

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS

MARIA JUSSARA DOS SANTOS DA SILVA

IDENTIFICAÇÃO DE *Fusarium* spp. ASSOCIADAS À MANCHA MARROM DA
PALMA FORRAGEIRA MIÚDA NO NORDESTE DO BRASIL

RIO LARGO – AL

2019

MARIA JUSSARA DOS SANTOS DA SILVA

IDENTIFICAÇÃO DE *Fusarium* spp. ASSOCIADAS À MANCHA MARROM DA
PALMA FORRAGEIRA MIÚDA NO NORDESTE DO BRASIL

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas como requisito para obtenção do grau de Mestre em Proteção de Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima

RIO LARGO – AL

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

S586i

Silva, Maria Jussara dos Santos da.

Identificação de *Fusarium* ssp. associadas a mancha marrom da palma forrageira miúda no Nordeste do Brasil / Maria Jussara dos Santos da Silva. – 2019.

42 f. : il.

Orientador: Gaus Silvestre de Andrade Lima.

Dissertação (mestrado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas. Rio Largo, 2019.

Bibliografia: f. 33-42.

1. *Nopalea cochenillifera*. 2. Palma forrageira - Doenças. 3. *Nectriaceae*. 4. *Árvore* (Filogenia). I. Título.

CDU: 636.085

MARIA JUSSARA DOS SANTOS DA SILVA

IDENTIFICAÇÃO DE *Fusarium* spp. ASSOCIADAS À MANCHA MARROM DA
PALMA FORRAGEIRA MIÚDA NO NORDESTE DO BRASIL

Dissertação submetida ao corpo
docente do Programa de Pós-
Graduação em Proteção de Plantas,
do Centro de Ciências Agrárias da
Universidade Federal de Alagoas.

Gaus Silvestre A. Lima

Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima - Universidade Federal de Alagoas (Orientador)

Banca Examinadora:

Maria de Fátima Silva Muniz

Prof.ª Dr.ª Maria de Fátima Silva Muniz – Universidade Federal de Alagoas

(Examinador Interno)

Jaqueline Figueiredo de O. Costa

Dr.ª Jaqueline Figueiredo de Oliveira Costa

(Examinador externo)

RIO LARGO – AL

2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, acima de tudo, por sempre me guiar em todos os momentos da minha trajetória e por dar-me coragem para enfrentar todos os desafios;

Aos meus pais Jilvan Sebastião e Maria Quitéria pelo amor incondicional, incentivo e apoio em todas as horas;

Ao meu esposo Alex Emanuel por todo incentivo e carinho durante toda essa jornada;

Ao meu orientador Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima, pela oportunidade, confiança, orientação e ensinamentos que foram fundamentais para minha formação. Serei eternamente grata;

Ao Dr. Frederico Monteiro Feijó pela amizade, ensinamentos, orientação e apoio durante toda minha trajetória no mestrado;

A todos do Laboratório de Fitopatologia Molecular pela ajuda mútua e ensinamentos. Em especial a Jackeline Laurentino pela amizade construída durante todos esses anos;

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas CECA-UFAL pelos conhecimentos passados, que contribuíram para a minha formação;

A todos os meus colegas do Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas do CECA-UFAL;

A CAPES pela bolsa de mestrado concedida, o que me permitiu adquirir inúmeros conhecimentos incluindo os fundamentais para a realização desse trabalho;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Obrigada!

RESUMO

A palma forrageira miúda (*Nopalea cochenillifera*) é uma cultura de grande importância para muitos países. No Brasil é mais cultivada na região Nordeste, com maior exploração nos estados da Bahia, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Rio Grande do Norte e Ceará, onde é utilizada principalmente como fonte de alimento para os animais, fornecendo nutrientes e suprimindo suas necessidades hídricas. Com a expansão dessa cultura, muitas doenças passaram a ser observadas, como a mancha marrom que é considerada a mais importante para a cultura. O gênero *Fusarium* é um dos agentes causais, mas até o presente momento nenhuma espécie do gênero foi identificada associadas à doença. Para a correta identificação das espécies pertencentes a esse gênero faz-se necessário o uso de técnicas moleculares, devido à alta taxa de variabilidade genética. Diante do exposto, este estudo teve como objetivo identificar e caracterizar espécies de *Fusarium* associadas à mancha marrom da palma forrageira miúda no Nordeste do Brasil. Para tanto, 26 isolados provenientes dos estados de Alagoas e Pernambuco foram obtidos da Coleção de Cultura de Fitopatógenos da UFAL (COUFAL). Para o correto posicionamento taxonômico dos isolados, foram realizadas análises morfo-culturais e moleculares (filogenias baseadas em sequências nucleotídicas parciais dos genes EF1- α e RPB2). De acordo com as análises morfo-culturais e moleculares foram identificadas seis espécies de *Fusarium* pertencentes a quatro complexos distintos: *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. pseudocircinatum* (*C. fujikuroi*); *F. oxysporum* (*C. oxysporum*); *Fusarium* sp. (*C. incarnatum-equiseti*) e *F. lunatum* (*C. dimerum*). As espécies *F. verticillioides* e *F. lunatum* foram as mais agressivas. Este é o primeiro relato dessas espécies associadas a mancha marrom na palma forrageira miúda no mundo.

Palavras-chaves: *Nopalea cochenillifera*. Doenças da Palma. Nectriaceae. Inferência Bayesiana.

ABSTRACT

The small forage palm (*Nopalea cochenillifera*) is a crop of great importance for many countries. In Brazil, it is more widely cultivated in the Northeast region, with greater exploitation in the states of Bahia, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Rio Grande do Norte and Ceará, where it is mainly used as a food source for animals, providing nutrients and supplying their needs water resources. With the expansion of this culture, many diseases began to be observed, such as the brown spot that is considered the most important for culture. The genus *Fusarium* is one of the causative agents, but to date no species of the genus has been identified associated with the disease. For the correct identification of the species belonging to this genus it is necessary to use molecular techniques, due to the high rate of genetic variability. In view of the above, this study aimed to identify and characterize *Fusarium* species associated with the brown spot of the small forage palm in Northeast Brazil. For this, 26 isolates from the states of Alagoas and Pernambuco were obtained from the Collection of Culture of Phytopathogens of UFAL (COUFAL). For the correct taxonomic positioning of the isolates, morphobacterial and molecular analyzes (phylogenies based on partial nucleotide sequences of the EF1- α and RPB2 genes) were performed. According to morphological and molecular analyzes, six species of *Fusarium* belonging to four different complexes were identified: *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. pseudocircinatum* (C. *fujikuroi*); *F. oxysporum* (C. *oxysporum*); *Fusarium* sp. (C. *incarnatum-equiseti*) and *F. lunatum* (C. *dimerum*). The species *F. verticillioides* and *F. lunatum* were the most aggressive. This is the first report of these species associated with the brown spot on the small forage palm in the world.

Key-words: *Nopalea cochenillifera*. Diseases of the Palm. Nectriaceae. Bayesian Inference.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Árvore filogenética de inferência Bayesiana baseada em sequências concatenadas dos genes EF1- α e RPB2. *Neonectria ramulariae* (CBS_18236) foi utilizada como grupo externo. Os isolados provenientes desse estudo estão marcados em negrito.....p.26
- Figura 2:** **Figura 2:** Características morfoculturais das espécies de *Fusarium*. **AI, BI, CI, DI, EI e FI**- Características das colônias. **AII**- Microconídio em falsa cabeça em monofiálide. **AIII**- Microconídio em cadeia. **BII**- Microconídio em falsa cabeça em monofiálide. **BIII**- Macroconídio e microconídio. **CII**- Microconídio em cadeia. **CIII**- Macroconídio. **DII**- Macroconídio e clamidósporo. **DIII**- Microconídio. **EII**- Macroconídio. **EIII**- Microconídio. **FII**- Microconídio. **FIII**- Clamidósporos.....p.28
- Figura 3:** **Figura 3:** Teste de agressividade realizado com as espécies de *Fusarium* identificadas no presente estudo. **1-** *F. verticillioides* **2-** *F. pseudocircinatum* **3-** *F. proliferatum* **4-** *F. oxysporum* **5-** *Fusarium* sp. **6-** *F. lunatum*, **a,b,c-** Testemunhas.....p.30

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Identificação dos isolados obtidos da COUFAL e suas procedências.....p.21
- Tabela 2:** Descrição dos primers utilizados para identificação das espécies do gênero *Fusarium*.....p.22
- Tabela 3:** Sequências de *Fusarium* spp. obtidas no banco de dados não redundante Genbank.....p.22
- Tabela 4:** Caracterização morfocultural das espécies de *Fusarium* e teste de agressividade.....p.29

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Cultura da Palma forrageira.....	12
2.1.1 Taxonomia e origem.....	12
2.1.2 Descrição botânica e fisiológica	12
2.1.3 Importância socioeconômica	14
2.1.4 Aspectos fitossanitários da cultura	14
2.2 Gênero <i>Fusarium</i>	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Obtenção dos Isolados.....	21
3.2 Caracterização molecular	21
3.3 Caracterização morfocultural.....	23
3.4 Teste de Agressividade.....	24
4. RESULTADOS	25
4.1 Caracterização molecular	25
4.2 Caracterização Morfocultural.....	27
4.3 Teste de Agressividade.....	30
5. DISCUSSÃO.....	30
6. CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, mais especificamente na região Nordeste, a palma forrageira (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck e *Opuntia ficus-indica* L.) é plantada quase que exclusivamente para a alimentação animal, principalmente nos longos períodos de estiagem (VICTOR et al., 2017). Sua produção gira em torno de 3,5 milhões de toneladas, sendo a região Nordeste a maior produtora nacional, especialmente pela predominância do clima semiárido com baixa umidade do ar e volume reduzido de chuvas, propício para a condução da cultura. Nesta região os estados da Bahia, Paraíba, Pernambuco, Sergipe e Alagoas apresentam respectivamente, as maiores produções (IBGE, 2017; VICTOR et al., 2017).

A cultura é atacada por uma série de microrganismos que são responsáveis por muitas doenças que podem comprometer seu potencial produtivo. Estas doenças resultam em podridões em cladódios e raízes além de manchas nos cladódios (mancha escamosa e mancha marrom) (SOUZA et al., 2010; BARBOSA et al., 2012; FLORES-FLORES et al., 2013; FEIJÓ, 2016).

A mancha marrom é considerada a principal doença da palma forrageira miúda no nordeste brasileiro e caracteriza-se por apresentar manchas de coloração preta nos cladódios, com bastante esporulação na superfície da lesão podendo se estender de uma face a outra, exibindo perfurações devido à queda do tecido infectado. As manchas podem coalescer, formando grandes áreas necrosadas podendo causar queda dos cladódios (SWART, 2003; SANTOS et al., 2006; LIMA et al., 2011; BARBOSA et al., 2012; CONFORTO et al., 2016). O gênero *Fusarium* tem sido frequentemente associado à doença (FLORES-FLORES et al., 2013; FEIJÓ, 2016).

O gênero *Fusarium* é um importante membro da família Nectriaceae, e suas espécies são consideradas cosmopolitas podendo infectar uma ampla gama de hospedeiro de importância econômica como: banana (*Musa* spp.), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), pínus (*Pinus* spp.), maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims), milho (*Zea mays* L.), baunilha (*Vanilla planifolia* Andrews), pitaya (*Hylocereus undatus* Haw), manga (*Mangifera indica* L.), aspargo (*Asparagus officinalis* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), arroz (*Oryza sativa* L.), beterraba (*Beta vulgaris* L.), cebola (*Allium cepa* L.) (LESLIE et al., 1990; HIROSHI KIMATI et al., 1997; ELMER 2001; MICHEREFF et al., 2005; LESLIE,

SUMMERELL 2006; ARAÚJO, 2008; CÂNDIDA et al., 2009; DISSANAYAKE et al., 2009; CARMO et al., 2017; CAO et al., 2018;).

A identificação das espécies desse gênero foi durante muito tempo resolvida apenas com o uso de caracteres morfológicos (WOLLENWEBER, REINKING, 1935; BOOTH, 1971; NELSON et al., 1983), mas nos anos 90, o uso de métodos baseados em sequencias de DNA, deixou claro que as classificações feitas apenas com dados morfológicos subestimavam a verdadeira diversidade de espécies (KAVAS et al., 2009).

