: esterco). (a) e (c) Quantidade de UFC, macro, microconídios, e clamidósporos nas proporções solo: esterco. (b) e (d) Tempo necessário para formação dos propágulos. (e) e (f) Regressão polinomial de propágulos em função das faixas de pH. (g), (h), (i) e (j) Estruturas avaliadas nas diferentes faixas de pH do substrato 5:4. (k), (l), (m) e (n) Estruturas avaliadas nas diferentes faixas de pH do substrato 5:6. Barras seguidas de mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste Tukey (5%).

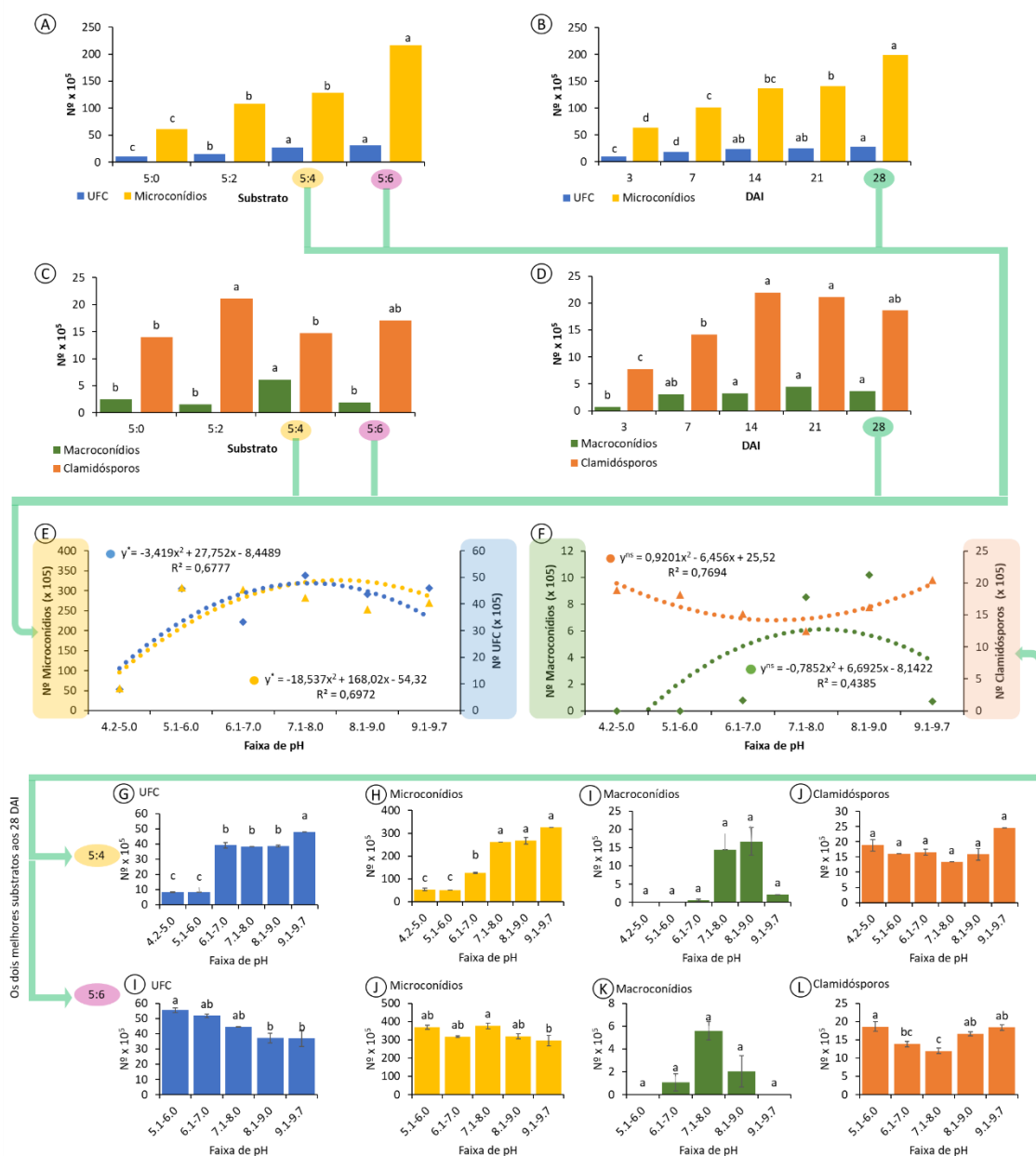
***Esporulação de Fop no substrato solo: fibra de coco***

