

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

MARIA LAURA URBANO NASCIMENTO

***Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense*: hospedeiros alternativos e
vetor**

Alegre

2021

MARIA LAURA URBANO NASCIMENTO

***Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*: hospedeiros alternativos e
vetor**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Moises Zucoloto

Alegre

2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

U72f Urbano Nascimento, Maria Laura, 1996-
Fusarium oxysporum f. sp. cubense : hospedeiros
alternativos e vetor / Maria Laura Urbano Nascimento. - 2021.
102 f. : il.

Orientador: Moises Zucoloto.

Coorientadores: Miguel Angel Dita Rodríguez, Jeanne Scardini Marinho Prado.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Fusariose da bananeira. 2. Broca-da-bananeira. 3. Epidemiologia. 4. Insetos vetores. 5. Fitossanidade. I. Zucoloto, Moises. II. Dita Rodríguez, Miguel Angel. III. Scardini Marinho Prado, Jeanne. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. V. Título.

CDU: 63

MARIA LAURA URBANO NASCIMENTO

***Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*: hospedeiros alternativos e vetor**

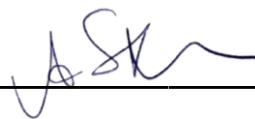
Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de mestre em Agronomia.

Aprovada em 28 de dezembro de 2021.



Dra. Jeanne Scardini Marinho Prado

Empresa Brasileira de Pesquisa
Agropecuária - EMBRAPA
(Examinador externo 1)



Prof. Dr. André da Silva Xavier

Universidade Federal do Espírito
Santo
(Examinador interno)



Dra. Poliana Fernanda Giachetto

Empresa Brasileira de Pesquisa
Agropecuária - EMBRAPA
(Examinador externo 2)



Prof. Dr. Moises Zucoloto

Universidade Federal do Espírito
Santo
(Orientador)

Aos meus pais, João Batista Oliveira do Nascimento (*in memoriam*) e Sheila Urbano, minha avó Celita Urbano, sobrinha Lara Torres do Nascimento, e ao amigo e ex-orientador, Willian Bucker Moraes.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por me conceder saúde e me dar forças para percorrer todo este caminho.

À Universidade Federal do Espírito Santo, no Programa de Pós Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias pela oportunidade de realização do mestrado.

À CAPES, pela concessão da bolsa, que foi de extrema importância para a realização do mestrado.

Aos membros examinadores da banca, pelas contribuições para o enriquecimento deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pelo conhecimento compartilhado que contribuiu para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu orientador, Professor Dr. Moises Zucoloto, pelo companheirismo, paciência, ensinamento e conhecimentos compartilhados durante o desenvolvimento desta dissertação.

Ao meu coorientador Dr. Miguel Angel Dita Rodriguez, pela parceria e oportunidade da realização deste trabalho, pelo suporte e todo o conhecimento compartilhado.

À minha coorientadora Dra. Jeanne Scardini Marinho Prado, por toda a atenção, suporte, parceria e todo o conhecimento compartilhado.

Aos funcionários e estagiário do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia e do Setor de Campos experimentais da Embrapa Meio Ambiente, Bruno, Henrique, Elen, José Roberto, Mara, Robertinho e Thayne, pelo suporte e conhecimentos compartilhados no decorrer deste ano de trabalho.

À Embrapa Meio Ambiente, por conceder infraestrutura e equipamentos para o desenvolvimento do trabalho, além da ajuda dos funcionários com o suporte no desenvolvimento das atividades.

À equipe da APTA, Polo Regional Vale do Ribeira – Pariquera-Açu, especialmente ao Dr. Edson Nomura, pela parceria e suporte nas coletas de campo que foram essenciais para o desenvolvimento dos experimentos.

À FAPESP, pelo financiamento do projeto no qual se fundamenta este trabalho.

Aos meus pais, Sheila Urbano e João Batista Oliveira do Nascimento (*in memoriam*), pela vida.

À minha avó Celita Urbano, pelo amor incondicional, apoio, motivação e incentivo, apesar da distância.

A toda minha família, pelo amor, por sempre torcerem pelo meu sucesso e me incentivarem.

Ao meu amigo Roxy, por ter se tornado família longe de casa e por todos os momentos compartilhados.

Aos colegas de república, pela convivência.

A todos que conheci durante essa jornada e que, direta ou indiretamente, em algum momento contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO GERAL

NASCIMENTO, Maria Laura Urbano; M.Sc.; Universidade Federal do Espírito Santo; 2021; ***Fusarium oxysporum* s. sp. cubense: hospedeiros alternativos e vetor**; Orientador: Moises Zucoloto.

Uma das doenças mais importantes na cultura da bananeira é a fusariose da bananeira (FB), causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). Pouco se sabe sobre a atuação de hospedeiros alternativos e de um possível vetor na dispersão e persistência da doença no campo. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi verificar o potencial de plantas daninhas e plantas utilizadas como coberturas vegetais como hospedeiras alternativas de Foc e a atuação da broca-da-bananeira (*Cosmopolites sordidus*) na disseminação da doença. Para o estudo de hospedeiros alternativos, dez espécies de plantas daninhas coletadas próximas a plantas de bananeira apresentando sintomas de FB foram submetidas ao isolamento de Foc possivelmente presente em tecidos de parte aérea e raízes. Após o isolamento, aqueles isolados identificados como *F. oxysporum* por meio do sequenciamento das regiões ITS e o gene que codifica para TEF-1 α foram submetidos a testes de patogenicidade para a bananeira (Cultivar Maçã, AAB). Além disso, sementes de seis espécies de plantas utilizadas como coberturas vegetais foram desinfestadas e semeadas em substrato infestado com Foc isolado CMAA1807. Aos 75 dias após a semeadura, amostras de raízes e parte aérea dessas plantas foram coletadas visando o reisolamento e confirmação da presença de Foc CMAA1807 através de reação de PCR. Para o estudo do papel da broca-da-bananeira na disseminação da doença, insetos adultos coletados em áreas contrastantes em função da presença da FB (parcelas Foc+ e Foc-) foram analisados quanto à presença de esporos de Foc possivelmente associados ao exoesqueleto ou no trato digestivo. Após a obtenção dos isolados, aqueles identificados como *F. oxysporum* foram submetidos a testes de patogenicidade em bananeira. Numa segunda etapa, indivíduos adultos de *C. sordidus* foram expostos à fonte de inóculo de Foc isolado CMAA1807 e colocados em contato com mudas de banana para a avaliação do seu potencial como vetor da doença. Foi verificado que algumas leguminosas podem servir como hospedeiras alternativas de Foc, como a *Crotalaria ochroleuca*, *Crotalaria spectabilis*, *Raphanus sativus* e *Canavalia ensiformis*, das quais foi possível reisolar o isolado CMAA1807. Como resultados das coletas realizadas em campo, foi possível isolar colônias de *F. oxysporum* associadas a plantas daninhas e ao exoesqueleto de adultos de *C. sordidus*. No entanto, ao testar a patogenicidade em bananeira, não foram observados sintomas típicos da FB, o que sugere que estes isolados possivelmente não se tratavam de Foc. Ao avaliar a dinâmica da interação entre a broca-da-bananeira e o agente causal da FB, foi observado que pode haver a associação fungo-inseto sobre a incidência e intensidade da doença em bananeira.

Palavras-chave: Broca-da-bananeira; Fusariose da bananeira; Epidemiologia; Insetos vetores; Fitossanidade.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Maria Laura Urbano; M.Sc.; Federal University of Espírito Santo; 2021; ***Fusarium oxysporum* s. sp. *cubense*: alternative hosts and vector**; Advisor: Moises Zucoloto.

One of the most important diseases in the banana crop is the Panama disease, or fusarium wilt, caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). Little is known about the role of alternative hosts and a possible vector on the dispersion and persistence of the disease in the field. Thus, the objective of this study was to verify the potential of weeds and plants used as green mulch as alternative hosts of Foc and the role of the banana weevil borer (*Cosmopolites sordidus*) in the dissemination of the disease. For the study of alternative hosts, weeds collected around banana plants showing fusarium wilt symptoms were submitted to the isolation of Foc possibly present in tissues of the aerial part and roots. After isolation, those isolates identified as *F. oxysporum* by sequencing the ITS regions and the gene encoding for TEF-1 α were subjected to pathogenicity tests for bananas. In addition, seeds of six species used as mulches were disinfested and sown on substrate infested with Foc. At the end of the experimental period, root and aboveground samples of these plants were collected for re-isolation and characterization of the inoculated Foc isolate by PCR reaction. To study the role of banana weevil borer in the dissemination of the disease, adult insects collected in banana plantations contrasting in the presence of FB (Foc+ and Foc-) were analyzed for the presence of Foc spores possibly associated with the exoskeleton or in the digestive tract. After obtaining the isolates, those identified as *F. oxysporum* were subjected to pathogenicity tests on banana trees. In a second step, adults of *C. sordidus* were exposed to the inoculum source of Foc and placed in contact with banana seedlings to evaluate its potential as a vector of the disease. Some legumes may serve as alternative hosts for Foc, like *Crotalaria spectabilis*, *Raphanus sativus* e *Canavalia ensiformis*. It was possible to isolate *F. oxysporum* colonies associated with weeds and the exoskeleton of *C. sordidus* adults collected in the field. However, when testing for pathogenicity to bananas, it was verified that these were possibly not Foc. When evaluating the dynamics of the interaction between the banana berry borer and the causal agent of Panama disease, it was observed that there might be a fungus-insect association on the incidence and intensity of the disease in bananas.

Keywords: Banana weevil borer; Epidemiology; Insect vectors; Plant health.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
CAPÍTULO 1	13
Plantas daninhas podem ser hospedeiras alternativas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>?	13
Introdução	15
Material e métodos	16
Isolamento de fungos endofíticos associados a ervas daninhas coletadas em áreas de produção de bananas afetadas pela fusariose da bananeira.....	16
Identificação de isolados de <i>Fusarium</i> spp. associados a ervas daninhas coletadas em áreas de produção de bananas afetadas pela fusariose da bananeira	17
Teste de patogenicidade para bananeira	18
Resultados e discussão	19
Isolamento de fungos endofíticos associados a ervas daninhas coletadas em áreas com a presença da fusariose da bananeira	19
Identificação de isolados de <i>Fusarium</i> spp. associados a ervas daninhas coletadas em áreas de produção de bananas afetadas pela fusariose da bananeira	22
Teste de patogenicidade para bananeira	32
Conclusões	36
Referências	36
CAPÍTULO 2	39
Plantas utilizadas como cobertura vegetal podem ser hospedeiras de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>?	39
Introdução	41
Material e métodos	42
Preparo do material e inoculação	42
Reisolamento e caracterização do patógeno.....	42
Resultados e discussão	44
Preparo do material e inoculação	44
Reisolamento e caracterização do patógeno.....	46
Conclusões	49
Referências	49
CAPÍTULO 3	53
A broca-da-bananeira <i>Cosmopolites sordidus</i> (Coleoptera: Curculionidae) pode ser vetor de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>, agente causal da fusariose da bananeira?	53
Introdução	55
Material e métodos	56

Isolamento de fungos endofíticos associados a adultos da espécie <i>Cosmopolites sordidus</i> coletados em áreas de produção de bananas afetadas pela fusariose da bananeira	56
Identificação de isolados de <i>Fusarium</i> spp. associados a adultos da espécie <i>Cosmopolites sordidus</i> coletados em áreas de produção de bananas afetadas pela fusariose da bananeira	58
Teste de patogenicidade para bananeira	59
Estudo da transmissão do agente causal da fusariose da bananeira por <i>Cosmopolites sordidus</i> em casa de vegetação	61
Resultados e discussão	64
Isolamento de fungos endofíticos associados a adultos da espécie <i>Cosmopolites sordidus</i> coletados em áreas de produção de bananas afetadas pela fusariose da bananeira	64
Identificação de isolados de <i>Fusarium</i> spp. associados adultos da espécie <i>Cosmopolites sordidus</i> em áreas de produção de bananas afetadas pela fusariose da bananeira	65
Teste de patogenicidade para bananeira	69
Estudo da transmissão do agente causal da fusariose da bananeira por <i>Cosmopolites sordidus</i> em casa de vegetação	72
Conclusões	76
Referências	77
CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXO I	84
Sequenciamento do gene que codifica para TEF1- α de isolados de <i>Fusarium</i> spp. provenientes de ervas daninhas coletadas em campo próximas a bananeiras com sintomas de Fusariose.....	84
ANEXO II	89
Sequenciamento da região ITS de isolados de <i>Fusarium</i> spp. provenientes de ervas daninhas coletadas em campo próximas a bananeiras com sintomas de Fusariose.....	89
ANEXO III	96
Sequenciamento do gene que codifica para TEF1- α de isolados de <i>Fusarium</i> spp. associados a adultos da espécie <i>Cosmopolites sordidus</i> coletados em áreas de bananeiras de parcelas de plantas com sintomas de Fusariose ou sadias.	96

INTRODUÇÃO GERAL

A banana é uma das frutas mais produzidas e consumidas no mundo, com grande relevância social e econômica. É considerada um alimento básico e importante para a segurança alimentar (PLOETZ, 2015; THANGAVELU; MUSTAFFA, 2012). Em 2019, a produção mundial de bananas atingiu cerca de 115 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2019). O Brasil possui características climáticas favoráveis para o cultivo dessa frutífera, que é produzida na maioria dos Estados. Com 461751 hectares plantados e produção de cerca de 7 milhões de toneladas, o país se destaca como o terceiro maior produtor mundial (FAOSTAT, 2019).

Apesar de ser uma cultura perene, a bananeira apresenta um ciclo de cultivo mais curto em relação a outras frutíferas. Dessa forma, a bananicultura se torna uma atividade atrativa, pois permite um rápido retorno do capital e fluxo contínuo de produção (ALVES, 1999). O cultivo dessa frutífera pode, no entanto, ser fortemente limitado devido à ocorrência de doenças, com perdas que podem alcançar 100% (SILVA et al., 2011; CORDEIRO et al., 2004). Uma das doenças mais importantes da bananeira é a fusariose, também popularmente conhecida como Mal-do-Panamá ou murcha de fusarium, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc).

As raças mais importantes conhecidas desse patógeno são R1, R2 e R4T que podem acometer as principais cultivares de banana plantadas no Brasil e no mundo (DITA et al. 2018). Por se tratar de um fungo veiculado pelo solo, o seu controle nem sempre é eficiente. Ainda hoje não foram desenvolvidas práticas agrícolas eficazes para sua erradicação em áreas contaminadas (SHEN et al., 2019). As principais estratégias de controle consistem em evitar a disseminação do patógeno, com alternativas como o uso de mudas micropropagadas selecionadas e medidas quarentenárias (CORDEIRO et al., 2005).

A maioria das espécies de *F. oxysporum*, incluindo Foc, são capazes de sobreviver na ausência do seu hospedeiro primário. Os clamidósporos, que são esporos fúngicos de parede espessa, são a forma mais comum de garantir a sua sobrevivência em condições adversas (LESLIE; SUMMERELL, 2006; PLOETZ, 2015). No entanto, além das estruturas de resistência, esses fungos podem sobreviver endofiticamente em hospedeiros alternativos, como ervas daninhas e plantas utilizadas como cobertura

vegetal (HELBIG; CARROLL, 1994). Existem relatos de Foc colonizando tecidos de plantas não pertencentes ao gênero *Musa* em áreas de bananeira infectadas (WAITE, DUNLAP, 1953; PITTAWAY et al., 1999; HENNESSY et al., 2005).

A utilização de plantas de cobertura é uma prática comumente sugerida em bananicultura como uma forma de auxiliar no controle de ervas daninhas, pragas e doenças (TARDY et al., 2015; PATTISON et al., 2014). Apesar disso, é preciso alertar-se de que algumas dessas espécies eventualmente podem atuar como hospedeiras de Foc (DITA et al, 2018). Ao serem infectadas pelo fungo, essas plantas podem servir como fonte de inóculo do patógeno para a bananeira e favorecer a ocorrência da doença no campo.

Devido ao padrão agregado de distribuição de plantas doentes, acredita-se que uma das principais formas de disseminação de Foc numa mesma área ocorre de planta a planta, por meio do contato das raízes infectadas (COUSINS; SUTHERLAND, 1930). Já foi observado que apesar da eliminação das plantas doentes a doença continua a se espalhar no campo (WARDLAW, 1961). Nesse contexto, deve-se considerar a atuação de outros agentes na dispersão do patógeno.

Diversos insetos-praga podem estar associados ao desenvolvimento e progresso de doenças de plantas. Isso pode ser atribuído aos danos provocados por meio da alimentação que facilitam a entrada de fitopatógenos, ou por atuarem como vetores (WILLSEY et al., 2017). Na cultura da bananeira, a broca *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae), ou moleque-da-bananeira, é uma praga de grande importância econômica, a qual, na sua fase larval, alimenta-se e provoca galerias no rizoma das plantas. Pode ser encontrado em praticamente todas as áreas produtoras de bananas no mundo (GOLD et al. 2001), assim como o Foc. Em estudo feito por Meldrum et al. (2013), foi possível detectar esporos de Foc no exoesqueleto de *Cosmopolites sordidus*, indicando que esse inseto pode atuar como vetor da doença.

Ainda hoje, existe uma deficiência de informações sobre as possíveis interações de Foc com hospedeiros alternativos e insetos vetores no campo. Identificar como ervas daninhas comuns e plantas utilizadas como coberturas vegetais podem contribuir para a sobrevivência e multiplicação do patógeno poderá influenciar diretamente na escolha de medidas mais eficientes no manejo destas em áreas infestadas com Foc no intuito de conter a população do patógeno.

CAPÍTULO 1

Plantas daninhas podem ser hospedeiras alternativas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*?

Resumo

As plantas daninhas, além de prejudicarem o desenvolvimento da bananeira por competição, ainda podem atuar como reservatório ou abrigo para nematoides, pragas e patógenos da cultura. O objetivo deste estudo foi identificar ervas daninhas coletadas em campo como possíveis hospedeiros alternativos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). Ervas daninhas foram coletadas em plantios de bananeira afetados pela fusariose da bananeira (FB) no estado de São Paulo visando o isolamento de Foc. As colônias isoladas foram identificadas por meio do sequenciamento das regiões TEF1- α e ITS e aqueles identificados como *Fusarium oxysporum* foram testados quanto à patogenicidade em bananeira. Para o teste de patogenicidade, foi utilizada a metodologia de imersão de raízes de mudas de banana cv. Maçã em suspensão de inóculo. Aos 80 dias após a inoculação (DAI), foram avaliados os sintomas de FB por meio de escala de notas, em função da descoloração do rizoma, e os dados transformados para Índice de Doença (ID). Além disso, foi feito o reisolamento dos fungos inoculados nas plantas inoculadas a partir de fragmentos de raízes, rizoma e pseudocaule. Foi possível isolar colônias de *Fusarium oxysporum* em raízes de Trapoeraba (TRARZ02 e TRARZ03), Trevo (TVORZ) e Maria Pretinha (MPRZ) e de uma planta ainda não identificada (P1RZ). De parte aérea foi possível obter apenas um isolado, proveniente de Capim Amargoso (CMPA01). Nenhum dos isolados causou sintomas típicos de FB aos 80 dias após inoculação em mudas de bananeira cv. Maçã, enquanto o isolado de Foc CMAA1807, utilizado como controle, apresentou ID de 75%. Foi possível reisolamento de todos os isolados nas raízes de pelo menos 16,67% das plantas testadas. Apenas os isolados MPRZ, P1RZ e TRARZ03 não foram recuperados em rizoma e apenas TRARZ02 e CMPA01 foram recuperados em pseudocaule. De acordo com os resultados encontrados neste estudo, plantas daninhas podem atuar como hospedeiras de *Fusarium oxysporum*, no entanto, quando inoculados em bananeira cv. Maçã não foram observados sintomas típicos de FB, o que sugere que podem não se tratar de Foc.

Palavras-chave: Plantas invasoras; Fitossociologia; Reservatório de inóculo; Manejo.

Abstract

In addition to impairing banana development by competition, weeds can also act as a reservoir or shelter for nematodes, pests and pathogens of the crop. The objective of this study was to identify weeds collected in the field as possible alternative hosts for *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). Weeds were collected from banana plantations affected by banana fusariosis (BF) in São Paulo state for isolation of Foc. Isolated colonies were identified by sequencing TEF1- α and ITS regions and those identified as *Fusarium oxysporum* were tested for pathogenicity in banana. For the pathogenicity test, the methodology of immersing roots of banana seedlings cv. Apple in inoculum suspension was used. At 80 days after inoculation (DAI), the symptoms of BF were evaluated using a scale of grades, as a function of rhizome discoloration, and the data transformed to Disease Index (DI). In addition, reisolation of the inoculated fungi was performed on the inoculated plants from root, rhizome, and pseudostem fragments. It was possible to isolate *Fusarium oxysporum* colonies from roots of tropical spiderwort (TRARZ02 and TRARZ03), Clover (TVORZ) and american black nightshade (MPRZ) and from a not yet identified plant (P1RZ). From the aerial part, it was possible to obtain only one isolate, which came from bitter grass (CMPA01). None of the isolates caused typical symptoms of BF at 80 days after inoculation in banana seedlings cv. Apple, while the Foc isolate CMAA1807, used as control, showed ID of 75%. It was possible to reisolate all isolates in the roots of at least 16.67% of the plants tested. Only isolates MPRZ, P1RZ and TRARZ03 were not recovered in rhizome and only TRARZ02 and CMPA01 were recovered in pseudostem. According to the results found in this study, weeds can act as hosts of *Fusarium oxysporum*, however, when inoculated in banana cv. Apple no typical symptoms of BF were observed, suggesting that they may not be Foc.

Keywords: Invasive Plants; Phytosociology; Inoculum reservoir; Management

Introdução

A fusariose da bananeira (FB) é um dos principais problemas fitossanitários na bananicultura. Essa doença é causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (Foc), um fungo cosmopolita habitante do solo. De acordo com a cultivar hospedeira, são definidas três principais raças desse patógeno: Raça 1 (R1), que afeta Gros Michel (AAA) e Maçã (Silk, AAB); raça 2 (R2) afeta bananas do subgrupo Bluggoe (ABB); e raça 4 (R4) que afeta, além daquelas suscetíveis a R1 e R2, bananeiras do subgrupo Cavendish (AAA) (DITA et al., 2018).

A forma mais comum de garantir a sobrevivência de Foc em condições adversas é por meio dos clamidósporos, que são esporos fúngicos de parede espessa (LESLIE; SUMMERELL, 2006; PLOETZ, 2015). Além dessas estruturas de resistência, esse patógeno pode sobreviver endofiticamente em hospedeiros alternativos, como ervas daninhas comumente encontradas em campo (WAITE; DUNLAP 1953; PITTAWAY et al., 1993; HENESSEY et al, 2005).

Além de prejudicar a produção de bananas por competição, as plantas daninhas podem atuar como reservatórios ou abrigos para nematoides, pragas e patógenos da cultura (OLIVEIRA et. al., 2018), incluindo Foc. A capacidade de Foc de colonizar as raízes de ervas daninhas, mesmo a baixos níveis, pode aumentar o seu potencial de sobrevivência na ausência de plantas hospedeiras suscetíveis.

A melhor estratégia de controle da FB em áreas onde a doença já está estabelecida é por meio do plantio de cultivares resistentes. O melhoramento e a seleção de cultivares busca, principalmente, resolver os problemas fitossanitários da cultura. No entanto, a presença de hospedeiros alternativos potenciais pode ser um fator externo associado ao desenvolvimento e persistência da doença no campo (HELBIG; CARROLL, 1994).

Pesquisas envolvendo os aspectos fitossociológicos das ervas daninhas na cultura da bananeira ainda são escassas. O potencial dessas plantas de atuarem como hospedeiras alternativas de Foc pode influenciar na epidemiologia da doença em campo e, desta forma, devem ser consideradas no plano de manejo. O objetivo deste estudo foi identificar ervas daninhas coletadas em campo como possíveis hospedeiras alternativas de Foc.

Material e métodos

Isolamento de fungos endofíticos associados a ervas daninhas coletadas em áreas de produção de bananas afetadas pela fusariose da bananeira

Para a identificação de possíveis hospedeiros alternativos de *Foc* em campo, foram coletadas amostras de ervas daninhas em plantios de bananeira afetados pela fusariose da bananeira (FB), nos municípios de Aguaí, Jaguariúna e Pariqueira-Açu – SP. Plantas com crescimento ativo próximas, em até 2 m de raio, a bananeiras expressando sintomas típicos de FB, foram coletadas e, depois de retirado o excesso de solo, transferidas individualmente para bolsas de papel devidamente etiquetadas. Após o acondicionamento, foram transportadas até o Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF) da Embrapa Meio Ambiente, onde foi realizado o isolamento.

Para o isolamento de *Foc* possivelmente presente nos tecidos das plantas coletadas, em câmara de fluxo laminar, foram seccionados pequenos fragmentos de parte aérea e raízes. Esses fragmentos passaram por processo de desinfestação conforme protocolo utilizado na Embrapa Meio Ambiente, sendo: imersão em água destilada e esterilizada (ADE) por 1 min, álcool 70% por 1 min, solução de hipoclorito a 1% por 1 min e novamente ADE por 1 min. Após a desinfestação, esses fragmentos foram acomodados em toalhas de papel por 5 minutos para retirada do excesso umidade e dispostos aleatoriamente 10 fragmentos/placa, para raiz e parte aérea separadamente, em placas de Petri (90 x 15mm) contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) suplementado com Estreptomicina (1 g.L⁻¹).

As placas foram incubadas em câmara de crescimento tipo BOD a 26° até o momento em que se observou o crescimento micelial característico do gênero *Fusarium*. Colônias com características morfológicas distintas foram transferidas a novas placas de Petri (90 x 15mm), contendo BDA e incubadas em BOD a 27°C, por cinco dias. A purificação dos isolados foi realizada pela técnica de cultura monospórica (FERNANDEZ, 1993).

Após a purificação das colônias, uma amostra de cada isolado em fase de esporulação foi enviada para o Instituto Biológico de Campinas para o sequenciamento das regiões ITS (*Internal Transcribed Spacers*) e TEF-1 α (*Transcription Elongation Factor*) para identificação ao nível de espécie.

Identificação de isolados de *Fusarium* spp. associados a ervas daninhas coletadas em áreas de produção de bananas afetadas pela fusariose da bananeira

Para extração do DNA dos isolados, foi utilizada a metodologia empregando o reagente CTAB (brometo de cetiltrimetilamonio), descrito por Doyle e Doyle (1991), a partir do micélio do fungo cultivado em meio batata-dextrose e triturado em microtubos, com auxílio de pistilo de plástico. O DNA genômico foi submetido à reação em cadeia pela polimerase (PCR) para amplificação de fragmento do gene do fator de alongação da tradução 1- α (TEF), empregando-se os primers EF1-728F (5' – CATCGAGAAGTTCGAGAAGG – 3') e EF1-986R (5' – TACTTGAAGGAACCCTTRCC – 3') (CARBONE; KOHN, 1999) e da região ITS (Internal Transcribed Spacer) com os primers ITS1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') e ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') (WHITE et al., 1990). A reação de PCR foi realizada empregando-se os primers na concentração final de 0,2 μ M, dNTPS a 0,2 mM, 1U da enzima GoTaq Green (Promega), em volume final de 25 μ L. O programa utilizado foi: desnaturação inicial a 94 oC/2 min, 40 ciclos de 94 oC/30 s – 54 oC/30 s – 72 oC/60 s, extensão final a 72 oC/4 min. A verificação dos produtos amplificados foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

Os produtos amplificados foram purificados por meio de precipitação com polietilenoglicol (SCHMITZ; RIESNER, 2006), submetidos à reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia, empregando-se o reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) e analisados em sequenciador capilar automático 3500 XL (Applied Biosystems).

Os fragmentos sequenciados foram analisados e comparados com sequências já existentes na base de dados do *GeneBank*, sediado no *National Center for Biotechnology Information* – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por meio da ferramenta BLASTn. As mesmas sequências foram utilizadas para inferência da relação filogenética entre os isolados obtidos e um isolado padrão de *Foc*, utilizando o método de Máxima verossimilhança e o modelo Tamura-Nei (TAMURA; NEI, 1993) no software MEGA (KUMAR et al., 2018; STECHER et al., 2020). O alinhamento das

sequências para o cálculo das árvores foi obtido pela ferramenta MUSCLE (*MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation*) (EDGARD, 2004), executada pelo MEGA.

As sequências do *GeneBank* que apresentaram os maiores scores foram selecionadas e alinhadas. Todos os isolados com maior similaridade a *F. oxysporum* foram submetidos a testes de patogenicidade para a bananeira.

Teste de patogenicidade para bananeira

O ensaio foi realizado em casa de vegetação, nas dependências da Embrapa Meio Ambiente, localizada no município de Jaguariúna – São Paulo, Brasil (22°42'20" S 46°59'09" W, a uma altitude de 584 metros). Foram avaliados sete isolados identificados como *F. oxysporum*: CMPA01, MPRZ, P1PA01, P1RZ01, TRARZ02, TRARZ03, TVORZ, procedentes de raízes ou parte aérea de ervas daninhas coletadas em campo, quanto à sua patogenicidade para a bananeira.

Para o teste de patogenicidade, foi utilizada a metodologia de imersão das raízes em suspensão de esporos, conforme descrito por Ribeiro et al. (2011) com modificações. A suspensão de inóculo foi preparada a partir das colônias crescidas em placas de Petri contendo BDA por 7 dias em BOD a 27 °C e fotoperíodo de 12 horas. Os esporos foram coletados, adicionando-se 10 ml de água destilada esterilizada (ADE) às placas contendo cada isolado e raspagem com pincel de cerdas macias. A suspensão obtida foi filtrada por meio de dupla camada de gaze esterilizada em recipiente tipo Becker. Desta, uma alíquota foi levada para observação em microscópio, onde foi realizada a contagem de macro e micro conídios em Câmara de Neubauer para padronização da calibração da concentração a ser utilizada (ALFENAS; MAFIA, 2007), de 10⁶ conídios/ml.