Desde então, muitos marcadores moleculares passaram a ser utilizados como as regiões ITS-rDNA, IGS, LSU e os genes EF1- α , RPB1, RPB2, CAM e β -tub sendo EF1- α e RPB2 os mais informativos (O'DONNELL et al., 1998; O'DONNELL et al., 2008; GEISER et al., 2004; HYDE et al., 2014). Essa abordagem revolucionou a taxonomia de *Fusarium*, reclassificando as espécies que antes eram representadas por seções, em complexos (O'Donnell, 2000, 2004). Atualmente são conhecidos 15 complexos de espécies de *Fusarium*. e dentre estes os complexos *oxysporum* e *fujikuroi* são os mais importantes (AOKI et al., 2014). Contudo, no caso da palma forrageira ainda não foram determinadas as espécies de *Fusarium* associadas à doença no Brasil.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar espécies de *Fusarium* associadas à mancha marrom da palma forrageira miúda no Nordeste do Brasil.

2.REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura da Palma forrageira

2.1.1 Taxonomia e origem

A palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*) pertence à família cactaceae, Divisão Embryophyta, Sub-divisão Angiospermea, Classe Dicotyledoneae, Sub-classe Archiclamiidae e Ordem Opuntiales. Esta família tem aproximadamente 178 gêneros e cerca de 2000 espécies já descritas (TAYLOR et al., 2002). Dentre estes, os gêneros *Opuntia* e *Nopalea*, são os mais utilizados como forrageiras (SILVA et al., 1990).

Seu centro de origem é no México (SANGLARD, MELO, 2015), sendo introduzida no Brasil pelos portugueses no século XIX, trazidas das Ilhas Canárias, com o objetivo da multiplicação da Cochonilha do Carmim [*Dactylopius coccus* Costa (Homóptera, Dactylopiidae)] para a produção do corante carmim, considerado de grande valor comercial na época (ARAÚJO et al., 2005; NUNES, 2011). Contudo, o cultivo da palma com este objetivo não obteve sucesso, e a partir de então a palma passou a ser cultivada como planta ornamental e em seguida como forrageira (SANTOS et al., 2006).

Durante o século XX, mais especificamente durante a seca de 1932, a palma foi introduzida e disseminada no nordeste brasileiro, desde o Piauí à Bahia (Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Sergipe) através do primeiro programa governamental de difusão da cultura da palma forrageira (LIMA et al., 2001).

Atualmente, existem dois bancos de germoplasma de palma no Brasil. Um localizado na Estação Experimental de Arcoverde (PE), na Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), com aproximadamente 1400 acessos de diferentes materiais, e cerca de 200 destes acessos foram introduzidos do México, África do Sul, Argélia, EUA, Chile, entre outros (SANTOS et al., 1999; SANTOS et al., 2006). O outro banco de germoplasma está localizado no município de Santana do Ipanema e é mantido pela Secretaria de Agricultura do Estado de Alagoas, possuindo cerca de 40 acessos entre os gêneros *Opuntia* e *Nopalea*. No Brasil existe a predominância de três cultivares para fins forrageiros, a Gigante ou Graúda, a Redonda e a Miúda ou Doce (SEAGRI, 2018).

2.1.2 Descrição botânica e fisiológica

A cultivar gigante (*O. ficus -indica*), também conhecida como Graúda, Santa ou Azeda, apresenta porte médio, caule ereto e pouco ramificado. As raquetes são grandes e seu peso pode variar de 1,0 a 2,0 kg com 40 a 50 cm de comprimento. As flores são hermafroditas e apresentam coloração amarelada, o fruto é uma baga ovoide com a mesma coloração das flores, mudando de cor para o roxo quando maduro. É considerada uma cultivar resistente à seca e altamente produtiva. Entretanto, o seu valor nutricional é baixo em relação as outras cultivares, apresentando uma menor aceitabilidade aos animais (SANTOS et al., 1997; FARIAS et a., 2005; SILVA; SANTOS,2006).

A cultivar redonda (*Opuntia* sp.) também conhecida como orelha de onça, é originária da palma gigante. É uma planta de porte médio e caule bastante ramificado lateralmente. Os cladódios têm forma ovoides e arredondado, pesando em média de 1,8 a 2,0 kg e cerca de 4,0 cm de comprimento. É uma cultivar bastante resistente a seca, com alto rendimento e com uma boa aceitação para os animais em relação a cultivar gigante, porém é suscetível à cochonilha-do-carmim (SILVA; SANTOS, 2006; VASCONCELOS et al., 2009; LOPES et al., 2012).

A cultivar miúda ou doce (*N. cochenilifera*), tem porte pequeno e caule ramificado, os cladódios apresentam-se de forma obovada com coloração verde brilhante, pesando cerca de 350 g e 25 cm de comprimento. As flores são vermelhas e os frutos apresentam coloração arroxeada. Essa cultivar é mais nutritiva e palatável para os animais, se comparada com as cultivares gigante e redonda, no entanto, tem uma menor resistência à seca. É mais exigente em relação à fertilidade do solo e umidade, necessitando de uma temperatura noturna mais amena. Apresenta uma menor produtividade de massa verde, porém em relação a produção de matéria seca é maior quando comparada com a *O. ficus-indica*. A grande vantagem em relação as outras cultivares é a resistência a cochonilha-do-carmim (SANTOS et al., 1990; ALBUQUERQUE, 2000; SANTOS et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2009;).

A ampla distribuição da palma nas regiões áridas e semiáridas do mundo é devido à sua fisiologia, sendo considerada uma planta xerófila. Cada órgão da planta é adaptado com uma extrema eficiência no aproveitamento de água, apresentando um metabolismo denominado de Ácido Crassuláceo (CAM), que tem a capacidade de absorver e aproveitar a água, através dos seus estômatos, em seus processos fisiológicos mais vezes do que uma planta de mecanismo C3 (CAVALCANTE et al., 2014).

2.1.3 Importância socioeconômica

O Brasil possui uma produção de 3.581.469,148 toneladas de palma forrageira produzidas em aproximadamente 126.925 propriedades, localizadas nas regiões semiáridas dos estados da Bahia, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Rio Grande do Norte, Ceará e Minas Gerais (IBGE, 2017).

A produção da palma na região semiárida, vem crescendo para fins forrageiro depois da primeira intervenção governamental. A partir disso, a cultura passou a ser cultivada pelos criadores da bacia leiteira, devido aos períodos prolongados de estiagem na região, principalmente em Pernambuco, Alagoas, Ceará e Paraíba (SANTOS et al., 2006). Em Alagoas a palma forrageira é a segunda cultura mais cultivada, sendo superada apenas pela cana-de-açúcar.

Uma das principais atividades desenvolvida no Nordeste brasileiro, é a agropecuária. Porém, ela é prejudicada devido aos longos períodos de seca e curtos períodos de chuva, o que contribui para a baixa produtividade dos animais. A falta de forragem disponível para os animais, faz com que os produtores optem por alimentos alternativos, o que gera maiores investimentos. Com isso, a palma forrageira aparece como a principal alternativa de alimento para os rebanhos de bovinos, caprinos e suínos (OLIVEIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2012).

Além de servir como forrageira, a palma pode ser utilizada de muitas formas: na alimentação humano (verdura, fruta fresca ou processada), na medicina (fabricação de medicamentos), na indústria de cosméticos (fabricação de shampoos e antitranspirantes), na fabricação de adesivos, fibras para artesanato, fabricação de papel, fabricação de corantes, em ornamentação (SANTOS et al., 2012).

Apesar de estudos e pesquisas mostrarem um aumento na produtividade da palma forrageira com o uso de um manejo adequado para a cultura, verifica-se no campo uma queda na produção, em função de danos provocados por pragas e principalmente pela ocorrência de doenças (SOUZA et al., 2010).

2.1.4 Aspectos fitossanitários da cultura

Alguns estudos com relação a problemas fitossanitários já foram desenvolvidos na cultura, como pesquisas com intuito de identificar e caracterizar os agentes fitopatogênicos que estão associados a doenças da palma forrageira que podem causar

podridões e manchas nos cladódios (SANTOS et al., 2006; SOUZA et al., 2010; FLORES-FLORES et al., 2013; FEIJÓ, 2016; OLIVEIRA et al., 2018; SANTIAGO et al., 2018).

Dentre as podridões em cladódios, podem ser citadas: Podridão de *Fusarium* comumente associada às espécies *F. solani* e *F. oxysporum* (GRANATA, 2001; MENEZES et al., 2005; SANTOS et al., 2006; SANTIAGO et al., 2018), Podridão Negra associada ao fungo *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. (FRANCO e PONTE, 1980; PONTE et al., 1983; BARBERA et al., 2001; COELHO, 2006; SOUZA et al., 2010), Podridão de *Macrophomina* que está diretamente associada ao fungo *Macrophomina phaseolina* (Tass.) (GRANATA, 2001), Podridão do pé, frequentemente associada a *Phytophthora cactorum* (Leb. E Cohn) Schroet. e *P. nicotianae* (Breda da Hahn) e *Pythium aphanidermatum* (CACCIOLA; MAGNANO, 1988; GRANATA, 2001; FEIJÓ et al., 2016) e Podridão de esclerócio causada pelo fungo *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) (BARBOSA et al., 2012).

Dentre as manchas de cladódios que ocorrem na cultura da palma forrageira, tem-se a mancha negra, a mancha escamosa e a mancha marrom. A mancha negra é frequentemente relatada no México em *O. ficus-indica* e sua etiologia está associada a muitos gêneros fúngicos como *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium* e *Pseudocercospora* (MÉNDEZ-GALLEGOS et al., 2009; SOUZA et al., 2010; BARBOSA et al., 2012; FLORES-FLORES et al., 2013). A mancha escamosa, como é conhecida no Brasil, está associada a *Neoscytalidium hyalinum* (C.K. Campb. & J.L. Mulder) e já foi relatada tanto em *O. ficus-indica* como em *Nopalea cochenillifera* (referência). Porém, recentemente foi identificada a espécie *Neofusicoccum batangarum* (Crous, Slippers & A.J.L. Phillips) causando uma doença conhecida como cancro escabroso em *Opuntia ficus-indica* na Sicília, doença essa, com sintomatologia idêntica à da mancha escamosa (SOUZA et al., 2010; BARBOSA et al., 2012; SCHENA et al., 2018).

A mancha marrom, conhecida anteriormente no Brasil como mancha de alternaria, foi relatada pela primeira vez no município de São Bento do Una - PE no ano de 2001, com 70% de incidência em palma miúda. Existem relatos de ocorrência desta doença no estado de Alagoas, Pernambuco e Paraíba (LIMA et al., 2011; BARBOSA et al., 2012). Os sintomas da doença caracterizam-se por manchas de coloração preta nos cladódios, de formas circulares ou elípticas, medindo 1,0-3,0cm de diâmetro com abundante esporulação na superfície da lesão. As lesões podem se estender de uma face a outra da

raquete, exibindo perfurações devido à queda do tecido infectado. As manchas podem coalescer, formando grandes áreas necrosadas e causando queda dos cladódios (SWART; SWART, 2003; SANTOS et al., 2006).

O principal agente etiológico da doença até então era *Alternaria tenuissima* (Nees et T. Nees) Wiltshire, mas estudos recentes relatam outros patógenos associados a mancha marrom com, *Colletotrichum* spp., *N. batangarum* (SWART; SWART, 2003; SANTOS et al., 2006; CONFORTO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2018). Estudos realizados por Feijó, (2016), relataram que além do gênero *Alternaria* os gêneros *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Macrophomina* *Neofusicoccum* e *Neopestalotiopsis*, estão associados a mancha marrom nos estados de Alagoas e Pernambuco. Esse mesmo autor ainda deixa claro que os isolados pertencentes ao gênero *Fusarium* foram os mais agressivos nos testes de patogenicidade.