As análises realizadas considerando a fibra de coco como fonte de matéria orgânica apresentaram respostas variadas entre as proporções de fibra e solo. O número de unidades formadoras de colônias foi semelhante entre as proporções 5:4 e 5:6, já o número de microconídios foi 40% superior na proporção 5:6 em relação a proporção 5:4 (Figura 4a). O número de clamidósporos foi maior na proporção 5:2, sendo semelhante à proporção 5:6. Foi registrado maior valor médio de número de macroconídios na proporção 5:4 (Figura 4c), sendo observada baixa variação com valores inferiores aos 3 DAI, os demais períodos de avaliação não diferiram entre si (Figura 4d)

Foi verificada estabilidade no número de UFC e clamidósporos a partir dos 14 DAI. Já em relação ao número de microconídios, o pico foi registrado ao 28 DAI, enquanto a produção de macroconídios foi estável ao longo do tempo, com variação apenas aos 3 DAI (Figura 4b, d).

O modelo quadrático de regressão polinomial foi o que apresentou melhor ajuste para os dados de produção de UFC e microconídios nas proporções 5:4 e 5:6 (solo: fibra de coco) aos 28 DAI. Isso indica existir uma tendência de maior produção dessas estruturas nas faixas de pH variando de 6,1 a 9,0. Já para a produção de macroconídios e clamidósporos não houve ajuste aos modelos de regressão propostos (Figura 4e, f).

As produções de unidades formadoras de colônia (UFC) de e microconídios na proporção 5:4 foram influenciadas positivamente pelo pH neutro e alcalino, enquanto as produções de macroconídios e clamidósporos não foram influenciadas pelo pH do substrato (Figura 4g-j). Na proporção 5:6 a resposta foi variada, com alta produção de UFC, microconídios e clamidósporos na faixa de pH variado do ácido ao alcalino, enquanto o número de macroconídios não foi afetado (Figura 4i-l).



**Figura 4.** Quantidade de propágulos produzidos por *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* nos diferentes substratos (solo: fibra de coco). (a) e (c) Quantidade de UFC, macro, microconídios, e clamidósporos nas proporções solo: esterco. (b) e (d) Tempo necessário para formação dos propágulos. (e) e (f) Regressão polinomial de propágulos em função das faixas de pH. (g), (h), (i) e (j) Estruturas avaliadas nas diferentes faixas de pH do substrato 5:4. (k), (l), (m) e (n) Estruturas avaliadas nas diferentes faixas de pH do substrato 5:6. Barras seguidas de mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste Tukey (5%).

## Discussão

São escassos os estudos que buscam compreender a interação entre Fop e as proporções de matéria orgânica do substrato, assim como o seu potencial na produção de estruturas infectivas associadas à manifestação de sintomas de murcha em genótipos de *Passiflora*. Contudo, a maior compreensão dessa interação pode subsidiar ações de manejo e uma maior eficiência do método de inoculação para avaliação e identificação precoce de fontes resistência ao Fop em apoio a programas de melhoramento.

As variações para os valores de UFC, microconídios, macroconídios e clamidósporos nas diferentes concentrações de solo: esterco ou solo: fibra de coco, podem estar relacionadas aos teores de nutrientes presentes nestes compostos orgânicos. Segundo Maitlo et al. (2017), diferentes composições de meios de cultura propiciam alterações na quantidade, e nos tipos de esporos produzidos por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, além de afetar seu crescimento micelial, podendo portanto, exercer efeito variado na severidade do patógeno a depender do substrato utilizado para inoculação.

