

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E  
BIOLÓGICAS – CCAAB  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CURSO DE MESTRADO**

**COMPORTAMENTO DE GENÓTIPOS DE  
BANANEIRA NA PRESENÇA DE  
*FUSARIUMOXYSPOURUM F. SP.*  
*CUBENSE***

**WELLY SACRAMENTO SANTANA**

**CRUZ DAS ALMAS – BA  
2023**

**COMPORTAMENTO DE GENÓTIPOS DE  
BANANEIRA NA PRESENÇA DE *FUSARIUM  
OXYSPORUM* F. SP. *CUBENSE***

**Welly Sacramento Santana  
Tecnóloga em Agroecologia  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2021**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais

**Orientador:** Prof. Dr. Edson Perito Amorim  
**Coorientador(a):** Dra. Vanusia B. O. Amorim  
Dra. Anelita de Jesus Rocha

**CRUZ DAS ALMAS-BA  
2023**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S232c

Santana, Welly Sacramento.

Comportamento de genótipos de bananeira na presença de *Fusarium oxysporum* F. sp. Cubense / Welly Sacramento Santana. Cruz das Almas, BA, 2023.  
72f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Edson Perito Amorim.

Coorientadora: Dra. Anelita de Jesus Rocha.

Coorientadora: Dra. Vanusia B. O. Amorim.

1.Banana – Doenças e pragas. 2.Banana – Melhoramento genético. 3.Fungos na agricultura – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 634.772

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

**COMPORTAMENTO DE GENÓTIPOS DE BANANEIRA  
NA PRESENÇA DE FUSARIUM OXYSPORUM F. SP.  
CUBENSE**

Comissão Organizadora da Defesa Dissertação

Welly Sacramento Santana

Aprovada em: 28 de Julho de 2023

Documento assinado digitalmente



**EDSON PERITO AMORIM**

Data: 27/08/2023 08:58:21-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Embrapa Mandioca e Fruticultura  
(Orientador)**

Documento assinado digitalmente



**RICARDO FRANCO CUNHA MOREIRA**

Data: 28/08/2023 11:56:57-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
(Examinador Interno)**

Documento assinado digitalmente



**ZALMAR SANTANA GONCALVES**

Data: 27/08/2023 11:58:56-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Embrapa Mandioca e Fruticultura  
(Examinador Externo)**

Dedico!

A *Deus*, por ser o meu mentor, minha fonte de água viva, onde recarreguei as minhas forças diariamente para lutar pela realização dos meus objetivos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que me permitiu aprender e amadurecer muito durante esses anos e por medar forças para superar tantas adversidades.

Aos meus pais Izaias e Marinalva que sempre acreditaram e apoiaram os meus estudos, me orgulho e amo muito vocês.

Ao meu noivo Ailton pelo incentivo, companheirismo e amor depositados, por sempre apoiar, por acreditar em mim. De forma singular, agradeço por ter sonhado junto comigo essa conquista.

Aos Meus irmãos Wellington, Uillians e Uilma que sempre estiveram presentes em minha vida, me incentivando e me apoiando em minhas escolhas.

Aos meus sobrinhos Luan e Maria Luiza por serem a minha fonte de felicidade, onde sempre recarreguei as minhas energias para seguir.

Ao Orientador dr. Edson Perito Amorim pela orientação, confiança, por sempre se mostrar à disposição e por todos os conhecimentos que me foram transmitidos.

À minha coorientadora dra. Anelita de Jesus Rocha pela paciência, por toda troca de experiência que me ajudaram a ter forças para continuar buscando essa conquista, sou muito grata por todo aprendizado, ensinamentos e, principalmente, por toda compreensão.

À minha coorientadora dra. Vanusia Amorim pelas contribuições na execução do trabalho, valiosos ensinamentos, carinho, confiança e amizade;

À minha amiga Vanessa, pelo companheirismo durante esses anos, pelos conselhos, e por sempre ter uma palavra de conforto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (PPG-RGV) pela oportunidade de realizar esta Pós-Graduação.

A Equipe do Programa de Melhoramento Genético de Bananeira da EMBRAPA, Wesley, Fernanda, Mileide, Marcelly, Tamyres, Manoela, Wanderley, Tais, Patricia, Meire, Amanda, Danilo pela ajuda, amizade, ensinamentos e momentos de descontração durante a caminhada.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura e ao Programa de Melhoramento Genético de Bananeira pela parceria e valiosas contribuições para o trabalho. Muito obrigada à todos os pesquisadores e funcionários envolvidos neste programa de melhoramento.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudo.