2.2 Gênero *Fusarium*

O gênero *Fusarium*, foi descrito inicialmente por Link em 1809 (LINK, 1809) e atualmente pertence a família Nectriaceae, ordem Hypocreales e classe Sordariomycetes (INDEX FUNGORUM, 2018). A primeira revisão sobre as espécies de *Fusarium* foi realizada por Wollenweber e Reinking (1935), a qual foi intitulada como “Die Fusarien” em que descreveram 65 espécies, 55 variedades e 22 formae speciales, sendo agrupadas em 16 seções, e a partir de então, mais de 1000 espécies já foram descritas (CABRAL, 2011).

Este gênero representa um dos grupos mais importantes de fungos ascomicetos (KVAS et al., 2009). Está distribuído em todo mundo, podendo ser encontrado no deserto, no ártico em regiões alpinas (BURGESS et al., 1997). Este grupo fúngico tem capacidade de infectar uma ampla gama de hospedeiro podendo colonizar tanto a parte vegetativa como a parte reprodutiva das plantas, mostrando uma diversificação em relação aos sintomas causados, fato que dificulta o manejo da doença (MILANESI, 2009; NAYAKA et al., 2011). Algumas plantas de importância econômica são: soja (*Glycine max* L.), algodão (*Gossypium hirsutum*), feijão (*Phaseolus vulgares*), arroz (*Oryza sativa*), banana (*Musa* spp.), tomate (*Solanum lycopersicum*), milho (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e alface (*Lactuca sativa* L.) (FADOHAN et al., 2003; BARRIOS et al., 2005; VAN HOVE et al., 2011; LIEW et al., 2016; KELLY et al., 2017).

Algumas espécies de *Fusarium* são produtoras de micotoxinas (tricotocenos, fumosinas, zearalenona, moniliformina e ácido fusárico), que ocasionam danos em sementes, cereais e outros produtos vegetais no período de pré e pós colheita (CHANG, 2014). O acúmulo dessas micotoxinas nos grãos pode acarretar, no caso de ingeridas, doenças severas, agudas e até mesmo crônicas em seres humanos e animais (MULÉ *et al.*, 2004).

O gênero *Fusarium*, inclui espécies que podem produzir três tipos de esporos: os macroconídios, microconídios e clamidósporos. Os macroconídios são hialinos, podendo ser produzidos em conidióforos ou em esporodóquios, variando de acordo com o tipo de espécie, podendo apresentar cerca de 3 a 5 septos transversais com uma célula apical e basal nas suas extremidades, chegando a ser uma característica de grande importância na sua taxonomia. Os microconídios podem ser produzidos em fiálides sobre as hifas apresentando diferentes formatos e sem septos. Produz também estruturas de resistências chamadas de clamidósporos, que são capazes de permanecer inativas no solo durante muito tempo, até que as condições de infecção sejam favoráveis para o desenvolvimento do patógeno (HAWKSWORTH *et al.*, 1995; MILANESI, 2009).

A taxonomia de *Fusarium* foi durante muito tempo resolvida apenas por caracteres fenotípicos na identificação e diferenciação de espécies (WOLLENWEBER e REINKING, 1935; BOOTH, 1971; NELSON *et al.*, 1983). Porém, nos anos 90 com o uso de métodos baseados em sequências de DNA, ficou claro que as classificações feitas com o uso de apenas dados morfológicos subestimavam a verdadeira diversidade de espécies desse gênero (KAVAS *et al.*, 2009).

Devido à alta taxa de variabilidade presente neste gênero, é necessário para a identificação de espécies o uso de mais de uma região genômica (AOKI *et al.*, 2014). De acordo com a literatura, os autores citam as regiões ITS-rDNA, IGS, LSU e os genes EF1- α , RPB1, RPB2, CAM e β -tub como sendo os marcadores moleculares utilizados para auxiliar na identificação deste grupo fúngico (O'DONNELL *et al.*, 2009; AL-SADI *et al.*, 2014; CASTELLÁ, 2014; KOYYAPPURATH *et al.*, 2016; HAWA *et al.* 2017; JACOBS *et al.*, 2018). Porém, os genes mais utilizados são EF1- α por ser um gene de cópia única, altamente informativo entre as espécies, apresentando baixa taxa de mutação, tendo assim, uma efetiva função de DNA barcoding para esse gênero (O'DONNELL *et al.*, 1998; GEISER *et al.*, 2004; HYDE *et al.*, 2014) juntamente com o RNA polymerase II (RPB2), que é um gene bastante informativo e confiável, apresentando uma boa resolução topológica nas árvores filogenéticas geradas (O'DONNELL *et al.*, 2008).

Essa abordagem revolucionou a taxonomia de *Fusarium* reclassificando as espécies, que antes eram representadas por seções, em complexos (O'Donnell, 2000, 2004). De acordo com Hyde et al., 2014, existem quinze complexos de espécies de *Fusarium* já descritos: Complexo *fujikuroi*, Complexo *nisikadoi*, Complexo *oxysporum*, Complexo *redolens*, Complexo *burgessii*, Complexo *babinda*, Complexo *concolor*, Complexo *sambucinum*, Complexo *nelsonii*, Complexo *incarnatum-equiseti*, Complexo *tricinctum*, Complexo *lateritium*, Complexo *buharirum*, Complexo *solani* e Complexo *dimerum*. Dentre estes, os complexos *fujikuroi*, *oxysporum*, *incarnatum-equiseti* e *dimerum*, são considerados importantes por acomodar espécies que infectam cactáceas, além de algumas delas produzirem micotoxinas (O'DONNELL et al., 2009; AOKI et al., 2014).

O complexo de espécie *fujikuroi* (FFSC) é composto por aproximadamente 60 espécies biológicas e filogenéticas formalmente descritas, que antigamente pertenciam a seção *Liseola* (KVAS et al., 2009). O complexo recebe esse nome referente ao teleomorfo *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw, tendo atualmente 11 espécies com a fase sexuada conhecida, entre elas *F. verticillioides* (Saccardo & Neirenberg) cujo teleomorfo é *Gibberella moniliformes* (Winelland), *F. proliferatum* (Matsushima & Neirenberg) com teleomorfo *G. intermedia* (Kuhlman) Sumuels, Nirenberg & Seifert) e *F. subglutinans* (Wollenweber & Reinking) com teleomorfo *G. subglutinans* (Nelson, Toussoun & Marasmas) (KVAS et al., 2009).

As espécies que pertencem a este complexo foram agrupadas de acordo com a semelhança nos caracteres morfológicos, sendo eles, os microconídios produzidos em cadeias ou em falsas cabeças de formato obovoide, ausência de clamidósporos e macroconídios contendo de 2 a 3 septos (LESLIE, SUMMERELL 2006; JACOBS et al., 2010). Além disso, estão presentes espécies patogênicas a culturas de importância econômica como, *F. fujikuroi* responsável por causar a doença Bakanae no arroz, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. temperatum* e *F. musae* causando podridão em gramíneas e em frutos, *F. sacchari* causando a doença “pokkah boeng” na cultura da cana-de-açúcar, como também a produção de micotoxinas referente a estes fungos (VAN HOVE et al., 2001; PSJ, NIAS 2012).

As espécies do complexo *oxysporum* (FOOSC) causam podridão e murcha vascular em diversos hospedeiros de importância econômica (O'DONNELL et al., 2008). Porém, devido a especificidade patogênica e virulência em relação aos hospedeiros, foi criado um sistema taxonômico dividido em *formae speciales* e raças, sendo reconhecido e

relatado mais de 150 *formae speciales* e raças destacando assim a importância desse complexo (ARMSTRONG, 1981; BOOTH, 1997; O'DONNELL et al., 1999). Alguns hospedeiros de importância econômica já relatados são: *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, causador do mal-do-panamá em bananeira (HIROSTI KIMATI et al., 1997); *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, agente da murcha-do-fusário do feijoeiro (CÂNDIDA et al., 2009); *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, causador da Fusariose do algodoeiro (ARAÚJO, 2008); *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, causador da murcha-do-tomateiro (MICHEREFF et al., 2005). Esta espécie ainda não possui o teleomorfo conhecido, sendo o complexo composto de uma espécie grupo, no qual precisa ser melhor estudada e classificada de maneira adequada (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

O complexo *incarnatum-equiseti* (FIESC) é composto por aproximadamente 30 espécies sendo dividido em dois clados (*equiseti* e *incarnatum*). No clado *equiseti*, as espécies foram descritas de acordo com as características morfológicas e moleculares sendo nomeado três espécies, *F. scirpi*, *F. lacertarum* e *F. equiseti*, que é considerada umas das principais espécies pertencentes a este complexo, principalmente por produzir micotoxinas (PFENNING; MARTINS 2000). Já no clado *incarnatum*, devido a taxonomia e nomenclatura inconsistente, ainda não foi nomeado nenhuma espécie, por apresentarem um elevado nível de espécies crípticas e extrema similaridade morfológica, com isso as espécies deste clado são descritas como *Fusarium* sp. (O'DONNELL et al., 2009; CABAÑES et al., 2014). Essas espécies já foram relatadas causando podridão em plantas de casuarina (*Casuarina equisetifolia* L.), sorgo (*Sorghum bicolor*), palma (*N. cochenillifera*) e entre outras (CABAÑES et al., 2014).

O complexo *dimerum* (FDSC) acomoda algumas espécies já descritas com base em análises multilocus, entre elas *F. dimerum*, *F. lunatum*, *F. penzigii* e *F. delphinoides*. Essas espécies apresentam semelhanças por causarem doenças em plantas como também em humanos e animais, exceto *F. lunatum* que é relatada causando doenças apenas em plantas do gênero *Opuntia* e *Gymnocalycium* (SCHROERS et al., 2009).

O gênero *Fusarium* também está presente em hospedeiros que pertence à família cactaceae, sendo um dos patógenos que mais ocasiona danos à cultura (SANTIAGO et al., 2018). De acordo com a literatura já foram relatadas *F. fujikuroi*, *F. lacertarum*, *F. proliferatum*, *F. solani* e *F. oxysporum* causando podridão em pitaya na Malásia (HAWA et al., 2017), palma miúda no Brasil (SANTIAGO et al., 2018), pitaya amarela na Malásia (HAWA et al., 2013), *Carnegiea gigantea* no Arizona e *Opuntia* sp. na Florida (BOOTH, ALCORN, 1959; MILLER, 1997), palma gigante no Brasil e em *Echinocactus grusonii*

na Itália (POLIZZI et al., 2004, DE SOUZA et al., 2010) respectivamente. *F. lunatum* causando mancha em *Opuntia dillenii* no Haiti e em palma gigante no México (BENJAMIN, SLOT, 1969; FLORES-FLORES et al., 2013). *F. opuntiarum* infectando plantas de *Opuntia* sp. na Argentina (FARR, 1973). *F. verticillioides* em *Phyllocactus hybridus* na Itália (O'DONNELL et al., 1998). Essas espécies além de causar perdas na produção também são relatadas em outras culturas como produtoras de micotoxinas (SANTIN et al., 2000; AOKI et al., 2014).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia Molecular do Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) localizado no km 85 da BR 101 Norte (9°27'54.71" S – 35°49'39.27" O), no município de Rio Largo, Alagoas, Brasil.

3.1 Obtenção dos Isolados

Foram obtidos 26 isolados patogênicos de *Fusarium* associados à mancha marrom da palma forrageira miúda da Coleção de Culturas de Fitopatógenos da Universidade Federal de Alagoas (COUFAL), localizado no Laboratório de Fitopatologia Molecular do Centro de Ciências Agrárias da UFAL (Tabela 1). Tais culturas foram depositadas no ano de 2016.

Tabela 1: Identificação dos isolados obtidos da COUFAL e suas procedências.

LOCALIDADES	CÓDIGO DOS ISOLADOS
Arapiraca/AL	COUFAL0205 e COUFAL0206
Branquinha/AL	COUFAL0207
Cacimbinhas/AL	COUFAL0208
Estrela de Alagoas/AL	COUFAL0209, COUFAL0210, COUFAL0211, COUFAL0212, COUFAL0213 e COUFAL0214
Olho D'Água do Casado/AL	COUFAL0215
Bom Conselho/PE	COUFAL0216, COUFAL0217 e COUFAL0218
Lajedo/PE	COUFAL0219, COUFAL0220 e COUFAL0221
São João/PE	COUFAL0222, COUFAL0223, COUFAL0224, COUFAL0225, COUFAL0226, COUFAL0227, COUFAL0228, COUFAL0229 e COUFAL0230

No estado de Alagoas foram obtidos 11 isolados em diferentes zonas: Zona da Mata (Branquinha), Agreste (Arapiraca, Cacimbinhas e Estrela de Alagoas) e Sertão (Olho D'Água do Casado) e no estado de Pernambuco foram obtidos 15 isolados em três municípios do Agreste (Bom Conselho, São João e Lajedo).