A diferença entre a quantidade de microconídios e macroconídios encontradas neste trabalho é similar a reportada por Maitlo et al. (2017), em que o número de microconídios foi superior ao de macroconídios, em todos os tratamentos.

Além do substrato, o pH exerce forte influência na disponibilidade, dissociação e mobilização de nutrientes no substrato. Conforme Orr e Nelson (2018), elementos como Fe, Mn e Zn se tornam insolúveis com a elevação do pH, e influenciam o crescimento e a esporulação de *Fusarium* sp. (Gatch e du Toit, 2012). A quantidade de enzimas produzidas pelo Fop pode ter sido influenciada pelo pH, uma vez que dentro das diferentes faixas de pH em um mesmo substrato a produção de células de Fop sofreu alteração. Para obtenção de energia, esse fungo libera enzimas específicas para a degradação do substrato. Além disso, sob diferentes níveis de pH *F. oxysporum* pode alterar a quantidade secretada de lipases, pectinases, xilanase e peptidases (Da Rosa-Garzon et al., 2017).

Neste trabalho, foi verificado que a esporulação de Fop é mais influenciada pelo tipo e a proporção de matéria orgânica utilizada do que pela acidez ou alcalinidade do substrato. A regressão dos substratos solo: esterco apontam uma tendência para maior produção de UFC na faixa de pH de 6,1 a 7,0. Diferentemente, no substrato solo: fibra de coco a produção de UFC foi favorecida por pH mais altos (7,1-8,0). Independente da fonte de matéria orgânica (solo ou esterco), a produção de microconídios foi favorecida por pH alcalino, corroborando com os resultados obtidos por Pinheiro (2015). Entretanto, a viabilidade desse esporo nestas condições não foi averiguada.

A influência do pH sobre *F. oxysporum* ainda apresenta controvérsias em função do tipo de solo utilizado nos ensaios e a variabilidade entre os isolados estudados (Huang et al., 2012; Cao et al., 2016; Orr e Nelson, 2018). Solos alcalinos do Arizona são condúctivos à murcha provocada por *F. oxysporum* em alface (Matheron e Koike, 2003). Por outro lado, o aumento do pH do solo, utilizando calcário como corretivo, tem suprimido a murcha provocada por *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae* (Gatch e Du Toit, 2017).

Neste trabalho, observou-se que o Fop foi capaz de esporular em níveis de pH ácidos e alcalinos, evidenciando a capacidade adaptativa deste fungo ao ambiente. Experimentos realizados por Pinheiro et al. (2016) apontam que valores alcalinos de pH estão relacionados com elevada incidência de fusariose no maracujazeiro em campo. Além disso, o crescimento micelial de Fop foi maior em níveis de pH alcalinos, em comparação a níveis mais ácidos do pH. Segundo Lima (2016), a microdisseminação de Fop é favorecida por níveis alcalinos de pH, podendo, portanto, contribuir com a eficiência de inoculação e surgimento de sintomas em genótipos susceptíveis de *Passiflora*.

Neste estudo, produção de clamidósporos não foi influenciada pelo pH quando esterco foi utilizado. Entretanto, ao se usar a maior proporção de fibra de coco ao solo (5:6) a produção de clamidósporos sofreu influência do pH. O pH do substrato é capaz de influenciar o pH intracelular de espécies de *F. oxysporum* e a regulação da expressão gênica (Caracuel et al., 2003).

Os efeitos do pH ambiental também se estendem à capacidade de *F. oxysporum* em causar doença em plantas. Segundo Masachis et al, (2016) no

início da infecção fungos *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* é capaz de secretar compostos alcalinos com objetivo de elevar o pH extracelular, promovendo o crescimento de hifas invasivas e virulência.