A todos os meus amigos da Pós graduação (UFRB), Embrapa (CNPMP), Danilo, AnaPaula, Rodrigo, Rodrigo José, Luana, Andressa, Luiz e Raisa.

Aos analistas dos Laboratórios de Biologia Molecular e Fitopatologia, Andresa Priscilae Leandro Rocha, por todos os ensinamentos compartilhados.

Aos funcionários da Embrapa (CNPMPF). Ao setor de práticas culturais, em especial a Rafael Aragão e Zalmir Santana por todos os conhecimentos passados ao longo desses anos. Ao técnico do Laboratório de Fitopatologia, Sinésio, por toda ajuda, amizade e pelas palavras acolhedoras.

À todos aqueles que contribuíram para realização deste trabalho muitoobrigada!



## **COMPORTAMENTO DE GENÓTIPOS DE BANANEIRA NA PRESENÇA DE *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *CUBENSE***

**RESUMO:** A banana é uma das frutas mais consumidas em todo o mundo; vital para a segurança alimentar em muitos países. Dentre os fatores que afetam o cultivo da bananeira, a incidência de pragas e doenças é prevalente, com destaque para murcha de Fusarium, uma das doenças mais destrutivas, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Atualmente a forma mais aceita para dar continuidade à cultivos em solos infestados por ciclos mais longos é a identificação e utilização de fontes de resistência em germoplasma ou em cultivares comerciais a fim de gerar genótipos altamente resistentes. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento de diploides melhorados e genótipos dos subgrupos Prata e Cavendish quanto a resistência à *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, raças 1 e Subtropical 4 em condições de casa de vegetação mediante inoculação artificial e por meio de análises histológicas e históquímica. Foram avaliados 24 diploides melhorados desenvolvidos pela Embrapa Mandioca e Fruticultura e 21 genótipos tipo “Prata” e “Cavendish” coletados em diferentes regiões do Brasil. Esses genótipos foram avaliados 90 dias após a inoculação, a partir de escala denotas para sintomas internos e categorizados de altamente resistentes à altamente suscetíveis. Foram também coletadas raízes dos genótipos contrastantes para resposta a Foc visando análises histológicas para observar a presença de estruturas do patógeno nos tecidos e análise histoquímica, por meio da detecção de calose. A partir das análises foram classificados os diploides CNPMF 0519, CNPMF 0557 e CNPMF 0612 como altamente resistentes à Foc ST4 e 013004-04, M53, 050012-02, SH3263, SH3362, 013019-01, CNPMF 0496, CNPMF 0513 e CNPMF 0534 como resistentes a Foc R1, por não apresentaram sintomas de murcha de Fusarium em casa de vegetação. O diploide CNPMF 0534 apresentou resistência completa à ambas raças avaliadas. Entre os genótipos tipo Prata e Cavendish avaliados, o híbrido Embrapa 02 foi caracterizado como altamente resistente, já o híbrido Embrapa 03 como moderadamente resistente. Entre os indivíduos tipo Cavendish, os BGB 271, BGB 151, BGB268 foram classificados como resistentes, e os genótipos BGB 150 e BGB 154, classificados como moderadamente resistentes. Os diploides melhorados avaliados como resistentes têm potencial e podem ser utilizados em cruzamentos com cultivares comerciais suscetíveis, contribuindo para o desenvolvimento da bananicultura e para programas de melhoramento de banana, bem como para a bananicultura a nível nacional e internacional. Além disso, a seleção de materiais resistentes entre os genótipos tipos Prata e Cavendish já cultivadas por produtores caracterizados como resistentes, podem caracterizar um ganho na seleção de material com variabilidade genética.