3.2 Caracterização molecular

Para caracterização molecular foi realizado a extração de DNA genômico, seguindo o protocolo CTAB adaptado de Doyle & Doyle (1987). As amplificações foram realizadas por PCR utilizando inicialmente os pares de primers EF1/EF2 que direcionam

à amplificação do gene EF-1 α , para realização de uma análise prévia da diversidade de espécies existente entre todos os isolados. Posteriormente, foram selecionados alguns isolados representativos para concluir a filogenia utilizando os primers 5F2/7CR específicos para o gene RPB2 (Tabela 2). Os produtos amplificados foram enviados para purificação e sequenciamento na empresa Macrogen (Seul, Coreia do Sul).

Tabela 2: Descrição dos primers utilizados na identificação das espécies de *Fusarium*.

Gene	Primer	Sequência (5'-3')	Referência
TEF-1 α	EF1	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	O' Donnell et al. 1998
	EF2	GGARGTACCAGTSATCATG	
RPB2	5f2	GGGGWGAYCAGAAGAAGGC	O'Donnell et al. 2013
	7cr	CCCATRGCTTGYTTRCCCAT	

As seqüências de nucleotídeos obtidas, foram montadas com o Software Codon Code Aligner v. 6.0.2, e analisadas visualmente. O arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas, foram corrigidos por comparação das seqüências nos sentidos senso e anti-senso. Inicialmente as análises foram feitas com o algoritmo BLASTn. Seqüências de referência para várias espécies foram obtidas no GenBank e utilizadas para construção da árvore filogenética (Tabela 3). As seqüências foram alinhadas usando o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004) no programa MEGA v.6 (TAMURA et al., 2013). A análise de Inferência Bayesiana (BI) para os conjuntos de dados concatenados (EF1- α e RPB2), foram realizadas empregando o método da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), no portal CIPRES (MILLER et al., 2010) usando MrBayes v. 3.2.3 (RONQUIST et al., 2012). As árvores foram visualizadas e editadas no programa FigTree v. 1.4 (ztree.bio.ed.ac.uk/software/figtree).

Tabela 3: Seqüências de *Fusarium* spp. obtidas no banco de dados não redundante Genbank.

ESPÉCIES	Nº de acesso da cultura	Nº de acesso do GenBank	
		EF-1 α	RPB2
<i>Fusarium circinatum</i>	NRRL_25331	AF160295	JX171623
<i>Fusarium dimerum</i>	CBS 108944	EU926334	KM232363
<i>F. dimerum</i>	NRRL 36140	HM347133	HM347218
<i>Fusarium delphinoides</i>	C26	KU711775	KU604380
<i>F. delphinoides</i>	NRRL_36160	HM347134	HM347219
<i>Fusarium equiseti</i>	NRRL_20697	GQ505594	JX171595
<i>F. equiseti</i>	NRRL_13402	GQ505592	JX171566
<i>Fusarium foetens</i>	NRRL 38302	KU171723	KU171703
<i>Fusarium fujikuroi</i>	NRRL_13566	AF160279	JX171570
<i>F. fujikuroi</i>	CBS130402	KU711677	KU604261

continuação tabela 3...

ESPÉCIES	Nº de acesso da cultura	Nº de acesso do GenBank	
		EF-1 α	RPB2
<i>Fusarium guttiforme</i>	NRRL 22945	AF160297	JX171618
<i>Fusarium inflexum</i>	NRRL_20433	AF008479	JX171583
<i>Fusarium lacertrum</i>	NRRL_52753	JF740828	JF741154
<i>F. lacertarum</i>	NRRL 20423	GQ505593	JX171581
<i>Fusarium lunatum</i>	NRRL_36168	-	JX171648
<i>F. lunatum</i>	CMM1288	-	KY549627
<i>F. lunatum</i>	COUFAL0209	-	MK301290
<i>F. lunatum</i>	COUFAL0213	-	MK301291
<i>F. lunatum</i>	COUFAL0227	-	MK301292
<i>Fusarium mangiferae</i>	MUCL_56003	LT574958	LT575039
<i>F. mangiferae</i>	NRRL_25226	AF160281	JX171622
<i>Fusarium oxysporum</i>	CBS135560	KU711709	KU604317
<i>F. oxysporum</i>	CBS135561	KU711710	KU604316
<i>F. oxysporum</i>	CBS_463.91	KU711712	KU604315
<i>F. oxysporum</i>	BRIP28044	KX434919	KX434989
<i>F. oxysporum</i>	COUFAL0206	-	MK301279
<i>F. oxysporum</i>	COUFAL0228	-	MK301280
<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	NRRL_25034	JF740710	JF741040
<i>F. pseudocircinatum</i>	MICMW_324a	KX870040	-
<i>F. pseudocircinatum</i>	COUFAL0219	-	MK301286
<i>F. pseudocircinatum</i>	COUFAL0220	-	MK301285
<i>Fusarium penzigii</i>	CBS_317_34	EU926324	KM232362
<i>F. penzigii</i>	NRRL 20711	HM347132	HM347217
<i>Fusarium proliferatum</i>	CBS138981	KT716210	KT716196
<i>F. proliferatum</i>	NRRL_43667	EF452998	EF470037
<i>F. proliferatum</i>	NRRL 22944	AF160280	JX171617
<i>F. proliferatum</i>	COUFAL0221	-	MK301281
<i>Fusarium sacchari</i>	NRRL_25033	JF740709	JF741039
<i>F. sacchari</i>	NRRL 52733	JF740812	JF740987
<i>F. sacchari</i>	NRRL_13999	AF160278	JX171580
<i>Fusarium subglutinans</i>	NRRL_54158	HM347131	HM347216
<i>F. subglutinans</i>	NRRL 22016	HM057336	JX171599
<i>Fusarium sp.</i>	NRRL_26417	GQ505598	GQ505776
<i>Fusarium sp.</i>	NRRL_32175	GQ505609	GQ505787
<i>Fusarium sp.</i>	NRRL 34005	GQ505629	GQ505807
<i>Fusarium sp.</i>	NRRL_43297	GQ505657	GQ505835
<i>Fusarium sp.</i>	COUFAL0210	-	MK301287
<i>Fusarium sp.</i>	COUFAL0211	-	MK301288
<i>Fusarium sp.</i>	COUFAL0222	-	MK301289
<i>Fusarium thapsinum</i>	NRRL_22045	AF160270	JX171600
<i>Fusarium verticillioides</i>	CBS135545	KX584417	KU604229
<i>F. verticillioides</i>	NRRL 22172	AF160262	EF470122
<i>F. verticillioides</i>	NRRL 25117	JF740743	JF741071
<i>F. verticillioides</i>	COUFAL0205	-	MK301282
<i>F. verticillioides</i>	COUFAL0207	-	MK301283
<i>F. verticillioides</i>	COUFAL0216	-	MK301284

<i>Giberela xylarioides</i>	NRRL25486	AY707136	JX171630
<i>Neonectria ramulariae</i> *	CBS_182.36	DQ789721	DQ789793

* Outgroup; TEF-1 α = Translation elongation factor 1- α ; RPB2 = RNA polymerase II. Isolados obtidos neste estudo estão destacados em negrito.

3.3 Caracterização morfocultural

Para caracterização cultural, discos de meio de cultura contendo estruturas do patógeno foram retirados das bordas das colônias cultivadas por sete dias e transferidos para placas de Petri contendo BDA sintético. Os tratamentos foram mantidos em incubadora BOD a 25°C \pm 1°C e fotoperíodo de 12 horas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo a repetição constituída por uma placa de Petri. Foram realizadas avaliações diárias do crescimento micelial das colônias (mm) em duas direções diametricamente opostas no fundo externo das placas, com auxílio de um paquímetro digital, durante sete dias. Também foram observadas a coloração das colônias e o aspecto do micélio aéreo. Os dados obtidos foram utilizados para calcular o índice de crescimento micelial (ICM, mm/dia), utilizando a fórmula: $ICM = \Sigma(D-D_a)/N$, sendo: ICM = índice de velocidade de crescimento micelial, D = diâmetro médio atual da colônia Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior e N = número de dias após a inoculação.

Para caracterização morfológica foi utilizado o meio BDA e agar-água (AA) para induzir a esporulação das espécies e mantidos em incubadora BOD a 25°C \pm 1°C e fotoperíodo de 12 horas por 10 dias. 50 conídios (macroconídios e microconídios) de cada espécie foram mensurados por imagens capturadas por câmera digital (Olympus IX2-SLP) acoplada a microscópio óptico com aumento de 400x, projetada em monitor de computador, através do software Cellsenses Standard (SAMSUNG SDC-415®). As características morfológicas foram baseadas no Manual de Identificação de *Fusarium* de Leslie e Summerell (2006).

3.4 Teste de Agressividade

No teste de agressividade foram utilizados cladódios sadios de palma forrageira miúda. Estes, foram tratados com solução de hipoclorito de sódio a 1% por cinco minutos, lavados em água destilada esterilizada (ADE) e secos à temperatura ambiente. Com o auxílio de uma agulha esterilizada realizou-se fermentos nos cladódios e em seguida, foram depositados discos de BDA contendo estruturas do patógeno de cada espécie (cultivados por sete dias) sobre os pontos de inoculação. Nas testemunhas utilizou-se

apenas discos de BDA sem estruturas do patógeno. Posteriormente, os cladódios foram acondicionados separadamente em sacos plásticos contendo um chumaço de algodão umedecido com ADE para proceder a câmara úmida de 48h. Após o período de câmara úmida os cladódios foram retirados dos sacos plásticos e mantidos em BOD a 25 ± 1 ° C e fotoperíodo de 12 horas durante até sete dias. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada repetição representada por um cladódio com quatro ferimentos (além da testemunha). Aos sete dias foram feitas medições das lesões em duas direções diametricamente opostas com auxílio de um paquímetro digital. As médias de severidade para cada espécie foram submetidas à análises de variação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização molecular

Para as análises filogenéticas selecionou-se o seguinte modelo evolutivo que foram calculados de acordo com Akaike Information Criterion (AIC): GTR+I+G para fator de alongação (EF-1 α) e para RNA polymerase II subunit (RPB2), respectivamente. A espécie *Neonectria ramulariae* (CBS 182.36) foi utilizada como outgroup.

Através de uma análise prévia utilizando o gene EF-1 α foi possível identificar seis espécies, dentre os 26 isolados, pertencentes ao gênero *Fusarium* que estão inseridas em quatro complexo distintos: *fujikuroi*, *oxysporum*, *incarnatum-equiseti* e *dimerum* (dados não mostrados). A partir dessas análises selecionou-se 14 isolados que as sequencias do gene RPB2 determinados visando complementar a filogenia.

Na árvore de Inferência Bayesiana com base nos dados concatenados (EF-1 α e RPB2), foi possível confirmar os resultados obtidos a partir da análise prévia, onde foram observados clados bem suportados dentro de cada complexo. No complexo *fujikuroi*, três isolados agruparam com *F. verticillioides* (COUFAL0205, COUFAL0207 e COUFAL0216), dois isolados com a espécie *F. pseudocircinatum* (COUFA-0219 e COUFAL0220) e um isolado se agrupou com *F. proliferatum* (COUFAL0221). No complexo *oxysporum*, dois isolados agruparam com *F. oxysporum* (COUFAL0206 e COUFAL0228). No complexo *incarnatum-equiseti* três isolados (COUFAL0214, COUFAL0210 e COUFAL0211) agruparam com *Fusarium* sp. que está inserido no clado *incarnatum*. Já no complexo *dimerum* três isolados agruparam com *F. lunatum* (COUFAL0209, COUFAL0213 e COUFAL0227) (Figura 1).