Bananeiras da cultivar Maçã, provenientes de cultura de tecido (Multiplanta Tecnologia Vegetal – Andradas, MG), foram aclimatadas por 15 dias em casa de vegetação antes da inoculação. As plantas foram retiradas das bandejas e acomodadas em recipientes do tipo Becker com o sistema radicular imerso na suspensão, onde ficaram em repouso por 30 minutos. Após o período de inoculação, foram transplantadas para vasos de 1L, contendo uma mistura de areia lavada e substrato comercial na proporção de 1:1. A mistura de substrato foi esterilizada duas

vezes por 60 minutos em autoclave, com intervalo de 24 horas e permaneceu 48 horas em repouso antes do plantio das mudas.

Foram utilizados dois tratamentos controle: uma testemunha positiva, inoculada com o isolado de Foc CMAA1807, que faz parte da coleção da Embrapa Meio Ambiente, originalmente isolado de bananeiras infectadas da cultivar Grand Naine (Nanica - Cavendish, AAA) no Vale do Ribeira, SP, Brasil; e uma testemunha negativa, não inoculada. O desenho experimental utilizado foi inteiramente ao acaso (DIC), com 6 plantas por tratamento.

A intensidade da doença foi avaliada aos 80 dias após a inoculação (DAI) em função da incidência e severidade para sintomas internos da FB, utilizando a escala de notas (DITA, 2021). Além disso, amostras de raízes e pseudocaule foram coletadas de cada tratamento, visando o reisolamento dos fungos inoculados.

Os valores de severidade da doença foram utilizados para calcular o Índice de Doença (ID) por meio da equação:

$$ID = [\sum(N_{1-5} \times S_{1-5}) / (N \times S)] \times 100\%$$

Em que N_{1-5} é o número de plantas as quais foram atribuídas determinada nota; S_{1-5} é o valor da nota atribuída; N é o número total de plantas testadas e S é a nota mais alta.

Os dados obtidos foram organizados em planilha Excel e processados no software SAS. A frequência de reisolamento dos fungos em partes das plantas avaliadas foram submetidos à análise de variância e em casos significativos, as médias comparadas pelo teste de Duncan.

O acesso de todas as cepas fúngicas utilizadas neste estudo está registrado no Sistema Brasileiro de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado - SisGen sob os códigos AE398C6 e AD048A4.

Resultados e discussão

Isolamento de fungos endofíticos associados a ervas daninhas coletadas em áreas com a presença da fusariose da bananeira

Dez espécies distintas de ervas daninhas foram coletadas em campo em diferentes áreas de produção de bananas. Após o isolamento, foi possível observar crescimento micelial característico do gênero *Fusarium* a partir do segundo dia de incubação nos fragmentos de todas as plantas amostradas. Foram obtidos 29 isolados provenientes de raízes ou parte aérea das plantas coletadas. Após a purificação, cada colônia morfologicamente distinta recebeu um código em função do nome e compartimento da planta em que foi isolado (Tabela 1).

Tabela 1: Isolados de *Fusarium* spp. obtidos de ervas daninhas coletadas próximas a bananeiras apresentando sintomas de fusariose em plantios comerciais e experimentais no estado de São Paulo

Código	Planta	Nome científico	Parte da planta	Local de coleta
BRAPA01	Braquiária	<i>Brachiaria</i> sp.	Aérea	Jaguariúna - SP
BRAPA02	Braquiária	<i>Brachiaria</i> sp.	Aérea	Jaguariúna - SP
BRAPA03	Braquiária	<i>Brachiaria</i> sp.	Aérea	Jaguariúna - SP
BRARZ01	Braquiária	<i>Brachiaria</i> sp.	Raiz	Jaguariúna - SP
BRARZ02	Braquiária	<i>Brachiaria</i> sp.	Raiz	Jaguariúna - SP
CMPA01	Capim-amargoso	<i>Digitaria insularis</i>	Aérea	Aguai - SP
CMPA02	Capim-amargoso	<i>Digitaria insularis</i>	Aérea	Aguai - SP
GSPA01	Gramma Seda	<i>Cynodon dactylon</i>	Aérea	Aguai - SP
GSPA02	Gramma Seda	<i>Cynodon dactylon</i>	Aérea	Aguai - SP
GSPA03	Gramma Seda	<i>Cynodon dactylon</i>	Aérea	Aguai - SP
GSRZ01	Gramma Seda	<i>Cynodon dactylon</i>	Raiz	Aguai - SP
GSRZ02	Gramma Seda	<i>Cynodon dactylon</i>	Raiz	Aguai - SP
GSRZ03	Gramma Seda	<i>Cynodon dactylon</i>	Raiz	Aguai - SP
GXPA	Guanxuma	<i>Sida rhombifolia</i>	Aérea	Jaguariúna - SP
GXRZ	Guanxuma	<i>Sida rhombifolia</i>	Raiz	Pariquera-Açu - SP
MPRZ	Maria Pretinha	<i>Solanum americanum</i>	Raiz	Pariquera-Açu - SP
P1PA01	P1	Não identificada	Aérea	Jaguariúna - SP
P1RZ01	P1	Não identificada	Raiz	Jaguariúna - SP
P2RZ01	P2	Não identificada	Raiz	Pariquera-Açu - SP
SRLPA01	Serralha	<i>Sonchus oleraceus</i>	Aérea	Aguai - SP
SRLPA02	Serralha	<i>Sonchus oleraceus</i>	Aérea	Aguai - SP
TRAPA01	Trapoeraba	<i>Commelina benghalensis</i>	Aérea	Aguai - SP
TRAPA02	Trapoeraba	<i>Commelina benghalensis</i>	Aérea	Aguai - SP
TRAPA03	Trapoeraba	<i>Commelina benghalensis</i>	Aérea	Jaguariúna - SP
TRARZ01	Trapoeraba	<i>Commelina benghalensis</i>	Raiz	Aguai - SP
TRARZ02	Trapoeraba	<i>Commelina benghalensis</i>	Raiz	Aguai - SP
TRARZ03	Trapoeraba	<i>Commelina benghalensis</i>	Raiz	Jaguariúna - SP
TRARZ04	Trapoeraba	<i>Commelina benghalensis</i>	Raiz	Jaguariúna - SP
TVORZ01	Trevo	<i>Trifolium</i> sp.	Raiz	Pariquera-Açu - SP

A Trapoeraba foi a espécie da qual foi isolado o maior número de colônias morfológicamente semelhantes a *Fusarium oxysporum*, coletada em duas das regiões amostradas. Em seguida, ficaram a Grama seda e Braquiária, cada qual proveniente de uma única área. Segundo Alves (2005), as principais espécies de ervas daninhas comumente encontradas nos bananais da região do Vale do Ribeira, SP, são a trapoeraba (*Commelina benghalensis*), tiririca (*Cyperus rotundus*), capim marmelada (*Brachiaria plantaginea*), guanxuma (*Sida sp.*), maria gorda (*Talinum patens*), azedinho (*Oxalis sp.*) e rubin (*Leonorus sibiricus*).

Foram observados o aspecto da colônia e a coloração, que apresentaram padrões de crescimento muito variáveis. Visualmente, todas as colônias foram caracterizadas pelo seu aspecto cotonoso ou aveludado, pigmentação alaranjada, arroxeadada, salmão ou creme. Microscopicamente apresentavam hifas hialinas, septadas e filamentosas, microconídios ovais e macroconídios fusiformes e septados, característicos do gênero *Fusarium*. A morfologia dos isolados não apresentou relação com seus hospedeiros.

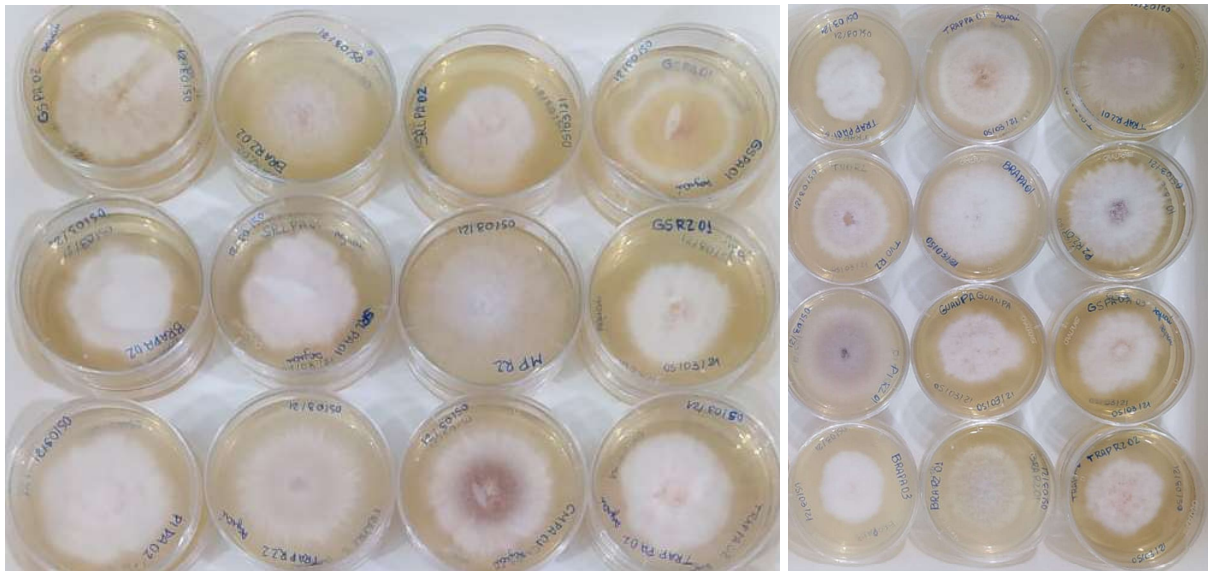


Figura 1: Colônias distintas com características morfológicas de *Fusarium* spp. isolados de ervas daninhas coletadas próximas a bananeiras apresentando sintomas de fusariose em plantios comerciais e experimentais no estado de São Paulo.

Identificação de isolados de *Fusarium* spp. associados a ervas daninhas coletadas em áreas de produção de bananas afetadas pela fusariose da bananeira

As sequências das regiões ITS e do gene que codifica para o fator de alongação TEF1- α (Anexo I) foram analisadas utilizando a ferramenta Blastn e alinhadas com as espécies de maior similaridade depositadas no GeneBank. Os critérios utilizados foram maiores Scores Máximo e Total (Max score e Total score), Query Cover (Cover %), Porcentagem de Identidade (Ident. %) e menor e-Value (E-value), entre as sequências analisadas e aquelas já depositadas nos bancos de dados. Com base nesses critérios, os melhores hits foram considerados a partir das sequências de TEF1- α (Tabela 2) e ITS (Tabela 3).

Tabela 2: Identificação dos isolados de *Fusarium* spp. obtidos de ervas daninhas coletadas próximas a bananeiras apresentando sintomas de fusariose em plantios comerciais e experimentais no estado de São Paulo, baseado na comparação das sequências do gene que codifica TEF1- α obtidas e aquelas depositadas no GenBank

Isolate	Blastn best hit	Max score	Total score	Cover %	E-value	Ident. %	Accession
TRARZ01	<i>Fusarium caatingaense</i> strain CBS 976.97 translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, partial cds	462	462	66%	1E-125	99%	MN170449.1
TRARZ02	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. niveum strain 150515-2 translation elongation factor 1-alpha (EF1a) gene, partial cds	436	436	97%	4E-118	98%	MN689545.1
TRARZ03	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. niveum strain 150515-2 translation elongation factor 1-alpha (EF1a) gene, partial cds	436	436	97%	4E-118	98%	MN689545.1
TRARZ04	<i>Fusarium</i> sp. isolate FIESC NY16-2-201-23 translation elongation factor 1-alpha (TEF1-a) gene, partial cds	359	359	19%	5E-94	94%	MN183749.1
TRAPA01	<i>Fusarium caatingaense</i> strain CBS 976.97 translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, partial cds	388	388	63%	2E-103	95%	MN170449.1
TRAPA02	<i>Fusarium incarnatum</i> isolate Fg3GSJ translation elongation factor 1-alpha (TEF) gene, partial cds	442	442	97%	8E-120	98%	MT163656.1
TRAPA03	<i>Fusarium</i> sp. strain 15Ar047 translation elongation factor 1 alpha (EF1) gene, partial cds	448	448	96%	2E-121	99%	MK298065.1
GSRZ01	<i>Fusarium incarnatum</i> strain DTO 417-I8 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	987	987	98%	0	99%	MN882829.1
GSRZ02	<i>Fusarium</i> sp. strain DTO 417-I8 translation elongation factor 1-alpha (TEF) gene, partial cds	411	411	63%	4E-110	97%	MN882765.1
GSRZ03	<i>Fusarium</i> sp. strain DTO 417-I8 translation elongation factor 1-alpha (TEF) gene, partial cds	451	451	64%	2E-122	100%	MN882765.1
GSPA01	<i>Fusarium caatingaense</i> strain CBS 976.97 translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, partial cds	468	468	68%	2E-127	98%	MN170449.1

GSPA02	Fusarium caatingaense strain CBS 976.97 translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, partial cds	473	473	67%	5E-129	100%	MN170449.1
GSPA03	Fusarium caatingaense strain CBS 976.97 translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, partial cds	468	468	68%	2E-127	99%	MN170449.1
BRARZ01	Fusarium sp. FFSC isolate F65 translation elongation factor 1-alpha (EF1alpha) gene, partial cds	431	431	97%	2E-116	97%	KU974231.1
BRARZ02	Fusarium sp. FFSC isolate F65 translation elongation factor 1-alpha (EF1alpha) gene, partial cds	440	440	97%	3E-119	98%	KU974231.1
BRAPA01	Fusarium sp. strain 15Ar047 translation elongation factor 1-alpha (EF1) gene, partial cds	442	442	96%	8E-120	99%	MK298065.1
BRAPA02	Fusarium lacertarum isolate CAS translation elongation factor alpha gene, partial cds	455	455	96%	1E-123	100%	KM679358.1
BRAPA03	Fusarium sp. strain 15Ar047 translation elongation factor 1-alpha (EF1) gene, partial cds	442	442	97%	8E-120	99%	MK298065.1
CMPA01	Fusarium sacchari isolate F.BA-A translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds	446	446	97%	6E-121	99%	MN255818.1
CMPA02	Fusarium caatingaense strain CBS 976.97 translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, partial cds	276	276	60%	1E-69	88%	MN170449.1
SRLPA01	Fusarium sp. isolate FIESC NY16-5-201-11 translation elongation factor 1-alpha (TEF1-a) gene, partial cds	451	451	98%	1E-122	98%	MN183745.1
SRLPA02	Fusarium incarnatum isolate Fg3GSJ translation elongation factor 1-alpha (TEF) gene, partial cds	455	455	96%	1E-123	99%	MT163656.1
P1PA01	Fusarium lacertarum isolate F115 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds	449	449	98%	5E-122	98%	MT149915.1
P1RZ01	Fusarium oxysporum isolate LJ134 translation elongation factor 1 alpha (TEF1a) gene, partial cds	425	425	97%	8E-115	98%	MN756524.1
GXPA	Fusarium sp. strain 15Ar047 translation elongation factor 1-alpha (EF1) gene, partial cds	453	453	96%	4E-123	100%	MK298065.1

GXRZ	Fusarium graminearum genome assembly, chromosome: IV	985	1970	98%	0	99%	LT222056.1
MPRZ	Fusarium oxysporum f. sp. niveum strain 150515-2 translation elongation factor 1-alpha (EF1a) gene, partial cds	429	429	97%	6E-116	98%	MN689545.1
TVORZ	Fusarium oxysporum f. sp. capsici isolate AYBZ-65/5 translation elongation factor 1-alpha (EF1-alpha) gene, partial cds	438	438	97%	1E-118	98%	MK001024.1
P2RZ	Fusarium fujikuroi isolate F167 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds	425	425	97%	8E-115	98%	MN861805.1

Tabela 3: Identificação dos isolados de *Fusarium* spp. obtidos de ervas daninhas coletadas próximas a bananeiras apresentando sintomas de fusariose em plantios comerciais e experimentais no estado de São Paulo, baseado na comparação das sequências das regiões ITS1/ITS2 obtidas e aquelas depositadas no GenBank

Isolate	Blastn best hit	Max score	Total score	Cover %	E-value	Ident. %	Accession
TRARZ01	Fusarium sp. FIESC_29 genomic DNA sequence contains ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, isolate MoPo2	987	987	98%	0.00E+00	100%	LT970815.1
TRARZ02	Fusarium sp. isolate FEB5C internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	983	983	97%	0.00E+00	100%	KT347152.1
TRARZ03	Fusarium sp. isolate FEB5C internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	983	983	98%	0.00E+00	99%	KT347152.1
TRARZ04	Fusarium sp. FIESC_29 genomic DNA sequence contains ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, isolate MoPo2	985	985	98%	0.00E+00	99%	LT970815.1
TRAPA01	Fusarium sp. FIESC_29 genomic DNA sequence contains ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, isolate MoPo2	979	979	97%	0.00E+00	100%	LT970815.1

TRAPA02	Fusarium sp. FIESC_29 genomic DNA sequence contains ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, isolate MoPo2	985	985	98%	0.00E+00	99%	LT970815.1
TRAPA03	Fusarium sp. CPK3514 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	985	985	97%	0.00E+00	100%	FJ840530.1
GSRZ01	Fusarium incarnatum strain DTO 417-I8 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	987	987	98%	0.00E+00	99%	MN882829.1
GSRZ02	Fusarium sp. FIESC_29 genomic DNA sequence contains ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, isolate MoPo2	985	985	99%	0.00E+00	99%	LT970815.1
GSRZ03	Fusarium solani strain DI12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	994	994	98%	0.00E+00	100%	KF918580.1
GSPA01	Fusarium sp. FIESC_29 genomic DNA sequence contains ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, isolate MoPo2	985	985	98%	0.00E+00	99%	LT970815.1
GSPA02	Fusarium solani strain DI12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	987	987	97%	0.00E+00	100%	KF918580.1
GSPA03	Fusarium solani strain DI12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	990	990	98%	0.00E+00	100%	KF918580.1
BRARZ01	Chromocleista sp. voucher research collection Farrer lab 140 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	996	996	98%	0.00E+00	99%	MN644724.1
BRARZ02	Uncultured fungus clone L046937-122-075-B01-unis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	996	996	98%	0.00E+00	99%	

BRAPA01	Fusarium sp. CPK3514 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	981	981	97%	0.00E+00	100%	FJ840530.1
BRAPA02	Fusarium sp. isolate DSM100287_DF16_RLCS18 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	987	987	98%	0.00E+00	99%	MT453272.1
BRAPA03	Aureobasidium pullulans voucher research collection Farrer lab 223 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	979	979	98%	0.00E+00	99%	MN644767.1
CMPA01	Gibberella moniliformis culture-collection NRRL:20956 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	953	953	97%	0.00E+00	99%	GQ168842.1
CMPA02	Fusarium solani strain DI12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	987	987	97%	0.00E+00	100%	KF918580.1
SRLPA01	Fusarium incarnatum isolate 15 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	985	985	97%	0.00E+00	100%	MN534779.1
SRLPA02	Fusarium solani strain DI12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	996	996	98%	0.00E+00	100%	KF918580.1
P1PA01	Fusarium solani strain DI12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	996	996	98%	0.00E+00	100%	KF918580.1
P1RZ01	Fusarium sp. CPK3516 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	976	976	96%	0.00E+00	100%	FJ840528.1
GXPA	Fusarium incarnatum isolate 15 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal	987	987	97%	0.00E+00	100%	MN534779.1

transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GXRZ	Fusarium graminearum genome assembly, chromosome: IV	985	1970	98%	0.00E+00	99%	LT222056.1
MPRZ	Fusarium sp. isolate FEB5C internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	987	987	98%	0.00E+00	100%	KT347152.1
TVORZ	Fusarium sp. isolate FEB5C internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	987	987	98%	0.00E+00	100%	KT347152.1
P2RZ	Fusarium proliferatum strain M14 isolate ISHAM-ITS_ID MITS1866 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1002	1002	98%	0.00E+00	99%	KP132230.1

Houve divergência entre os resultados encontrados para identificação a partir das regiões ITS e o gene que codifica para TEF-1 α . Com base nas regiões ITS, nenhum dos isolados foi caracterizado como pertencentes ao complexo *Fusarium oxysporum*. No entanto, a partir do sequenciamento TEF-1 α , sete isolados procedentes de cinco espécies distintas foram identificados como *Fusarium oxysporum*, sendo: CMPA01, proveniente de parte aérea de Capim-amargoso (*D. insularis*); MPRZ proveniente de raízes de Maria-pretinha (*S. americanum*); P1RZ01 proveniente de parte aérea e raízes de uma planta não identificada; TRARZ02 e TRARZ03 de raízes de Trapoeraba (*C. benghalensis*); e TVORZ, proveniente de raízes de Trevo (*Trifolium* sp.). Com base nesses resultados, foi possível inferir que esses isolados pertenciam ao complexo de espécies de *F. oxysporum*.

As sequências de cada isolado, juntamente com as sequências de um isolado de Foc (CMAA1807), além de outro isolado proveniente de pseudocaule de bananeira com sintomas de fusariose (BNA), foram utilizados na inferência das relações filogenéticas entre elas. Duas árvores foram calculadas por meio da análise de Máxima Verossimilhança, a partir dos genes ITS (Figura 2) e TEF1- α (Figura 3).

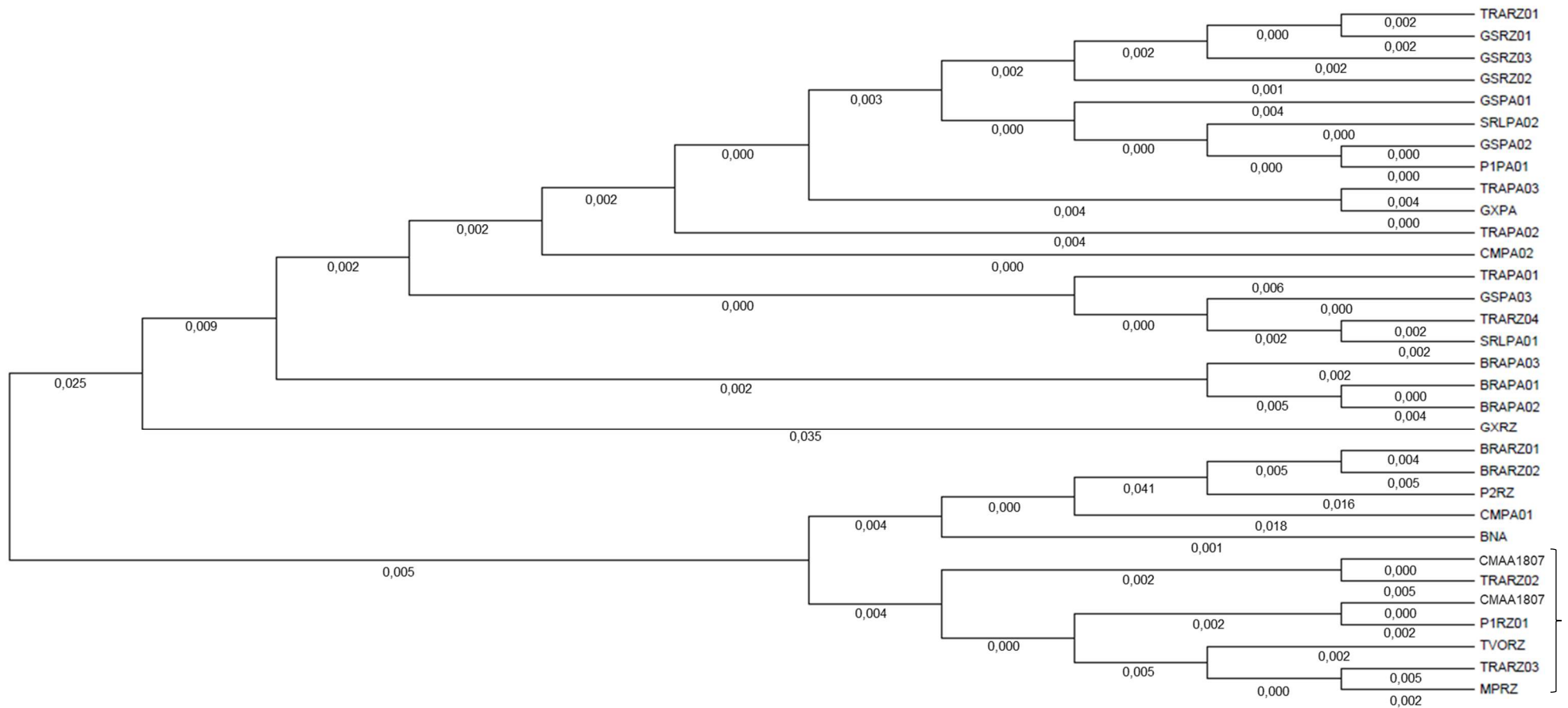


Figura 2: Dendrograma com maior probabilidade de verossimilhança (-1596,42) mostrando a relação entre 29 isolados de *Fusarium* spp., um isolado padrão de Foc (CMAA1807/CMAA1807) e um isolado proveniente de pseudocaule de bananeira com sintomas de fusariose (BNA), baseado nas seqüências das regiões ITS1/ITS2, a partir do método de Maximum Likelihood.

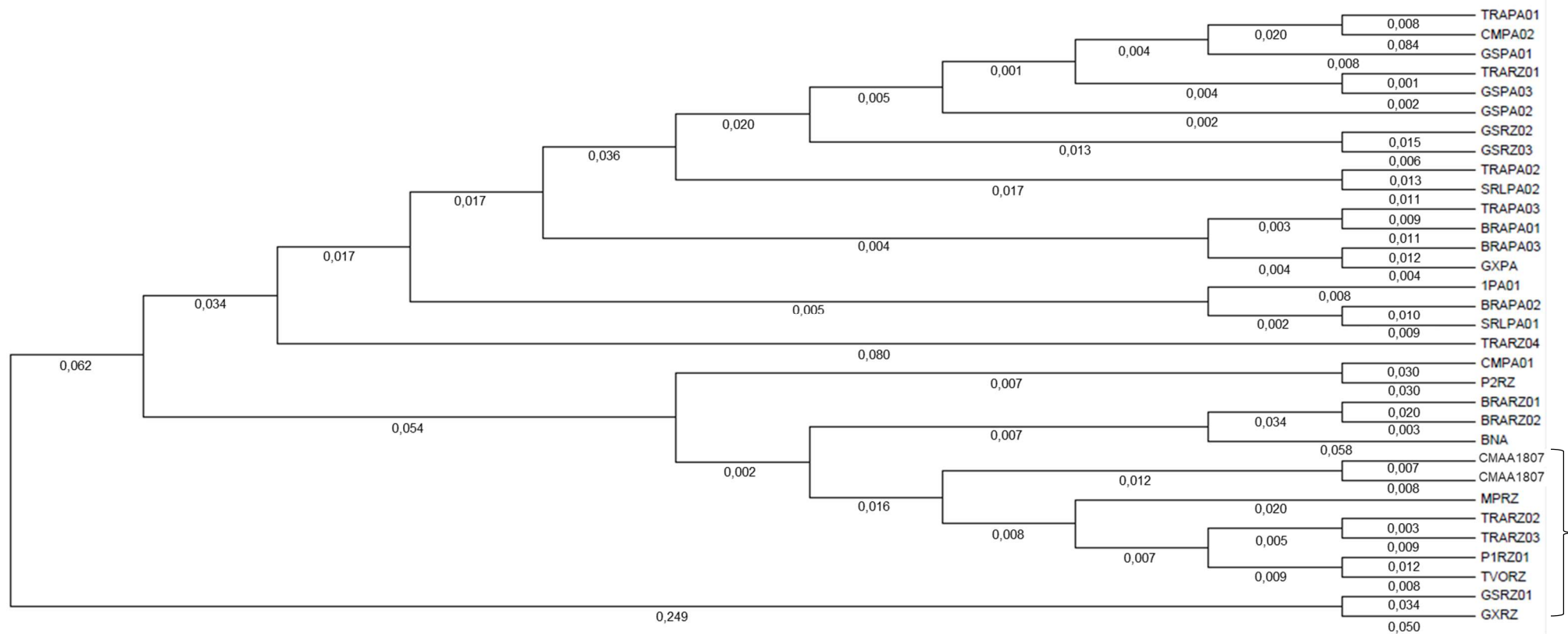


Figura 3: Dendrograma com maior probabilidade de verossimilhança (-1596,42) mostrando a relação entre 29 isolados de *Fusarium* spp., um isolado padrão de Foc (CMAA1807) e um isolado proveniente de pseudocaule de bananeira com sintomas de fusariose (BNA), baseado nas sequências do gene TEF1- α , a partir do método de Maximum Likelihood.

Diferentemente dos alinhamentos obtidos com as sequências do GeneBank para identificação dos isolados a partir das regiões ITS e o gene que codifica para TEF-1 α , não houve divergência nas análises filogenéticas realizadas no programa MEGA. Todos os isolados identificados como *F. oxysporum* foram clusterizados nos mesmos grupos para ambas as análises. Destes, TRARZ02, TRARZ03, MPRZ, e TVORZ e P1RZ01 se apresentaram mais próximos do isolado de Foc CMAA1807, inferindo maior verossimilhança entre eles.

O complexo *F. oxysporum* (FOSC) compreende importantes espécies causadoras de murchas vasculares em espécies agrícolas cultivadas. Aqueles que têm a capacidade de afetar a mesma cultura estão incluídos na mesma *formae specialis*. A maioria das *formae specialis* são patogênicas para uma única cultura (FOURIE et al., 2011). Dentro de FOSC, Foc é particularmente diversificado. Atualmente, são conhecidas três principais raças e 24 VCGs (*vegetative compatibility groups* ou grupos de compatibilidade genética) (MAGDAMA et al, 2020). Por apresentarem grande variabilidade genética e morfológica, para esse complexo de espécies, a principal forma de dividir os subgrupos se baseia em características de patogenicidade.