**Palavras chaves:** Musa ssp., Melhoramento genético, Murcha de fusarium

## **BEHAVIOR OF BANANA GENOTYPES AGAINST FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. CUBENSE**

**ABSTRACT:** Banana is one of the most consumed fruits in the world; vital to food security in many countries. Among the factors that affect banana cultivation, the incidence of pests and diseases is prevalent, with emphasis on Fusarium wilt, one of the most destructive diseases, caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Currently, the most accepted way to continue cultivation in infested soils for longer cycles is to identify and use sources of resistance in germplasm or commercial cultivars in order to generate highly resistant genotypes. In this sense, the present work aimed to evaluate the behavior of improved diploids and genotypes of the Prata and Cavendish subgroups regarding resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, races 1 and Subtropical 4 in greenhouse conditions by artificial inoculation through histological and histochemical analysis. Twenty-four improved diploids developed by Embrapa Mandioca e Fruticultura and 21 “Prata” and “Cavendish” genotypes collected in different regions of Brazil were evaluated. These genotypes were evaluated 90 days after inoculation, using a rating scale for internal symptoms and categorized from highly resistant to highly susceptible. Roots of contrasting genotypes were also collected for response to Foc, aiming at histological analyzes to observe the presence of pathogen structures in the tissues and histochemical analysis, through the detection of callose. Based on the analyses, diploids CNPMF 0519, CNPMF 0557 and CNPMF 0612 were classified as highly resistant to Foc ST4 and 013004-04, M53, 050012-02, SH3263, SH3362, 013019-01, CNPMF 0496, CNPMF 0513 and CNPMF 0534 as resistant to Foc R1, as they did not show symptoms of Fusarium wilt in the greenhouse. The diploid CNPMF 0534 showed complete resistance to both evaluated races. Among the evaluated Prata and Cavendish genotypes, the hybrid Embrapa 02 was characterized as highly resistant, while the hybrid Embrapa 03 was characterized as moderately resistant. Among Cavendish-type individuals, BGB 271, BGB 151, BGB 268 were classified as resistant, and genotypes BGB 150 and BGB 154 were classified as moderately resistant. Improved diploids evaluated as resistant have potential and can be used in crosses with susceptible commercial cultivars, contributing to the development of banana farming and to banana breeding programs, as well as to banana farming at national and international level. In addition, the selection of resistant materials among the Prata and Cavendish genotypes already cultivated by producers characterized as resistant, may characterize a gain in the selection of material with genetic variability.

**Keywords:** *Musa* ssp., Genetic improvement, Fusarium wilt

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL.....                                                                                                                                           | 11 |
| 2. REFERENCIAL TEORICO.....                                                                                                                                        | 13 |
| 2.1 Murcha de Fusarium .....                                                                                                                                       | 13 |
| 2.2 Mecanismos de resistência de plantas a patógenos .....                                                                                                         | 15 |
| 2.3 Melhoramento genético da cultura da banana .....                                                                                                               | 17 |
| 3.REFERÊNCIAS .....                                                                                                                                                | 20 |
| CAPITULO 1. Comportamento de diploides melhorados de bananeira contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raças 1 e subtropical 4 em casa de vegetação |    |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                                                                                 | 29 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                                                         | 31 |
| 2.1 Cepas de Fusarium .....                                                                                                                                        | 31 |
| 2.2 Materiais vegetais e crescimento.....                                                                                                                          | 32 |
| 2.3 Inoculação de plantas.....                                                                                                                                     | 33 |
| 2.4 Avaliação dos sintomas .....                                                                                                                                   | 33 |
| 2.5 Análises histológicas e histoquímicas.....                                                                                                                     | 34 |
| 2.5.1 Clareamento e coloração de estruturas fúngicas em raiz.....                                                                                                  | 34 |
| 2.5.2 Análise Histoquímica .....                                                                                                                                   | 34 |
| 2.5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....                                                                                                               | 34 |
| 3. RESULTADOS.....                                                                                                                                                 | 35 |
| 3.1 Triagem para resistência à Foc R1.....                                                                                                                         | 35 |
| 3.2 Triagem para resistência à Foc ST4.....                                                                                                                        | 36 |
| 3.3 Análise de agrupamento entre os diploides para as respostas induzidas por Foc R1 e Foc ST4 .....                                                               | 37 |
| 3.4 Análises Histológicas e Histoquímicas .....                                                                                                                    | 38 |
| 4. DISCUSSÃO.....                                                                                                                                                  | 40 |
| 5. CONCLUSÕES.....                                                                                                                                                 | 44 |
| 6. REFERÊNCIAS .....                                                                                                                                               | 45 |

CAPÍTULO 2: Avaliando a resistência de genótipos de bananeira tipo Prata e Cavendish contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raça Subtropical 4 em casa de vegetação

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                 | 53 |
| 2. METODOLOGIA<br>.....                                            | 55 |
| 2.1 Cepa de Foc e preparo de inóculo .....                         | 56 |
| 2.2 Material vegetal e crescimento .....                           | 57 |
| 2.3 Inoculação de plantas e avaliação de sintomas.....             | 57 |
| 2.4 Análises histológicas e histoquímica .....                     | 58 |
| 3. RESULTADOS.....                                                 | 58 |
| 3.1 Avaliação de genótipos tipo prata.....                         | 59 |
| 3.2 Avaliação de genótipos tipo Cavendish .....                    | 60 |
| 3.3 Avaliação da interação Foc ST4 e genótipos tipo Prata .....    | 61 |
| 3.4 Avaliação da interação Foc ST4 e genótipos tipo Cavendish..... | 61 |
| 4. DISCUSSÃO.....                                                  | 61 |
| 5. CONCLUSÕES.....                                                 | 65 |
| 6. REFERÊNCIAS .....                                               | 66 |