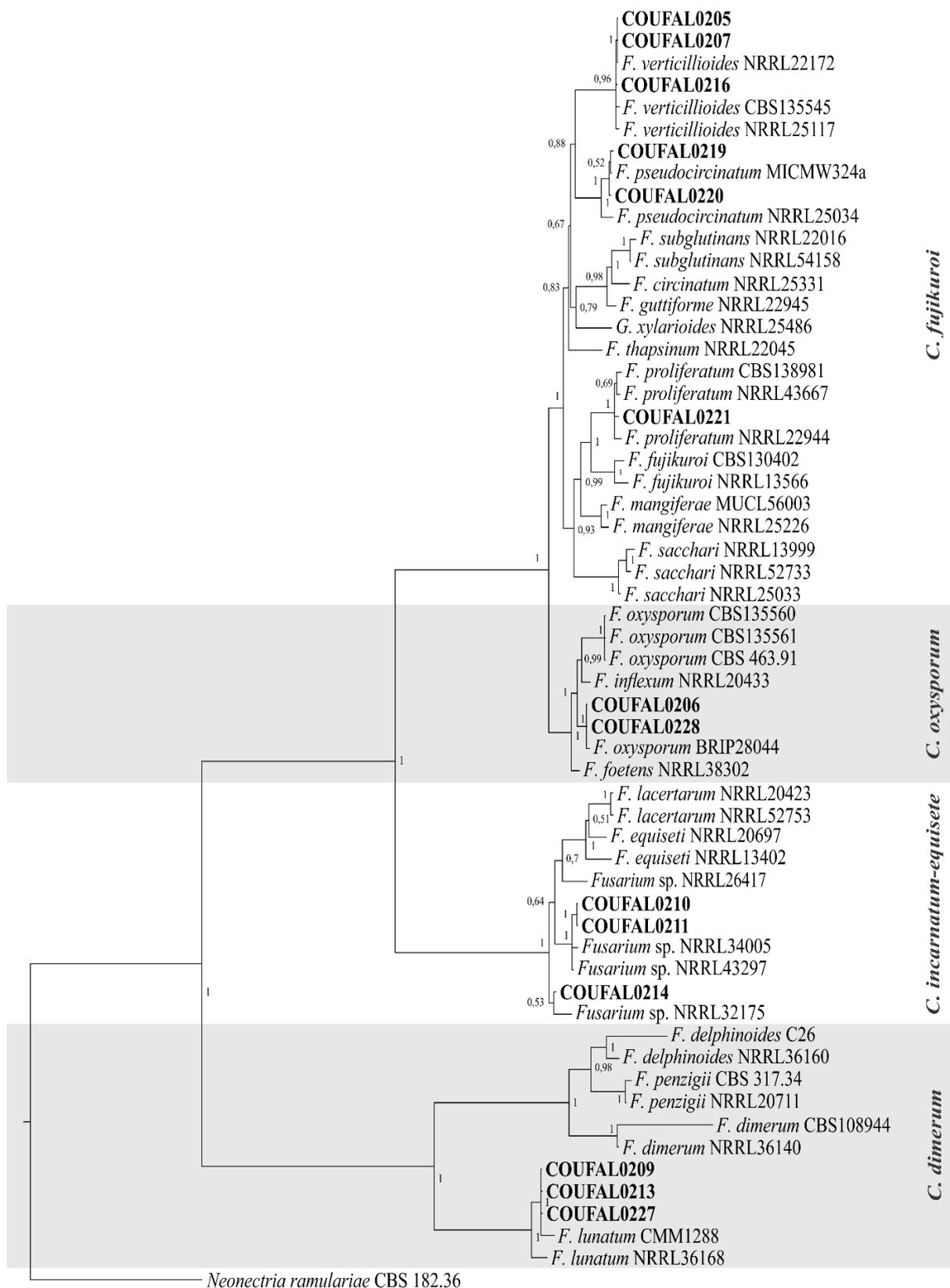


Figura 1: Árvore filogenética de inferência Bayesiana baseada em sequências concatenadas dos genes EF1- α e RPB2. *Neonectria ramulariae* (CBS_18236) foi utilizada como grupo externo. Os isolados provenientes desse estudo estão marcados em negrito.

As seis espécies identificadas (*F. verticillioides*, *F. pseudocircinatum*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *Fusarium* sp. e *F. lunatum*) estavam presentes entre os municípios do agreste pernambucano. Em Alagoas, apenas quatro das seis espécies foram identificadas (*F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. lunatum* e *Fusarium* sp.) distribuídas entre os municípios das zonas da mata, agreste e sertão.

4.2 Caracterização Morfocultural

Os isolados das espécies de *Fusarium* apresentaram-se heterogêneos quanto à coloração da colônia em meio de cultura BDA sintético. Houve variação nos valores de índice de crescimento micelial, tamanho e forma dos macroconídios e microconídios entre as espécies identificadas. Não foi observado formação de macroconídios para as espécies *F. verticillioides* e *F. lunatum*. Como também, houve ausência de clamidósporos para as espécies *F. proliferatum*, *F. pseudocircinatum*, *Fusarium* sp. e *F. verticillioides* (Figura 2 e Tabela 4).

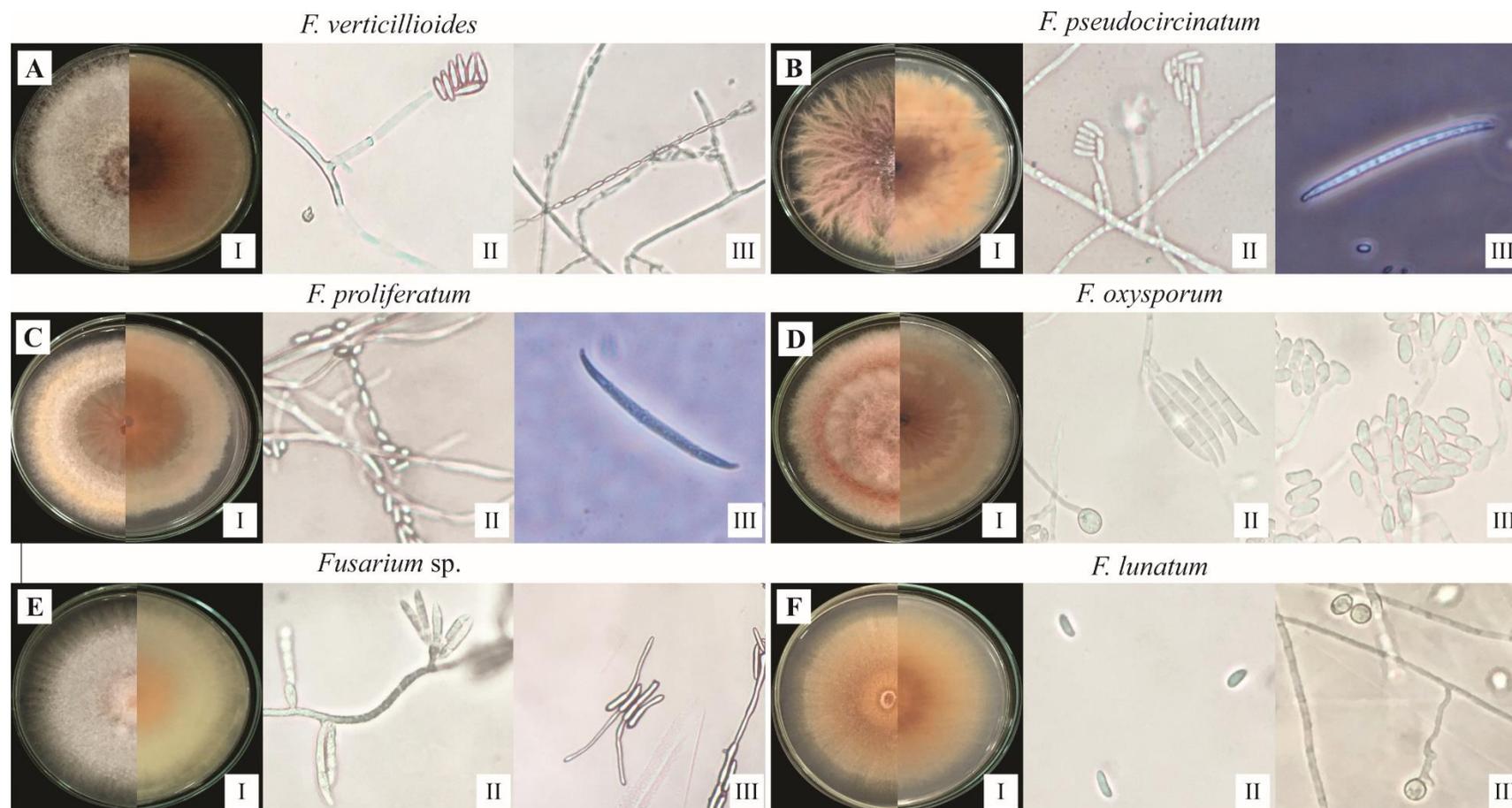


Figura 2: Características morfoculturais das espécies de *Fusarium*. **AI, BI, CI, DI, EI e FI-** Características das colônias. **AII-** Microconídio em falsa cabeça em monofiálide. **AIII-** Microconídio em cadeia. **BII-** Microconídio em falsa cabeça em monofiálide. **BIII-** Macroconídio e microconídio. **CII-** Microconídio em cadeia. **CIII-** Macroconídio. **DII-** Macroconídio e clamidósporo. **DIII-** Microconídio. **EII-** Macroconídio. **EIII-** Microconídio. **FII-** Microconídio. **FIII-** Clamidósporos.

Tabela 4: Caracterização morfocultural das espécies de *Fusarium* e teste de agressividade.

Espécie	Microconídio (µm)		Forma	Macroconídio (µm)		Nº de septos	Forma	Cmd ¹	I.C.M ² (mm/dia)	Coloração da Colônia Verso/Reverso	D. L. ³ (mm)
	Comp.	Larg.		Comp.	Larg.						
<i>F. verticillioides</i>	6.10-4.08	2.46-1.20	Obovoide	-	-	-	-	-	10.33	Púrpura/Rosa	10,87a
<i>F. pseudocircinatum</i>	9.02-3.44	3.77-1.64	Oval	75.81-24.74	6.66-2.83	3 a 4	Falcado	-	7.38	Púrpura/Rosa claro	11,8a
<i>F. proliferatum</i>	9.78-3.77	4.53-1.60	Obovoide e elíptico	59.76-34.93	5.91-2.43	3	Falcado	-	7.99	Rosa/Amarelo	11,18a
<i>F. oxysporum</i>	13.19-7.02	5.06-1.70	Obovoide e elíptico	55.93-26.40	6.91-2.26	3 a 4	Falcado	+	7.48	Rosa claro/Púrpura	12,5a
<i>Fusarium sp.</i>	15,49-10.65	7.25-2.26	Obovoide	29.08 -17,64	4.37-2.88	3	Falcado	-	9.60	Rosa/Salmão	19,5b
<i>F. lunatum</i>	9.90-6.56	4.42-2.04	Alantoide	-	-	-	-	+	7.85	Alaranjado/ Alaranjado	19,43b

¹Clamidósporos; ²Índice de crescimento micelial; ³Diâmetro das lesões.

^{a,b} As letras referem-se ao Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.3 Teste de Agressividade

As espécies identificadas apresentaram diferentes níveis de agressividade aos sete dias após a inoculação. Os sintomas consistiram em lesões circulares e necróticas, que podiam ser observados na parte adaxial dos cladódios. Nenhum sintoma foi observado nas testemunhas (Figura 3). As espécies *F. verticillioides*, *F. pseudocircinatum*, *F. proliferatum* e *F. oxysporum* não diferiram estatisticamente quando testados ao nível de 5% de probabilidade, porém as espécies *Fusarium* sp. e *F. lunatum* diferiram das demais sendo consideradas as mais agressivas (Tabela 4).



Figura 3: Teste de agressividade realizado com as espécies de *Fusarium* identificadas no presente estudo. **1-** *F. verticillioides* **2-** *F. pseudocircinatum* **3-** *F. proliferatum* **4-** *F. oxysporum* **5-** *Fusarium* sp. **6-** *F. lunatum*, **a,b,c-** Testemunhas.