Os esporos produzidos por Fop, nos tratamentos com adição de esterco bovino foram superiores aos substratos que receberam fibra de coco: 98% para UFC, 48% para microconídios, e 13% para clamidósporos. Porém, a fibra de coco produziu 65% mais macroconídios. Assim, a utilização de esterco bovino nos substratos se mostrou mais eficiente na produção de estruturas infectivas. Além disso, esse substrato demonstrou estabilidade na manutenção dos esporos ao longo do tempo, o que pode ser vantajoso em relação a substratos constituídos apenas por areia lavada (Lima et al., 2019) em que o teor de matéria orgânica é muito baixo, contribuindo com a redução da concentração do inóculo ao longo do tempo.

Neste estudo verificou-se que as proporções de solo e esterco, e solo e fibra de coco, forneceram condições para que Fop atingisse a concentração de  $10^6$  esporos por grama de substrato que é a concentração recomendada em testes de patogenicidade para *F. oxysporum* (Ortiz et al., 2014; Ortiz e Hoyos-Carvajal, 2016; Garcia et al., 2019). Porém, o tempo necessário para que Fop atingisse essa concentração variou entre as misturas.

Com base nos resultados obtidos pode-se considerar as UFC como o parâmetro mais indicado para seleção de um substrato a ser utilizado na inoculação artificial de Fop. Representa, indiretamente, a viabilidade das estruturas do patógeno, embora estudos da interação planta patógeno devam ser realizados, já que a presença do hospedeiro pode favorecer a germinação de clamidósporos. Deste modo sugere-se que os substratos nas proporções 5:6 e 5:4 (solo: esterco) com faixa de pH entre 6,50 e 8,0 sejam testadas para a inoculação artificial de Fop, visando aumentar a eficácia do método de inoculação. Com isso, os programas de melhoramento genético podem avançar na identificação e seleção de genótipos promissores ao desenvolvimento de cultivares de maracujá amarelo com resistência ao Fop.

## Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado a Raoni Andrade Pires, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de pós-doutorado júnior a Lucas Kennedy Silva Lima (L.K.S.L - PDJ 152109/2019-6) e apoio financeiro (Processo 421033/2018-5) e das bolsas de produtividade em pesquisa (PQ) à Francisco Ferraz Laranjeira (F.F.L PQ309895/2016-2) e Onildo Nunes de Jesus (O.N.J. - PQ312774/2018-4); à Embrapa Mandioca e Fruticultura, pela permissão do uso das instalações.

## Referências

- CAO, Y.; WANG, J. WU, H.; YAN, S.; GUO, D.; WANG, G.; MA, Y. Soil chemical and microbial responses to biogas slurry amendment and its effect on *Fusarium* wilt suppression. **Applied Soil Ecology**, v. 107, p. 116-123, 2016.
- CARACUEL, Z.; CASANOVA, C.; RONCERO, M. I. G.; DI PIETRO, A.; RAMOS, J. pH response transcription factor PacC controls salt stress tolerance and expression of the P-Type Na<sup>+</sup>-ATPase Ena1 in *Fusarium oxysporum*. **Eukaryotic cell**, v. 2, n. 6, p. 1246-1252, 2003.
- DA ROSA-GARZON, N. G.; LAURE, H. J.; SOUZA-MOTTA, C. M. D.; ROSA, J. C.; CABRAL, H. Medium pH in submerged cultivation modulates differences in the intracellular protein profile of *Fusarium oxysporum*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 7, p. 664-672, 2017.
- FERNANDES, T. R.; SEGORBE, D.; PRUSKY, D.; DI PIETRO, A. How alkalization drives fungal pathogenicity. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 11, p. e1006621, 2017.
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P., NOGUEIRA, D. A.; FERREIRA, M. E. B. Package 'ExpDes. pt'. *Cran R* 2013
- FISCHER, I. H.; ALMEIDA, A. D.; FILETI, M. D. S.; BERTANI, R. D. A.; ARRUDA, M. D.; BUENO, C. J. Avaliação de passifloraceas, fungicidas e *Trichoderma* para o manejo da podridão-do-colo do maracujazeiro, causada por *Nectria haematococca*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 709-717, 2010.

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

FLORES, P. S.; BRUCKNER, C. H. Raios gama na sobrevivência de plantas de maracujazeiro amarelo inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*. **Ciência Rural**, v. 44, n. 4, p. 639-644, 2014.