Teste de patogenicidade para bananeira

Nenhuma das plantas inoculadas com os isolados provenientes de ervas daninhas coletadas em campo apresentou sintomas típicos de Foc aos 80 dias após a inoculação. Apenas o isolado padrão de Foc, utilizado como controle positivo (CMAA1807), provocou danos no rizoma, caracterizado pela necrose dos tecidos. Algumas plantas apresentaram danos sem relação com o patógeno, causados, provavelmente por um inseto (Díptera) oportunista, como observados nos tratamentos CMPA e P1PA (Figura 4).

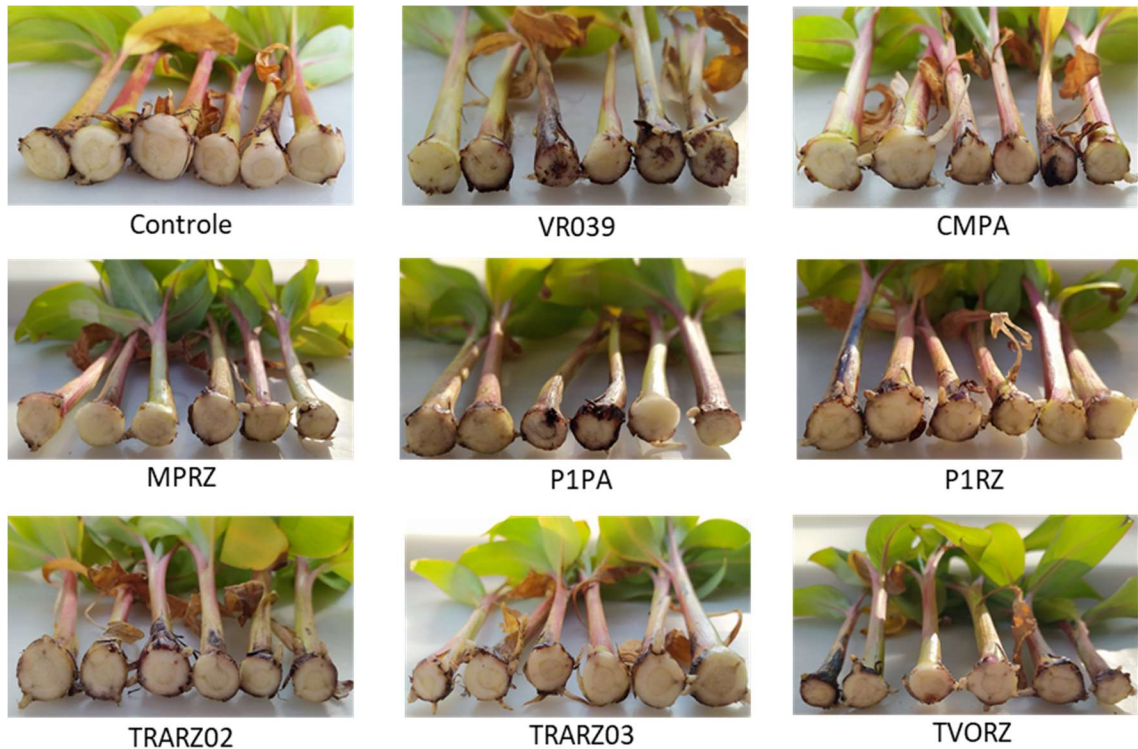


Figura 4: Seção transversal de rizoma de mudas de banana da cultivar Maçã, 80 dias após a inoculação com isolados de *Fusarium oxysporum* (CMPA01, MPRZ, P1PA01, P1RZ01, TRARZ02, TRARZ03, TVORZ), obtidos de ervas daninhas coletadas em campo próximas (até 2m de raio) a bananeiras com sintomas de fusariose e um isolado padrão de Foc (CMAA1807).

Aos 80 dias, foi possível reisolar todos os isolados nas raízes de pelo menos 16,67% das plantas de banana cv. Maçã inoculadas com cada isolado. Isso sugere que os isolados podem se tratar de estirpes de *F. oxysporum* não patogênicas para a bananeira, mas apenas endofíticos. Apenas MPRZ, P1RZ e TRARZ03 não foram recuperados em rizoma e apenas CMPA01 (50% das plantas testadas); TRARZ02 (16,67 %) e TRARZ02 (16,67 %) foram recuperados em pseudocaule (Figura 5).

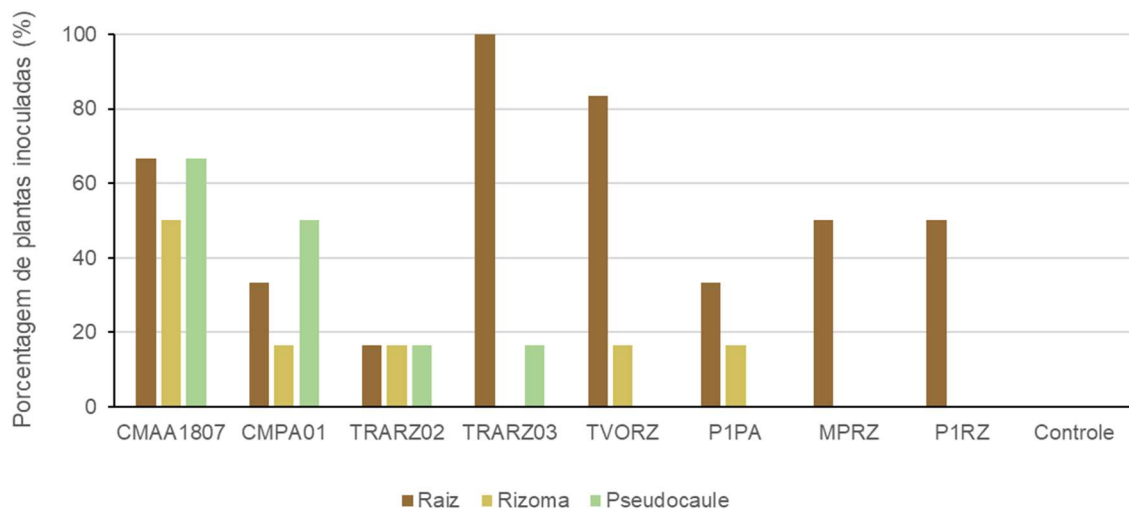


Figura 5: Frequência de reisolamento de isolados de *Fusarium oxysporum* (CMAA1087; CMPA01; TRAARZ02; TRARZ03; TVORZ; P1PA; MPRZ; P1RZ), recuperados em compartimentos de raízes, rizoma e pseudocaule, 80 dias após inoculação em mudas de banana cv. Maçã.

Por se tratarem de isolados fúngicos procedentes de coletas de campo, as técnicas disponíveis para sua caracterização são ponto chave para melhor descrição da espécie. Apesar de exigir maior disponibilidade de mão de obra e tempo, o teste de patogenicidade é o método mais efetivo, nesses casos. Apesar disso, em testes de patogenicidade, Foc é especialmente de difícil caracterização devido à variabilidade dos métodos de inoculação, influência da temperatura, idade do hospedeiro e tempo para expressão de sintomas (FOURIER et al. 2009).

Hennessy et al. (2005) investigaram a infecção por Foc em 154 plantas de 18 espécies coletadas em plantios comerciais ou experimentais no norte da Austrália. Destas, quatro testaram positivo para infecção por Foc R4T baseado em testes de VCG: *Chloris inflata*, *Euphorbia heterophylla*, *Cyanthilium cinereum* e *Tridax procumbens*. No entanto, neste trabalho os autores não avaliaram a patogenicidade dos isolados para a bananeira.

De forma semelhante, quatro espécies foram relatadas como hospedeiras de Foc R1 no norte de Queensland, Austrália: *Cleome aculeata*, *Youngia japonica*, *Eleusine indica* e *Digitaria ciliares*. No total, foram analisadas 115 amostras de 20 espécies diferentes de plantas. Também foram testadas outras 18 espécies para Foc R4T, sendo que foi possível reisolar o patógeno de todas (ABARES, 2018).

Áreas em Queensland e New South Wales foram avaliadas para a presença de hospedeiros alternativos de Foc. Ervas daninhas encontradas adjacentes a plantas de bananeira com sintomas de FB foram coletadas e raízes foram avaliadas em laboratório quanto à presença de Foc. Destas, foi possível detectar Foc R1 ou R4T em *Solanum nigrum*, *Conyza canadenses*, *Oxalis corniculata*, *Cynodon radiatus*, *Sedum requieni*, *Youngia japônica*, *Urochloa mutica*, *Microlaena stipoides* (STATE OF QUEENSLAND, 2021). Nesse mesmo estudo, em experimentos de casa de vegetação, encontraram resultados positivos para *Ageratum conyzoides*, *Axonopus compressus*, *Amaranthus viridis*, *Panicum maximum*, *Urochloa humidicola*, *Cyperus brevifolius*, *Cyperus rotundus*, *Centella asiática*, *Arachis pintoi*, *Praxelis clematidea*, *Commelina cyanea*, *Urochloa decumbens*, *Paspalum conjugatum*, *Stachys arvensis*, *Digitaria milanijana* quando inoculadas com Foc R4ST. Algumas plantas demonstraram resultado positivo para ambos os testes, o que foi o caso de *Euphorbia hirta*, *Synedrella nodiflora*, *Bidens pilosa*, *Eleusine indica*, *Dichondra repens*, *Cyanthillium cinereum*, *Physalis mínima*, *Chloris gayana* cv. *Callide*, *Cleome aculeata*, *Digitaria ciliares*, *Tridax procumbens*, *Mitracarpus hirtus* e *Euphorbia heterophylla*. Os autores também não avaliaram a patogenicidade em bananeira.

A utilização de herbicidas é o principal método empregado no controle das plantas daninhas. Isso se deve à sua praticidade e eficiência, muitas vezes sendo o único método empregado (BLANCO; FRANCO; NOMURA, 2013). No entanto, após a eliminação dessas plantas que permanecerão na superfície da área, caso estejam infectadas por Foc, os propágulos do patógeno podem retornar ao solo. Dessa forma, deve-se considerar que o método de manejo de ervas daninhas pode estar associado à propagação dentro e entre áreas de produção de bananas.

Ainda hoje, existe uma deficiência de informações sobre os aspectos fitossociológicos das ervas daninhas na bananeira. A identificação de ervas daninhas comumente encontradas em bananais capazes de acolher Foc poderá influenciar diretamente na escolha de medidas mais eficientes no manejo destas em áreas infestadas com Foc no intuito de conter a população do patógeno. O potencial das estruturas produzidas durante a colonização dessas plantas em infectar a bananeira posteriormente, bem como o efeito do uso de herbicidas em plantas infectadas na viabilidade das estruturas reprodutivas de Foc, por exemplo, são questões ainda a serem elucidadas.

Conclusões

Foi possível isolar colônias de *Fusarium oxysporum* de raízes e parte aérea de ervas daninhas coletadas próximas a plantas de bananas com FB. No entanto, quando testados em casa de vegetação, nenhum dos isolados foi patogênico em bananeira cv. Maçã, o que não permite classificá-los como *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Referências

- ABARES, 2018. Department of Agriculture and Fisheries and Hort Innovation. Disponível em: < <https://betterbananas.com.au/2018/03/20/alternative-host-research/>>. Acesso em 15 nov 2021.
- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 22. ed., Viçosa: Editora UFV, 2007. 382 p
- ALVES, E. **Plantas daninhas na cultura da banana**. In: Reunião itinerante de fitossanidade do instituto biológico, 2005, Registro - SP. Anais. Registro: Emopi, pp.45-50, 2005.
- BLANCO, F. M. G.; FRANCO, D. A. de S.; NOMURA, E. S. Manejo das plantas daninhas na cultura da banana. In: Eduardo Monteiro de Campos Nogueira ALMEIDA, I. M. G. de; FERRARI, J. T.; BERIAM, L. O. S. **BANANICULTURA** - Manejo Fitossanitário e Aspectos Econômicos e Sociais da Cultura. São Paulo: Instituto Biológico, v.1, p. 194-203, 2013. 243p.
- CARBONE, I.; KOHN, L.M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**. v. 91, pp. 553-556, 1999.
- CHAKRABARTI, A. *Fusarium oxysporum*: a "moving" view of pathogenicity. In: HORWITZ, B. A.; MUKHERJEE, P. K.; MUKHERJEE, M.; KUBICEK, C. P. **Genomics of soil- and plant-associated plant-associated fungi**. New York Dordrecht London: Springer, pp. 157-190, 2013.
- DITA, M. (ed.). Practical guidelines for early screening and field evaluation of banana against *Fusarium* wilt, *Pseudocercospora* leaf spots and drought. **Biodiversity International**. Montpellier: Biodiversity International, 2021. 83 p.
- DITA, M.; BARQUERO. M.; HECK, D.; MIZUBUTI E. S. G.; STAVER, C. P. *Fusarium* Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. **Frontiers In Plant Science**, v. 9, out. 2018.

- DOYLE, J.J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v.19, pp. 11-15, 1987.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. v. 32, pp. 1792-1797, 2004.
- FERNANDEZ, M. R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1993.
- FOURIE, G.; STEENKAMP, E. T.; GORDON, T. R.; VILJOEN, A. Evolutionary Relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Vegetative Compatibility Groups. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, pp. 4770–4781, 2009
- FOURIE, G.; STEENKAMP, E.T.; PLOETZ, R.C.; GORDON, T.R.; VILJOEN, A. Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* within the *Fusarium oxysporum* complex. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 11, pp. 533–542, 2011.
- HENNESSY, C.; WALDUCK, G.; DALY, A.; PADOVAN, A. Weed hosts of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4 in northern Australia. *Australasian Plant Pathology*, v.34 p.115–117, 2005.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, v.35:1547-1549. 2018
- LESLIE, J. F., AND SUMMERELL, B. A. **The Fusarium laboratory manual**. Ames: JohnWiley and Sons, 2006.
- MAGDAMA, F.; MONSERRATE-MAGGI, L.; SERRANO, L.; GARCÍA ONOFRE, J.; JIMÉNEZ-GASCO, M. del M. Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*, the Fusarium Wilt Pathogen of Banana, in Ecuador. *Plants*, v. 9, 1133–1151, 2020.
- OLIVEIRA, E. F. de; SANTOS, P. R. R. dos; SANTOS, G. R. dos. Seeds of weeds as an alternative host of phytopathogens. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 85, 2018.
- PITTAWAY, P. A.; NASIR, N.; PEGG, K. G. Soil receptivity and host– pathogenhost-pathogen dynamics in soils naturally infested with *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense*, the cause of Panama disease in bananas. *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 50, pp. 623–628, 1999.
- PLOETZ, R. C. **Fusarium Wilt of Banana**. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 105, pp. 1512-1521, 2015.
- RIBEIRO, L.R., AMORIM, E.P., CORDEIRO, Z.M., SILVA, S. de OLIVEIRA, DITA, M.A. Discrimination of banana genotypes for Fusarium wilt resistance in greenhouse. *Acta Hortícola*, v. 897, pp. 381-385, 2011.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v.354, p.311-313, 2006.

STATE OF QUEENSLAND. Guide to Alternative Hosts of Panama Disease in Australia. Queensland: Hort innovation, 2020. 48p.

STECHEER, G.; TAMURA, K.; KUMAR, S. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS. **Molecular Biology and Evolution**, 2020.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, p. 512-526, 1993.

WAITE, B. H.; DUNLAP, V. C. Preliminary host range studies with *Fusarium oxysporum* f. *cubense*. **Plant Disease Reporter**, v. 37, pp. 79–80, 1953.

WAITE, B. H.; STOVER, R. H. Studies on *Fusarium* wilt of bananas: Variability and the cultivar concept in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Canadian Journal of Botany**, v. 38, pp. 985–994, 1960.

WAITE, B.; DUNLAP, V. Preliminary host range studies with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Plant Disease Report**, v. 37, pp. 79–80, 1953.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELGARD, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. New York: Academic Press, 1990. p.315-322.

CAPÍTULO 2

Plantas utilizadas como cobertura vegetal podem ser hospedeiras de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*?

Resumo

A utilização de coberturas vegetais é uma prática recomendada para cuidados com o solo na cultura da bananeira. No entanto, algumas espécies podem atuar como hospedeiras alternativas *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), o agente causal da fusariose da bananeira (FB) ou murcha de fusarium. Neste estudo, seis espécies de plantas de cobertura foram avaliadas quanto ao seu potencial como hospedeiras alternativas de Foc em ensaios de casa de vegetação, a saber, Aveia Preta (*Avena sativa*), *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria ochroleuca*, Feijão de Porco (*Canavalia ensiformis*), Milheto (*Pennisetum americanum*) e Nabo forrageiro (*Raphanus sativus*). Para isso, foi realizada a semeadura de cada espécie em substrato estéril infestado ou não infestado com um isolado de Foc. Aos 75 dias após a semeadura, foram avaliadas as características fenotípicas das plantas germinadas e amostras de cada planta foram coletadas para reisolamento do patógeno. As colônias recuperadas foram submetidas a testes de PCR para confirmar que se tratavam de Foc. Foi possível recuperar pelo menos uma colônia do patógeno em quatro das espécies avaliadas. Das seis espécies avaliadas, apenas de Aveia Preta (*Avena sativa*) não foi possível reisolar um isolado de Foc, sendo as demais espécies potenciais hospedeiras alternativas do fungo. *Crotalaria ochroleuca* apresenta o maior potencial como hospedeira alternativa de Foc. Novos estudos são necessários para avaliar o potencial destes hospedeiros em campo e das estruturas de Foc produzidas durante a sua colonização em infectar a bananeira.

Palavras-chave: *Crotalaria ochroleuca*; *Raphanus sativus*; Reservatório de inóculo; Manejo de doenças; Fusariose da bananeira.

Abstract

The use of living mulches is a recommended practice for soil care in banana cultivation. However, some species can act as alternative hosts for *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), the causal agent of banana fusarium (BF) or fusarium leaf spot. In this study, six cover crop species were evaluated for their potential as alternative hosts for Foc in greenhouse trials, namely, Black oat (*Avena sativa*), *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria ochroleuca*, Horse bean (*Canavalia ensiformis*), Millet (*Pennisetum americanum*), and Turnip rape (*Raphanus sativus*). For this, each species was sown in sterile substrate infested or not infested with an isolate of Foc. At 75 days after sowing, the phenotypic characteristics of the germinated plants were evaluated and samples from each plant were collected for re-isolation of the pathogen. The recovered colonies were submitted to PCR tests to confirm that they were Foc. It was possible to recover at least one colony of the pathogen in four of the species evaluated. Of the six species evaluated, only from Black Oat (*Avena sativa*) it was not possible to reisolate an isolate of Foc, the other species being potential alternative hosts for the fungus. *Crotalaria ochroleuca* presents the greatest potential as an alternative host for Foc. Further studies are needed to evaluate the potential of these hosts in the field and the Foc structures produced during their colonization to infect banana.

Key words: *Crotalaria ochroleuca*; *Raphanus sativus*; Inoculum reservoir; Crop management.

Introdução

A murcha de fusarium ou fusariose da bananeira (FB) é considerada como um dos principais problemas fitossanitários da cultura da banana e uma das doenças de plantas mais destrutivas do mundo (PEREZ-VICENTE, 2004). O agente causal dessa doença, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) é um fungo indutor de murcha vascular endêmico em regiões de produção bananas. De acordo com a patogenicidade às diferentes cultivares de bananas, são definidas três principais raças de Foc: R1, R2 e R4T (DITA et al, 2018).

Devido às características epidemiológicas dessa doença, o seu controle não é uma tarefa fácil. Uma vez presente na área, a erradicação de Foc é praticamente impossível. Nesse caso, a utilização de cultivares resistentes é considerado o único método a ser empregado quando disponível (PLOETZ, 2015). Algumas medidas direcionadas à indução de supressividade do solo podem aplicadas com o objetivo de reduzir a quantidade de inóculo e a intensidade da doença. Práticas como a rotação de culturas, aplicação de resíduos orgânicos, agentes de biocontrole e utilização de coberturas vegetais podem ser úteis (DITA et al, 2018).

O uso de coberturas vegetais auxilia no controle de plantas daninhas, evita a erosão, mantém a umidade e ajuda a melhorar as condições física, química e biológica do solo (CANTO, 1992). Podem ser utilizadas nas entrelinhas ou anteceder o plantio da bananeira, como cobertura morta (KASPAR; SINGER, 2011). Entretanto, algumas espécies de plantas podem atuar como hospedeiras alternativas assintomáticas de diversos patógenos, inclusive Foc, servindo como reservatório de inóculo no campo (CHALA et al., 2016; PASTRANA et al., 2017; OCIMATI et al., 2018; ŠIŠIĆ et al., 2018; HENRY et al, 2019).

Entender como a interação entre Foc e hospedeiros alternativos pode influenciar na sobrevivência do patógeno e dinâmica da doença são importantes para melhorar as estratégias de manejo da cultura em áreas infestadas. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de seis espécies de plantas de cobertura como possíveis hospedeiras alternativas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Material e métodos

Preparo do material e inoculação

O ensaio foi realizado em casa de vegetação, nas dependências da Embrapa Meio Ambiente, localizada no município de Jaguariúna – São Paulo, Brasil, localizada a 22°42'20" de latitude sul e 46°59'09" de longitude oeste e altitude de 584 metros.

Foram utilizadas seis espécies de plantas de cobertura, sendo: Aveia Preta (*Avena sativa*), *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria ochroleuca*, Feijão de Porco (*Canavalia ensiformis*), Milheto (*Pennisetum americanum*) e Nabo forrageiro (*Raphanus sativus*). As sementes foram inicialmente desinfestadas e submetidas a testes de germinação para verificação da viabilidade.

Após a verificação da viabilidade, a semeadura foi realizada em substrato estéril infestado com Foc. O substrato foi previamente esterilizado em autoclave por 60 minutos, duas vezes, com intervalo de 24 horas. Para a infestação, 30g de inóculo constituído do isolado de Foc CMAA1807 crescido em meio de cultura areia-fubá (MAF) na concentração de 10^6 u.f.c.g⁻¹ foi incorporado ao substrato em cada vaso no momento da semeadura. O MAF foi preparado na proporção 5:1:1 (areia-fubá-água) em Erlenmeyer (150 ml) e autoclavado duas vezes por 60 minutos. Em câmara de fluxo laminar, foram adicionados a cada Erlenmeyer contendo MAF, dez discos (0,5 cm de diâmetro) do isolado CMAA1807 crescido em meio BDA por sete dias a 26 °C em fase de esporulação. Posteriormente, foram incubados em BOD a 26 °C por vinte dias.

Substrato estéril e sem inocular foi utilizado como controle negativo para cada espécie. O desenho experimental foi inteiramente ao acaso, com cinco repetições. Para cada espécie, foram semeadas três sementes por vaso.

Reisolamento e caracterização do patógeno

Após 75 dias da semeadura, foi avaliada a altura de planta e coletadas amostras de raízes, caules e folhas visando o reisolamento do patógeno em meio BDA. As colônias

recuperadas de cada espécie foram purificadas (FERNANDEZ, 1993) e submetidas à extração de DNA e análise de PCR para comprovar que se tratava de *FocMAA1807*.

Para a extração do DNA genômico, foi utilizado o método de Raeder e Broda (1985) com modificações. Após o crescimento em BDA, as colônias foram cultivadas por quatro dias em meio ao caldo de batata-dextrose (CBD), sob agitação em incubadora shaker a 27°C. O CBD foi produzido a partir do caldo de 250 g de batata inglesa cozida em 750 ml de água destilada por 15 minutos, adicionado de 6 g dextrose. Em cada Erlenmeyer, contendo 100 ml do CBD autoclavado, foram adicionados cinco discos de micélio de cada colônia crescido por sete dias em BDA a 27°C.

Após a esporulação em CBD, foi realizada a filtragem por meio de dupla camada de gaze estéril para coleta dos esporos em tubos do tipo Falcon. Esses tubos foram centrifugados duas vezes por cinco minutos a 3500 RPM e o sobrenadante descartado. Ao pellet obtido, foram adicionados 750 µl de tampão de extração (250mM NaCl; 200 mM Tris HCl pH 8,0; 25 mM EDTA; 0,5% SDS) e transferida uma porção de 1ml para tubos Eppendorf. Foi feita a agitação de cada tubo em Vórtex por um minuto, que em seguida foram incubados a 65 °C por 40 minutos em banho-maria, sendo homogeneizados a cada 10 minutos.

Após o banho-maria, foram adicionados 475 µl de fenol equilibrado e 225 µl de clorofórmio a cada tubo e homogeneizados até que fosse obtida uma emulsão por inversão. Em seguida, foram centrifugados por cinco minutos a 12000 RPM e a fase aquosa transferida para um tubo novo contendo 600µl da fase aquosa de isopropanol, mantido a baixa temperatura, seguido de centrifugação a 12000 RPM por cinco minutos. O pellet obtido foi lavado com 500µl de etanol 70% por duas vezes e colocado para secar sob vácuo por 15 minutos. Após a secagem, o DNA foi ressuspensionado em 40 µl de tampão de extração contendo RNase (10 mg.ml) e incubado em termobloco a 37°C por 45 minutos. A qualidade do DNA foi analisada em gel de agarose e, quando necessário, foi realizado o tratamento do DNA pela adição de RNase (10 mg.ml).

As reações de PCR foram realizadas utilizando os primers *Foc1/Foc2* (5'-CAGGGGATGTATGAGGAGGCT/5'-GTGACAGCGTCGTCTAGTTCC) e protocolo descritos por Lin et al. (2009). Os parâmetros para as PCRs foram: desnaturação a 94°C por 60 segundos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento a 68°C por 30 segundos; polimerização a 72°C por 90 segundos, e extensão final a 72°C durante 10 minutos. Os produtos de PCR foram

submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Os primers Foc1/Foc2 amplificam um fragmento de DNA correspondente a 242 pb, que foi utilizado como parâmetro para confirmar que os isolados recuperados se tratavam de CMAA1807Foc.

Os dados de altura das plantas e a germinação foram submetidos à análise de variância e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade no programa estatístico SAS (2011).

O acesso de todas as cepas fúngicas utilizadas neste estudo está registrado no Sistema Brasileiro de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado - SisGen sob os códigos AE398C6 e AD048A4.

Resultados e discussão

Preparo do material e inoculação

A inoculação com Foc CMAA1807 influenciou na resposta fenotípica de todas as espécies inoculadas. Quando comparadas com as plantas dos tratamentos não inoculados, aquelas que foram semeadas em substrato infestado visualmente apresentaram subdesenvolvimento (Figura 1).

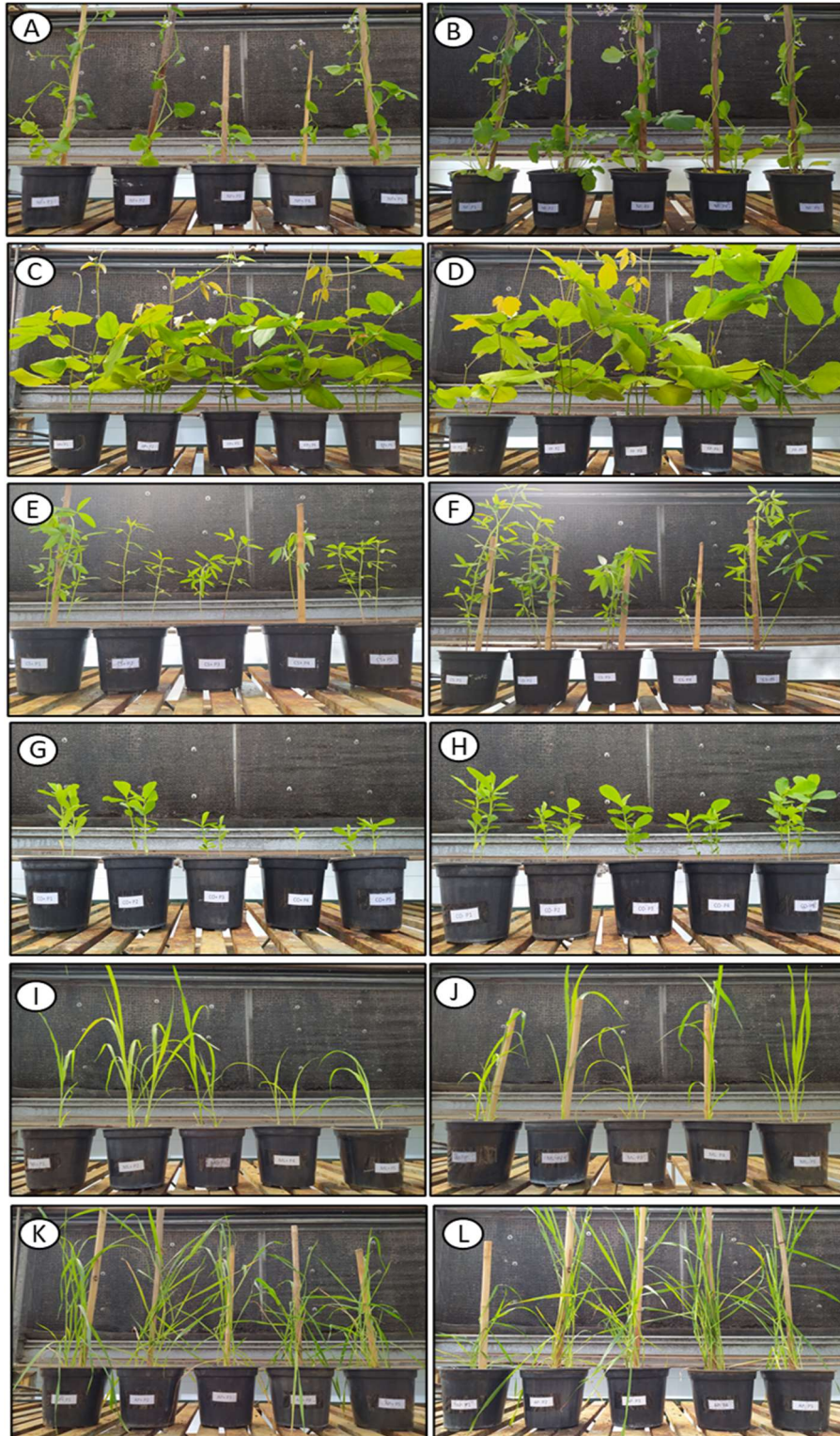


Figura 1: Resposta fenotípica de plantas utilizadas como coberturas vegetais inoculadas (Foc+) ou não inoculadas (Foc-) com Foc CMAA1807. *Raphanus sativus* Foc+ (A) e Foc- (B); *Canavalia ensiformis* Foc+ (C) e Foc- (D); *Crotalaria spectabilis* Foc+ (E) e Foc- (F); *Crotalaria ochroleuca* Foc+ (G) e Foc- (H); *Pennisetum americanum* Foc+ (I) e Foc- (J) e *Avena sativa* Foc+ (K) e Foc- (L).