5. DISCUSSÃO

Muitas regiões genômicas podem ser utilizadas na identificação de espécies do genero *Fusarium* porém os genes EF1- α (considerado o barcoding) e RPB2 são as mais precisas para este fim (O'DONNELL et al., 2008; HYDE et al., 2014). Baseando-se nesses genes o presente estudo identificou seis espécies pertencentes a quatro complexos distintos: *fujikuroi* (FFSC), complexo *oxysporum* (FOSC), complexo *incarnatum-equiseti* (FIESC) e complexo *dimerum* (FDSC).

No complexo *fujikuroi* (FFSC) foram identificadas três espécies *F. proliferatum*, *F. verticillioides* e *F. pseudocircinatum*. A espécie *F. proliferatum* já foi relatada causando mancha foliar em tomateiro na China (GÃO et al., 2016), podridão em sementes de aveia na Hungria (MOLNAR O. 2016), podridão em bulbos de alho na Espanha, Carolina do Norte e Índia (PALMERO et al., 2010; RAVI SANKAR et al., 2012; QUESADA-OCAMPO et al., 2014;), podridão basal da cebola na Finlândia (HAAPALAINEN et al., 2016,) podridão no alho e cebola na Argentina

(SALVALAGGIO et al., 2013), podridão em frutos de pimenta em Trindade (RAMPERSAD et al., 2011). No Brasil há relatos apenas em milho no estado de Pernambuco (BARROS, 2013).

A espécie *F. verticillioides* foi descrita pela primeira vez associado a doenças em animais (SHELDON, 1904). A partir daí, foi relatada em muitas espécies vegetais no mundo, sendo verificado com maior ocorrência na cultura do milho causando podridão no colmo, raiz e deterioração nos grãos armazenados (AGRIOS, 2005; DORN et al., 2009). Em países como França, Espanha e Itália, essa espécie é frequentemente relatada em grãos de milho (FADOHAN et al., 2003), mas já foi relatada também na América do Norte causando doenças em milheto e gramas nativas (LESLIE et al., 2004). No Brasil essa espécie foi latada em gengibre (MOREIRA et al., 2015), milho (BARROS, 2013) e em café (PFENNING; MARTINS 2000), pinus (MACIEL et al., 2017).

A espécie *F. pseudocircinatum* causa doenças em muitas culturas de importância econômica no mundo como: malformação da manga (*Mangifera indica* L.) na República Dominicana, Austrália, México e Brasil (FREEMAN et al., 2014; GARCÍA-LÓPEZ et al., 2016; LIEW et al., 2016; (MACHADO, 2013)), murcha em acácia koa (*Acacia koa* A. Gary) no Hawaii (SHIRAISHI et al., 2012), podridão da haste da baunilha (*Vanilla planifolia*) na Indonésia (PINARIA et al., 2010), cancro em citros (*Citrus* spp.) na Grécia, Itália e Espanha (SANDOVAL-DENIS et al., 2018), podridão de pós-colheita em frutos de banana na Guatemala (TARNOWSKI et al., 2010).

Em cactácea, há relatos de *F. proliferatum* causando podridão do caule em pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) na Malásia (HAWA et al., 2013) e de *F. verticillioides* causando doença em *Phyllocactus hybridus* na Itália (O'DONNELL et al., 1998). Contudo, este é o primeiro relato destas espécies (*F. proliferatum*, *F. verticillioides* e *F. pseudocircinatum*) infectando palma forrageira miúda.

As espécies pertencentes ao complexo *oxysporum* (FOSC) apresentam similaridades por causarem murcha vascular em seus hospedeiros (O'DONNELL et al., 2008). Este estudo identificou a espécie *F. oxysporum*, que de acordo com Mycobank database (2019), apresenta ampla gama de hospedeiro, sendo relatado em mais de 600 gêneros botânicos no mundo. Em cactáceas, essa espécie já foi relatada causando murcha em *Astrophytum myriostigma* na Itália (GARIBALDI et al., 2016), podridão seca em *Astrophytum ornatum* no México (QUEZADA-SALINAS et al., 2017), podridão de *Fusarium* em plantas de *Zygocactus* e *Rhipsalidopsis* na Alemanha (GERIACH, 1972), podridão da base em *Zygocactus truncatus* nos Estados Unidos (MOORMAN et al.,

1980), em *Cereus peruvianus* na Itália (GARIBALDI et al., 2011), e em frutos de pitaya (*Selenicereus megalanthus*) na Colômbia (GONZALES et al., 2016), podridão seca em *Echinocactus grusonii* na Inglaterra (HAZELGROVE et al., 1979), podridão em *Astrophytum myriostigma*, *Cereus marginatus* var. *cristata*, *C. peruvianus monstruosus* e *C. peruvianus florida* na Itália (BERTETTI et al., 2017). Em palma forrageira foi relatada causando podridões em *O. ficus-indica* e *N. cochenillifera* no Brasil (SOUZA et al., 2010; SANTIAGO et al., 2018). Portanto, este é o primeiro relato de *F. oxysporum* associados a mancha marrom em *N. cochenillifera* no mundo. Além de palma forrageira no Brasil, essa espécie já foi relatada causando doenças em teca (*Tectona grandis*) (BORGES et al., 2018), em yacon (*Smallantus sonchifolius*) mais conhecido como batata (MORAES et al., 2017), em rosa sp. (BARGUIL et al., 2009), pinus (MACIEL et al., 2017) e em outras culturas como citros, mandioca, feijão, arroz, tomate, sorgo (MENDES et al., 1998).

Os membros do complexo *incarnatum-equiseti* (FIESC) compreendem mais de 30 espécies filogeneticamente distintas que estão divididas em dois clados denominados de *Incaratum* e *Equiseti* (O'DONNELL et al. 2009, 20012). As espécies deste complexo estão cada vez mais associados a doenças de plantas, além de causarem problemas de saúde em humanos e animais (JACOBS et al., 2018). Nesse complexo, três isolados agruparam no clado *ircarnatum* que possui espécies crípticas de extrema similaridade morfológica e até então todas as espécies relatada dentro deste clado são nomeadas como *Fusarium* sp., assim como nossos isolados (O'DONNELL et al., 2009; CABAÑES et al., 2014). Dentre as espécies que compõem o complexo apenas *F. lacertarum* (clado *Equiseti*) foi relatada em cactácea causando podridão em cladódios de *Nopalea cochenillifera* no Brasil (SANTIAGO et al., 2018).

O complexo *dimerum*, apresenta grande importância uma vez que a maioria das espécies causam doenças em humanos e vegetais, exceto a espécie *F. lunatum*, identificado no presente estudo, que é relatada causando doenças apenas em plantas da família cactaceae (*Opuntia* e *Gymnocalycium*) (SCHROERS et al., 2009). Em palma forrageira, essa espécie (*F. lunatum*) foi relatada em *O. ficus-indica* (palma forrageira da variedade gigante) no México, associada a mancha negra, doença de grande importância nesse país (FLORES-FLORES et al., 2013). No entanto, essa é a primeira ocorrência de *F. lunatum* no Brasil, além de ser o primeiro relato em *N. cochenillifera*.

Em relação às análises morfológicas, algumas espécies identificadas apresentaram características semelhantes ao que já foram descritas na literatura (LESLIE, SUMMERELL, 2006; IBRAHIM et al 2017; CHANG et al., 2018; SREEPURNA et al.,

2018). Já as espécies *F. verticillioides* e *F. lunatum* não produziram macroconídios mesmo utilizando diferentes meios de cultura, características também observadas por outros autores, que já relataram a dificuldade de produzir macroconídios para essas espécies (LESLIE, SUMMERELL, 2006). Observou-se também ausência de clamidósporos nas espécies *F. verticillioides*, *F. pseudocircinatum*, *F. proliferatum* e *Fusarium* sp., sendo esses resultados similares aos de Leslie, Summerell (2006).

As variações observadas nas espécies em relação à coloração e crescimento das colônias, corroboram com trabalhos para o gênero *Fusarium* (STUMPF, 2011; KUHEN JÚNIOR et al., 2013; CARMO, 2017). Porém, alguns autores relatam que para este gênero estas características são muito variáveis, podendo ser influenciadas pelas condições de cultivo (VENNERE, 2004; RAHJOO et al., 2008)

Os isolados de *Fusarium* do presente estudo foram obtidos de três diferentes zonas do semiárido nordestino: na Zona da mata, um isolado (*F. verticillioides*), no Agreste, 24 isolados (*F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. pseudocircinatum*, *Fusarium* sp., *F. lunatum* e *F. oxysporum*) e no Sertão, um isolado (*F. lunatum*). Com isso, é possível supor que o clima dessas regiões provavelmente não influencie na diversidade de espécies identificadas no presente estudo uma vez que houve ocorrência de mesmas espécies em diferentes zonas. Porém, somente com um número maior de isolados das zonas da mata e sertão para afirmar essa hipótese.

Em relação aos estados/municípios de coleta, foram identificadas quatro espécies no estado de Alagoas e dentre estas *F. verticillioides* foi a mais prevalente. Em Pernambuco as seis espécies estavam presentes e a mais prevalente foi *F. lunatum*. Foi possível observar também maior distribuição das espécies nos municípios de Alagoas, já em Pernambuco, as espécies identificadas em um município não eram observadas nos outros. Em Bom Conselho apenas a espécie *F. verticillioides*, em São João, *F. oxysporum*, *F. lunatum* e *Fusarium* sp. e por fim Lajedo onde identificamos as espécies *F. pseudocircinatum* e *F. proliferatum*. Com isso, podemos supor também a necessidade de uma amostragem maior para verificar a real diversidade de espécies não só nos estados de Alagoas e Pernambuco, mas também em outros estados produtores da cultura.

As espécies *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides* e *Fusarium* sp., já foram relatadas em algumas culturas no Brasil, como alface, citros, feijão, mandioca, soja, tomate (MENDES, 1998), milho (BARROS, 2013) e café (PFENNING, MARTINS 2000). E de acordo com dados do IBGE (2017), essas culturas estão distribuídas nos municípios onde foram realizadas as coletas. Assim, levantamos a hipótese de que a

ocorrência dessas espécies, infectando palma forrageira, podem ser associadas à migração do patógeno entre hospedeiros ou através de atividade antropogênica, contribuindo para a diversidade de espécies encontradas nos estados de Alagoas e Pernambuco. Já a espécie *F. pseudocircinatum* foi relatada no Brasil apenas em Petrolina/PE na cultura da manga, porém, em Lajedo/PE (único local onde a espécie foi identificada) não há plantio comercial de manga (IBGE, 2017) o que não significa dizer que esse hospedeiro não seja encontrado no município servindo como fonte de inóculo para a palma forrageira. Já *F. lunatum*, não foi relatada em nenhuma cultura no Brasil e isso, provavelmente, se deve a escassez de estudos relacionados a doenças em cactáceas (únicos hospedeiros dessa espécie até então) no país.

É possível supor também que a fonte de inóculo esteja presente nas áreas de coleta na forma de clamidósporos, que são estruturas de resistência capazes de permanecer no solo por longos períodos, porém mais estudos são necessários, direcionados ao histórico de cultivo nessas áreas, introdução de material infectado e até mesmo rotação de culturas com plantas hospedeiras das espécies de *Fusarium* aqui identificadas.

Algumas espécies identificadas neste trabalho como *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. pseudocircinatum* e *F. oxysporum*, são capazes de produzir micotoxinas, prejudiciais a humanos e animais (SANTIN et al., 2000; AOKI et al., 2014). E como os produtores relatam que os cladódios com sintomas da doença (mancha marrom) são fornecidos aos animais faz-se necessário estudos mais detalhados em relação estas espécies uma vez que possam produzir toxinas capazes de agredirem os animais, podendo inclusive levá-los à morte.

Por fim, esse estudo demonstra a importância do uso de marcadores moleculares que sejam altamente informativos na identificação precisa das espécies de *Fusarium*. Apesar da alta diversidade de espécies observada neste estudo, é possível que outras espécies pertencentes ao gênero *Fusarium* estejam associadas a mancha marrom em cladódios de *N. cochenillifera*. Portanto, estudos adicionais utilizando amostras provenientes de outras localidades são necessários antes de uma conclusão definitiva sobre a real diversidade de *Fusarium* associada a essa doença.