GARCIA, E.; PAIVA, D.; COSTA, J.; PORTUGAL, A.; ARES YEBRA, A. First Report of Fusarium Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* on Passion Fruit in Portugal. **Plant Disease**, n. ja, 2019.

GATCH, E. W.; DU TOIT, L. J. Effects of micronutrients on *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* and limestone-mediated suppression of spinach Fusarium wilt. In: Abstr.) **Phytopathology**. 2012. p. S4.

GATCH, E. W.; DU TOIT, L. J. Limestone-mediated suppression of Fusarium wilt in spinach seed crops. **Plant disease**, v. 101, n. 1, p. 81-94, 2017.

GORDON, T. R. *Fusarium oxysporum* and the Fusarium wilt syndrome. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, p. 23-39, 2017.

LIMA, G. S. **Modelagem da microdisseminação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* em ambientes heterogêneos simulados**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). 72f. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, Cruz das Almas, 2016.

LIMA, L. K. S.; de JESUS, O. N.; SOARES, T. L.; de OLIVEIRA, S. A. S.; HADDAD, F.; GIRARDI, E. A. Water deficit increases the susceptibility of yellow passion fruit seedlings to Fusarium wilt in controlled conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 243, p. 609-621, 2019.

LIMA, L. K.; SANTOS, I. S.; GONCALVES, Z. S.; SOARES, T. L.; JESUS, O. N.; GIRARDI, E. A. Grafting height does not affect Fusarium wilt control or horticultural performance of *Passiflora gibertii* NE Br. rootstock. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n. AHEAD, 2018.

MAITLO, S.; RAJPUT, A.; SYED, R.; KHANZADA, M.; RAJPUT, N.; LODHI, A. Influence of physiological factors on vegetative growth and sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. **Pak J Bot**, v. 49, p. 311-316, 2017.

MASACHIS, S.; SEGORBE, D.; TURRÀ, D.; LEON-RUIZ, M.; FÜRST, U.; EL GHALID, M.; LEONARD, G.; LÓPEZ-BERGES, M. S.; RICHARDS, T. A.; FELIX,



G.; DI PIETRO, A. A fungal pathogen secretes plant alkalizing peptides to increase infection. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 6, p. 1-9, 2016.

MATHERON, M. E.; KOIKE, S. T. First report of Fusarium wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in Arizona. **Plant Disease**, v. 87, n. 10, p. 1265-1265, 2003.

OHARA, T.; INOUE, I.; NAMIKI, F.; KUNOH, H.; TSUGE, T. REN1 is required for development of microconidia and macroconidia, but not of chlamydospores, in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. **Genetics**, v. 166, n. 1, p. 113-124, 2004.

OLIVEIRA, E. J. D.; SOARES, T. L.; BARBOSA, C. D. J.; SANTOS-FILHO, H. P.; JESUS, O. N. D. Severidade de doenças em maracujazeiro para identificação de fontes de resistência em condições de campo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 35(2), 485-492, 2013.

ORR, R.; NELSON, P. N. Impacts of soil abiotic attributes on Fusarium wilt, focusing on bananas. **Applied Soil Ecology**, v. 132, p. 20-33, 2018.

ORTIZ, E.; CRUZ, M.; MELGAREJO, L. M.; MARQUÍNEZ, X.; HOYOS-CARVAJAL, L. Histopathological features of infections caused by *Fusarium oxysporum* and *F. solani* in purple passionfruit plants (*Passiflora edulis* Sims). **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 40, n. 2, p. 134-140, 2014 .

ORTIZ, E.; HOYOS-CARVAJAL, L. Standard methods for inoculations of *F. oxysporum* and *F. solani* in *Passiflora*. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 17, p. 1569-1575, 2016.

PEREIRA, P. P. A.; LIMA, L. K. S.; SOARES, T. L.; LARANJEIRA, F. F.; de JESUS, O. N.; GIRARDI, E. A. Initial vegetative growth and survival analysis for the assessment of Fusarium wilt resistance in *Passiflora* spp. **Crop Protection**, 121, 195-203. 2019.