Quando submetidos à análise estatística, não foi possível relacionar a altura das plantas com a inoculação do patógeno. A análise de variância não foi significativa para altura de nenhuma das espécies avaliadas e as médias foram estatisticamente iguais para cada espécie entre os tratamentos inoculado ou não inoculado (Tabela 1).

Tabela 1: Altura média de plantas de cobertura aos 80 dias após a semeadura em substrato infestado (Foc +) ou não infestado (Foc -) com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense*

Espécie	Inoculado (Foc+)	Não inoculado (Foc -)
<i>Avena sativa</i>	39,47	49,03
<i>Canavalia ensiformis</i>	48,38	54,03
<i>Crotalaria ochroleuca</i>	15,58	16,32
<i>Crotalaria spectabilis</i>	27,86	37,35
<i>Pennisetum americanum</i>	11,29	17,05
<i>Raphanus sativus</i>	31,96	52,13

Reisolamento e caracterização do patógeno

Foi possível reisolamento de colônias semelhantes a CMAA1807 em pelo menos uma das repetições de todas as espécies testadas, exceto de Aveia Preta. Algumas colônias morfológicamente semelhantes foram recuperadas de tratamentos não inoculados com o patógeno. *Crotalaria ochroleuca* foi a espécie da qual foi recuperado o maior número de colônias entre as repetições inoculadas. Das seis repetições, foi possível recuperar de quatro delas em raízes e de duas na parte aérea, sendo que duas destas se tratavam da mesma planta. De Feijão de porco, foram recuperadas em raízes de duas repetições; de Nabo Forrageiro em raízes e parte aérea de apenas uma repetição e apenas uma em parte aérea de *Crotalaria spectabilis*.

Após a extração do DNA dos fungos isolados e reação de PCR com os primers Foc1/Foc2, foi possível obter produtos de PCR de 242 pb daquelas colônias recuperadas de *C. ochroleuca*, Nabo Forrageiro, Feijão de porco e *C. spectabilis*, como esperado para o isolado inoculado. Não foram observados produtos amplificados para aquelas colônias recuperadas de tratamentos não inoculados, como foi o caso de um isolado de raízes de Aveia Preta (AP-4R) e um de raízes de Milheto (ML-5R) (Figura 2).

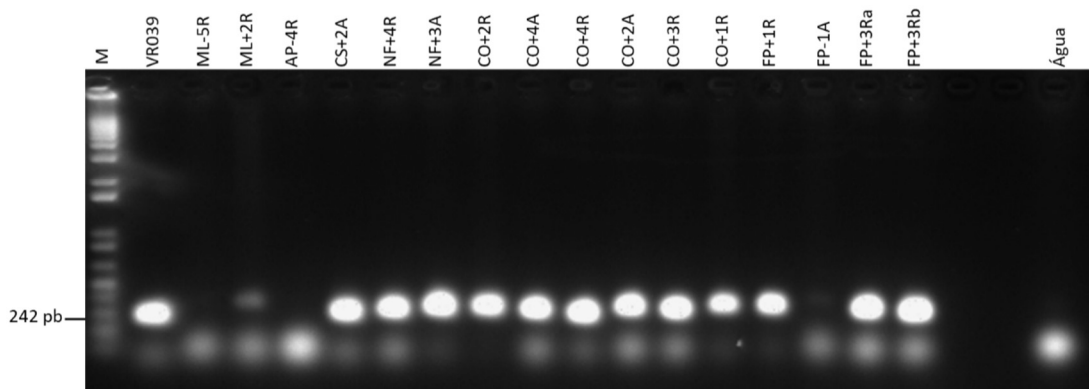


Figura 2: Análise dos produtos amplificados por PCR em eletroforese de gel de agarose 1,5% amplificados com os primers Foc1/Foc2 (Lin et al, 2009). M = DNA ladder 1kb plus; CMAA1807: Isolado de Foc utilizado como inóculo (Controle positivo); ML+ = isolados obtidos de *Pennisetum americanum* inoculado; ML- = isolado obtido de *Pennisetum americanum* não inoculado; AP = isolado recuperado de *Avena sativa* não inoculada; CS+ = isolado obtido de *Crotalaria spectabilis* inoculada; NF+ = isolado recuperado de *Raphanus sativus* inoculado; CO+ = isolado recuperado de *Crotalaria ochroleuca* inoculada; FP - = isolado recuperado de *Canavalia ensiformis* não inoculado; FP+ = isolado recuperado de *Canavalia ensiformis* inoculado; Água = água *nuclease free* (controle negativo). Os números correspondem à repetição e as letras, à parte da planta de das quais os isolados foram recuperados (R = Raíz e A = parte aérea).

Apesar da grande variabilidade no reisolamento de Foc entre as repetições da mesma espécie de plantas, o resultado positivo dos fungos recuperados para Foc CMAA1807 por meio das PCRs indica o potencial destas como hospedeiras alternativas do patógeno. Considerando que o isolado CMAA1807 foi inoculado nas plantas, que permaneceram em condições controladas durante o bioensaio, possivelmente, o isolado recuperado e amplificado com os primers Foc1/Foc2 trata-se do mesmo.

O maior número de colônias recuperado em *C. ochroleuca* pode apontar a espécie como importante hospedeira alternativa em potencial. *Crotalaria ochroleuca* já foi relatada como hospedeira de fungos do gênero *Fusarium*, como *F. oxysporum*, *F. udum* e outros gêneros de fitopatógenos (CASAGRANDE et al., 2016; SILVA, 2016; PFENNING et al., 2019). Assim como a crotalária, as demais espécies das quais foi possível recuperar o isolado inoculado, indicando colonização da planta, também fazem parte da família Fabaceae. Em contrapartida, ambas as espécies das quais não foram recuperadas colônias de Foc CMAA1807 pertencem à família Poaceae. Segundo Leslie e Summerell (2006), os cereais e as gramíneas geralmente não são afetados por *F. oxysporum*, embora ainda possam ser infectados por ele.

Ao incorporar plantas de cobertura no sistema de cultivo da bananeira, seja em intercultivo ou como cobertura morta, a escolha das espécies mais adequadas deve atender a alguns critérios. Fatores como status não invasivo para a cultura de interesse, adaptação ao clima, disponibilidade de sementes, baixo custo de manejo, produção de biomassa adequada e capacidade de competição contra ervas daninhas são cruciais (TIXIER et al., 2011; LAVIGNE et al., 2012; ACHARD et al., 2018). Além desses, outro parâmetro que deve ser considerado é o seu potencial de hospedar Foc, conforme observado no presente estudo. É necessário, ainda, avaliar a capacidade das estruturas do patógeno produzidas durante a colonização desses hospedeiros em infectar a bananeira e, nesse caso, o nível de agressividade.

Šišić et al. (2018) demonstraram a capacidade de muitas espécies de *Fusarium* patogênicas para a ervilha, sobretudo *F. oxysporum* e *F. avenum*, de sobreviver em plantas de trevo (*Trifolium* sp.) e ervilhaca (*Vicia sativa*) em campo. Foram isoladas 14 espécies de *Fusarium* associadas a raízes assintomáticas dessas plantas coletadas em cinco regiões de características diferentes na Europa. Quando testados para a patogenicidade em ervilha, 33 dos 65 isolados de seis dessas espécies recuperados causaram sintomas significativos de podridão de raízes. Os autores constataram que o fato de todos os isolados terem sido recuperados de raízes majoritariamente assintomáticas sugere que os mesmos sobreviveram endofiticamente nessas espécies. No entanto, quando inoculados no hospedeiro primário foram capazes de causar doença.

Na presença de plantas hospedeiras ou não-hospedeiras, as estruturas dormentes do patógeno são estimuladas a germinar devido à secreção de exsudados radiculares (STOVER, 1962). Diversos mecanismos envolvidos nas interações patógeno-hospedeiro são citados em literatura para o complexo de espécies de *Fusarium oxysporum*, incluindo Foc (BAAYEN et al., 1988; DI PIETRO et al., 2001; DELGADO-JARANA et al., 2005; DELLER et al., 2011; LI et al., 2013; DI et al., 2016; PORTAL GONZÁLEZ et al., 2021). Para colonizar os tecidos da planta e estabelecer doença, os fungos precisam dispor de efetores específicos para interagir com o espectro de proteínas e outros metabolitos secretados pelo hospedeiro (GUO et al., 2014). Dessa forma, apesar de se comportarem como endofíticos em espécies não primárias,

possivelmente, após a colonização dos tecidos desses hospedeiros o patógeno pode retornar ao solo e, na presença de plantas suscetíveis, causar novas infecções.

A confirmação de que algumas plantas de cobertura podem ser hospedeiras alternativas de Foc em campo pode auxiliar na otimização das estratégias de manejo de bananeiras afetadas pela FB. Estas informações podem direcionar a recomendação das espécies de cobertura que proporcionarão maiores benefícios para a cultura, sem serem possíveis fontes de inóculo de Foc. Espécies como a *Crotalaria ochroleuca* podem não ser a melhor recomendação para ser incorporada no sistema de cultivo da bananeira em áreas com a presença de Foc. Isso porque, ao invés de suprimir a população do patógeno, podem contribuir para o aumento dos níveis de inóculo do patógeno no campo.

Estudos adicionais são necessários para avaliar o potencial das estruturas de Foc recuperadas destes hospedeiros em infectar a bananeira.

Conclusões

Das seis espécies avaliadas no presente estudo, apenas *Avena sativa* não se caracteriza como potencial hospedeira alternativa de Foc, uma vez que foi possível recuperar o isolado em todas as outras espécies. A espécie *Crotalaria ochroleuca* apresenta o maior potencial como hospedeira alternativa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc).

Referências

ACHARD, R.; TIXIER, P.; DOREL, M.; ESTRADE, J. R. Intercropping of grass cover crops in banana plantations: Impacts on banana growth and yield. **Tropical Agriculture and Development**, v. 62, pp. 1-8, 2018.

BAAYEN, R. P. Responses related to lignification and intravascular periderm formation in carnations resistant to *Fusarium* wilt. **Canadian Journal of Botany**, v. 66, pp. 784–792, 1988.

- CANTO, A. C. Avaliação de leguminosas de cobertura no Estado do Amazonas. **Revista Univer. Amaz.**, Série Ciência Agronômica, v. 1, p. 49-61, 1992.
- CASAGRANDE, J. G.; CRESPO, N. C.; GUIMARÃES, S. S. C.; DE OLIVEIRA, K. C. L. *Crotalaria* como hospedeira alternativa e fonte de inóculo de fungos fitopatogênicos. **Enciclopédia Biosfera**. v. 13, p. 354, 2016.
- CHALA, A.; KEBEDE, T.; BLOMME, G. Natural occurrence and pathogenicity of *Xanthomonas* bacteria on selected plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, pp. 2146–2155, 2016.
- DELGADO-JARANA, J.; MARTÍNEZ-ROCHA, A. L.; ROLDÁN-RODRIGUEZ, R.; RONCERO, M. I. G.; DI PIETRO, A. *Fusarium oxysporum* G-protein β subunit Fgb1 regulates hyphal growth, development, and virulence through multiple signalling pathways. **Fungal Genetic Biology**, v. 42, pp. 0–72, 2005.
- DELLER, S., HAMMOND-KOSACK, K. E.; RUDD, J. J. The complex interactions between host immunity and non-biotrophic fungal pathogens of wheat leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, pp. 0–71, 2011.
- DI PIETRO, A.; GARCIA-MACEIRA, F. I.; MEGLE CZ, E.; RONCERO, M. I. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. **Molecular Microbiology**. 39, pp. 1140– 1152, 2001.
- DI, X; TAKKEN, F. L. W.; TINTOR, N. How Phytohormones Shape Interactions between Plants and the Soil-Borne Fungus *Fusarium oxysporum*. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 170, 2016,
- DITA, M.; BARQUERO. M.; HECK, D.; MIZUBUTI E. S. G.; STAVER, C. P. Fusarium Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. **Frontiers In Plant Science**, v. 9, 2018.
- FERNANDEZ, M. R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1993.
- GUO, L.; HAN, L.; YANG, L.; ZENG, H.; FAN, D. Genome and Transcriptome Analysis of the Fungal Pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Causing Banana Vascular Wilt Disease. PLoS ONE, v. 9, n. 95543, 2014.
- HENRY, P. M.; PASTRANA, A. M.; LEVEAU, J. H. J.; GORDON, T. R. Persistence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* in soil through asymptomatic colonization of rotation crops. **Phytopathology**, v. 109, pp. 770–779, 2019.
- KASPAR, T. C.; SINGER, J. W. **The Use of Cover Crops to Manage Soil. Soil Management: Building a Stable Base for Agriculture**. USDA - Agricultural Research Service/UNL Faculty, pp. 321-337, 2011.

LAVIGNE, C.; ACHARD, R.; TIXIER, P.; LESUEUR JANNOYER, M. How to integrate cover crops to enhance sustainability in banana and citrus cropping systems. **Acta Horticulturae**, v. 928, 351–357, 2012.

LESLIE, J. F., AND SUMMERELL, B. A. **The Fusarium laboratory manual**. Ames: JohnWiley and Sons, 2006.

LI, X.; BAI, T.; LI, Y.; RUAN, X.; LI, H. Proteomic analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 - inoculated response to Fusarium wilts in the banana root cells. **Proteome Science**, v. 11, n. 41, 2013.

LIN, Y. H., CHANG, J. Y., LIU, E. T., CHAO, C. P., HUANG, J. W., CHANG, P. F. L. Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. **European Journal of Plant Pathology**, v. 123, pp. 353–365, 2009.

LIU, S.; LI, J.; ZHANG, Y.; LIU, N.; VILJOEN, A.; MOSTERT, D.; ZUO, C.; HU, C.; BI, F.; GAO, H.; SHENG, O.; DENG, G.; YANG, Q.; DONG, T.; DOU, T.; YI, G.; MA, L. J.; LI, C. Fusaric acid instigates the invasion of banana by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* TR4. **New Phytologist**, v. 225, pp. 913–929, 2020.

PASTRANA, A. M.; BASALLOTE-UREBA, M. J.; CAPOTE, N. Symptomless reservoirs of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* and alternative hosts of *Fusarium solani* pathogenic to strawberry. **Journal of Plant Pathology**, v. 99, pp. 141-148, 2017.

PEREZ-VICENTE, L. Fusarium wilt (Panama disease) of bananas: An updating review of the current knowledge on the disease and its causal agent. **Fitosanidad**, v. 8, pp. 27–38, 2004.

PFENNING, L.H., de MELO, M.P., COSTA, M.M. REIS, AILTON; CABRAL, CLEIA SANTOS; LIMA, CRISTIANO S.; ABREU, LUCAS M.; COSTA, SARAH S. *Fusarium udum* revisited: a common, but poorly understood member of the *Fusarium fujikuroi* species complex. **Mycological Progress** v. 18, pp. 107–117 2019.

PLOETZ, R. C. Management of Fusarium wilt of banana: a review with special reference to tropical race 4. **Crop Protection**, v. 73, pp. 7-15, 2015.

PORTAL GONZÁLEZ, N.; SOLER, A.; RIBADENEIRA, C.; SOLANO, J.; PORTIELES, R.; HERRERA ISLA, L.; COMPANIONI, B.; BORRAS-HIDALGO, O.; SANTOS BERMUDEZ, R. Phytotoxic Metabolites Produce by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 2. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. 629395, 2021.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, n. 1, pp. 17-20, 1985.

SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT® 9.3 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2011.

SILVA, T. C. **Linhagens filogenéticas do complexo *Fusarium oxysporum* E *Fusarium udum* associadas à murcha do maracujazeiro. Dissertação** (Mestrado em Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras. Lavras, 84 p., 2016.

ŠIŠIĆ, A; BAĆANOVIĆ-ŠIŠIĆ, J; KARLOVSKY, P; WITTWER, R; WALDER, F; CAMPIGLIA, E; RADICETTI, E; FRIBERG, H; BARESEL, J. P.; FINCKH, M. R. Roots of symptom-free leguminous cover crop and living mulch species harbor diverse *Fusarium* communities that show highly variable aggressiveness on pea (*Pisum sativum*). **PLOS ONE**, v. 13, 2018.

STOVER, R. **Fusarial wilt (Panama disease) of Bananas and Other Musa Species.** Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1962. 177 p.

TIXIER, P.; LAVIGNE, C.; ALVAREZ, S.; GAUQUIER, A.; BLANCHARD, M.; RIPOCHE, A.; ACHARD, R. Model evaluation of cover crops, application to eleven species for banana cropping systems. **European Journal of Agronomy**, v. 34, 53–61, 2011.

CAPÍTULO 3

A broca-da-bananeira *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae) pode ser vetor de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, agente causal da fusariose da bananeira?

Resumo

Pouco se sabe sobre como a broca ou moleque-da-bananeira (*Cosmopolites sordidus*) pode influenciar na ocorrência e intensidade da fusariose da bananeira (FB), causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. O entendimento da possível atuação desse inseto praga sobre a disseminação de Foc poderá melhorar significativamente as atuais estratégias de manejo da doença. O objetivo deste estudo foi averiguar aspectos envolvidos na possível relação entre Foc e *C. sordidus*. O trabalho foi dividido em duas etapas: isolamento de esporos de Foc associados a *C. sordidus* coletados em campo e teste de patogenicidade dos mesmos em bananeira cv. Maçã; e estudo da atuação de *C. sordidus* na transmissão da FB em condições de casa de vegetação, onde foi avaliado o desenvolvimento da doença em plantas infestadas com o inseto inoculado com Foc ou simultaneamente infestadas com o patógeno e o inseto separadamente. Foi possível isolar colônias de *F. oxysporum* associadas ao exoesqueleto de adultos de *C. sordidus* coletados em bananais em parcelas com ou sem a presença da doença. No entanto, ao testar a patogenicidade para a bananeira, nenhum dos isolados causou sintomas da FB, não podendo caracterizá-los como Foc. Ao avaliar a dinâmica da interação entre a broca-da-bananeira e o agente causal da FB, foi observado que pode haver a associação entre os dois agentes sobre a incidência e intensidade da doença em bananeira, uma vez que foi possível recuperar colônias do patógeno nos tratamentos em que as plantas foram infestadas com o inseto inoculado com Foc. Além disso, nas plantas infestadas separadamente com a broca e Foc foi possível recuperar o maior número de isolados do patógeno, o que indica uma ação combinada entre Foc e a broca. Novos estudos são necessários para compreender melhor as diferentes formas de interação entre Foc e *C. sordidus* e a possível atuação deste inseto como vetor deste patógeno.

Palavras-chave: Epidemiologia; Disseminação; *Cosmopolites sordidus*; *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Abstract

Little is known about how the banana weevil borer (*Cosmopolites sordidus*) can influence the occurrence and intensity of fusarium wilt of bananas (FWB), caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Understanding the possible action of this pest insect on the spread of Foc may significantly improve current strategies for managing the disease. The objective of this study was to investigate aspects involved in the possible relationship between Foc and *C. sordidus*. The work was divided into two stages: isolation of Foc spores associated with *C. sordidus* collected in the field and pathogenicity test of them in banana cv. Apple; and study of the role of *C. sordidus* in the transmission of FWB under greenhouse conditions, where the development of the disease was evaluated in plants infested with the insect inoculated with Foc or simultaneously infested with the pathogen and the insect separately. It was possible to isolate *F. oxysporum* colonies associated with the exoskeleton of *C. sordidus* adults collected from banana plants in plots with or without the presence of the disease. However, when testing for pathogenicity to banana, none of the isolates caused symptoms of FWB, and thus could not be characterized as Foc. When evaluating the dynamics of the interaction between the banana weevil borer and the causal agent of FWB, it was observed that there may be an association between the two agents on the incidence and intensity of the disease in banana, since it was possible to recover colonies of the pathogen in treatments in which the plants were infested with the insect inoculated with Foc. Moreover, in plants infested separately with the borer and Foc it was possible to recover the greatest number of isolates of the pathogen, indicating a combined action between Foc and the borer. Further studies are needed to better understand the different forms of interaction between Foc and *C. sordidus* and the possible role of this insect as a vector of this pathogen.

Key-words: Epidemiology; Dissemination; *Cosmopolites sordidus*; *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Introdução

Um dos principais problemas fitossanitários que afetam a produção da bananeira (*Musa* sp.) é a fusariose da bananeira (FB), ou murcha de *Fusarium*. A doença causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) foi descrita pela primeira vez em 1874, na Austrália (BANCROFT, 1876). Atualmente está disseminada em todas as regiões produtoras de bananas do mundo, causando grandes perdas (OLIVARES et al., 2018).

Foc é um fungo tipicamente causador de murcha vascular. Após a penetração nas raízes da bananeira, dissemina-se no xilema da planta onde são liberadas toxinas que comprometem o sistema vascular e pode causar mortalidade de plantas suscetíveis (PORTAL GONZALÉZ et al., 2021). O sintoma mais característico da doença é o desenvolvimento de uma coloração pardo-avermelhada na região do xilema das plantas que começa nas raízes secundárias e se estende para o rizoma e pseudocaule com o progresso da doença. Externamente, pode ser observado o amarelecimento das folhas mais velhas para as mais novas, que murcham, secam e se quebram junto ao pseudocaule (CORDEIRO et al., 2005)

A principal forma de disseminação de Foc ocorre por meio do plantio de material propagativo infectado. Outras vias incluem a água de irrigação, equipamentos e ferramentas contaminados, trânsito de animais e trabalhadores que podem transportar Foc entre diferentes áreas (DITA et al., 2018). Além disso, sob grande intensidade da doença, uma quantidade de inóculo pode ser liberado pelas raízes, levando à disseminação entre plantas adjacentes (STOVER, 1962).

Não existem relatos de vetores associados à transmissão da fusariose em bananeira. No entanto, em estudo feito por Meldrum et al. (2013), foi possível detectar esporos de Foc no exoesqueleto de *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae). Esse inseto-praga, popularmente conhecido como broca-da-bananeira, broca-do-rizoma ou moleque-da-bananeira, pode ser encontrado em praticamente todas as áreas produtoras de bananas no mundo, assim como Foc (PADMANABAN, 2018). As fêmeas de *C. sordidus* perfuram e ovipositam no rizoma da bananeira, onde as larvas, quando eclodem, alimentam-se e provocam galerias (GALLO, 2002). O entendimento da possível atuação desse inseto praga sobre a disseminação de Foc e intensidade da doença poderá gerar informações importantes para melhorar significativamente as

atuais estratégias de manejo da FB. O objetivo deste estudo foi averiguar aspectos envolvidos na relação Foc x *Cosmopolites sordidus*.

Material e métodos

Isolamento de fungos endofíticos associados a adultos da espécie *Cosmopolites sordidus* coletados em áreas de produção de bananas afetadas pela fusariose da bananeira

As amostragens de indivíduos adultos de *C. sordidus* foram realizadas na região do Vale do Ribeira em plantios comerciais e áreas contrastantes quanto à presença da fusariose, em parcelas com plantas doentes (Foc+) e sadias (Foc-), em Jacupiranga e Itapeúna – SP (Tabela 1).

Amostras de adultos de *C. sordidus* foram coletadas de duas plantações comerciais de banana localizadas no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil: VR_{Eld} (município de Eldorado, cultivar Prata, Pome, AAB, 24°37'33,0 "S, 48 ° 11 ' 54,0 "W, Alt. = 86m); e VR_{Jac} (município de Jacupiranga, cultivar Gran naine, Cavendish, AAA, 24°52'47,0 "S, 48°03'18,0" W, Alt. = 94 m).

Em cada área, foram instaladas dez armadilhas, sete delas do tipo telha, confeccionadas com pseudocaule de plantas que já produziram, e três do tipo Pitfall, confeccionadas com garrafas plásticas de 2,25 L contendo fragmentos de rizoma de bananeira e o feromônio Cosmolure®. As armadilhas foram distribuídas de forma a cobrir toda a área de estudo (Figura 1).



Figura 1. Mapa das fazendas comerciais de produção de banana: A) VR_{Jac} e B) VR_{Eld} ; mostrando as áreas com incidência (Foc+) ou não (Foc-) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*, de onde foram coletadas as amostras de *Cosmopolites sordidus* adultos. Ortomosaicos de imagens captadas com drone. Base: imagens do Google Earth.

A cada amostragem, as armadilhas permaneciam instaladas no campo por uma semana, quando os insetos capturados eram coletados, transportados para o Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF), da Embrapa Meio Ambiente. Trinta insetos da espécie *C. sordidus* coletados nas duas propriedades (parcelas Foc+ e Foc-) foram submetidos a um processo de isolamento de esporos potencialmente

associados ao exoesqueleto (solução externa) e trato digestivo (solução interna), utilizando a metodologia descrita por Meldrum et al. (2013) com modificações. Para a análise da presença de esporos no exoesqueleto, cada inseto foi colocado em um microtubo estéril de 2 mL e agitado em Vortex por 5 min em 300 µL de água destilada estéril. As suspensões obtidas foram vertidas em placas de Petri (90 x 15 mm), contendo meio de cultura BDA suplementado com antibiótico. Em seguida, os mesmos insetos foram esterilizados superficialmente por 5 minutos em solução de hipoclorito a 2% e 5 minutos em álcool 70 % e macerados em 300 µL de água destilada para análise da presença de esporos no trato digestivo. As suspensões obtidas foram dispostas em placas de Petri (90 x 15 mm), contendo meio de cultura BDA suplementado com antibiótico. Todas as placas foram acondicionadas em BOD a 26°C por cinco dias.

As colônias obtidas que apresentavam características morfológicas de *Fusarium oxysporum* foram repicadas em meio de cultura BDA até serem obtidas as culturas puras. Uma amostra de cada colônia foi enviada para o Instituto Biológico de Campinas para identificação por meio do sequenciamento do gene que codifica para o fator de alongação 1 α (TEF-1 α).

Identificação de isolados de *Fusarium* spp. associados a adultos da espécie *Cosmopolites sordidus* coletados em áreas de produção de bananas afetadas pela fusariose da bananeira

Para extração do DNA dos isolados, foi utilizada a metodologia empregando o reagente CTAB (brometo de cetiltrimetilamonio), descrito por Doyle e Doyle (1991) a partir do micélio do fungo cultivado em meio batata-dextrose e triturado em microtubos com auxílio de pistilo de plástico. O DNA genômico foi submetido à reação em cadeia pela polimerase (PCR) para amplificação de fragmento do gene do fator de alongação da tradução 1- α (TEF), empregando-se os primers EF1-728F (5' – CATCGAGAAGTTCGAGAAGG – 3') e EF1-986R (5' – TACTTGAAGGAACCCTTRCC – 3') (CARBONE; KOHN, 1999) e da região ITS (internal transcribed spacer) com os primers ITS1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') e ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') (WHITE et al., 1990). A reação de PCR foi realizada empregando-se os primers na concentração final de 0,2 µM,

dNTPS a 0,2 mM, 1U da enzima GoTaq Green (Promega), em volume final de 25 µL. O programa utilizado foi: desnaturação inicial a 94 oC/2 min, 40 ciclos de 94 oC/30 s – 54 oC/30 s – 72 oC/60 s, extensão final a 72 oC/4 min. A verificação dos produtos amplificados foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

Os produtos amplificados foram purificados por meio de precipitação com polietilenoglicol (SCHMITZ; RIESNER, 2006), submetidos à reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia empregando-se o reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) e analisados em sequenciador capilar automático 3500 XL (Applied Biosystems).

Os fragmentos sequenciados foram analisados e comparados com sequências já existentes na base de dados do *GeneBank*, sediado no *National Center for Biotechnology Information* – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), pela ferramenta BLASTn. As mesmas sequências foram utilizadas para inferência da relação filogenética entre os isolados obtidos e um isolado padrão de *Foc*, utilizando o método de Máxima verossimilhança e o modelo Tamura-Nei (TAMURA; NEI, 1993) no software MEGA (KUMAR et al., 2018; STECHER et al., 2020). O alinhamento das sequências para o cálculo das árvores foi obtido pela ferramenta MUSCLE (*MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation*) (EDGARD, 2004), executada pelo MEGA.

As sequências do *GeneBank* que apresentaram os maiores scores foram selecionadas e alinhadas. Todos os isolados com maior similaridade a *F. oxysporum* foram submetidos a testes de patogenicidade para a bananeira.

Teste de patogenicidade para bananeira

O ensaio foi realizado em casa de vegetação, nas dependências da Embrapa Meio Ambiente, localizada no município de Jaguariúna – São Paulo, Brasil (22°42'20" S 46°59'09" W, altitude de 584 metros). Foram avaliados isolados de *F. oxysporum* associados a *C. sordidus* coletados em campo quanto à patogenicidade para a bananeira cv. Maçã.

Além dos isolados de *F. oxysporum*, havia dois tratamentos controle: uma testemunha positiva, inoculada com o isolado padrão de Foc CMAA1807 e uma testemunha negativa, não inoculada. O design experimental foi inteiramente ao acaso (DIC), com seis plantas por tratamento. As plantas utilizadas foram mudas de bananeira cv. Maçã, provenientes de cultura de tecidos, adquiridas da empresa Multiplanta tecnologia vegetal (Andradas – MG) e aclimatadas por 15 dias em casa de vegetação.