6. CONCLUSÃO

- As espécies *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. pseudocircinatum*, *Fusarium sp.*, *F. lunatum* e *F. oxysporum* estão associadas a mancha marrom da palma forrageira miúda (*Nopalea cochenillifera*) nos estados de Alagoas e Pernambuco.
- Este é o primeiro relato das espécies *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. pseudocircinatum*, *Fusarium sp.*, *F. lunatum* e *F. oxysporum* causando mancha marrom na palma forrageira miúda no mundo.
- As espécies *F. verticillioides* e *F. lunatum* foram mais prevalentes nos estados de Alagoas e Pernambuco, respectivamente.
- As espécies *Fusarium sp.* e *F. lunatum* foram as mais agressivas.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. Plant pathology. San Diego: Academic Press. 5 ed. 2005. 922 p
- ALFIERI JR, S. A. Index of plant diseases in Florida. **Fla Dept Agric Cons Serv Div Plant Ind Bull**, v. 11, p. 1-389, 1984.
- AL-SADI, A. et al. Characterization and pathogenicity of fungal pathogens associated with root diseases of citrus in Oman. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 16, n. 2, 2014.
- AOKI, T.; O'DONNELL, K.; GEISER, D. M. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, n. 3, p. 189-201, 2014.
- ARAÚJO, L. F. et al. Equilíbrio higroscópico da palma forrageira: Relação com a umidade ótima para fermentação sólida. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, n. 3, p. 379-384, 2005.
- ARMSTRONG, G. M. *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt disease. **Fusarium: disease, biology, and taxonomy**, p. 391-399, 1981.
- BARBOSA, R. S. et al. Doenças da Palma Forrageira. In: LOPES, E. B. (Ed.) Palma forrageira: Cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino. João Pessoa: EMEPA/FAEPA, p. 81 – 98, 2012.
- BARGUIL, B. M. et al. First report of dry rot caused by *Fusarium oxysporum* on rose (*Rosa* spp.) in Brazil. **Plant Disease**. v.93, p.766, 2009.
- BARRIOS, L. M.; PÉREZ, I. O. Nuevos registros de hongos en semillas de *Oryza sativa* en Cuba. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología**, v. 75, p. 64-67, 2005.
- BARROS, N.L. Caracterização morfológica e molecular de isolados de *Fusarium* associados a grãos de milho. Garanhuns (UFRPE) Dissertação, 2013. 40p.
- BENJAMIN, C. R., SLOT, A. Fungi of Haiti. *Sydowia*. v. 23, n. 1-6, p. 125-163, 1969.
- BERTETTI, D. et al. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* on new hosts of the cactaceae and euphorbiaceae families. **Journal of Plant Pathology**, v. 99, n. 2, 2017.
- BOOTH, C. et al. The genus *fusarium*. 1971.
- BOOTH, J. A.; ALCORN, S. M. Seedling rot of *Carnegiea gigantea* (Engelm.) Britt. & Rose caused by *Fusarium* spp. **Plant Disease Report**, v. 43, p. 1038-1041, 1959.
- BORGES, R. C. F. et al. Vascular wilt of teak (*Tectona grandis*) caused by *Fusarium oxysporum* in Brazil. **Phytopathologia Mediterranea**. v.57, n.1, p. 115-121, 2018.
- BURGESS, L. W. B. et al. Biodiversity and population studies in *Fusarium*. **SYDOWIA-HORN-**, v. 48, p. 1-11, 1996.

CABRAL, C. S. Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* das Regiões Sul e Sudeste do Brasil e identificação de acessos resistentes de alface. Recife (UFRPE). 2012. Dissertação. 97f.

CACCIOLA, S. O.; MAGNANO, DI S. L. Foot rot of prickly pear cactus by *Phytophthora nicotianae*. **Plant Disease**, v. 72, p. 793 – 796. 1988.

CÂNDIDA, D. V. et al. Controle genético da murcha do fusário (*Fusarium oxysporum*) em feijoeiro comum. **Tropical plant pathology**, v. 34, n. 6, p. 379-384, 2009.

CARMO, A. L.M. *Fusarium* em sementes de pínus no Brasil: Distribuição, patogenicidade, identificação de espécies e controle biológico. Curitiba (UFPR), Tese de Doutorado, 2017, 87 p.

CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F. J. Phylogenetic diversity of *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex isolated from Spanish wheat. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 2, p. 309-317, 2014.

CAVALCANTE, L. A. D. et al. Respostas de genótipos de palma forrageira a diferentes densidades de cultivo. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 44, n. 4, p. 424-433, 2014.

CHANDRA, NAYAKA S. et al. Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, n. 5, p. 1625-1639, 2011.

CHANG, X. et al. Identification of *Fusarium* species associated with soybean root rot in Sichuan Province, China. **European Journal of Plant Pathology**, v. 151, n. 3, p. 563-577, 2018.

COELHO, R. S. B. Doenças da palma. In: MENEZES, R. S. C.; SIMÕES, D. A., SAMPAIO, E. V. S. B (Eds). *A palma no Nordeste do Brasil: Conhecimento atual e novas perspectivas de uso*. 1ª ed. Editora Universitária – UFPE, Recife, Brasil, p. 57-63. 2006

CONFORTO, C. et al. First Report of Cladode Brown Spot in Cactus Prickly Pear Caused by *Neofusicoccum batangarum* in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, p.1238, 2016.

DE ALBUQUERQUE, S. G. Cultivo da palma forrageira no Sertão do São Francisco. Embrapa Semiárido-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2000.

DE SOUZA, A. E. F. et al. Ocorrência e identificação dos agentes etiológicos de doenças em palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill.) no seminário paraibano. **Biotemas**, v. 23, n. 3, p. 11-20, 2010.

DORN, B. et al. *Fusarium* species complex on maize in Switzerland: occurrence, prevalence, impact and mycotoxins in commercial hybrids under natural infection. **European Journal of Plant Pathology**, v. 125, n. 1, p. 51-61, 2009.

FANDOHAN, P. et al. Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in África. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 570-579, 2003.

FARIAS, I. et al. Manejo de colheita e espaçamento da palma-forrageira, em consórcio com sorgo granífero, no agreste de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 341-347, 2005.

FARR, M. L.; SPEGAZZINI, C. Annotated list of Spegazzini's fungus taxa. **Biblioth. Mycol.** Vol. 1. 35: 1-823. 1973.

FEIJÓ, F. M. et al. First report of cladode and foot rots caused by *Pythium aphanidermatum* on cactus (*Nopalea cochenillifera*). **Plant Disease**, v. 100, n. 8, p. 1797-1797, 2016.

FLORES-FLORES, R. et al. Identification of fungal species associated with cladode spot of prickly pear and their sensitivity to chitosan. **Journal of phytopathology**, v. 161, n. 7-8, p. 544-552, 2013.

FRANCO, A.; PONTE, J. J. Podridão polaciana da palma forrageira. **Fitopatologia Brasileira** v. 5, n. 2, 277-282. 1980.

FREDERICO, M. F. Etiologia e prevalência das manchas de cladódios da palma forrageira miúda nos estados de Alagoas e Pernambuco. Rio Largo (UFAL). 2016. TESE (Doutorado em proteção de plantas). 2014. 76 p.

FREEMAN, S. et al. First report of Mango Malformation Disease caused by *Fusarium pseudocircinatum* in Mexico. **Plant. Disease**. v. 98. 1583,

Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo Agropecuário 2017. Disponível em: https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html. Acesso: abril de 2018.

GAO, M. et al. First report of tomato leaf spot caused by *Fusarium proliferatum* in China. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 38, n. 3, p. 400-404, 2016.

GONZÁLEZ, C.; COCK, L. S.; LÓPEZ, E. G. Caracterización molecular de *Fusarium* asociado a pudrición basal del fruto en Pitahaya (*Selenicereus megalanthus*). **Agromía Mesoamericana**, v. 27, n. 2, p. 277-285, 2016.

GARCÍA-LÓPEZ, E. et al. First report of *Fusarium pseudocircinatum* causing mango malformation disease in Dominican Republic. **Plant Disease**, v. 100, n. 7, p. 1501-1501, 2016.

GARIBALDI, A. et al. First report of basal stem rot of apple cactus (*Cereus peruvianus monstrosus*) caused by *Fusarium oxysporum* in Italy. **Plant Disease**. v. 95, p. 877, 2011.

GARIBALDI, A. et al. First Report of *Fusarium oxysporum* causing wilt on *Astrophytum myriostigma* in Italy. **Plant disease**, v. 100, n. 1, p. 215, 2016.

GEISER, D. M. et al. A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**. v. 110, p. 473-479, 2004.

GERIACH, W. *Fusarium*-Fäule und andere pilzliche Krankheiten gärtnerisch wichtiger Kakteen in Deutschland). **Journal of Phytopathology**.v.74, n.3, p.197–217, 1972

GRANATA, G. Doenças bióticas e abióticas. In: BARBERA et al. Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira. FAO / SEBRAE – PB, p. 112 – 122, 2001.

HAAPALAINEN, M. et al. *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. redolens* associated with basal rot of onion in Finland. **Plant Pathology**, v. 65, n. 8, p. 1310-1320, 2016.

HAWKSWORTH, D. L. et al. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. CAB International. **International Mycological Institute, Kew, UK**, 1995.

HYDE, K. D. et al. One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera. **Fungal Diversity**, v. 67, n. 1, p. 21-125, 2014.

IBRAHIM, N. F. et al. Characterization of *Fusarium* spp. associated with pineapple fruit rot and leaf spot in Peninsular Malaysia. **Journal of Phytopathology**, v. 165, n. 11-12, p. 718-726, 2017.

JACOBS, A. et al. Characterisation of members of the *Fusarium incarnatum*-*equiseti* species complex from undisturbed soils in South Africa. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, n. 11, p. 1999-2008, 2018.

JACOBS, A. et al. *Fusarium ananatum* sp. nov. in the *Gibberella fujikuroi* species complex from pineapples with fruit rot in South Africa. **Fungal Biology**, v. 114, n. 7, p. 515-527, 2010.

KELLY, L. A. et al. *Fusarium* species associated with stalk rot and head blight of grain sorghum in Queensland and New South Wales, Australia. **Plant Pathology**, v. 66, n. 9, p. 1413-1423, 2017.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo. Editora Agronômica Ceres. 1997. v. 2. 774p.

KOYYAPPURATH, S. et al. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae* is the causal agent of root and stem rot of vanilla. **Plant Pathology**, v. 65, n. 4, p. 612-625, 2016.

KUHNEM JÚNIOR, P. R. et al. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. **Ciência Rural**. v. 43, n. 4, p. 583-588, 2013.

KVAS, M. et al. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. **Fungal divers**, v. 34, p. 1-21, 2009.

LESLIE, J. F. et al. Species diversity and toxin production by strains in the *Giberella fujikuroi* species complex isolated from prairie grasses in Kansas. **Applied and Enviromental Microbiology**. v. 70, p. 2254-2262, 2004.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Ames: Blackwell, 2006.388 p.