PINHEIRO, G. S. **Modelagem do risco de fatores abióticos à fusariose do maracujá e à sobrevivência do agente causal**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). 75f. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, Cruz das Almas, 2015.

PINHEIRO, G. S.; CAJUHI, L. F.; de SOUZA GUIMARÃES, Â. L.; ROSA, R. C. C.; LARANJEIRA, F. F. Identificação e modelagem do risco de fatores químicos

e físicos à incidência da fusariose do maracujazeiro na Bahia. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 9, n. 04, p. 1168-1182, 2016.

SANTOS, C. H. B.; OLIVEIRA, E. J. D.; LARANJEIRA, F. F.; JESUS, O. N. D.; GIRARDI, E. A. Growth, fruit set, and fusariosis reaction of yellow passion fruit grafted onto *Passiflora* spp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 38, n. 3, 2016.

SILVA, A. D. S.; OLIVEIRA, E. J. D.; HADDAD, F.; LARANJEIRA, F. F.; JESUS, O. N. D.; OLIVEIRA, S. A. S. D.; COSTA, M. A. P. de C.; FREITAS, J. P. X. Identification of passion fruit genotypes resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 3, p. 236-242, 2013.

TEIXEIRA, P. C.; DONAGEMMA, G. K.; FONTANA, A; TEIXEIRA, W. G. (2017) - **Manual de métodos de análise do solo**. 3. ed. Brasília: Embrapa, 573 p.

YAN, Y.; KURAMAE, E. E.; KLINKHAMER, P. G.; van VEEN, J. A. Revisiting the dilution procedure used to manipulate microbial biodiversity in terrestrial systems. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 81, n. 13, p. 4246-4252, 2015.

R Development Core Team. 2016. **R: A language and environment for statistical computing**, Vienna: R Foundation for statistical computing, 2016. Available in:<<https://cran.r-project.org/>>. Access in: June, 20, 2016.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi possível identificar que a agressividade dos isolados e o tipo de substrato tem efeito na incidência de murcha causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* e também no desenvolvimento de estruturas infectivas desse fungo.

A agressividade de isolados de Fop é decorrente da sua produção de toxinas, e a seleção de isolados com maior potencial de causar mortalidade em plantas de maracujazeiro pode ajudar na seleção rápida de genótipos com resistência ao Fop.

A utilização de esterco como fonte de matéria orgânica em substratos para inoculação de Fop foi benéfica ao patógeno, podendo também fornecer elementos nutricionais à planta. O pH ambiental parece influenciar o desenvolvimento do patógeno, porém mais estudos sobre esse fator são necessários para que seja possível afirmar sua influência na interação *Passiflora*-Fop. Além disso, novos estudos são necessários visando identificar as toxinas produzidas por Fop, e assim ajudar no entendimento do seu modo de ação em *Passiflora* spp.

---

**Anexo: Normas de Submissão do European Journal of Plant  
Pathology**

---

## Sequences

Sequences must be deposited in the GenBank, full alignment of datasets must be submitted to the TreeBASE and a Mycobank number must be added for new species and taxonomic changes.

Please submit Sequences as Electronic Supplementary Material at reviewing stage.

## Types of papers

All contributions should be submitted in English and are subject to peer reviewing.

Research papers describing original research should address biological problems. They should contain a novel and well formulated hypothesis, a sound experimental approach, results that confirm or reject the hypothesis and they should offer novel insight into the existing body of knowledge. Research papers should not exceed twenty pages of printed text, including tables, figures and references (one page of printed text = approximately 600 words).

The Short communication format is intended for presentation of important observations that can be clearly described in an abbreviated format. For example, molecular data useful for typing pathogens or the first report of preliminary data would be suitable for this section.

Short descriptions of genes isolated from pathogens and pest organisms, and of plant genes with a putative function in plant– pathogen interactions can also be presented in the Short communication format. Short communications should contain firm data and will be refereed. A Short communication should have an abstract and should not exceed four printed pages in total. There are no subheadings and a description of Materials and methods should be integrated in the text.