Para a inoculação, foi utilizada a metodologia de imersão de raízes (RIBEIRO et al., 2011). As plantas foram acomodadas em recipientes do tipo Becker com o sistema radicular submerso na suspensão, onde ficaram em repouso por 30 minutos. Após esse período, foram transplantadas para vasos de 1 L, contendo uma mistura de areia lavada e substrato comercial na proporção de 1:1. A mistura de substrato foi esterilizada duas vezes por 60 minutos em autoclave, com intervalo de 24 horas e permaneceu 48 horas em repouso antes do plantio das mudas.

Foram utilizados dois tratamentos controle: uma testemunha positiva, inoculada com o isolado de Foc CMAA1807, que faz parte da coleção da Embrapa Meio Ambiente, originalmente isolado de bananeiras infectadas da cultivar Grand Naine (Nanica - Cavendish, AAA) no Vale do Ribeira, SP, Brasil, e uma testemunha negativa, não inoculada. O design experimental utilizado foi inteiramente ao acaso (DIC), com 6 plantas por tratamento.

A intensidade da doença foi avaliada aos 80 dias após a inoculação (DAI), em função da incidência e severidade para sintomas internos da FB, utilizando a escala de notas (DITA, 2021). Além disso, amostras de raízes e pseudocaule foram coletadas de cada tratamento visando o reisolamento dos fungos inoculados.

Os valores de severidade da doença foram utilizados para calcular o Índice de Doença (ID) por meio da equação:

$$ID = [\sum(N_{1-5} \times S_{1-5}) / (N \times S)] \times 100\%$$

Em que N_{1-5} é o número de plantas as quais foram atribuídas determinada nota; S_{1-5} é o valor da nota atribuída; N é o número total de plantas testadas e S é a nota mais alta.

Os dados obtidos foram organizados em planilha Excel e processados no software SAS. A frequência de reisolamento dos fungos em partes das plantas avaliadas foram

submetidos à análise de variância e em casos significativos, as médias comparadas pelo teste de Duncan.

O acesso de todas as cepas fúngicas utilizadas neste estudo está registrado no Sistema Brasileiro de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado - SisGen sob os códigos AE398C6 e AD048A4.

Estudo da transmissão do agente causal da fusariose da bananeira por *Cosmopolites sordidus* em casa de vegetação

Para a avaliação da atuação de *C. sordidus* como vetor de Foc, um total de 125 indivíduos adultos foram coletados em áreas sem a presença da fusariose e expostos *in vitro* à fonte de inóculo de um isolado de Foc (CMAA1807), presente na coleção da Embrapa Meio Ambiente, utilizando três metodologias distintas. Os insetos submetidos ao contato com cada fonte de inóculo de Foc foram colocados em contato com plantas saudáveis de bananeira. Mudanças micropropagadas de bananeira cv. Maçã foram cultivadas por cem dias em casa de vegetação, em vasos contendo uma mistura de substrato estéril e solo de barranco. O desenho experimental utilizado foi inteiramente ao acaso (DIC), com cinco repetições por tratamento. Para cada tratamento, foram colocados cinco insetos em contato com a base de cada planta que foi envolta por malha mesh para que não houvesse dispersão dos insetos (SADIK et al., 2010). Os tratamentos consistiam em três diferentes metodologias de inoculação além de quatro tratamentos controle:

- Controle 1: plantas com insetos e sem inoculação com Foc (Foc-Cs+);
- Controle 2: plantas inoculadas com Foc por meio da adição de 30g de MAFI na concentração de 10^6 u.f.c.g⁻¹ e sem insetos (Foc+Cs-);
- Controle 3: plantas com inseto e inoculadas com Foc (Foc+Cs+);
- Controle 4: plantas sem insetos e não inoculadas (Foc-Cs-);
- Suspensão de inóculo diretamente sobre o exoesqueleto (Cs SPS) – em tubos do tipo Falcon contendo 10 ml de suspensão de esporos de Foc CMAA1807 foram acondicionados cinco insetos e agitados em vórtex por 15 segundos. Cada tubo consistiu em uma repetição. Para o preparo da suspensão, o isolado CMAA1807 foi repicado em placas de Petri (90 x 15 mm), contendo meio de cultura BDA e cultivado durante uma semana em BOD a 26°C. Em câmara de

fluxo, foi realizada a raspagem com pincel de cerdas macias utilizando 10 ml de água destilada para a liberação dos esporos. A suspensão obtida foi filtrada através de gaze esterilizada e a concentração ajustada para 10^6 esporos. mL⁻¹.

- Contato com meio de cultura colonizado por Foc (Cs MAFI) – em placas de Petri contendo meio de cultura de areia-fubá de milho infestado (MAFI) por Foc CMAA1807 esporulado, foram colocados cinco insetos que permaneceram durante 24 horas em BOD a 25 °C. Cada placa consistiu em uma repetição. O MAF foi preparado na proporção 5:1:1 (Areia: Fubá de milho: Água, respectivamente). Em erlenmeyers (150 ml), o MAF foi autoclavado duas vezes por 60 minutos com intervalo de 24 horas e infestado pela adição de cinco discos (0,5 cm de diâmetro) do isolado CMAA1807 crescido por sete dias em BDA. Os frascos foram incubados em BOD a 26 °C por vinte dias para a produção de inóculo.
- Contato com fragmento de planta infectada por Foc (Cs PSC) – em caixas do tipo Gerbox foram colocados cinco insetos em contato com pedaços de pseudocaule de bananeira infectadas por Foc coletadas em campo por 24 horas em BOD a 25 °C. Cada caixa consistiu em uma repetição.

O monitoramento foi feito semanalmente para a ocorrência de sintomas da fusariose pelo período de aproximadamente sessenta dias. Ao final do período experimental, foram recuperados os insetos e coletadas amostras das plantas visando o reisolamento de Foc CMAA1807. As colônias recuperadas de cada tratamento foram purificadas (FERNANDEZ, 1993) e submetidas à extração de DNA e análise de PCR para comprovar que se tratavam de Foc CMAA1807.

Para a extração do DNA genômico, foi utilizado o método de Raeder e Broda (1985) com modificações. Após o crescimento em BDA, as colônias foram cultivadas por 4 dias em meio caldo de batata-dextrose (CBD) sob agitação em incubadora shaker a 27°C. O CBD foi produzido a partir do caldo de 250 g de batata inglesa cozidas em 750 ml de água destilada por 15 minutos, adicionado de 6 g dextrose. Em cada Erlenmeyer, contendo 100 ml do CBD autoclavado, foram adicionados 5 discos de micélio de cada colônia crescido por 7 dias em BDA a 27°C.

Após a esporulação em CBD, foi realizada a filtração por meio de dupla camada de gaze estéril para coleta dos esporos em tubos do tipo Falcon. Esses tubos foram centrifugados duas vezes por cinco minutos a 3500 rpm e o sobrenadante descartado. Ao pellet obtido, foram adicionados 750 µl de tampão de extração (250mM NaCl; 200 mM Tris HCl pH 8,0; 25 mM EDTA; 0,5% SDS) e transferidos uma porção de 1ml para tubos Eppendorf. Foi feita a agitação de cada tubo em Vórtex por 1 minuto e em seguida incubados a 65°C por 40 minutos em banho-maria, homogeneizados a cada 10 minutos. Após o banho-maria, foram adicionados 475 µl de fenol equilibrado e 225 µl de clorofórmio a cada tubo e homogeneizados até que fosse obtida uma emulsão por inversão. Em seguida, foram centrifugados por 5 minutos a 12000 RPM e a fase aquosa transferida para um tubo novo contendo 600 µl da fase aquosa de isopropanol mantido a baixa temperatura, seguido de centrifugação a 12000 RPM por 5 minutos. O pellet obtido foi lavado com 500 µl de etanol 70% por duas vezes e colocado para secar sob vácuo por 15 minutos. Após a secagem, o DNA foi ressuscitado em 40 µl de tampão de extração contendo RNase (10 mg.ml) e incubado em termobloco a 37°C por 45 minutos. A qualidade do DNA foi analisada em gel de agarose e, quando necessário, foi realizado o tratamento do DNA pela adição de RNase (10 mg.ml).

As reações de PCR foram realizadas utilizando os primers Foc1/Foc2 (5'-CAGGGGATGTATGAGGAGGCT/5'-GTGACAGCGTCGTCTAGTTCC) e protocolo descritos por Lin et al. (2009). Os parâmetros para as PCRs foram: desnaturação a 94°C por 60 segundos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento a 68°C por 30 segundos; polimerização a 72°C por 90 segundos, e extensão final a 72°C durante 10 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Os primers Foc1/Foc2 amplificam um fragmento de DNA correspondente a 242 pb, que foi utilizado como parâmetro para confirmar que os isolados recuperados se tratavam de Foc.CMAA1807.

O acesso de todas as cepas fúngicas utilizadas neste estudo está registrado no Sistema Brasileiro de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado – SisGen, sob os códigos AE398C6 e AD048A4.

Resultados e discussão

Isolamento de fungos endofíticos associados a adultos da espécie *Cosmopolites sordidus* coletados em áreas de produção de bananas afetadas pela fusariose da bananeira

Foram isoladas trinta colônias com aspecto morfológico semelhantes a *F. oxysporum* de ambas as soluções (interna e externa) obtidas dos adultos de *C. sordidus*, de ambas as propriedades (VR_{Eld} e VR_{Jac}) e áreas contrastantes quanto à incidência de FB (Foc+/Foc-) (Tabela 1).

Tabela 1: Isolados de *Fusarium* spp. associados a insetos adultos da espécie *Cosmopolites sordidus* coletados em parcelas de bananeiras infectadas (Foc+) ou não (Foc-) pela fusariose da bananeira em duas propriedades (VR_{Eld} e VR_{Jac}) localizadas no Vale do Ribeira/SP

Código	Propriedade	Parcela	Solução
DF+1E	VR _{Jac}	Foc+	Externa
DF+2E	VR _{Jac}	Foc+	Externa
DF+5aE	VR _{Jac}	Foc+	Externa
DF+5bE	VR _{Jac}	Foc+	Externa
DF+5cE	VR _{Jac}	Foc+	Externa
DF+6E	VR _{Jac}	Foc+	Externa
DF+8aE	VR _{Jac}	Foc+	Externa
DF+8bE	VR _{Jac}	Foc+	Externa
DF-2I	VR _{Jac}	Foc-	Interna
DF-4aE	VR _{Jac}	Foc-	Externa
DF-7aE	VR _{Jac}	Foc-	Externa
DF-8E	VR _{Jac}	Foc-	Externa
DF-9aE	VR _{Jac}	Foc-	Externa
DF-9bE	VR _{Jac}	Foc-	Externa
KF+1bI	VR _{Eld}	Foc+	Interna
KF+2aE	VR _{Eld}	Foc+	Externa
KF+3bE	VR _{Eld}	Foc+	Externa
KF+3I	VR _{Eld}	Foc+	Interna
KF+4E	VR _{Eld}	Foc+	Externa
KF+7E	VR _{Eld}	Foc+	Externa
KF+8aE	VR _{Eld}	Foc+	Externa
KF+8bE	VR _{Eld}	Foc+	Externa
KF+8cE	VR _{Eld}	Foc+	Externa
KF-10bE	VR _{Eld}	Foc-	Externa
KF-5aE	VR _{Eld}	Foc-	Externa
KF-5bE	VR _{Eld}	Foc-	Externa
KF-5cE	VR _{Eld}	Foc-	Externa
KF-7E	VR _{Eld}	Foc-	Externa
KF-9E	VR _{Eld}	Foc-	Externa

Para as características morfológicas das colônias, foram observados o crescimento micelial e a coloração. Visualmente, todas as colônias apresentavam aspecto cottonoso ou aveludado, pigmentação alaranjada, arroxeadada, salmão ou creme. Microscopicamente apresentavam hifas hialinas, septadas e filamentosas, microconídios ovais e macroconídios fusiformes e septados, característicos desse complexo de espécies (LESLIE; SUMERELL, 2006) (Figura 2).



Figura 2: Colônias distintas com características morfológicas de *Fusarium* spp. associados a adultos da espécie *Cosmopolites sordidus* coletados em campos de produção de bananas em parcelas de plantas apresentando sintomas de fusariose ou não (parcelas Foc+ ou Foc-) no estado de São Paulo.

Identificação de isolados de *Fusarium* spp. associados adultos da espécie *Cosmopolites sordidus* em áreas de produção de bananas afetadas pela fusariose da bananeira

As sequências do gene que codifica para o fator de alongação TEF1- α foram analisadas utilizando a ferramenta Blastn e alinhadas com as sequências depositadas no GeneBank de espécies com maior similaridade. Os critérios utilizados foram maiores Scores Máximo e Total (Max score e Total score), Query Cover (Cover %), Porcentagem de Identidade (Ident. %) e menor e-Value (E-value) entre as sequências analisadas e aquelas já depositadas nos bancos de dados. Com base nesses critérios, os melhores hits foram selecionados (Tabela 2).

Tabela 2: Identificação dos isolados de *Fusarium* spp. associados a insetos adultos da espécie *Cosmopolites sordidus* coletados em áreas de bananeiras com fusariose ou sadias de duas propriedades (VR_{Jac} e VR_{Eld}) localizadas no Vale do Ribeira/SP

Isolate	Blastn best hit	Max score	Total score	Cover %	E-value	Ident. %	Accession
DF+1	EF452969.1 <i>Fusarium sacchari</i> strain NRRL 43543 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds	1223	1223	99	0	99.85	MG018802.1
DF+2	JF740837.1 <i>Fusarium oxysporum</i> strain NRRL 52763 translation elongation factor alpha gene, partial cds	1232	1232	100	0	100	EU246571.1
DF+5a	FJ538245.1 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> strain NRRL 32158 translation elongation factor 1 alpha (EF-1alpha) gene, partial cds	1238	1238	100	0	100	MN386735.1
DF+5b	FJ538245.1 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> strain NRRL 32158 translation elongation factor 1 alpha (EF-1alpha) gene, partial cds	1238	1238	100	0	100	MN386735.1
DF+5c	KF255484.1 <i>Fusarium solani</i> strain CBS 132898 translation elongation factor 1a (<i>tef1</i>) gene, partial cds	1232	1232	100	0	98.86	KR816154.1
DF+6	JF740837.1 <i>Fusarium oxysporum</i> strain NRRL 52763 translation elongation factor alpha gene, partial cds	1232	1232	100	0	100	EU246571.1
DF+8a	FJ538245.1 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> strain NRRL 32158 translation elongation factor 1 alpha (EF-1alpha) gene, partial cds	1238	1238	100	0	100	MN386735.1
DF+8b	FJ538245.1 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> strain NRRL 32158 translation elongation factor 1 alpha (EF-1alpha) gene, partial cds	1238	1238	100	0	100	MN386735.1
DF-2	<i>Fusarium sterilihyphosum</i> strain NRRL 25623 translation elongation factor 1 alpha (<i>TEF1</i>) gene, complete cds	1206	1206	100	0	99.56	MN193869.1
DF-4a	KF255484.1 <i>Fusarium solani</i> strain CBS 132898 translation elongation factor 1a (<i>tef1</i>) gene, partial cds	1232	1232	100	0	98.86	KR816154.1
DF-7a	EF452969.1 <i>Fusarium sacchari</i> strain NRRL 43543 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds	1223	1223	99	0	99.85	MG018802.1
DF-8	KF255484.1 <i>Fusarium solani</i> strain CBS 132898 translation elongation factor 1a (<i>tef1</i>) gene, partial cds	1234	1234	97	0	100	KF255484.1

DF-9a	EF452969.1 <i>Fusarium sacchari</i> strain NRRL 43543 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds	1223	1223	99	0	99.85	MG018802.1
DF-9b	EF452969.1 <i>Fusarium sacchari</i> strain NRRL 43543 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds	1223	1223	99	0	99.85	MG018802.1
KF+1b	KF255484.1 <i>Fusarium solani</i> strain CBS 132898 translation elongation factor 1a (tef1) gene, partial cds	1232	1232	100	0	98.86	KR816154.1
KF+2a	EF452969.1 <i>Fusarium sacchari</i> strain NRRL 43543 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds	1223	1223	99	0	99.85	MG018802.1
KF+2b	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> isolate BMAE104Foc small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	863	863	99	0	99.19	MN396268.1
KF+3b	EF452969.1 <i>Fusarium sacchari</i> strain NRRL 43543 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds	1223	1223	99	0	99.85	MG018802.1
KF+4	<i>Fusarium sterilihyphosum</i> strain NRRL 25623 translation elongation factor 1 alpha (TEF1) gene, complete cds	1206	1206	100	0	99.56	MN193869.1
KF+7	JF740837.1 <i>Fusarium oxysporum</i> strain NRRL 52763 translation elongation factor alpha gene, partial cds	1234	1234	100	0	100	CP053267.1
KF+8a	KF255484.1 <i>Fusarium solani</i> strain CBS 132898 translation elongation factor 1a (tef1) gene, partial cds	1232	1232	100	0	98.86	KR816154.1
KF+8b	EF452969.1 <i>Fusarium sacchari</i> strain NRRL 43543 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds	1223	1223	99	0	99.85	MG018802.1
KF+8c	KF255484.1 <i>Fusarium solani</i> strain CBS 132898 translation elongation factor 1a (tef1) gene, partial cds	1232	1232	100	0	99.01	HQ731056.1
KF-10b	JF740837.1 <i>Fusarium oxysporum</i> strain NRRL 52763 translation elongation factor alpha gene, partial cds	1234	1234	100	0	100	CP053267.1
KF-5a	<i>Fusarium sterilihyphosum</i> strain NRRL 25623 translation elongation factor 1 alpha (TEF1) gene, complete cds	1206	1206	100	0	99.56	MN193869.1
KF-5b	<i>Fusarium sterilihyphosum</i> strain NRRL 25623 translation elongation factor 1 alpha (TEF1) gene, complete cds	1206	1206	100	0	99.56	MN193869.1

KF-5c	KF255484.1 <i>Fusarium solani</i> strain CBS 132898 translation elongation factor 1a (tef1) gene, partial cds	1232	1232	100	0	98.86	KR816154.1
KF-7a	KF255484.1 <i>Fusarium solani</i> strain CBS 132898 translation elongation factor 1a (tef1) gene, partial cds	1232	1232	100	0	98.86	KR816154.1
KF-9	FJ538245.1 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> strain NRRL 32158 translation elongation factor 1 alpha (EF-1alpha) gene, partial cds	1230	1230	100	0	99.85	KT006896.1

Dez isolados foram alinhados com maior similaridade dentro de FOSC, os quais foram obtidos majoritariamente associados a indivíduos *C. sordidus* coletados nas parcelas de plantas afetadas pela Fusariose (Foc+). Destes, seis foram provenientes da fazenda VR_{Jac} (DF+2, DF+6, DF+5, DF+5b, DF+8, DF+8b), em que a parcela de plantas doentes e saudias se encontravam adjacentes. Na Fazenda VR_{Eid}, onde as parcelas doente e sadia se encontravam mais distantes, foram obtidos quatro isolados, sendo dois provenientes da parcela de plantas doentes (KF+2b, KF+7) e dois da parcela de plantas saudias (KF-9, KF-10b).

De acordo com Gold e Bagabe (1997), adultos de *C. sordidus* podem se locomover por mais de 30 metros em 5 dias. Isso pode contribuir para a dispersão da doença a longas distâncias ao se deslocarem entre áreas infestadas e livres de Foc. Meldrum et al. (2013), avaliando a distribuição de plantas infectadas por Foc R4T na Austrália, observaram que além do padrão agregado de distribuição, também ocorriam casos isolados de plantas doentes, o que sugeria outros fatores envolvidos na disseminação da doença. Nessa mesma área avaliada, os autores coletaram adultos de *C. sordidus* e conseguiram detectar esporos de Foc associados ao exoesqueleto desses insetos por meio de análises moleculares. Esses autores, no entanto, não testaram a viabilidade do inóculo recuperado em causar novas infecções na bananeira.

Teste de patogenicidade para bananeira

Nenhuma das plantas inoculadas com os isolados associados a *C. sordidus* coletados em campo apresentou sintomas típicos de FB, aos 80 dias após a inoculação. Apenas o isolado padrão de Foc, utilizado como controle positivo (CMAA1807), provocou sintomas típicos da doença no rizoma das plantas inoculadas, com índice de doença de 62,5% (Figura 3).

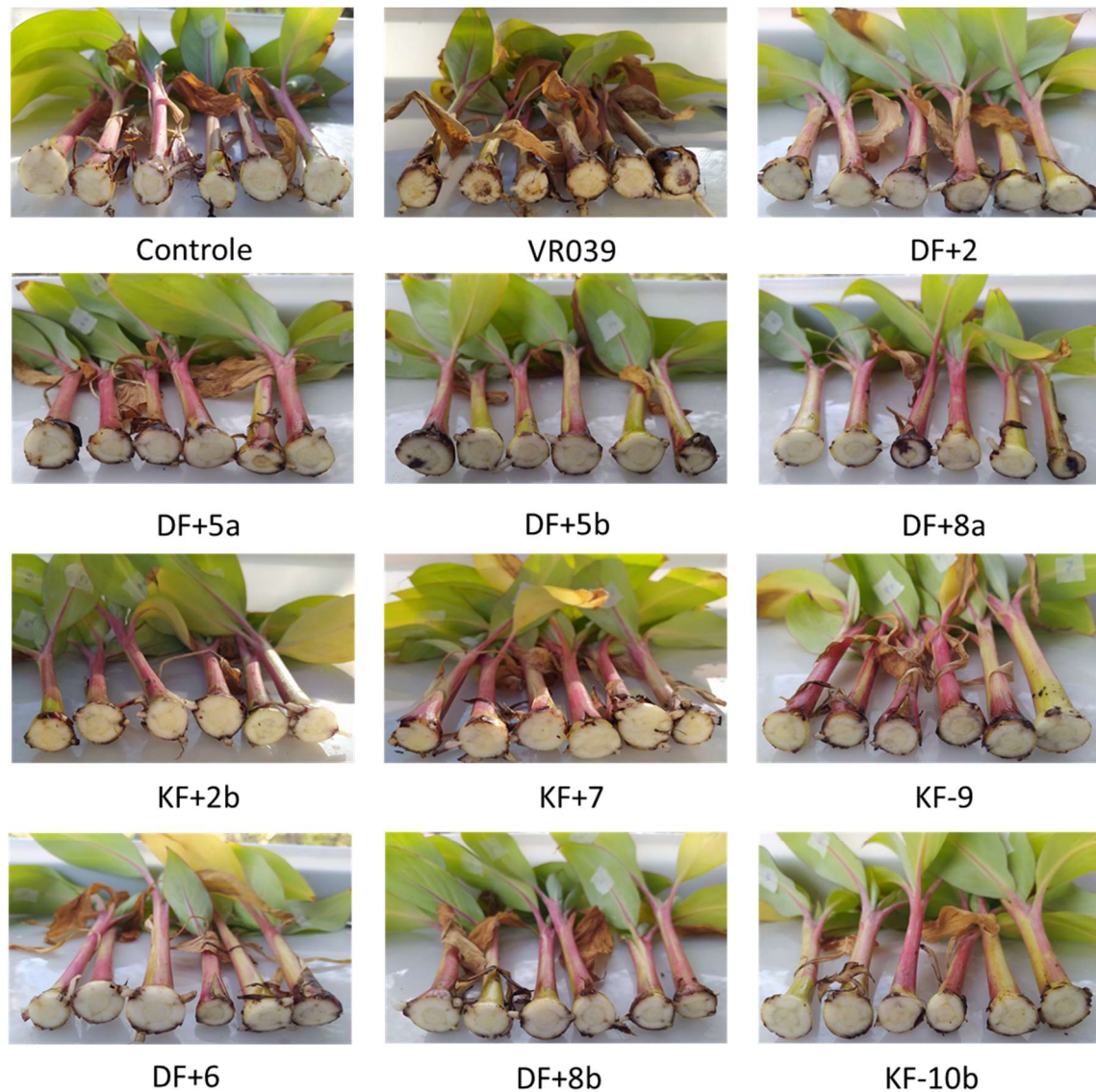


Figura 3: Seção transversal de rizoma de mudas de banana Maçã inoculadas com isolados de *Fusarium oxysporum* (DF+2, DF+5a, DF+5b, DF+8a, KF+2b, KF+7, KF-9, DF+6, DF+8b, KF-10b) associados a *Cosmopolites sordidus* coletados em campos de produção de bananas em áreas Foc + e Foc – (com ou sem sintomas de fusariose).

Aos 80 dias, foi possível recuperar todos os isolados nas raízes assintomáticas de pelo menos 33,3% das plantas inoculadas com cada isolado. Apenas KF-10b, KF+2b e KF-9 não foram recuperados em rizoma e apenas DF+5a, DF+2, KF+7 e KF-9 não foram recuperados em pseudocaule (Figura 4).

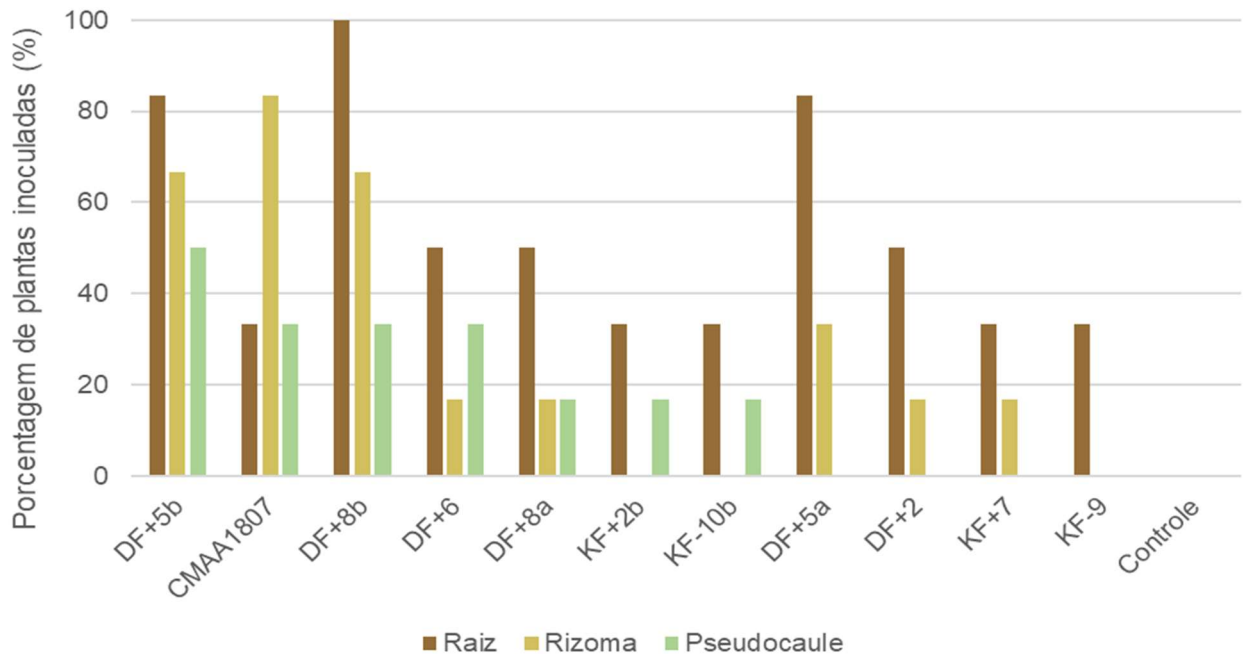


Figura4: Frequência de reisolamento de isolados de *Fusarium oxysporum* (DF+5b; CMAA1807; DF+8b; DF+6; DF+8a; KF+2b; KF-10b; DF+5a; DF+2; KF+7; KF-9), recuperados em compartimentos de raízes, rizoma e pseudocaule, 80 dias após inoculação em mudas de banana cv. Maçã.

As espécies de fungos pertencentes ao complexo de *F. oxysporum* (FOSC) são tipicamente causadoras de murchas vasculares em diversas espécies agrícolas cultivadas. A principal forma de dividir os subgrupos das espécies de FOSC se baseia em características de patogenicidade. Aquelas constantemente associadas à mesma cultura são incluídas na mesma *formae specialis* (FOURIE et al., 2011). Dentro do FOSC, Foc é um patógeno particularmente de complexa caracterização devido à sua grande variabilidade genética. Além da especialização a nível de hospedeiro (*formae speciales*), ainda é dividido em três principais raças em função da cultivar afetada (DITA et al., 2018) e 24 grupos de compatibilidade vegetativa (VCGs) (MAGDAMA et al, 2020).

Por se tratarem de isolados procedentes de coletas de campo, as técnicas disponíveis para sua caracterização são ponto chave para melhor descrição da espécie. Fatores como a grande variabilidade dos métodos de inoculação, influência da temperatura, idade do hospedeiro e período de incubação do patógeno podem influenciar significativamente os estudos de patogenicidade (FOURIE et al. 2009). No presente estudo, foi utilizado apenas o teste de patogenicidade sobre a cv. Maçã, a mais

suscetível para todas as raças de Foc. Nesse caso, os isolados testados não se apresentaram virulentos para a bananeira, sugerindo que podem não se tratar de Foc. Os experimentos estão sendo repetidos para confirmar esses resultados, especialmente referentes àqueles isolados recuperados em rizoma e pseudocaule.

Estudo da transmissão do agente causal da fusariose da bananeira por *Cosmopolites sordidus* em casa de vegetação

Em todos os tratamentos onde foi realizada a inoculação com Foc CMAA1807, foi possível verificar a presença de sintomas no rizoma das plantas. O maior dano às plantas foi observado no tratamento onde Foc e *C. sordidus* foram introduzidos separadamente na base das plantas. Ainda assim, foi possível observar a ocorrência de sintomas da doença e danos associados à introdução dos insetos que foram expostos às diferentes fontes de inóculo (Figura 5).