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da bananeira (*Musa* spp.) é a base econômica de diversos países, sendo considerada essencial para segurança alimentar e uma das mais importantes, pois representa grande parte do percentual de consumo de frutas no mundo (GUERRA et al., 2009; THANGAVELU et al., 2021). Cultivada em países tropicais e subtropicais, sua produção tem papel importante na economia de países em desenvolvimento (FAOSTAT, 2023). A Índia é o maior produtor, seguido pela China, Indonésia e Brasil (FAOSTAT, 2023).

Como ocorre em qualquer espécie cultivada, a bananeira é afetada por diversos problemas fitossanitários que têm gerado limitações ao cultivo. Dentre as doenças que afetam o cultivo da bananeira, destaca-se a murcha de *Fusarium*, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (Foc), sendo uma das doenças que mais gera danos e preocupações à bananicultura mundial. A classificação em raças foi adotada para distinguir isolados de Foc que afetam um conjunto específico de cultivares de bananeira (PLOETZ 2015). A raça 1 (R1) causa danos especialmente entre as cultivares Gros Michel, cultivares do subgrupo Prata, como Prata-Anã, Prata Catarina e Prata Gorutuba, e a cultivar Maçã; a raça 2 afeta cultivares do subgrupo Bluggoe, um tipo de banana utilizado especialmente para cocção, associado ao genoma ABB; a raça 3 afeta uma forma especial distinta, que compreende as heliconiaceas, um parente selvagem das bananas que também são afetadas pela raça 1 e a raça 2, e a raça 4 (subdivididas em Tropical e Subtropical), que afetam cultivares do subgrupo Cavendish e as cultivares suscetíveis às raças 1 e 2 do patógeno, sendo portanto, mais destrutiva devido à sua ampla gama de hospedeiros (STOVER 1962; PLOETZ, 1990; PLOETZ, 2006).

A raça 4 foi subdividida em raça tropical 4 (R4T) e raça subtropical 4 (ST4) (PLOETZ 1990; STOVER 1962; RAMAN et al 2021). O Foc R4T afeta Cavendish em condições tropicais e subtropicais, já os isolados de Foc ST4 causa doença em cultivares Cavendish nos subtrópicos quando há fatores predisponentes, tais como extremos de temperatura ou alagamentos, e distingue-se pelos grupos de compatibilidade vegetativa (VCGs) (BUDDENHAGEN, 2009; BATISTA et al., 2022;). Estão associados ao Foc ST4 os VCGs 0120, 01201, 01202, 01209, 01210, 01211, 01215, e 0120/15; e ao Foc R4T, apenas o VCG 01213/16 (BUDDENHAGEN, 2009; DITA et al., 2018).

O surto de murcha de *Fusarium* causado por R1 ocorrido em meados do século XX dizimou a indústria bananeira de exportação, centrada na cultivar Gros Michel, em especial na América Central (PLOETZ, 2006; DITA et al., 2018). A devastação de cultivares Gros Michel pelo patógeno na década de 1960 conduziu a busca por métodos efetivos de controle, a melhor alternativa para essa solução foi a substituição de cultivares do subgrupo Gros Michel por cultivares do subgrupo Cavendish, com destaque para a cultivar Grande Naine, sendo esta, uma opção bem sucedida, uma vez que essa cultivar apresentava resistência a Foc R1 (REBOUCAS et al., 2018; ZHENG et al., 2018; FAO, 2019).

No Brasil não há relatos de incidência de R4T, considerada pelo Ministério da Agricultura e Pecuária do Brasil uma praga quarentenária, que mesmo sob controle permanente, constitui ameaça à economia agrícola do país (ICA, 2019). No entanto, a R1 é considerada uma doença endêmica responsável por sérios danos à produção, sobretudo para cultivares do subgrupo Prata, consideradas

preferidas pelos consumidores brasileiros (PLOETZ, 2015; DITA et al., 2018; REBOUÇAS et al., 2018). Os clamidósporos são responsáveis pela sobrevivência do Foc, podendo se manter inativo no solo ou em plantas daninhas por décadas. Algumas medidas geralmente utilizadas para outras doenças fúngicas não são eficazes para o controle ou redução da Murcha de Fusarium, além do mais, representam riscos tanto para a saúde humana quanto animal e altamente perigoso para o meio ambiente. Nos últimos anos o controle biológico vem em uma crescente exponencialmente para o controle dessa enfermidade, porém ainda não se consegue obter resultados satisfatórios. Diante disso, a adoção de cultivares resistentes associada a implementação de boas práticas culturais são as medidas de controle mais eficientes (PLOETZ, 2006; PLOETZ, 2015).