Authors who wish to submit a Mini review should first contact the Editorial Office, since only Mini reviews on topical issues will be considered for publication. Mini reviews should not exceed 12 pages of printed text, including tables, figures, and references.

## Manuscript Submission

### *Manuscript Submission*

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

### *Permissions*

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

### *Online Submission*

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

### *Important notes*

- Upon submission, the **e-mail addresses of all authors** will be requested. At the end of the submission process, the corresponding author will receive an acknowledgement e-mail and all co-authors will be contacted automatically to confirm their affiliation to the submitted work.
- Please note that it is mandatory to use **line numbering** for the manuscript. If a manuscript does not have line numbers it is returned to the author.

### **Title page**

#### *Title Page*

Please use this **template title page** for providing the following information.

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country
- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

### *Abstract*

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

### *For life science journals only (when applicable)*

Trial registration number and date of registration

Trial registration number, date of registration followed by “retrospectively registered”

### *Keywords*

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

### *Declarations*

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations'.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

### *To be used for non-life science journals*

**Funding** (information that explains whether and by whom the research was supported)

**Conflicts of interest/Competing interests** (include appropriate disclosures)

**Availability of data and material** (data transparency)

**Code availability** (software application or custom code)

**Authors' contributions** (optional: please review the submission guidelines from the journal whether statements are mandatory)

### *To be used for life science journals + articles with biological applications*

**Funding** (information that explains whether and by whom the research was supported)

**Conflicts of interest/Competing interests** (include appropriate disclosures)

**Ethics approval** (include appropriate approvals or waivers)

**Consent to participate** (include appropriate statements)

**Consent for publication** (include appropriate statements)

**Availability of data and material** (data transparency)

**Code availability** (software application or custom code)

**Authors' contributions** (optional: please review the submission guidelines from the journal whether statements are mandatory)

Please see the relevant sections in the submission guidelines for further information as well as various examples of wording. Please revise/customize the sample statements according to your own needs.

## **Text**

### *Text Formatting*

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

### *Headings*

Please use no more than three levels of displayed headings.

### *Abbreviations*

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

### *Footnotes*

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference



citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

### *Acknowledgments*

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

## **References**

### *Citation*

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Ideally, the names of six authors should be given before et al. (assuming there are six or more), but names will not be deleted if more than six have been provided.

### *Reference list*

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

Journal names and book titles should be *italicized*.

- Journal article Harris, M., Karper, E., Stacks, G., Hoffman, D., DeNiro, R., Cruz, P., et al. (2001). Writing labs and the Hollywood connection. *Journal of Film Writing*, 44(3), 213–245.
- Article by DOI Slifka, M. K., & Whitton, J. L. (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Journal of Molecular Medicine*, <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- Book Calfee, R. C., & Valencia, R. R. (1991). *APA guide to preparing manuscripts for journal publication*. Washington, DC: American Psychological Association.
- Book chapter O'Neil, J. M., & Egan, J. (1992). Men's and women's gender role journeys: Metaphor for healing, transition, and transformation. In B. R. Wainrib (Ed.), *Gender issues across the life cycle* (pp. 107–123). New York: Springer.
- Online document Abou-Allaban, Y., Dell, M. L., Greenberg, W., Lomax, J., Peteet, J., Torres, M., & Cowell, V. (2006). Religious/spiritual commitments and psychiatric practice. Resource document. American Psychiatric Association. [http://www.psych.org/edu/other\\_res/lib\\_archives/archives/200604.pdf](http://www.psych.org/edu/other_res/lib_archives/archives/200604.pdf). Accessed 25 June 2007.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