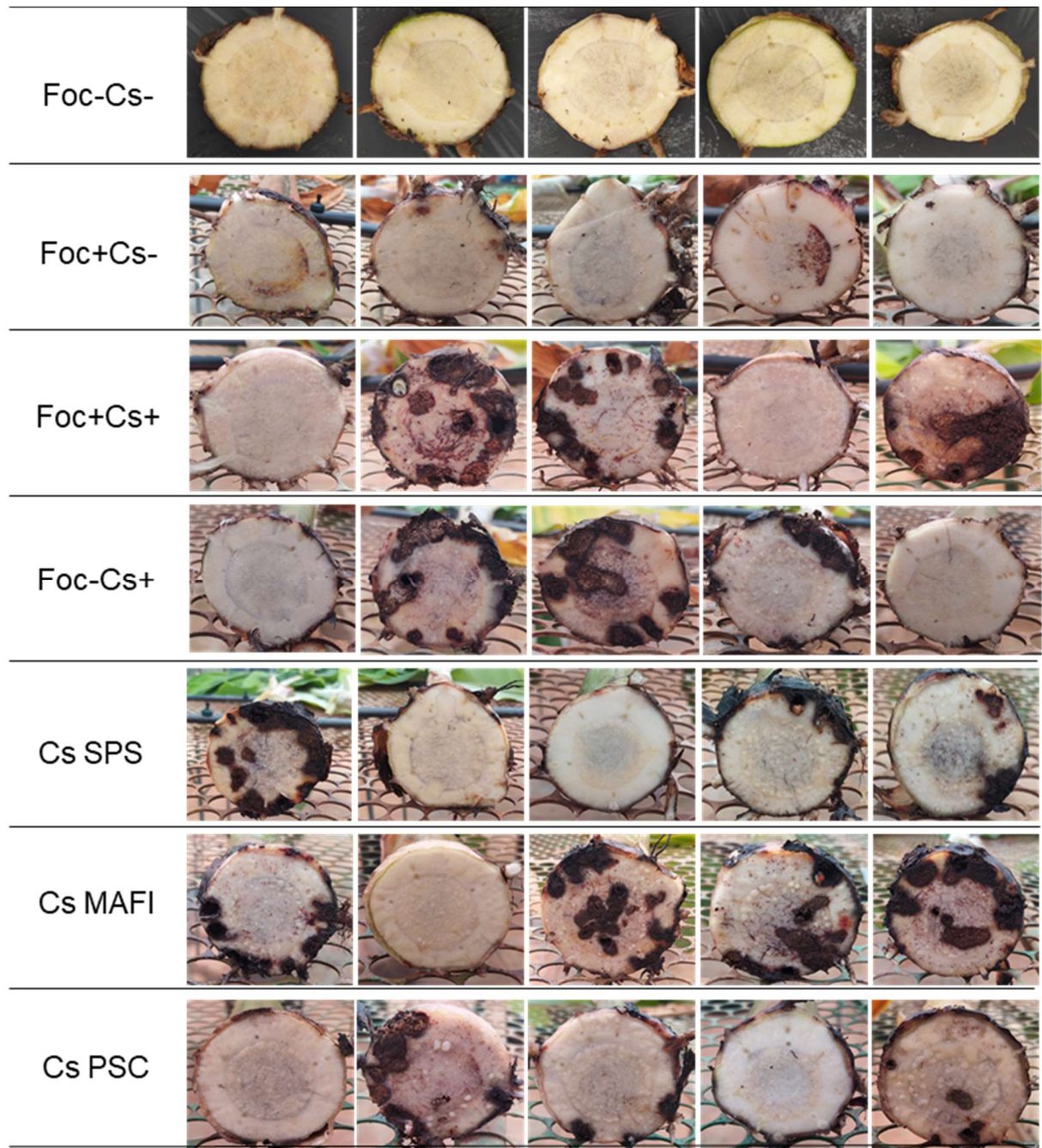


Figura 5: Seção transversal de rizoma de plantas de banana Maçã, 80 dias após a infestação com adultos de *Cosmopolites sordidus* expostos à distintas fontes de inóculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* inoculação com isolados de *Fusarium oxysporum* (Cs SPS = inseto exposto à suspensão de inóculo; Cs MAFI = inseto exposto ao meio de cultura Areia-Fubá de milho inoculado com Foc; Cs PSC = inseto exposto a pedaços de pseudocaule infectado por Foc.); insetos sem exposição ao inóculo e sem inoculação na planta (Foc-Cs+); insetos sem exposição ao inóculo e infestação do substrato na base da planta (Foc+Cs+); sem infestação com inseto e com infestação do substrato (Foc+Cs-); e sem infestação por *C. sordidus* e Foc (Foc-Cs-).

Após o reisolamento a partir de fragmentos de rizoma e pseudocaule das plantas inoculadas, foi possível obter 17 colônias com características morfológicas semelhantes às do isolado CMAA1807, entre os distintos tratamentos.

Tabela 3: Colônias com aspecto morfológico semelhantes ao isolado de Foc CMAA1807, recuperadas de distintos tratamentos no estudo da transmissão do agente causal da fusariose da bananeira por *Cosmopolites sordidus*

Tratamento	Parte da planta/inseto
Foc+ Cs+3Cs a	Exoesqueleto broca
Foc+ Cs+3Cs b	Exoesqueleto broca
Foc+ Cs+3Cs c	Exoesqueleto broca
Foc+ CS+2P	Pseudocaule
Foc+ CS+2R	Raiz
Foc+ CS+3R	Raiz
Foc+ CS+3Rb	Raiz
Foc+ CS+1R	Raiz
Foc+ CS+4R	Raiz
Foc+ CS-1R	Raiz
Foc+ CS-4R	Raiz
Cs MAFI 5R	Raiz
Cs MAFI 4R	Raiz
Cs MAFI 3R	Raiz
Cs SPS 3R	Raiz
Cs SPS 1R	Raiz
Cs PSC 5P	Raiz

Após a extração do DNA dos fungos reisolados das plantas de cada tratamento e reação de PCR com os primers Foc1/Foc2, foi possível obter produtos de PCR de 242 pb de colônias recuperadas dos tratamentos Foc+Cs+, Foc+Cs-, Cs MAFI e Cs SPS, como esperado para o isolado inoculado. Uma única colônia foi recuperada do tratamento Cs PSC, porém, não foi observado produto amplificado, uma vez que apesar de o pseudocaule utilizado estar infectado com Foc, não se tratava de CMAA1807 (Figura 6).

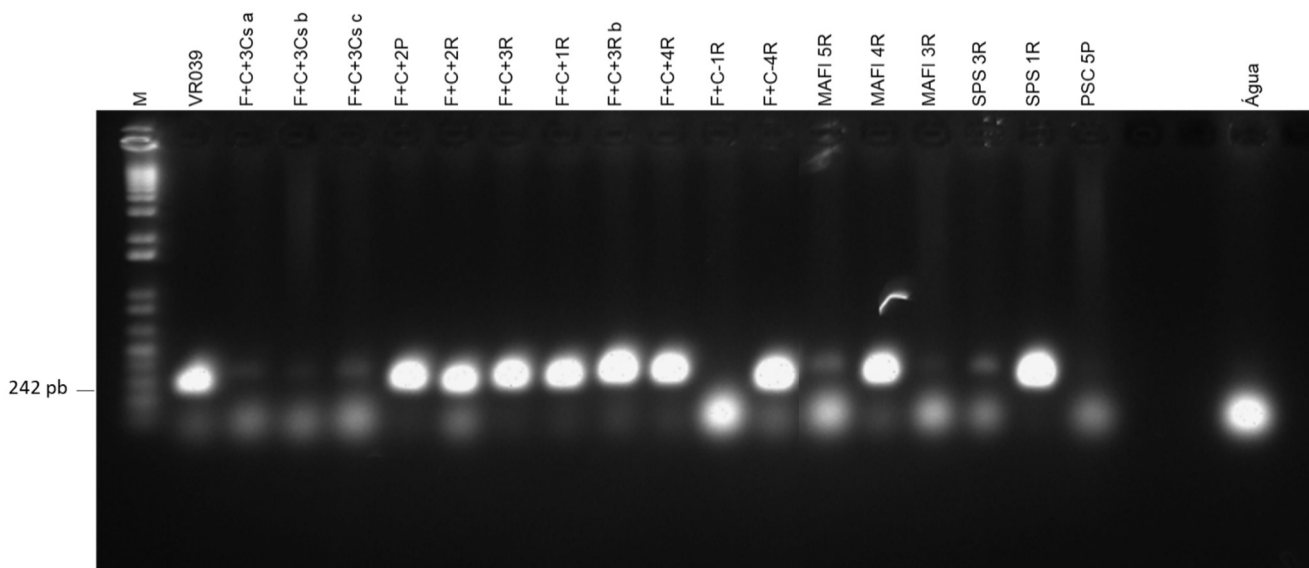


Figura 6: Análise dos produtos amplificados por PCR em eletroforese de gel de agarose 1,5% utilizando os primers Foc1/Foc2 (Lin et al, 2009) do DNA extraído de fungos reisolados de plantas de banana cv. Maçã 60 dias após a infestação com adultos de *C. sordidus* expostos à diferentes fontes de inóculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) ou infestação do substrato na base da planta com Foc. M = DNA ladder 1kb plus; CMAA1807 = Isolado de Foc utilizado como inóculo (Controle positivo); Cs SPS = inseto exposto à suspensão de inóculo; Cs MAFI = inseto exposto ao meio de cultura Areia-Fubá de milho inoculado com Foc; Cs PSC = inseto exposto a pedaços de pseudocaule infectado por Foc; Foc-Cs+ = insetos sem exposição ao inóculo e sem inoculação na planta; Foc-Cs- = sem infestação com inseto e com infestação do substrato. Os números correspondem à repetição e as letras, à parte da planta ou inseto das quais os isolados foram recuperados (R = Raiz; P = Pseudocaule; a, b e c = exoesqueleto do inseto recuperado).

O maior número de colônias de Foc CMAA1807 foi recuperado no tratamento onde Foc e *C. sordidus* foram introduzidos separadamente. Nesse mesmo tratamento, foi possível recuperar um inseto adulto vivo, do qual foram isoladas colônias de Foc CMAA1807, associadas ao exoesqueleto (Figura 4 – Foc-Cs+3B a, b e c). Isso pode indicar que o inseto tenha adquirido os propágulos do patógeno, a partir do contato com o substrato infestado e facilitado a sua entrada na planta. A maior parte dos insetos adultos não foi recuperada, o que pode sugerir que os mesmos tenham escapado ao longo do período experimental, apesar da utilização da malha mesh. O monitoramento dos insetos nem sempre é possível, uma vez que em contato com a planta, os mesmos se abrigam na bainha das mesmas, abaixo do nível de solo dentro dos vasos.

Em estudo recente desenvolvido por Heck et al. (2021), foi avaliada a distribuição espaço-temporal da fusariose da bananeira no estado de Minas Gerais por meio de

um modelo de epidemiologia comparativa. As parcelas avaliadas eram contrastantes quanto ao manejo de *C. sordidus* (com ou sem manejo). Foi feito o monitoramento da população dos insetos e simultaneamente a avaliação da incidência da fusariose pelo período de dois anos. Foram observadas diferenças no comportamento da curva de progresso da incidência da doença entre as duas parcelas, onde os níveis foram mais altos nas parcelas sem o manejo do inseto (13%), do que nas parcelas onde foi controlado (6,7%), indicando associação entre a Broca e a FB.

Apesar da grande variabilidade no reisolamento entre as repetições do mesmo tratamento, o resultado positivo para os fungos recuperados como Foc CMAA1807 nos tratamentos onde foram introduzidos os insetos expostos à fonte de inóculo pode indicar a associação entre a broca-da-bananeira e Foc. Sánchez et al. (2021) avaliaram o potencial *in vitro* de *C. sordidus* como transportador de inóculo de Foc aderidos externamente ao exoesqueleto ou internamente no trato digestivo. Os autores concluíram que cinco minutos de contato com pseudocaule infectado por Foc seria o suficiente para que os insetos adquirissem esporos viáveis do patógeno e assim permanecessem infestados por até três dias. Quando testada a patogenicidade do inóculo recuperado destes insetos na cv. Gros Michel, em condições de casa de vegetação, todas as plantas inoculadas apresentaram sintomas da doença. No entanto, neste estudo, os autores não avaliaram a atuação simultânea do inseto e do patógeno diretamente sobre a planta.

As diferentes formas de interação entre Foc e *C. sordidus* necessitam de mais estudos com o intuito de compreender e esclarecer a possível atuação deste inseto como vetor da fusariose da bananeira com mais detalhes. A interação entre diferentes fatores, culturais ou ambientais, sobre a epidemiologia da doença devem ser melhor avaliadas para que possam integrar os planos de manejo da doença.

Conclusões

Foi possível isolar colônias de *F. oxysporum* associadas ao exoesqueleto de adultos de *C. sordidus* coletados em bananais em parcelas com ou sem a presença da doença. No entanto, ao testar a patogenicidade para a bananeira, nenhum dos

isolados reproduziu sintomas característicos da doença, não sendo classificados como Foc.

Ao avaliar a dinâmica da interação entre a broca-da-bananeira e o agente causal da FB, foi observada maior intensidade da doença em plantas infestadas com o inóculo e com os insetos.

Referências

BANCROFT, J. Report of the Board Appointed to Enquire into the Cause of Disease Affecting Livestock and Plants. **Votes and Proceedings**, v. 3, pp. 1011-1038, 1876

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. D.; KIMATI, H. Doenças da bananeira. In: KIMATI, H. A., L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. Ed. Manual de Fitopatologia. São Paulo, SP: **Agronômica Ceres**, v. 2, p. 99- 117, 2005.

DITA, M. (ed.). Practical guidelines for early screening and field evaluation of banana against Fusarium wilt, *Pseudocercospora* leaf spots and drought. **Bioversity International**. Montpellier: Bioversity International, 2021. 83 p.

DITA, M.; BARQUERO. M.; HECK, D.; MIZUBUTI E. S. G.; STAVER, C. P. Fusarium Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. **Frontiers In Plant Science**, v. 9, out. 2018.

FERNANDEZ, M. R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1993.

FOURIE, G.; STEENKAMP, E. T.; GORDON, T. R.; VILJOEN, A. Evolutionary Relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Vegetative Compatibility Groups. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, pp. 4770–4781, 2009

FOURIE, G.; STEENKAMP, E.T.; PLOETZ, R.C.; GORDON, T.R.; VILJOEN, A. Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, pp. 533–542, 2011.

GALLO, D.; NAKANO, O; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN,

J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. Entomologia Agrícola. São Paulo: **Agronômica Ceres**, p. 920, 2002

GOLD, C.S.; BAGABE, M.I. Banana weevil, *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae), infestation of cooking and beer bananas in adjacent stands in Uganda. **African Entomologist**, v. 5, n. 1, p.103-108, 1997.

GUILLEN SÁNCHEZ, C., TIXIER, P., TAPIA FERNÁNDEZ, A., CONEJO BARBOZA, A. M., SANDOVAL FERNÁNDEZ, J. A.; DE LAPEYRE DE BELLAIRE, L. Can the banana weevil *Cosmopolites sordidus* be a vector of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 1? Unravelling the internal and external acquisition of effective inoculum. **Pest Management Science**, v. 77, pp. 3002–3012, 2021.

HECK, D.W.; ALVES, G.; MIZUBUTI, E.S.G. Weevil borers affect the spatio-temporal dynamics of banana fusarium wilt. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 329, 2021.

LESLIE, J. F., AND SUMMERELL, B. A. **The Fusarium laboratory manual**. Ames: JohnWiley and Sons, 2006.

LIN, Y. H., CHANG, J. Y., LIU, E. T., CHAO, C. P., HUANG, J. W., CHANG, P. F. L. Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. **European Journal of Plant Pathology**, v. 123, pp. 353–365, 2009.

MAGDAMA, F.; MONSERRATE-MAGGI, L.; SERRANO, L.; GARCÍA ONOFRE, J.; JIMÉNEZ-GASCO, M. del M. Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, the Fusarium Wilt Pathogen of Banana, in Ecuador. **Plants**, v. 9, 1133–1151, 2020.

MELDRUM, R. A.; DALY, A. M.; TRAN-NGUYEN, L. T. T.; AITKEN, E. A. B. Are banana weevil borers a vector in spreading *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 in banana plantations?. *Australasian Plant Pathology*, v. 42, pp. 543–549, 2013.

OLIVARES, B. O.; REY, J. C.; LOBO, D.; NAVAS-CORTÉS, J.A.; GÓMEZ, J.A.; LANDA, B.B. Fusarium Wilt of Bananas: A review of agro-environmental factors in the venezuelan production system affecting its development. **Agronomy**, v. 11, n. 986, 2021.

PADMANABAN, B. Pests of banana. *Pests and Their Management*, Springer: Singapore. pp. 441-455, 2018.

PORTAL GONZÁLEZ, N.; SOLER, A.; RIBADENEIRA, C.; SOLANO, J.; PORTIELES, R.; HERRERA ISLA, L.; COMPANIONI, B.; BORRAS-HIDALGO, O.; SANTOS BERMUDEZ, R. Phytotoxic Metabolites Produce by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* Race 2. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. 629395, 2021.

RIBEIRO, L.R., AMORIM, E.P., CORDEIRO, Z.M., SILVA, S. de OLIVEIRA, DITA, M.A. Discrimination of banana genotypes for Fusarium wilt resistance in greenhouse. **Acta Horticola**, v. 897, pp. 381-385, 2011.

SADIK, K.; NYINE, M.; PILLAY, M. A screening method for banana weevil (*Cosmopolites sordidus* Germar) resistance using reference genotypes. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 30, p. 4725-4730, 2010.

STOVER, R. **Fusarial wilt (Panama disease) of Bananas and Other Musa Species**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1962. 177 p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível observar que plantas comumente utilizadas como coberturas vegetais podem servir como hospedeiras alternativas de Foc, atuando como fonte de inóculo do patógeno no campo.

Na ausência de plantas hospedeiras, a sobrevivência de Foc em campo se dá por meio das estruturas de resistência que remanescem no solo, os clamidósporos. A possibilidade de sobrevivência do patógeno em outras espécies de plantas pode ajudar na multiplicação do patógeno na ausência de bananeiras suscetíveis, o que não ocorreria no solo.

Alguns fatores como o efeito do uso de herbicidas para o controle de ervas daninhas infectadas sobre viabilidade das estruturas reprodutivas de Foc, por exemplo, são questões ainda a serem elucidadas. Além disso, até que ponto e quais os tipos de estruturas produzidas durante a colonização desses hospedeiros secundários, bem como a patogenicidade para bananeiras, ainda precisa ser melhor avaliada.

Estudos adicionais são necessários para avaliar o potencial das estruturas de Foc recuperadas de plantas de cobertura ou ervas daninhas naturalmente hospedeiras de Foc em campo em infectar a bananeira posteriormente.

Além disso, as diferentes formas de interação entre Foc e *C. sordidus* necessitam de mais estudos com o intuito de esclarecer a possível atuação desse inseto como vetor da fusariose da bananeira com mais detalhes. A broca da bananeira pode atuar diretamente carregando esporos associados ao seu exoesqueleto entre plantas infectadas e não infectadas? Ou apenas facilita a infecção ao promover portas de entrada para a colonização da planta por Foc?

A interação entre esses fatores sobre a epidemiologia da doença devem ser melhor avaliadas para que possam integrar os planos de manejo da fusariose da bananeira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. J. **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMF, 1999. 585 p.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. D.; MEISSNER FILHO, P. E. Doenças e métodos de controle. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. da S. **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2004. Cap. 9, p. 146–182.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira (*Musa* spp.) In: **Doenças da Bananeira**. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. Manual de Fitopatologia. Agronômica Ceres, v.2, p.99- 117, 2005.

COUSINS, H. H; SUTHERLAND, J. B. Plant diseases and pests. Report of the Secretary of the Advisory Committee on the Banana Industry. In: **Annual Report Department of Science and Agriculture Jamaica for the year ending**, pp 15–19, 1930.

DITA, M.; BARQUERO. M.; HECK, D.; MIZUBUTI E. S. G.; STAVER, C. P.. Fusarium Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. **Frontiers In Plant Science**, v. 9, out. 2018. 03

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>.

GOLD, C. S; PENA, J. E; KARAMURA, E. B. Biology and integrated pest management for the banana weevil *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae). **Integr Pest Manag Ver**, v. 6, pp. 79–155, 2001.

HELBIG, J. B.; CARROLL, R. B.. Dicotyledonous Weeds as a Source of *Fusarium oxysporum* Pathogenic on Soybean. **Plant Disease**, v. 68, p.694-696, 1994.

HENNESSY, C.; WALDUCK, G.; DALY, A.; PADOVAN, A. Weed hosts of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 in northern Australia. **Australasian Plant Pathology**, v.34 p.115–117, 2005.

LESLIE, J. F., AND SUMMERELL, B. A. The Fusarium laboratory manual. Ames: JohnWiley and Sons, 2006.

LIN, Y.-H., CHANG, J.-Y., LIU, E.-T., CHAO, C.-P., HUANG, J.-W., CHANG, P.-F. L., ET AL. Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4. **European Journal of Plant Pathology**, v. 123, pp. 353–365, 2009.

MELDRUM, R. A.; DALY, A. M.; TRAN-NGUYEN, L. T. T.; AITKEN, E. A. B. Are banana weevil borers a vector in spreading *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 in banana plantations? **Australasian Plant Pathology**, 42, 543–549. 2013.

PATTISON, A. B.; WRIGHT, C. L.; KUKULIES, T. L.; MOLINA, A. B. Ground cover management alters development of Fusarium wilt symptoms in Ducasse bananas. **Australasian Plant Pathology**, v. 43, n.4, p.465–476, 2014.

PITTAWAY, P. A.; NASIR, N.; PEGG, K. G. Soil receptivity and host– pathogen dynamics in soils naturally infested with *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, the cause of Panama disease in bananas. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 50, pp. 623–628, 1999.

PLOETZ, R. C. **Fusarium Wilt of Banana**. Phytopathology, Saint Paul, v. 105, p. 1512-1521, 2015.

RIBEIRO, L.R., AMORIM, E.P., CORDEIRO, Z.M., SILVA, S. de OLIVEIRA, DITA, M.A. Discrimination of banana genotypes for Fusarium wilt resistance in greenhouse. **Acta Hortícola**, v. 897, pp. 381-385, 2011.

SADIK, K.; NYINE, M.; PILLAY, M. A screening method for banana weevil (*Cosmopolites sordidus* Germar) resistance using reference genotypes. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 30, p. 4725-4730, 2010.

SHEN, Z.; XUE, C.; PENTON, C. R.; THOMASHOW, L. S.; ZHANG, N.; WANG, B.; RUAN, Y.; LI, R.; SHEN, Q. Suppression of banana Panama disease induced by soil microbiome reconstruction through an integrated agricultural strategy. **Soil Biology and Biochemistry**, v.128, p.164-174, 2019.

SILVA, S. D. E.; MATOS, A. P. de; ALVES, E. J. Genetic improvement of banana tree. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 5, p. 693-703, 1998

SILVA, S. O.; MATOS, A.; CORDEIRO, Z. J. M.; LIMA, M. J. C.; AMORIM, E. P. Avaliação de genótipos tetraploides de bananeira cultivados em área infestada pelo agente causal do Msl-do-Panamá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, p. 125-132, 2011.

TARDY, F., MOREAU, D., DOREL, M., AND DAMOUR, G. Trait-based characterisation of cover plants' light competition strategies for weed control in banana cropping systems in the French West Indies. **European Journal of Agronomy**, v. 71, p. 10–18, 2015.

THANGAVELU, R.; MUSTAFFA, M. Current advances in the Fusarium wilt disease management in banana with emphasis on biological control. **Plant Pathology**, New York, p. 273-298, 2012

WAITE, B. H.; DUNLAP, V. C. Preliminary host range studies with *Fusarium oxysporum* f. cubense. **Plant Disease Reporter**, v. 37, pp. 79–80, 1953.

WARDLAW, C. W. **Banana diseases, including plantains and abaca**. Longmans, Green & Co., Ltd, London, 1961.

WILLSEY, T.; CHATTERTON, S.; CÁRCAMO, H. Interactions of root-feeding insects with fungal and oomycete plant pathogens. **Frontiers of Plant Science**, v. 8, n. 1764, 2017.

ANEXO I

Sequenciamento do gene que codifica para TEF1- α de isolados de *Fusarium* spp. provenientes de ervas daninhas coletadas em campo próximas a bananeiras com sintomas de Fusariose

Código	Sequência FASTA
VR - 039 A	>CMAA1807A ATCTCGATCGCGCGTCCTTTGCCCATCGACTTCCCCTACGACTCGAAACGTGCCCCGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAATTTTGCAATATGACCGTAATT TTTTTGGTGGGGCAATTTACCCCGCCACTTGAGCGACGGGGCGCGTTTGCCTCTTACCATTACAACCTCAATGAGTGCGTCGTCACGTGTCAAGCAGTC ACTAACCATTCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGCAAGGGTCCCCTTCAAGTAA
VR - 039 B	>CMAA1807B ATCATCGATCGCGCGTCCTTTGCCCATCGACTTCCCCTACGACTCGAAACGTGCCCCGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAATTTTGCAATATGACCGTAATT TTTTTGGTGGGGCAATTTACCCCGCCACTTGAGCGACGGGGCGCGTTTGCCTCTTACCATTACAACCTCAATGAGTGCGTCGTCACGTGTCAAGCAGTC ACTAACCATTCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGCAAGGGTCCCCTTCAAGTAA
TRARZ01	>TRARZ01 GCATTTTCGCGATCGCCGCCCTCTACCCACCGATCCATCAGTCGAATCAGTTTACCACGATTGAATATGCGCCTGTTACCCCGCTCGAGTACAAAATTT TGCGGTTCAACCGTAATTTTTTTTTGGTGGGGTTTCAACCCCGCTACTCGAGTGACAGGCGTTTGCCTCTTCCCACAACTCATGTCTTGCGCATCACG TGTCATAAGTCACTAACCACCCGACAATAGGAAGCCGCGAGCTCGGCAAGGGTTCCCTTCAAGTAATGATGATGCGTTGAGATCTTGTGAATGTACAC CGAAAGCAGTCTCTAGATCGACATGCCTGAAAACGAAGGAGATGAGAGAAGTAGGTTGCAAGAAAAGTGGCAAGGGTTCCCTTCAAGTAA
TRARZ02	>TRARZ02 TTCCATCATCGCGCGTCCTTTGCCCATCGATTTCCCCTACGACTCGAAACGTGCCCCGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAATTTTGCAATATGACCGTAATT TTTTTGGTGGGGCAATTTACCCCGCCACTTGAGCGAAGGGAGCGTTTGCCTCTTACCATTCTCACAACCTCAATGAGTGCGTCGTCACGTGTGAAGCAG TCACTAACCATTCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGCAAGGGCCCCCTTCAAGTAA
TRARZ03	>TRARZ03 TTCATCATCGCGCGTCCTTTGCCCATCGATTTCCCCTACGACTCGAAACGTGCCCCGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAATTTTGCAATATGACCGTAATT TTTTTGGTGGGGCAATTTACCCCGCCACTTGAGCGAAGGGAGCGTTTGCCTCTTACCATTCTCACAACCTCAATGAGTGCGTCGTCACGTGTGAAGCAG TCACTAACCATTCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGCAAGGGCCCCCTTCAAGTAA
TRARZ04	>TRARZ04 GATTTCTTGATGCCGTCTTCTGCCCATCGATCCATCACTCGAATCAGTCTCGACTGAATATGCACCTATTACCCCGCTCGAGTACAAAATTTTGCGATT CACTCGTATTTTTTTGGTGGGGCCCATGCCCCGCTACTCGAGCGACAGGCGCTTGCCCTTCCCACAACATCTTGTGCATCACGTGTCAATCAGTCAAT CAGTCACTAACCCTCGACAATAGGAAGCCGCGGAGCTCGGCAAGGGTTCCCTTCAAGTAACGACGATCTTGGTTTCGTGTGAAGAACCAGATTGAGGAGG CTGATGATGAGTTTTCGTAAAAGAATGGCCGAGGGCGATGTGAACACCGATAACGAGAATGACTTGTGCATAGCAAATACGGATTAAGTTAGGATATGTT