- LIEW, E. C. Y. et al. Review of *Fusarium* species isolated in association with mango malformation in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 45, n. 6, p. 547-559, 2016.
- LIMA, G. S. A. et al. Development and validation of a standard area diagram set for assesment of *Alternaria* Spot on cladodes of the prickly pear cactus. **Journal of Plant Pathology**, v. 93, p. 691- 695, 2011.
- LIMA, I. M. M.; GAMA, N. S. Registro de plantas hospedeiras (cactaceae) e de nova forma de disseminação de *Diaspis echinocacti* (Bouché) (Hemíptera: Diaspididae), cochonilha da palma forrageira, nos estados de Pernambuco e Alagoas. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 3, p. 479 – 481, 2001.
- LOPES, E. B. et al. Cultivo da Palma Forrageira. In: LOPES, E. B. (Ed.) Palma forrageira: Cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino. João Pessoa: EMEPA/FAEPA. 2012. p. 21 – 60.
- MACIEL, C. G. et al. *Fusarium oxysporum* and *F. verticillioides* associated with damping-off in *Pinus* spp. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 1, p. 134-141, 2017.
- MACHADO, A.K.F.M. Espécies de *Fusarium* associadas a malformação da mangueira. Minas Gerais (UFLA). Dissertação. 2013. 52 p.
- MASRATUL HAWA, M. et al. *Fusarium fujikuroi* associated with stem rot of red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) in Malaysia. **Annals of Applied Biology**, v. 170, n. 3, p. 434-446, 2017.
- MASRATUL HAWA, M.; SALLEH, B.; LATIFFAH, Z. Characterization and pathogenicity of *Fusarium proliferatum* causing stem rot of *Hylocereus polyrhizus* in Malaysia. **Annals of applied Biology**, v. 163, n. 2, p. 269-280, 2013.
- MENDES, M. A. S. et al. **Fungos em Plantas no Brasil**. Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, Brasília, 555 p. 1998
- MÉNDEZ-GALLEGOS, S.J.; et al. Identificación y control de las principales enfermedades del nopal. **Revista Salud Pública y Nutrición**, v. 2, p. 2 – 13, 2009.
- MICHEREFF, S.J. et al. Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, S.J.; ANDRADE, D.E.G.T.; MENEZES, M. (Eds.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. p.1 – 18.
- MILANESI, P.M. Caracterização, toxicidade e patogenicidade de *Fusarium* spp. em genótipos de soja em sistema plantio direto. Santa Maria (UFSM). Dissertação (Mestrado em Agronomia). 2009. 91 p.
- MILLER, J.W. Tri-ology Techn. Rep. Div. Pl. Indust., Florida. **Plant Pathology Section**. V. 32, n. 3, p 7-9.1993.
- MILLER, J.W. Tri-ology Techn. Rep. Div. Pl. Indust., Florida. **Plant Pathology**. v. 36 n. 2, p 14-16.1997.

- MOLNÁR, O. *Fusarium proliferatum* causing head blight on oat in Hungary. **European journal of plant pathology**, v. 146, n. 3, p. 699-703, 2016.
- MOORMAN, G. W.; KLEMMER, R. A. *Fusarium oxysporum* causes basal stem rot of *Zygocactus truncatus*. **Plant Disease**, v. 64, n. 12, p. 1118-1119, 1980.
- MORAES, W. B. et al. First report of *Fusarium oxysporum* causing *Fusarium* root rot on yacon potatoes in Brazil. **Plant Disease**. v.101, n.4, p. 629, 2017.
- MOREIRA, S. I. et al. Postharvest Ginger Rhizome Rot Caused by *Fusarium verticillioides* in Brazil. **Plant Disease**, v. 99, n. 8, p. 1177-1177, 2015.
- MULÉ, G.; SUSCA, A.; STEA, G.; MORETTI, A. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* and *F usarium subglutinans*. **European Journal Plant Pathology**. v 110, p. 495-502, 2004.
- Mycobank. Disponível em ><http://www.mycobank.org/quicksearch.aspx><. Acesso: janeiro de 2019.
- NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium Species: an Illustrated Manual for Identification***. Philadelphia: Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.
- NUNES, C. S. Usos e aplicações da palma forrageira como uma grande fonte de economia para o semiárido nordestino. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 6, n. 1, p. 58-66, 2011.
- O' DONNELL, K. et al. Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via FUSARIUM-ID and *Fusarium* MLST. **Mycologia**. v.104, p. 427–445, 2012.
- O'DONNELL, K. et al. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, n. 8, p. 2477-2490, 2008.
- O'DONNELL, K. et al. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 12, p. 936-948, 2009.
- O'DONNELL, K. et al. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 14, p. 7905-7910, 2000.
- O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, p. 465-493, 1998.
- O'DONNELL, K. et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene

genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.95, n. 5, p. 2044–2049. 1998.

OLIVEIRA, F. T. et al. Palma forrageira: adaptação e importância para os ecossistemas áridos e semiáridos. **Revista Verde**, v. 5, n. 4, p. 27 – 37, 2010.

OLIVEIRA, L. F. M. et al. Identification of *Colletotrichum* species associated with brown spot of cactus prickly pear in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 3, p. 247-253, 2018.

PALMERO, D. et al. First report of *Fusarium proliferatum* causing rot of garlic bulbs in Spain. **Plant disease**, v. 94, n. 2, p. 277-277, 2010.

PFENNING, Ludwig Heinrich; MARTINS, Melissa Faria. Espécies de *Fusarium* associados ao cafeeiro na região sul de Minas Gerais. 2000.

PINARIA, A. G.; LIEW, E. C. Y.; BURGESS, L. W. *Fusarium* species associated with vanilla stem rot in Indonesia. **Australasian Plant Pathology**, v. 39, n. 2, p. 176-183, 2010.

Phytopathological Society of Japan (PSJ); National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS) Common names of plant diseases in Japan, 2nd edn. Phase Out Inc., Nagoya. 2012

POLIZZI, G.; VITALE, A. First report of basal stem rot of golden barrel cactus caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* in Italy. **Plant disease**, v. 88, n. 1, p. 85-85, 2004.

PONTE, J. J.; FRANCO, A.; MENEZES, R. N. Uma nova enfermidade da palma forrageira. **Fitopatologia Brasileira**. V.8 (2). p 185-187. 1983

QUESADA-OCAMPO, L. M. et al. First Report of *Fusarium* Rot of Garlic Bulbs Caused by *Fusarium proliferatum* in North Carolina. **Plant Disease**, v. 98, n. 7, p. 1009-1009, 2014.

QUEZADA-SALINAS, A. et al. First Report of *Fusarium oxysporum* Causing Stem Dry Rot in *Astrophytum ornatum* in Mexico. **Plant Disease**, v. 101, n. 7, p. 1324-1324, 2017.

RAJHOO, V et al. Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Irã. **Journal Plant Pathology**, v. 90, p. 463-468, 2008.

RAMPERSAD, S. N.; TEELUCKSINGH, L. D. First Report of *Fusarium proliferatum* Infecting Pimento Chili Peppers in Trinidad. **Plant Disease**, v. 95, n. 10, p. 1313-1313, 2011.

SALAZAR-GONZÁLEZ, C.; SERNA-COCK, L.; GÓMEZ-LÓPEZ, E. Molecular characterization of *Fusarium* associated with basal rot of the fruit of pitahaya (*Selenicereus megalanthus*). **Agronomía Mesoamericana**, v. 27, n. 2, p. 277-285, 2016.

- SALVALAGGIO, A. E.; RIDAO, A. del C. First report of *Fusarium proliferatum* causing rot on garlic and onion in Argentina. **Plant Disease**, v. 97, n. 4, p. 556-556, 2013.
- SANDOVAL-DENIS, M. et al. Symptomatic Citrus trees reveal a new pathogenic lineage in *Fusarium* and two new *Neocosmospora* species. **Persoonia**, v. 40, p. 1-25, 2018.
- SANGLARD, D. A.; MELO, G. G. **Pesquisas com palma forrageira: panorama atual**. Disponível em:
<http://www.cdsa.ufcg.edu.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=988:pesquisas-com-palma-forrageira-panorama-atual&catid=92:artigos&Itemid=460>. Acesso em: 10 de junho de 2018.
- SANKAR, N. R.; BABU, GUNDALA, P. First report of *Fusarium proliferatum* causing rot of garlic bulbs (*Allium sativum*) in India. **Plant Disease**, v. 96, n. 2, p. 290-290, 2012.
- SANTIAGO, M. F. et al. First Report of a Member of the *Fusarium oxysporum* Species Complex Causing Cladode Rot in *Nopalea cochenillifera* in Brazil. **Plant Disease**, v. 102, n. 12, p. 2652, 2018.
- SANTIAGO, M. F. et al. First report of *Fusarium lacertarum* causing cladode rot in *Nopalea cochenillifera* in Brazil. **Journal of Plant Pathology**. v. 100, n. 3, p. 611-611, 2018. 2018.
- SANTIN, E. et al. Micotoxinas do *Fusarium* spp na avicultura comercial. **Ciência Rural**, v. 31, n. 1, 2001.
- SANTOS, D. C. E. et al. Usos e aplicações da palma forrageira. In: LOPES, E. B. (Ed.) **Palma forrageira: Cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino**. João Pessoa: EMEPA/FAEPA, p. 99 - 150, 2012.
- SANTOS, D. C. et al. Desempenho produtivo de vacas 5/8 holando/zebu alimentadas com diferentes cultivares de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Zootecnia, v. 30, n. 1, p. 12 – 17, 2001.
- SANTOS, M. V. F. et al. Estudo comparativo de cultivares de palma forrageira “Gigante”, “Redonda” (*Opuntia ficus-indica* Mill) e “Miúda” (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dick) na produção de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 19, n. 6, p. 504 – 511, 1997.
- SANTOS, M. V. F. et al. Estudo comparativo de cultivares de palma forrageira “Gigante”, “Redonda” (*Opuntia ficus-indica* Mill) e “Miúda” (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dick) na produção de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 19, n. 6, p. 504 – 511, 1990.
- SCHENA, L. et al. First Report of *Neofusicoccum batangarum* as Causal Agent of Scabby Cankers of Cactus Pear (*Opuntia ficus-indica*) in Minor Islands of Sicily. **Plant Disease**, v. 102, n. 2, p. 445-445, 2018.

- SCHROERS, H. J. et al. Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. **Mycologia**, v. 101, n. 1, p. 44-70, 2009.
- SECRETARIA DA AGRICULTURA DO ESTADO DE ALAGOAS (SEAGRI). Disponível em > www.agricultura.al.gov.br. Acessado em: novembro de 2018.
- SHELDON, J.L. A corn mold. In: ANNU. REP. AGRIC. EXP. STN. NEBR., 17., p.23-32, 1904.
- SHIRAIISHI, A. et al. AFLP, pathogenicity, and VCG analyses of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium pseudocircinatum* from *Acacia koa*. **Plant disease**, v. 96, n. 8, p. 1111-1117, 2012.
- SILVA, C. C. F.; SANTOS, L. C. Palma Forrageira (*Opuntia Ficus-Indica* Mill) como alternativa na alimentação de ruminantes. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 7, n. 10, p. 1 – 13. 2006.
- SILVA, D. M. P. Ocorrência de calloenesis sobre a cochonilha em Alagoas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 281 – 282, 1990.
- SOUZA, A. E. F. et al. Ocorrência e identificação dos agentes etiológicos de doenças em palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill.) no semiárido paraibano. **Revista Biotemas**, v. 23, n. 3, p. 11 – 20, 2010.
- SWART, W. J.; SWART, V. R. An Overview of Research on Diseases of Cactus Pear in South Africa. **Journal of the Professional Association for Cactus Development**. v. 15, p. 115 – 120. 2003.
- TARNOWSKI, T. L.; PÉREZ-MARTÍNEZ, J. M.; PLOETZ, R. C. Fuzzy pedicel: a new postharvest disease of banana. **Plant Disease**, v. 94, n. 5, p. 621-627, 2010.
- TAYLOR, N. P. et al. Realignment and revision of the Opuntioideae (Cactaceae) of Eastern Brazil. In: HUNT, D. et al. (Ed.). **Studies in the Opuntioideae (Cactaceae)**, p. 99 – 132. 2002.
- TUPAKI-SREEPURNA, A. et al. Phylogenetic Diversity and In Vitro Susceptibility Profiles of Human Pathogenic Members of the *Fusarium fujikuroi* Species Complex Isolated from South India. **Mycopathologia**, v. 183, n. 3, p. 529-540, 2018.
- VAN HOVE, F. et al. *Gibberella musae* (*Fusarium musae*) sp. nov., a recently discovered species from banana is sister to *F. verticillioides*. **Mycologia**, v. 103, n. 3, p. 570-585, 2011.
- VASCONCELOS, A. G. V. et al. Micropropagação de palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera* Salm Dyck). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias, Recife**, v. 2, n. 1, p. 28-31, 2007.
- VENNERE, O. **Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi**: a study on two extreme cases. Uppsala: Faculty of Science and Technology, 2004. 72p.

VICTOR, M. M.; UCHÔA, J. E.; RIATTO, V. B. First use of cactus and cushcush as biocatalysts in the enantioselective reduction of β -keto esters. **Industrial Crops and Products**, v. 96, p. 126-131. 2017

WOLLENWEBER, H. W; REINKING, O. A. Die fusarien, ihre beschreibung, schadwirkung und bekämpfung. **Paul Parey**. 1935.