## Tables

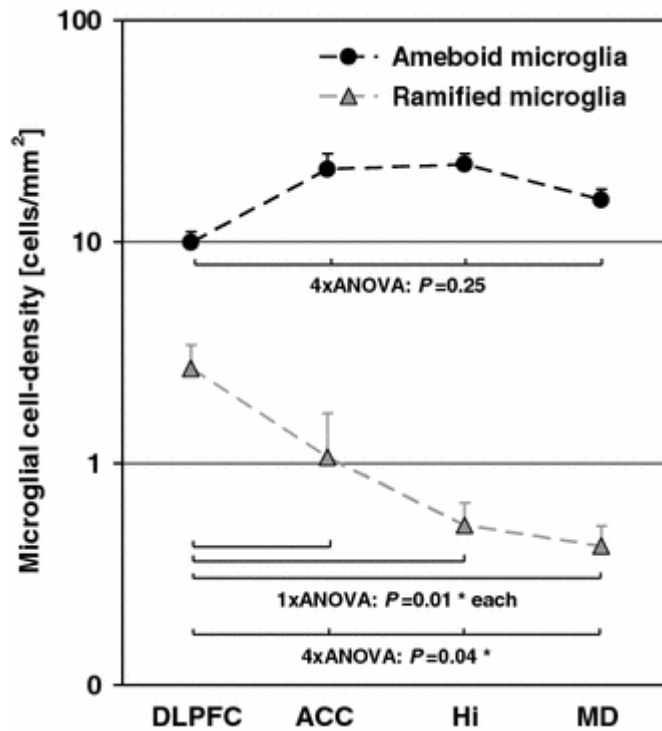
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

## Artwork and Illustrations Guidelines

### *Electronic Figure Submission*

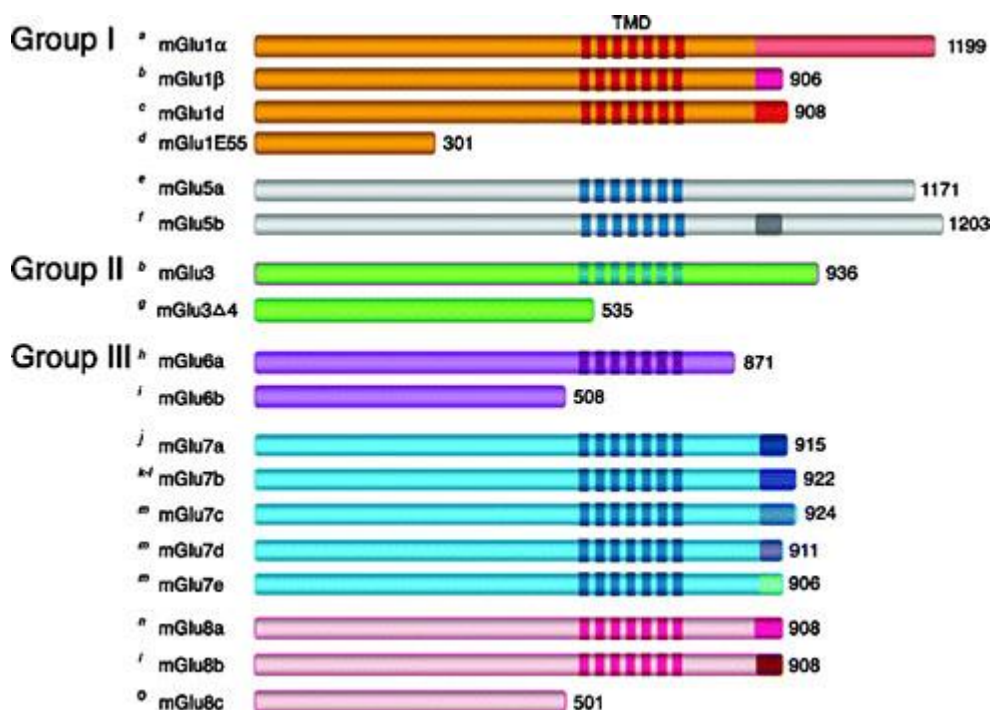
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

## Line Art



- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

### Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

### Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

### Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

### *Figure Numbering*

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices [Supplementary Information (SI)] should, however, be numbered separately.

### *Figure Captions*

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

### *Figure Placement and Size*

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.
- For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

### *Permissions*

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

### *Accessibility*

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1