	<p>AAATGTTATGAGCGCCAACAAGAGTTTGGAGCTCTGCTGTTGACAACCCAATACGGTCGAAAGGATGGAGAGGCCAAAGATGAGATATCCGCGTTTTCTGC TTTTTACGGTTTTGAATTGATCAAGCCAGGCATAGAATCAATATAACTATTATGAATATGATGTTTCAGGACACCAACATATATCGGGGTACACAATATG AATGGGAGATATTCTTTTTCATAAAATGCCATTATGTTCTTCTCCTCAACTCATAAAGTAGATTTCATTCTGTCTAAGGTATATCAGATTCTTTCACAG TCTTGAATCGACAAAGGGAATGTACTTGGTAACTCCATCAATCCTTTCTGCGAATCCAAAGTCATCCAAAATAACCCTTATGGCGGATCACGGCTACT GCATATCTTAGGACTGCCACTTATCCGACTTGGTAGCCTTTGTAGCACAAAGTCTTGGAGGACGGTGTATGTGCGGTTGGGGTTCCTTCT CTGAGGTGACAGAGCCGTCCTTCTTCACTTTGATATACGTGTACTGAATATCTTGTCTGCCTTGAGTGAGATGGATCGCCTTCCAGACAGGGTTAGAA GAGGTGTAGTCAGAAGCGCTCAGGGCAACGACCTTGGAGGTGTCTTAGTTACCACGGGCGGGGATGTAGCCCACAATCTTAATAGTCTCGCCAATGTTA TGTGTACAGTGTCTACAACGTGACAGTCAACTTGGAGGTGCGTACAGCACACCAGGTAGCGCAGCTAGCTTGCCTGCATTGCCCTGTACGTAATGG AACCACCATTTCGATGTTCTGGTAAATGGCCTGGCTATACGGCATGTCTAGCTACA</p>
TRAPA01	<p>>TRAPA01 GGCTAGATGTATGCCGCATTCTACTCCCAGTCCATCAGTCGAAGCAGATTTCAGCACGATTGAATATGCGCCTGTGCCCCGCTCGAGTACAAAATGTTGC GGTTCAACCGAAATTTTTTTGGTGGGGTTTTCAACCCCGCTACTCAAGTGACAGGCGTTTTGCCCTTCTCCACAAAATCATGTCTTGCGCATCACGTGT CCATAAGTCACTAACCACCCGACAATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGCAAGGGTTCTTCAAGTAATGATGATGCGTTGAGATCTTGTGAATGTACACCGA AAGCAGTCTCTAGATCGACATGCCTGAAAACGAAGGAGATGAGAGAAGTAGGTTGCAAGAAAAGTGGCAAGGGTTCTTCAAGTAA</p>
TRAPA02	<p>>TRAPA02 GCTCTGATCGCACGCCCTCTACCCACCGATCCATCAGTCGAATCAGTTACGACGATTGAATATGCGCCTGTTTTCCGCTCGAGTACAAAATTTTGCGGT TCAACCGTATTTTTTTGGTGGGGTTTTCAACCCCGCTACTCGAGCGACAGACGTTTTGCCCTCTTCCACAAAATCATGTCTTGTGCATCACGTGTCCATC AGCCACTAATCACCCGACAATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGCAAGGGTTCTTCAAGTAA</p>
TRAPA03	<p>>TRAPA03 GCATTGTGATCGCACGCCCTCTGCCACCGATCCATCACTCGAATCAGTCTCGACTGAATATGCGCCTGTTACCCCGCTCGAGTACAAAATTTTGCGGT TCAACCGTAAATTTTTTTGGTGGGGTCCATACCCCGCTACTCGAGTGACAGGCGCTTGCCTCTTCCACAAAATTTTGTGCATCACGTGTACGCCAATCA GTCCTAACCCTCGACAATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGCAAGGGTTCTTCAAGTAA</p>
GSRZ01	<p>>GSRZ01 TTGGTAGCGGAGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATACGTTGCCCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCCGTAAAACGGG ACGGCCCCCGGAGGACCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACCTTCTGAGTAAAACAAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGG CATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCT GGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCCGGTTCCCCAAATCGATTGGCGGTACAGT CGAGCTTCCATAGCGTAGTAATCATAACCTCGTTACTGGTAATCGTTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTA GGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAACCAACCA</p>
GSRZ02	<p>>GSRZ02 GCTTCGCGACGCCGAATCTACCCCTCGATCCATCAGTCGAATCAGTCTTACGACGATTGAATATGCGCCTGTTACCCCGCTCGAGTACAAAATTTTGCGG TTCAACCGTAATTTTTTTGGTGGGGTTTTCAACCCCGCTACTCAAGTGACAGGCGTTTTGCCCTTCCACAAATGCGCATCACGTGTCAATCAGTCACTAA CCACCCGACAATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGCAAGGGTTGCTTCAAGTAAGCAGCTATGCTTGATGATGCGTTGAGATCTTGTGAATGTACACCGAAAG CAGTCTCTAGATCGACATGCCTGAAAACGAAGGAGATGAGAGAAGTAGGTTGCAAGAAAAGTGGCAAGGGTTCTTCAAGTAA</p>
GSRZ03	<p>> GSRZ03 GCTTCTCGATCGCACGACATCTACCCATCGATCCATCAGTCGAATCAGTCTTACGACGATTGAATATGCGCCTGTTACCCCGCTCGAGTACAAAATTTT CGCGTTCAACCGTAATTTTTTTGGTGGGGTTTTCAACCCCGCTACTCGAGTGACAGGCGTTTTGCCCTTCCACAAATGCGCATCACGTGTCAATCAGTCA</p>

	CTAACCACCCGACAATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGCAAGGGTTCCCTTCAAGTAAGCAGCTATGCTTGATGATGCGTTGAGATCTTGTGAATGTACACCG AAAGCAGTCTCTAGATCGACATGCCTGAAAACGAAGGAGATGAGAGAAGTAGGTTGCAAGAAAAGTGGCAAGGGTTCCCTTCAAGTAA
GSPA01	> GSPA01 ATTTTCATGGATCGCACGCCCTCTACCCACCGATCCATCAGTCGAATCAGTTTCACCACGATTGAATATGCGCCTGTTACCCCGCTCGAGTACAAAATT TTGCGGTTCAACCGTAATTTTTTTTTGGTGGGGTTTCAACCCCGCTACTCGAGTGACAGGCGTTTGCCCTCTTCCCACAAACTCATGTCTTGCGCATCAC GTGTCCATAAGTCACTAACCACCCGACAATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGCAAGGGTTCCCTTCAAGTAAGATGATGCGTTGAGATCTTGTGAATGTACAC CGAAAGCAGTCTCTAGATCGACATGCCTGAAAACGAAGGAGATGAGAGAAGTAGGTTGCAAGAAAAGTGGCAAGGGTTCCCTTCAAGTAA
GSPA02	> GSPA02 GCTTCTCGATCGCACGCCCTCTACCCACCGATCCATCAGTCGAATCAGTTTCACCACGATTGAATATGCGCCTGTTACCCCGCTCGAGTACAAAATTTT GCGGTTCAACCGTAATTTTTTTTTGGTGGGGTTTCAACCCCGCTACTCGAGTGACAGGCGTTTGCCCTCTTCCCACAAACTCATGTCTTGCGCATCACGT GTCCATAAGTCACTAACCACCCGACAATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGCAAGGGTTCCCTTCAAGTAATGATGATGCGTTGAGATCTTGTGAATGTACACC GAAAGCAGTCTCTAGATCGACATGCCTGAAAACGAAGGAGATGAGAGAAGTAGGTTGCAAGAAAAGTGGCAAGGGTTCCCTTCAAGTAA
GSPA03	> GSPA03 GCATTTTCGTGATCGCACGCCCTCTACCCACCGATCCATCAGTCGAATCAGTTTCACCACGATTGAATATGCGCCTGTTACCCCGCTCGAGTACAAAATT TTGCGGTTCAACCGTAATTTTTTTTTGGTGGGGTTTCAACCCCGCTACTCGAGTGACAGGCGTTTGCCCTCTTCCCACAAACTCATGTCTTGCGCATCAC GTGTCCATAAGTCACTAACCACCCGACAATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGCAAGGGTTCCCTTCAAGTAATGATGATGCGTTGAGATCTTGTGAATGTACA CCGAAAGCAGTCTCTAGATCGACATGCCTGAAAACGAAGGAGATGAGAGAAGTAGGTTGCAAGAAAAGTGGCAAGGGTTCCCTTCAAGTAA
BRARZ01	> BRARZ01 AAACTCGATCGCGCGTCCTTTGTTTCATCGATTTCCCCACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCCCGCTCGAGTCTTAATTTTTTGGCATATGACCGTAAT TTTTTTGGTGGGGGCATTTACCCCGCCACTCGAGCGATGGGCGCGTTTTTGCCCTCTCCTATTCCCACAGCCTCATTGAGCGCATCGTCACGTGTCAA GCAGTCACTAACCATTCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGCAAGGGTTCAATTCAGTAAAA
BRARZ02	> BRARZ02 ATCTCGATCGCGCGTCCTTTGTTTCATCGATTTCCCCACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCCCGCTCGAGTTAAAAATTTTGGCATATGACCGTAATTT TTTTTTGGTGGGGGCATTTACCCCGCCACTCGAGCGATGGGCGCGTTTTTGCCCTCTCCTATTCCCACAGCCTCATTGAGCGCATCGTCACGTGTCAAGC AGTCACTAACCATTCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGCAAGGGTCACTTCAAGTAAAA
BRAPA01	> BRAPA01 GATCGTGATCGCACGCCCTCTGCCACCGACCCATCACTCGAATCAGTCTCGACTGAATATGCGCCTGTTACCCCGCTCGAGTACAAAATTTTGGCGTT CAACCGTAATTTTTTTGGTGGGGTCCATAACCCCGCTACTCGAGTGACAGGCGCTTGCCCTCTTCCCACAAAATCTTGTGCATCACGTGTCAGCCAATCAG TCACTAACCCTCGACAATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGCAAGGGTCCCTTCAAGTAA
BRAPA02	> BRAPA02 GCTGTTCTGATCGCACGTCTCTGCCATCGATCCATCACCCGAATCAGTCTCGACGACTGAACATGCGCCTGTTACCCCGCTCGAGTACAAAATTTTG CGGTTCAATCGTAATTTTTTTGGTGGGGCTTATAACCCCGCTACTCGAGTGACAGGCGCTTGCCCTCTTCCCACAAAATCACTTGCATCACGTGTCAAT CAGTCACTAACCACCCGACAATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGCAAGGGTTCCCTTCAAGTAA
BRAPA03	> BRAPA03 GATGGACGATCGCACGCCCTCTGCCACCGACCCATCACTCGAATCAGTCTCGACTGAATATGCGCCTGTTACCCCGCTCGAGTACAAAATTTTGGCGT TCAACCGTAATTTTTTTGGTGGGGTCCATAACCCCGCTACTCGAGTGACAGGCGCTTGCCCTCTTCCCACAAAATCTTGTGCATCACGTGTCAGCCAATCA GTCATAACCCTCGACAATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGCAAGGGTCCCTTCAAGTAA

CMPA01	> CMPA01 TTCTCGATCGCGCTCCTTTGTACATCGATTTCCCTACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAATTTTGGCATATGACCGTAATT TTTTTGGTGGGGCATTACCCCGCCACTCGAGCGATGGGCGCGTTTTTGGCCTTTCTAGCCACAACCTCAATGAGCGCATCATCACGTGTCAAGCAGT CACTAACCATCTGACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGCAAGGGCCCTTCAAGTAAATA
CMPA02	> CMPA02 GCTCACTGTATGCTGCATTCTAATCTTGATCCATCTATCGAAGCAGATTGCGACGATTGAATATGCGCCTGAACCCCGCTCGAGTACAAAATGTTGCGG TTCAACCGAAAATTTTTTTGGTGGGGTTTTCAACCCCGCTACTCAATGGAAAGGCGTTTTGCCCTCTTCCCACAAAACCTCATGTCTTGCGCATCGAGAGTCC ATAAGTAACTAACCCCGCGAGAAAATGAATGCGCCGAGCTCTCTTAGGGTTCCCTCAAGTAATGATGATGCGTTGAGATCTTGTGAATGTACACCGAAA GCAGTCTCTAGATCGACATGCCTGAAAACGAAGGAGATGAGAGAAGTAGGTTGCAAGAAAAGTGGCAAGGGTTCCCTTCAAGTAA
SRLPA01	> SRLPA01 ACTTTTCTGATCGCACGCCCTCTGCCCATCGATCCATCACCCGAATCAGTCTCGACGACTGAACATGCGCCTGTTACCCCGCTCGAGTACAAAATTTTG CGGTTCAATCGTAATTTTTTTGGTGGGGCTTATACCCCGCTACTCGAGTGACAGGCGCTTGCCCTCTTCCCACAAAATCACTTGCGCATCACGTGTCAAT CAGTCACTAACCCTCGACAATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGCAAGGGTCCCTTCAAGTAA
SRLPA02	> SRLPA02 GCTGCTGATCGCACGCCCTCTACCCACCGATCCATCAGTCTGAATCAGTTACGACGATTGAATATGCGCCTGTTACCCCGCTCGAGTACAAAATTTTGGC GTTCAACCGTATTTTTTTGGTGGGGTTTTCAACCCCGCTACTCGAGCGACAGACGTTTTGCCCTCTTCCCACAAAACCTCATGTCTTGTGCATCACGTGTCCA TCAGCCACTAATCACCCGACAATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGCAAGGGTCCCTTCAAGTAA
P1PA01	> P1PA01 GCTTCTGATCGCACGCCCTCTGCCCATCGATCCATCACCCGAATCAGTCTCGACGACTGAACATGCGCCTGTTAACCCCGCTCGAGTACAAAATTTTGC GGTTCAATCGTAATTTTTTTGGTGGGGCTTATACCCCGCTACTCGAGTGACAGGCGCTTGCCCTCTTCCCACAAAATCACTTGCGCATCACGTGTCAATC AGTCACTAACCACCCGACAATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTAA
P1RZ01	> P1RZ01 ATTCTCATCACGCTCCTTTGCCCATCGATTTCCCTACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAATTTTGAATATGACCGTAATT TTTTTGGTGGGGCACTTACCCCGCCACTTGAGCGACGGGAGCGTTTTGCCCTCTTACCATTCTCACAACTCAATGAGTGCGTCGTACGTGTCAAGCAG TCACTAACCATTCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGCAAGGGCCCTTTTCAAGTAA
GXPA	> GXPA GATGCGTGATCGCACGCCCTCTGCCCACCGATCCATCACTCGAATCAGTCTCGACTGAATATGCGCCTGTTACCCCGCTCGAGTACAAAATTTTGGGGT TCAACCGTAATTTTTTTGGTGGGGTCCATACCCCGCTACTCGAGTGACAGGCGCTTGCCCTCTTCCCACAAAATCTTGTGCATCACGTGTGAGCCAATCA GTCATAACCCTCGACAATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTAA
GXRZ	> GXRZ TAGTCGCGGAGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTTATGTTGCCCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCGTAAAAAGGGAC GGCCCGCCGAGGAACCCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACTTCTGAGTATAAAAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC ATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTG GCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCAGCTTGGTGTGGGAGCTGCAGTCTGCTGCACTCCCAAAATACATTGGCGGTACAGT CGAGCTTCCATAGCGTAGTAATTTACACATCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAG GAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAACCCAACCA

MPRZ	> MPRZ ATCAGCATCGCGGTCCTTTGCCCATCGATTTCCCTACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCCCGCTCGAGCTTAAAATTTTGCAATATGACCGTAATTT TTTTGGTGGGGCACTTACCCCGCCACTTGAGCGAAGGGAGCGTTTGCCCTCTTACCATTCTCACAACTCAATGAGTGCGTCGTCACGTGTGAAGCAGT CACTAACCATTCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGCAAGGGTCCTTCAAGTAA
TVORZ	> TVORZ ATATCTCATCGCGGTCCTTTGCCCATCGATTTCCCTACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAATTTTGCAATATGACCGTAAT TTTTTTTGGTGGGGCACTTACCCCGCCACTTGAGCGACGGGAGCGTTTGCCCTCTTACCATTCTCACAACTCAATGAGTGCGTCGTCACGTGTCAAGC AGTCACTAACCATTCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGCAAGGGCTCATCAAGTAAAA
P2RZ	> P2RZ CTCATCGATCGCGGTCCTTTGCCACCGATTTCCCTTACGATTCGAAACGTGCCTGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAATTTTGCGATATGACCGTAAT TTTTTTTGGTGGGGCATTACCCCGCCACTCGAGTGATGGGCGCGTTTTGCCCTTTCTGTCCACAACCTCAATGAGCGCATTGTACGTGTCAAATAA CCATTCGACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGCAAGGGCCTATCAAGTAAAA
BNA	>BNA TACTCTCGATCGCGGTCCTTTGCCCATCGATTTCTCCATACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCCCGCTCGAGATCTAATATTTTGCGATATGACCGTAA TTTTTTTGGTGGGGCATTACCCCGCCACTCGAGCGGCGATGCGCGTTTTCTGCCCTCTCATTTCCACAACCTTCTGAGCGCATCGTCACGTGTTAAGCA GTCATAACCATTTCGACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGCAAGGGCCCTTTCAAGTAAAA

ANEXO II

Sequenciamento da região ITS de isolados de *Fusarium* spp. provenientes de ervas daninhas coletadas em campo próximas a bananeiras com sintomas de Fusariose

Isolado	Sequência FASTA
VR - 039 A	<pre>>CMAA1807A TGAGTCGCGGAGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATAACCACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAACGGGACG GCCCCGAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATATAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT CGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAATTGCGCCCAGTATTCTGGCGG GCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCCCAAATTGATTGGCGGTCACGTCGAGCT TCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCCTGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACC CGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAACCAACC</pre>
VR - 039 B	<pre>>CMAA1807B TGTAGTCGCGGAGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATAACCACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAACGGGA CGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATATAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC ATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCAGTATTCTGG CGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCCCAAATTGATTGGCGGTCACGTCGA GCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCCTGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT ACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAACCAACCA</pre>
TRARZ01	<pre>> TRARZ01 TTAGTAGCGGAGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATAACCTATAACGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAACGGGAC GGCCCGCCGAGGACCCCTAAACTCTGTTTTAGTGGAACTTCTGAGTAAAACAAACAAATAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT CGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCAGTATTCTGGCG GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCGCGTTCCCCAAATCGATTGGCGGTCACGTCGAGC TTCCATAGCGTAGTAATCATAACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA CCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAACCAACCA</pre>

<p>TRARZ02</p>	<p>>TRARZ02 TGGTGTGCGGGAGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATAACCACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAACGGGA CGCCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC ATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGG CGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCTCAAATTGATTGGCGGTACGTCGA GCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAAACAACCA</p>
<p>TRARZ03</p>	<p>>TRARZ03 CATCGTAGCGGAGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATAACCACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAACGGGAC GGCCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA TCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGC GGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCTCAAATTGATTGGCGGTACGTCGAG CTTCATAGCGTAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAAACAACCA</p>
<p>TRARZ04</p>	<p>>TRARZ04 CGGAGTCGCGGAGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATAACCTATAACGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAACGGGA CGCCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACCTCTGAGTAAAACAAAATAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC ATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGG CGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCCGCTTCCCCAAATCGATTGGCGGTACGTCGAG GCTTCCATAGCGTAGTAATCATAACACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAA TACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAAACAACCA</p>
<p>TRAPA01</p>	<p>>TRAPA01 TGAGTCGCGGAGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATAACCTATAACGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAACGGGAC GGCCCCGCCAGGACCCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACCTCTGAGTAAAACAAAATAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT CGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCG GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCCGCTTCCCCAAATCGATTGGCGGTACGTCGAGC TTCCATAGCGTAGTAATCATAACACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAAACAACCA</p>
<p>TRAPA02</p>	<p>>TRAPA02 CTGCGTCGCGGAGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATAACCTATAACGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAACGGGA CGCCCCGCCAGGACCCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACCTCTGAGTAAAACAAAATAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC ATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGG CGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCCGCTTCCCCAAATCGATTGGCGGTACGTCGA GCTTCCATAGCGTAGTAATCATAACACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAA TACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAAACAACCA</p>

TRAPA03	<p>>TRAPA03 TGTTGTCGCGGAGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATAACGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCTGTAAAAAGGGAC GGCCCGCCCGAGGACCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACCTTCTGAGTAAAAACAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT CGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCG GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCGCGTTCCCCAAATCGATTGGCGGTACGTCGAGC TTCCATAGCGTAGTAATCATAACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA CCCCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAACCAACCAATA</p>
GSRZ01	<p>>GSRZ01 TTGGTAGCGGAGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATAACGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCGTAAAAACGGGA CGCCCGCCCGAGGACCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACCTTCTGAGTAAAAACAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA TCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGC GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCGCGTTCCCCAAATCGATTGGCGGTACGTCGAG CTTCCATAGCGTAGTAATCATAACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAACCAACCA</p>
GSRZ02	<p>>GSRZ02 TTGGTTCGCGGAGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATAACGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCGTAAAAACGGGAC GGCCCGCCCGAGGACCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACCTTCTGAGTAAAAACAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT CGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCG GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCGCGTTCCCCAAATCGATTGGCGGTACGTCGAGC TTCCATAGCGTAGTAATCATAACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA CCCCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAACCAACCA</p>
GSRZ03	<p>> GSRZ03 TGTGGTAGCGGAGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATAACGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCGTAAAAACGGG ACGGCCCGCCCGAGGACCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACCTTCTGAGTAAAAACAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC ATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGG CGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCGCGTTCCCCAAATCGATTGGCGGTACGTCGA GCTTCCATAGCGTAGTAATCATAACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAA TACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAACCAACCA</p>
GSPA01	<p>> GSPA01 CTTGTTCGCGGAGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATAACGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCGTAAAAACGGGAC GGCCCGCCCGAGGACCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACCTTCTGAGTAAAAACAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT CGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCG GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCGCGTTCCCCAAATCGATTGGCGGTACGTCGAGC TTCCATAGCGTAGTAATCATAACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA CCCCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAACCAACCA</p>

GSPA02	<p>> GSPA02 TTTCGTCGCGGAGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATAACGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCCGTAAAACGGG ACGGCCCGCCGAGGACCCTAAACTCTGTTTTAGTGGAACCTTCTGAGTAAAAACAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC ATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGG CGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCGCGTTCCCCAAATCGATTGGCGGTACAGTCGA GCTTCCATAGCGTAGTAATCATAACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAA TACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAAACCAACC</p>
GSPA03	<p>> GSPA03 TGAGTCGCGGAGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATAACGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCCGTAAAACGGGA CGGCCCCCGCCGAGGACCCTAAACTCTGTTTTAGTGGAACCTTCTGAGTAAAAACAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA TCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGC GGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCGCGTTCCCCAAATCGATTGGCGGTACAGTCGAG CTTCCATAGCGTAGTAATCATAACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAAACCAACCA</p>
BRARZ01	<p>> BRARZ01 TAGTAGCGGAGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCAATTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGG CCCGCCAGAGGACCCTAAACTCTGTTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAAACCAATAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC GATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGG GCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCGAGCCCTCGCGGCAAGCCGGCCCCGAAATATAGTGGCGG TCTCGCTGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGTAAAACCCCTCGCAACTGGTACGCGGCGCGGCCAAGCCGTTAAACACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGAT CAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAAACCAACC</p>
BRARZ02	<p>> BRARZ02 TTTAGTCGCGGAGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCAATTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGA CGGCCCCCGCCAGAGGACCCTAAACTCTGTTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAAACCAATAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC ATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGG CGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCTCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCGAGCCTCACGGCAAGCCGGCCCCGAAATATAGTGGC GGTCTCGCTGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGTAAAACCCCTCGCAACTGGTACGCGGCGCGGCCAAGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGG ATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAAACCAACCA</p>
BRAPA01	<p>> BRAPA01 TTGGTAGCGGAGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATAACGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCTGTAAAAGGGAC GGCCCGCCGAGGACCCTAAACTCTGTTTTAGTGGAACCTTCTGAGTAAAAACAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT CGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCG GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCGCGTTCCCCAAATCGATTGGCGGTACAGTCGAGC TTCCATAGCGTAGTAATCATAACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAAACCAACCA</p>

BRAPA02	<p>> BRAPA02 TTGTAAGCGGAGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATACGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCAGCCCTGTAAAAAGGGA CGCCCCCGCCGAGGACCCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACCTCTGAGTAAAAACAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA TCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGC GGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCGCGTTCCCCAAATCGATTGGCGGTACAGTCGAG CTTCCATAGCGTAGTAATCATAACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAACCCAACCA</p>
BRAPA03	<p>> BRAPA03 TAGTCGCGGAGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATACGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCAGCCCTGTAAAAACGGGAC GGCCCGCCGAGGACCCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACCTCTGAGTAAAAACAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT CGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCG GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCGCGTTCCCCAAATCGATTGGCGGTACAGTCGAGC TTCCATAGCGTAGTAATCATAACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAACCCAACCA</p>
CMPA01	<p>> CMPA01 TGGCGTCGCGGAGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCAACTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCAGCTCCCGGTAAAAACGGGAC GGCCCGCCAGAGGACCCCAAACTCTGTTTCCATGTGTAACATCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA TCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGC GGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGAGTCAAATCGCGTTCCCCAAATTGATTGGCGGTACAGTCG AGCTTCCATAGCGTAGTAGCAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAA TACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAACCCAACCA</p>
CMPA02	<p>> CMPA02 TGAGTCGCGGAGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATACGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCAGCCCGTAAAAACGGGA CGCCCCCGCCGAGGACCCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACCTCTGAGTAAAAACAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA TCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGC GGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCGCGTTCCCCAAATCGATTGGCGGTACAGTCGAG CTTCCATAGCGTAGTAATCATAACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAACCCAACCA</p>
SRLPA01	<p>> SRLPA01 TGCGTCGCGGAGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATACGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCAGCCCGTAAAAAGGGA CGCCCCCGCCGAGGACCCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACCTCTGAGTAAAAACAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC ATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGG CGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCGCGTTCCCCAAATCGATTGGCGGTACAGTCGA GCTTCCATAGCGTAGTAATCATAACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAA TACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAACCCAACCA</p>

SRLPA02	<p>> SRLPA02 TTCGTCGCGGAGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATACGTTGCCTCGGCGGATCAGCCC CGCCCCGTAAAACGGGA CGCCCCCGCCGAGGACCCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACCTCTGAGTAAAACAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA TCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCAGTATTCTGGC GGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCGCGTTCCCCAAATCGATTGGCGGTACGTCGAG CTTCCATAGCGTAGTAATCATAACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAACCAACCA</p>
P1PA01	<p>> P1PA01 TTCGTCGCGGAGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATACGTTGCCTCGGCGGATCAGCCC CGCCCCGTAAAACGGGA CGCCCCCGCCGAGGACCCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACCTCTGAGTAAAACAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA TCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCAGTATTCTGGC GGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCGCGTTCCCCAAATCGATTGGCGGTACGTCGAG CTTCCATAGCGTAGTAATCATAACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAACCAACCA</p>
P1RZ01	<p>> P1RZ01 GAGTCGCGGAGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCACTTGTGCTCGGCGGATCAGCCC GCTCCCGGTAAAACGGGACGG CCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAAACCATAAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC GATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCAGTATTCTGGC GCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCCCAAATTGATTGGCGGTACGTCGAGCT TCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACC CGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAACCAACCA</p>
GXPA	<p>> GXPA TGGGTCGCGGAGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATACGTTGCCTCGGCGGATCAGCCC CGCCCCGTAAAAAGGGA CGCCCCCGCCGAGGACCCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACCTCTGAGTAAAACAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC ATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCAGTATTCTGG CGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCGCGTTCCCCAAATCGATTGGCGGTACGTCGA GCTTCCATAGCGTAGTAATCATAACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAA TACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAACCAACCA</p>
GXRZ	<p>> GXRZ TAGTCGCGGAGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTTATGTTGCCTCGGCGGATCAGCCC CGCCCCGTAAAAAGGGACG GCCCCCGCAGGAACCCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACCTCTGAGTAAAACAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT CGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCAGTATTCTGGCG GGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCAGCTTGGTGTGGGAGCTGCAGTCTGCTGCACTCCCCAAATACATTGGCGGTACGTCGAG CTTCCATAGCGTAGTAATTTACACATCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAACCAACCA</p>

MPRZ	<p>> MPRZ TTGGTCGCGGAGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATAACCACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGAC GGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA TCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGC GGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCTCAAATTGATTGGCGGTACGTCGAG CTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA CCCCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAAACAACCA</p>
TVORZ	<p>> TVORZ TGTCGCGGAGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATAACCACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCC TCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAA ACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGT TAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCTCAAATTGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTA AAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT ATAAGCGGAGGAAAAAAAAAACAACCA</p>
P2RZ	<p>> P2RZ TGCGTCGCGGAGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATAACCAATTGTTCCTCGGCGGACAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACG GCCCCGAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT CGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCG GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCCCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCGAGCCCTTGCGGCAAGCCGGCCCCGAAATCTAGTGGCG GTCTCGCTGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGTAAAACCCCTCGCAACTGGTACGCGGCGCGGCCAAGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGA TCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAAACAACCA</p>
BNA	<p>>BNA TAGTCGCGGAGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATAACCAATTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACG GCCCCGAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT CGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCG GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGAGTCAAATCGCGTTCCTCAAATTGATTGGCGGTACGTCGA GCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAAAAACAACCA</p>

ANEXO III

Sequenciamento do gene que codifica para TEF1- α de isolados de *Fusarium* spp. associados a adultos da espécie *Cosmopolites sordidus* coletados em áreas de bananeiras de parcelas de plantas com sintomas de Fusariose ou sadias

Código	Sequência FASTA
DF+1	>DF+1 AGTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAGTCACGGTGACCGGGAGCGTCTGAGTGACATGTTAGTACTAGGAAATAGAGTGAGGCATGAGCGACAACATACCA ATGACGGTGACATAGTAGCGGGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGGCG TACTTGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCCTATTGTCAGATGGTTAGTGACTGCTTGACACGTGATGATGCGCTCATTGAAGTTGTGGCTAGGAAA GGGCAAAAACGCGCCCATCGCTCGAGTGGCGGGGTAAATGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCATATCGAAAATTTTTGGTCTCGAGCGGGGTAGCGGGCAC GTTTCGAGTTCGTAGGGGAAATCGATGTACAAAGGACGCGCGATCGAAGGGAAAGTGACTAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGCTTGTTCGATACCACCG CACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGTAGCCATGTCAGCATCTTGTTCGAAAGGAATACCCCGCCAGGTCTTGGTGAGGGTTTTCGATGGCAGATAAGCT CATCATCGAGGGTAGTACTCACAGTGGTTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAG
DF+2	>DF+2 AGTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAATCACGGTGACCGGGAGCGTCTGAGTGATATGTTAGTACGAAGAGAAGTAGAATGAAGCATGAGCGACAACATAC CAATGACGGTGACATAGTAGCGAGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGG CGTACTTGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCCTATTGTTGAATGGTTAGTGACTGCTTACACGTGACGACGCACTCATTGAGGTTGTGAGAATGG TAAGAGGGCAAACGCTCCCTTCGCTCAAGTGGCGGGGTAAGTGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCATATTGCAAAAATTTTTGGTCTCGAGCGGGGTAGCGGG CACGTTTTCGAGTCGTAGGGGAAATCGATGGGCAAAGGACGCGCGATTGAAGGGAAAGTGACTAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGCTTGTTCGATACCA CCGCACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGAAACGATGTCAGTATGTTGACTTTGAGAAATACCCCGCCAGGTCTTGGTCGGGATTGACGATGGCAGATAT GCTCATTGTTCGAGGAGTACTCACAGTGGTTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAG
DF+5a	>DF+5a AGTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAATCACGGTGACCGGGAGCGTCTGAGTGATATGTTAGTACGAAGAGAAGTAGAATGAAGCATGAGCGACAACATAC CAATGACGGTGACATAGTAGCGAGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGG CGTACTTGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCCTATTGTTGAATGGTTAGTGACTGCTTGACACGTGACGACGCACTCATTGAGGTTGTGAGAATGG TAAGAGGGCAAACGCTCCCGTTCGCTCAAGTGGCGGGGTAAGTGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCATATTGCAAAAATTTTTGGTCTCGAGCGGGGTAGCGG GCACGTTTTCGAGTCGTAGGGGAAATCGATGGGCAAAGGACGCGCGATTGAAGGGAAAGTGACTAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGCTTGTTCGATACC ACCGCACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGAAACGATGTCAGTATGTTGACTTTGAGAAATACCCCGCCAGGTCTTGGTCGGGATTGACGATGGCAGATA TGCTCATTGTTCGAGGAGAGTACTCACAGTGGTTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAG
DF+5b	>DF+5b AGTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAATCACGGTGACCGGGAGCGTCTGAGTGATATGTTAGTACGAAGAGAAGTAGAATGAAGCATGAGCGACAACATAC CAATGACGGTGACATAGTAGCGAGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGG CGTACTTGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCCTATTGTTGAATGGTTAGTGACTGCTTGACACGTGACGACGCACTCATTGAGGTTGTGAGAATGG

	<p>TAAGAGGGCAAACGCTCCCGTCGCTCAAGTGGCGGGGTAAGTGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCATATTGCAAAATTTTTGGTCTCGAGCGGGGTAGCGG GCACGTTTTCGAGTCGTAGGGGAAATCGATGGGCAAAGGACGCGCGATTGAAGGGAAAGTGACTAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGCTTGTTCGATACC ACCGCACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGAAACGATGTCAGTATGTTGACTTTGAGAAATACCCCGCCAGGTCTTGGTCTGGGATTGACGATGGCAGATA TGCTCATTGTTCGAGGAGAGTACTCACAGTGGTTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAG</p>
DF+5c	<p>>DF+5c AGTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAATCACGGTGGCCGGGGGCGTCTGTTGATTGTTAGTGGTGAGACATGTGTGAGAGGTGACAGCAACATAACCAATGA CGGTGACATAGTAGCGGGGAGTCTCGAACTTCCAGAGGGCAATGTCGATGGTGTATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGGACCCAGGCGTACT TGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCCTATTGTTGGACCGGTTAGCGTCTGTTGTGAACCACGTGATGATGCGCGCCAAGAGGGTTTTGGTGTTTTTG TGTGCAGGGATCAGGGCTTTGTCCAACGTCGCCCCGAGTGGCGGGGTAATGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCGGACCGCAAAAAATTTTGGAACTCGGGAGA AGCGGGCGCAGAGCGTATCGCGAGGGAGGGATTTCGATGTGGAATAGCAAGGCGCGATCGGGGGAGATGTCACCAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGC TTGTTCGATACCACCGCACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTAGATGATTGTCAGCATGAAGTGAATGATGAATACCCCGCCGAGATGCCAGGCGGGGTTT CACGACCCGAGATAAGTAGATCGCGATGAGGGTTTTGACTTACGGTGGTTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTGAG</p>
DF+6	<p>>DF+6 AGTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAATCACGGTGGCCGGGAGCGTCTGAGTGATATGTTAGTACGAAGAGAAGTAGAATGAAGCATGAGCGACAACATAC CAATGACGGTGACATAGTAGCGAGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGTATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGG CGTACTTGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCCTATTGTTGAATGGTTAGTGACTGCTTACACGTCGACGACGCACTCATTGAGGTTGTGAGAATGG TAAGAGGGCAAACGCTCCCTTTCGCTCAAGTGGCGGGGTAAGTGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCATATTGCAAAATTTTTGGTCTCGAGCGGGGTAGCGG CACGTTTTCGAGTCGTAGGGGAAATCGATGGGCAAAGGACGCGCGATTGAAGGGAAAGTGACTAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGCTTGTTCGATACCA CCGCACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGAAACGATGTCAGTATGTTGACTTTGAGAAATACCCCGCCAGGTCTTGGTCTGGGATTGACGATGGCAGATAT GCTCATTGTTCGAGGAGTACTCACAGTGGTTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAG</p>
DF+8a	<p>>DF+8a AGTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAATCACGGTGGCCGGGAGCGTCTGAGTGATATGTTAGTACGAAGAGAAGTAGAATGAAGCATGAGCGACAACATAC CAATGACGGTGACATAGTAGCGAGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGTATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGG CGTACTTGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCCTATTGTTGAATGGTTAGTGACTGCTTGACACGTGACGACGCACTCATTGAGGTTGTGAGAATGG TAAGAGGGCAAACGCTCCCGTCGCTCAAGTGGCGGGGTAAGTGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCATATTGCAAAATTTTTGGTCTCGAGCGGGGTAGCGG GCACGTTTTCGAGTCGTAGGGGAAATCGATGGGCAAAGGACGCGCGATTGAAGGGAAAGTGACTAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGCTTGTTCGATACC ACCGCACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGAAACGATGTCAGTATGTTGACTTTGAGAAATACCCCGCCAGGTCTTGGTCTGGGATTGACGATGGCAGATA TGCTCATTGTTCGAGGAGAGTACTCACAGTGGTTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAG</p>
DF+8b	<p>>DF+8b AGTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAATCACGGTGGCCGGGAGCGTCTGAGTGATATGTTAGTACGAAGAGAAGTAGAATGAAGCATGAGCGACAACATAC CAATGACGGTGACATAGTAGCGAGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGTATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGG CGTACTTGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCCTATTGTTGAATGGTTAGTGACTGCTTGACACGTGACGACGCACTCATTGAGGTTGTGAGAATGG TAAGAGGGCAAACGCTCCCGTCGCTCAAGTGGCGGGGTAAGTGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCATATTGCAAAATTTTTGGTCTCGAGCGGGGTAGCGG GCACGTTTTCGAGTCGTAGGGGAAATCGATGGGCAAAGGACGCGCGATTGAAGGGAAAGTGACTAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGCTTGTTCGATACC ACCGCACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGAAACGATGTCAGTATGTTGACTTTGAGAAATACCCCGCCAGGTCTTGGTCTGGGATTGACGATGGCAGATA TGCTCATTGTTCGAGGAGAGTACTCACAGTGGTTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAG</p>

<p>DF-2</p>	<p>>DF-2 GTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAGTCACGATGACCGGGAGCGTCTGAGTGATATGTTAGTACGAATAAAGGGAGAACGAGGCATGAGCGACAACATACC AATGACGGTGACATAGTAGCGAGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGGC GTACTTGAAGGAACCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCCTATTGTCGAGTGGTTAGTGACTGCTTGACACGTGACGATGCGCTCAGAAGGTTGTGAAAATGGAG GGCAGAAACGCGCATCGCTCGAGTGGCGGGGTAAATGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCATATCGCAAAATTTTTGGTCTCGAGCGGGGTAGCGGGCACGTT TCTAGTCGTATGGAGAATCGATGGGCAGAGGACGCGCGATTGAAGGGAAAGTAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTTCGCTTGTTCGATAACCACCGCAC TGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGGAGCGATGTCAGCATGTTATCTTGGTGATACCCCGCCAGATCTCGGTGGGATAACGATGGCAGATAAGCTCATCGT AGAGGGTAGTACTCACAGTGGTTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAG</p>
<p>DF-4a</p>	<p>>DF-4a AGTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAGTCACGGTGGCCGGGGGCGTCTGTTGATTGTTAGTGGTGAGACATGTGTGAGAGGTGACAGCAACATACCAATGA CGGTGACATAGTAGCGGGGAGTCTCGAACTTCCAGAGGGCAATGTTCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGGACCCAGGCGTACT TGAAGGAACCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCCTATTGTTGGACCGGTTAGCGTCTGTTGTGAACCACGTGATGATGCGCGCCAAGAGGGTTTTGGTGTTTTTG TGTGCAGGGATCAGGGCTTTGTCCAACGTCGCCCCGAGTGGCGGGGTAAATGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCGGACCGCAAAAATTTTTGGAACCTCGGGAGA AGCGGGCGCAGAGCGTATCGCGAGGGAGGGGATTTCGATGTGGAATAGCAAGGCGCGATCGGGGGAGATGTCACCAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTTCGC TTGTTCGATAACCACCGCACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTAGATGATTGTCAGCATGAAGTGAATGATGAATACCCCGCCGAGATGCCAGGCGGGGTTTC CACGACCCGAGATAAGTAGATCGCGATGAGGGTTTTGACTTACGGTGGTTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTGAG</p>
<p>DF-7a</p>	<p>>DF-7a AGTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAGTCACGGTGACCGGGAGCGTCTGAGTGACATGTTAGTACTAGGAAATAGAGTGAGGCATGAGCGACAACATACCA ATGACGGTGACATAGTAGCGGGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGGCG TACTTGAAGGAACCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCCTATTGTCAGATGGTTAGTGACTGCTTGACACGTGATGATGCGCTCATTGAAGTTGTGGCTAGGAAA GGGCAAAAACGCGCCCATCGCTCGAGTGGCGGGGTAAATGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCATATCGCAAAATTTTTGGTCTCGAGCGGGGTAGCGGGCAC GTTTTCGAGTCGTAGGGGAAATCGATGTACAAAGGACGCGCGATCGAAGGGAAAGTACTAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTTCGCTTGTTCGATAACCACCG CACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGTAGCCATGTCAGCATCTTGTTCGAGAGGAATACCCCGCCAGGTCTTGGTGAGGGTTTTCGATGGCAGATAAGCT CATCATCGAGGGTAGTACTCACAGTGGTTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAG</p>
<p>DF-8</p>	<p>>DF-8 AGTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAGTCACGGTGGCCGGGGGCGTCTGTTGATTGTTAGTGGTGAGACATGTGTGAGAGGTGACAGCAACATACCAATGA CGGTGACATAGTAGCGGGGAGTCTCGAACTTCCAGAGGGCAATGTTCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGGACCCAGGCGTACT TGAAGGAACCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCCTATTGTTGGACCGGTTAGCGTCTGTTGTGAACCACGTGATGATGCGCGCCAAGAGGGTTTTGGTGTTTTTG TGTGCAGGGATCAGGGCTTTGTCCAACGTCGCCCCGAGTGGCGGGGTAAATGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCGGACCGCAAAAATTTTTGGAACCTCGGGAGA AGCGGGCGCAGAGCGTATCGCGAGGGAGGGGATTTCGATGTGGAATAGCAAGGCGCGATCGGGGGAGATGTCACCAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTTCGC TTGTTCGATAACCACCGCACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTAGATGATTGTCAGCATGAAGTGAATGATGAATACCCCGCCGAGATGCCAGGCGGGGTTTC CACGACCCGAGATAAGTAGATCGCGATGAGGGTTTTGACTTACGGTGGTTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTGAG</p>
<p>DF-9a</p>	<p>>DF-9a AGTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAGTCACGGTGGCCGGGGGAGCGTCTGAGTGACATGTTAGTACTAGGAAATAGAGTGAGGCATGAGCGACAACATACCA ATGACGGTGACATAGTAGCGGGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGGCG TACTTGAAGGAACCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCCTATTGTCAGATGGTTAGTGACTGCTTGACACGTGATGATGCGCTCATTGAAGTTGTGGCTAGGAAA GGGCAAAAACGCGCCCATCGCTCGAGTGGCGGGGTAAATGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCATATCGCAAAATTTTTGGTCTCGAGCGGGGTAGCGGGCAC</p>

	GTTTCGAGTCGTAGGGGAAATCGATGTACAAAGGACGCGCGATCGAAGGGAAAGTGACTAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGCTTGTTCGATACCACCG CACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGTAGCCATGTCAGCATCTTGTTTTCAAGAGGAATACCCCGCCAGGTCTTGGTGAGGGTTTTCGATGGCAGATAAGCT CATCATCGAGGGTAGTACTCACAGTGGTTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAG
DF-9b	>DF-9b AGTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAGTCACGGTGACCGGGAGCGTCTGAGTGACATGTTAGTACTAGGAAATAGAGTGAGGCATGAGCGACAACATACCA ATGACGGTGACATAGTAGCGGGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGGCG TACTTGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCCTATTGTTCAGATGGTTAGTGACTGCTTGACACGTGATGATGCGCTCATTGAAGTTGTGGCTAGGAAA GGGCAAAAACGCGCCCATCGCTCGAGTGGCGGGGTAAATGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCATATCGAAAATTTTTGGTCTCGAGCGGGGTAGCGGGCAC GTTTCGAGTCGTAGGGGAAATCGATGTACAAAGGACGCGCGATCGAAGGGAAAGTGACTAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGCTTGTTCGATACCACCG CACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGTAGCCATGTCAGCATCTTGTTTTCAAGAGGAATACCCCGCCAGGTCTTGGTGAGGGTTTTCGATGGCAGATAAGCT CATCATCGAGGGTAGTACTCACAGTGGTTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAG
KF+1b	>KF+1b AGTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAGTCACGGTGGCCGGGGCGTCTGTTGATTGTTAGTGGTGAGACATGTGTGAGAGGTGACAGCAACATAACCAATGA CGGTGACATAGTAGCGGGGAGTCTCGAACTTCCAGAGGGCAATGTTCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGGACCCAGGCGTACT TGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCCTATTGTTGGACCGGTTAGCGTCTGTTGTGAACCACGTGATGATGCGCGCAAGAGGGTTTTGGTGTTTTTG TGTGCAGGGATCAGGGCTTTGTCCAACGTGCGCCGAGTGGCGGGGTAAATGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCGGACCGCAAAAATTTTGGAACTCGGGAGA AGCGGGCGCAGAGCGTATCGCGAGGGAGGGGATTTCGATGTGGAATAGCAAGGCGCGATCGGGGGAGATGTCACCAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGC TTGTTCGATACCACCGCACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTAGATGATTGTTCAGCATGAAGTGAATGATGAATACCCCGCCGAGATGCCAGGCGGGGTTT CACGACCCGAGATAAGTAGATCGCGATGAGGGTTTTGACTTACGGTGGTTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTGAG
KF+2a	>KF+2a AGTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAGTCACGGTGGCCGGGGAGCGTCTGAGTGACATGTTAGTACTAGGAAATAGAGTGAGGCATGAGCGACAACATACCA ATGACGGTGACATAGTAGCGGGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGGCG TACTTGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCCTATTGTTCAGATGGTTAGTGACTGCTTGACACGTGATGATGCGCTCATTGAAGTTGTGGCTAGGAAA GGGCAAAAACGCGCCCATCGCTCGAGTGGCGGGGTAAATGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCATATCGAAAATTTTTGGTCTCGAGCGGGGTAGCGGGCAC GTTTCGAGTCGTAGGGGAAATCGATGTACAAAGGACGCGCGATCGAAGGGAAAGTGACTAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGCTTGTTCGATACCACCG CACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGTAGCCATGTCAGCATCTTGTTTTCAAGAGGAATACCCCGCCAGGTCTTGGTGAGGGTTTTCGATGGCAGATAAGCT CATCATCGAGGGTAGTACTCACAGTGGTTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAG
KF+3b	>KF+3b AGTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAGTCACGGTGGCCGGGGAGCGTCTGAGTGACATGTTAGTACTAGGAAATAGAGTGAGGCATGAGCGACAACATACCA ATGACGGTGACATAGTAGCGGGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGGCG TACTTGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCCTATTGTTCAGATGGTTAGTGACTGCTTGACACGTGATGATGCGCTCATTGAAGTTGTGGCTAGGAAA GGGCAAAAACGCGCCCATCGCTCGAGTGGCGGGGTAAATGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCATATCGAAAATTTTTGGTCTCGAGCGGGGTAGCGGGCAC GTTTCGAGTCGTAGGGGAAATCGATGTACAAAGGACGCGCGATCGAAGGGAAAGTGACTAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGCTTGTTCGATACCACCG CACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGTAGCCATGTCAGCATCTTGTTTTCAAGAGGAATACCCCGCCAGGTCTTGGTGAGGGTTTTCGATGGCAGATAAGCT CATCATCGAGGGTAGTACTCACAGTGGTTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAG
KF+3	>KF+3 AGTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAGTCACGGTGGCCGGGGAGCGTCTGAGTGACATGTTAGTACTAGGAAATAGAGTGAGGCATGAGCGACAACATACCA

	<p>ATGACGGTGACATAGTAGCGGGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGGCG TACTTGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCATTGTCAGATGGTTAGTGACTGCTTGACACGTGATGATGCGCTCATTGAAGTTGTGGCTAGGAAA GGGCAAAAACGCGCCCATCGCTCGAGTGGCGGGGTAAATGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCATATCGCAAATTTTTGGTCTCGAGCGGGGTAGCGGGCAC GTTTTCGAGTCGTAGGGGAAATCGATGTACAAAGGACGCGCGATCGAAGGGAAAGTGACTAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGCTTGTTCGATACCACCG CACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGTAGCCATGTCAGCATCTTGTTCGAAAGGAATAACCCGCCAGGTCTTGGTGAGGGTTTTCGATGGCAGATAAGCT CATCATCGAGGGTAGTACTCACAGTGGTTCGACTTCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAG</p>
<p>KF+4</p>	<p>>KF+4 GTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAGTCACGATGACCGGGAGCGTCTGAGTGATATGTTAGTACGAATAAAGGGAGAACGAGGCATGAGCGACAACATAACC AATGACGGTGACATAGTAGCGAGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGGC GTACTTGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCATTGTCAGATGGTTAGTGACTGCTTGACACGTGACGATGCGCTCAGAAGGTTGTGAAAATGGAG GGCAGAAACGCGCATCGCTCGAGTGGCGGGGTAAATGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCATATCGCAAATTTTTGGTCTCGAGCGGGGTAGCGGGCACGTT TCTAGTCGTATGGAGAATCGATGGGCAGAGGACGCGCGATTGAAGGGAAAGTAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGCTTGTTCGATACCACCGCAC TGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGGAGCGATGTCAGCATGTTATCTTGGTGATAACCCGCCAGATCTCGGTGGGATAACGATGGCAGATAAGCTCATCGT AGAGGGTAGTACTCACAGTGGTTCGACTTCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAG</p>
<p>KF+7</p>	<p>>KF+7 GTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAATCACGGTGACCGGGAGCGTCTGAGTGATATGTTAGTACGAAGAGAAGTAGAATGAAGCATGAGCGACAACATAACC AATGACGGTGACATAGTAGCGAGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGGC GTACTTGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCATTGTTGAATGGTTAGTGACTGCTTCACACGTGACGACGACTCATTGAGGTTGTGAGAATGGT AAGAGGGCAAACGCTCCCTTCGCTCAAGTGGCGGGGTAAATGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCATATTGCAAATTTTTGGTCTCGAGCGGGGTAGCGGGC ACGTTTTCGAGTCGTAGGGGAAATCGATGGGCAAAGGACGCGCGATTGAAGGGAAAGTGACTAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGCTTGTTCGATACCAC CGCACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGAAACGATGTCAGTATGTTGACTTTGAGAAATACCCCGCCAGGTCTTGGTCGGGATTGACGATGGCAGATATG CTCATTGTTCGAGGAGAGTACTCACAGTGGTTCGACTTCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAG</p>
<p>KF+8a</p>	<p>>KF+8a AGTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAGTCACGGTGGCCGGGGGCGTCTGTTGATTGTTAGTGGTGAGACATGTGTGAGAGGTGACAGCAACATAACCAATGA CGGTGACATAGTAGCGGGGAGTCTCGAACTTCCAGAGGGCAATGTCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGGACCCAGGCGTACT TGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCATTGTTGGACCGGTTAGCGTCTGTTGTGAACCACGTGATGATGCGCGCCAAGAGGGTTTTGGTGTTTTTG TGTGCAGGGATCAGGGCTTTGTCCAACGTCGCCCAGTGGCGGGGTAAATGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCGGACCGCAAAAATTTTGGAACTCGGGAGA AGCGGGCGCAGAGCGTATCGCGAGGGAGGGATTGATGTGGAATAGCAAGGCGCGATCGGGGAGATGTCACCAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGC TTGTTCGATACCACCGCACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTAGATGATTGTCAGCATGAAGTGAATGATGAATACCCCGCCGAGATGCCAGGCGGGGTTT CACGACCCGAGATAAGTAGATCGCGATGAGGGTTTTGACTTACGGTGGTTCGACTTCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTGAG</p>
<p>KF+8b</p>	<p>>KF+8b AGTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAGTCACGGTGGCCGGGGGCGTCTGAGTGACATGTTAGTACTAGGAAATAGAGTGAGGCATGAGCGACAACATAACCA ATGACGGTGACATAGTAGCGGGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGGCG TACTTGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCATTGTCAGATGGTTAGTGACTGCTTGACACGTGATGATGCGCTCATTGAAGTTGTGGCTAGGAAA GGGCAAAAACGCGCCCATCGCTCGAGTGGCGGGGTAAATGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCATATCGCAAATTTTTGGTCTCGAGCGGGGTAGCGGGCAC GTTTTCGAGTCGTAGGGGAAATCGATGTACAAAGGACGCGCGATCGAAGGGAAAGTGACTAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGCTTGTTCGATACCACCG</p>

	CACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGTAGCCATGTCAGCATCTTGTTCCTCAAGAGGAATACCCCGCCAGGTCTTGGTGAGGGTTTTCGATGGCAGATAAGCT CATCATCGAGGGTAGTACTCACAGTGGTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAG
KF+8c	>KF+8c GTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAGTCACGGTGGCCGGGGCGTCTGTTGATTGTTAGTGGTGAGACATGTGTGAGAGGTGACAGCAACATACCAATGAC GGTGACATAGTAGCGGGGAGTCTCGAACTTCCAGAGGGCAATGTCGATGGTGATAACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGGACCCAGGCGTACTT GAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCTATTGTTGGACCGGTTAGCGTCTGTTGTGAACCACGTGATGATGCGCGCCAAGAGGGTTTTGGTGTTCGCT GTGCAGGGATCAGGGCTTTGTCCAACGTCGCCCCGAGTGGCGGGGTAATGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCGGACCGCAAAAAATTTTGGAACTCGGGAGAA GCGGGCGCAGAGCGTATCGCGAGGGAGGGGATTTCGATGTGGAATAGCAAGGCGCGATCGGGGGAGATGTCACCAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGCT TGTTCGATAACCACCGCACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTAGATGATTGTCAGCATGAAGTGAATGATGAATACCCCGCCCGAGATGCCAGGCGGGGTTCC ACGACCCGAGATAAGTAGATCGCGATGAGGGTTTTGACTTACGGTGGTTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTGAG
KF-10b	>KF-10b GTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAATCACGGTGGCCGGGAGCGTCTGAGTGATATGTTAGTACGAAGAGAAGTAGAATGAAGCATGAGCGACAACATACC AATGACGGTGACATAGTAGCGGAGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGATAACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGGC GTACTTGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCTATTGTTGAATGGTGTAGTGACTGCTTCACACGTGACGACGCACTCATTGAGGTTGTGAGAATGGT AAGAGGGCAAACGCTCCCTTCGCTCAAGTGGCGGGGTAAGTGGCCACCAAAAAAATTACGGTCATATTGCAAAAATTTTGGTCTCGAGCGGGGTAGCGGGC ACGTTTTCGAGTCGTAGGGGAAATCGATGGGCAAAGGACGCGCGATTGAAGGGAAAGTACTAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGCTTGTTCGATAACCAC CGCACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGAAACGATGTCAGTATGTTGACTTTGAGAAATACCCCGCCAGGTCTTGGTGGGATTGACGATGGCAGATATG CTCATTTGTCGAGGAGAGTACTCACAGTGGTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAG
KF-5a	>KF-5a GTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAGTCACGATGACCGGGAGCGTCTGAGTGATATGTTAGTACGAATAAAGGGGAGAACGAGGCATGAGCGACAACATACC AATGACGGTGACATAGTAGCGGAGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGATAACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGGC GTACTTGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCTATTGTCGAGTGGTGTAGTGACTGCTTGACACGTGACGATGCGCTCAGAAGGTTGTGAAAATGGAG GGCAGAAACGCGCATCGCTCGAGTGGCGGGGTAATGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCATATCGCAAAAATTTTGGTCTCGAGCGGGGTAGCGGGCACGTT TCTAGTCGTATGGAGAATCGATGGGCAGAGGACGCGCGATTGAAGGGAAAGTAACTAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGCTTGTTCGATAACCACCGCAC TGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGGAGCGATGTCAGCATGTTATCTTGGTGATAACCCCGCCAGATCTCGGTGGGATAACGATGGCAGATAAGCTCATCGT AGAGGGTAGTACTCACAGTGGTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAG
KF-5b	>KF-5b GTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAGTCACGATGACCGGGAGCGTCTGAGTGATATGTTAGTACGAATAAAGGGGAGAACGAGGCATGAGCGACAACATACC AATGACGGTGACATAGTAGCGGAGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGATAACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGGC GTACTTGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCTATTGTCGAGTGGTGTAGTGACTGCTTGACACGTGACGATGCGCTCAGAAGGTTGTGAAAATGGAG GGCAGAAACGCGCATCGCTCGAGTGGCGGGGTAATGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCATATCGCAAAAATTTTGGTCTCGAGCGGGGTAGCGGGCACGTT TCTAGTCGTATGGAGAATCGATGGGCAGAGGACGCGCGATTGAAGGGAAAGTAACTAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGCTTGTTCGATAACCACCGCAC TGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGGAGCGATGTCAGCATGTTATCTTGGTGATAACCCCGCCAGATCTCGGTGGGATAACGATGGCAGATAAGCTCATCGT AGAGGGTAGTACTCACAGTGGTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAG
KF-5c	>KF-5c AGTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAGTCACGGTGGCCGGGGCGTCTGTTGATTGTTAGTGGTGAGACATGTGTGAGAGGTGACAGCAACATACCAATGA CGGTGACATAGTAGCGGGGAGTCTCGAACTTCCAGAGGGCAATGTCGATGGTGATAACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGGACCCAGGCGTACT

	<p>TGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCTATTGTTGGACCGGTTAGCGTCTGTTGTGAACCACGTGATGATGCGCGCCAAGAGGGTTTTGGTGTTTTTG TGTGCAGGGATCAGGGCTTTGTCCAACGTCGCCCCGAGTGGCGGGGTAATGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCGGACCGCAAAAATTTTGAACTCGGGAGA AGCGGGCGCAGAGCGTATCGCGAGGGAGGGGATTTCGATGTGGAATAGCAAGGCGCGATCGGGGGAGATGTCACCAACCTTCTCGAATTCTCGATGGTTTCGC TTGTTCGATAACCACCGCACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTAGATGATTGTCAGCATGAAGTGAATGATGAATACCCCGCCGAGATGCCAGGCGGGGTTCC CACGACCCGAGATAAGTAGATCGCGATGAGGGTTTTGACTTACGGTGGTTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTGAG</p>
KF-7	<p>>KF-7 AGTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAGTCACGGTGGCCGGGGGCGTCTGTTGATTGTTAGTGGTGAGACATGTGTGAGAGGTGACAGCAACATACCAATGA CGGTGACATAGTAGCGGGGAGTCTCGAATTCCAGAGGGCAATGTCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGGACCCAGGCGTACT TGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCTATTGTTGGACCGGTTAGCGTCTGTTGTGAACCACGTGATGATGCGCGCCAAGAGGGTTTTGGTGTTTTTG TGTGCAGGGATCAGGGCTTTGTCCAACGTCGCCCCGAGTGGCGGGGTAATGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCGGACCGCAAAAATTTTGAACTCGGGAGA AGCGGGCGCAGAGCGTATCGCGAGGGAGGGGATTTCGATGTGGAATAGCAAGGCGCGATCGGGGGAGATGTCACCAACCTTCTCGAATTCTCGATGGTTTCGC TTGTTCGATAACCACCGCACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTAGATGATTGTCAGCATGAAGTGAATGATGAATACCCCGCCGAGATGCCAGGCGGGGTTCC CACGACCCGAGATAAGTAGATCGCGATGAGGGTTTTGACTTACGGTGGTTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTGAG</p>
KF-9	<p>>KF-9 GTACCAGTGATCATGTTCTTGATGAAATCACGGTGACCGGGAGCGTCTGAGTGATGTGTTAGTACGAAGAGAAGTAGAATGAAGCATGAGCGACAACATACC AATGACGGTGACATAGTAGCGAGGAGTCTCGAATTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGGC GTACTTGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTTCCTATTGTTGAATGGTTAGTGACTGCTTGACACGTGACGACGCACTCATTGAGGTTGTGAGAATGGT AAGAGGGCAAACGCTCCCGTCGCTCAAGTGGCGGGGTAAGTGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCATATTGCAAAAATTTTGGTCTCGAGCGGGGTAGCGGGC ACGTTTCGAGTCGTAGGGGAAATCGATGGGCAAAGGACGCGCGATTGAAGGGAAAGTACTAACCTTCTCGAATTCTCGATGGTTTCGCTTGTTCGATACCAC CGCACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGAAACGATGTCAGTATGTTGACTTTGAGAAATACCCCGCCAGGTCTTGGTTCGGGATTGACGATGGCAGATATG CTCATTGTCGAGGAGAGTACTCACAGTGGTTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAG</p>