Centros de pesquisa pelo mundo, como a *Fundación Hondureña de Investigación Agrícola* (FHIA); *Centre Africain de Recherches sur Bananiers et Plantains* (CARBAP) em Camarões; *International Institute of Tropical Agriculture* (IITA) na Nigéria e Uganda; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) no Brasil; *National Banana Research Center* (NCRB) na Índia; *National Research Organization* (NARO) em Uganda; e *Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement* (CIRAD) na França, trabalham na busca por cultivares resistentes utilizando-se de avaliações morfoagronômicas em materiais resistentes presentes em bancos de germoplasma (LI et al., 2014; LI et al., 2015; THANGAVELU et al., 2021; 2022; ZHAN et al., 2022; ROCHA et al., 2022).

Um dos programas de melhoramento genético de bananas e plátanos mais antigos é o da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, onde se trabalha com melhoramento para obtenção de cultivares de bananeira para garantir a sustentabilidade dos cultivos no enfrentamento à danos causados pela R1 bem como de ST4 e de forma preventiva contra R4T; já que essa raça é considerada uma doença ausente no Brasil. As estratégias adotadas baseiam-se nos métodos de hibridização entre triploides e tetraploides comerciais e diploides melhorados e selvagens, indução de mutação e de resistência, variação somaclonal e sequenciamento do genoma para o desenvolvimento de cultivares de bananeira e plátanos resistentes (SILVA et al., 2013; AMORIM et al., 2016; ROCHA et al., 2022).

Um grande desafio da produção de bananas no Brasil é o aumento de incidência da murcha de Fusarium causada pela R1. As cultivares do subgrupo Prata, como a Prata-Anã e suas derivadas, são as mais plantadas pelos produtores brasileiros, no entanto tem enfrentado dificuldades com a murcha de Fusarium nas principais áreas de produção da fruta no país (GONÇALVES et al., 2019). Além delas, são também utilizadas as cultivares do subgrupo Cavendish, disponíveis para os agricultores, e que apresentam resistência a Foc R1, mas não a Foc R4T (CORDEIRO et al., 2016; GONÇALVES et al., 2019).

Em pesquisas anteriores sobre bananeiras cultivadas (*Musa* spp.), foram identificados quatro tipos genômicos distintos: *M. acuminata* (A), *M. balbisiana* (B), *M. schizocarpa* (S) e a espécie *Australimusa* (T). Um estudo recente mostrou que a resistência à murcha de Fusarium varia consideravelmente dentro de cada tipo de genoma. Nas mais de 2000 cultivares de bananeira identificadas, a maioria é triploide ou diploide e originou-se de hibridizações intraespecíficas e/ou interespecíficas entre *M. acuminata* e *M. balbisiana*. Dentro de um mesmo genoma pode existir variações, que podem ser explicadas pela presença de

diferentes genes de resistência em cada estrutura genômica. Além disso, foi observado que a resistência à doença é provavelmente quantitativa, ou seja, influenciada por múltiplos genes. É possível desenvolver variedades mais resistentes ou tolerantes por meio de mutações selecionadas em cultivares existentes (SMITH et al., 2006; ZUO et al., 2018).

Segundo Rocha et al (2022a), as fontes de resistência relacionadas a Foc R4T ainda são compostas principalmente por diploides. Dentre elas incluem os diploides Pahang, Calcutta 4, Zebrina, Pisang Lilin, Malaccensis, Jari Buaya e Tuu Gia (ZUO et al., 2018; RIBEIRO et al., 2018; GONÇALVES et al., 2019; CHEN et al., 2019). As cultivares BRS Caprichosa, BRS Garantida, BRS Japira, BRS Pacovan Ken, BRS Preciosa, BRS Princesa, BRS Tropical, BRS Vitória, BRS Pioneira, BRS Platina e BRSPacoua são produtos dos processos de hibridações realizadas pelo programa de melhoramento genético da Embrapa, todas resistentes a Foc R1. O desenvolvimento de híbridos diploides melhorados que sejam resistentes a Foc para uso em cruzamentos com cultivares comerciais suscetíveis, é uma estratégia eficiente para o melhoramento da bananeira (REBOUÇAS et al., 2018).

Alguns diploides têm apresentado potencial para uso em cruzamentos, destacando-se o diploide M53, resistente a Foc R1 e Foc R4T, usado como parental nos híbridos desenvolvidos pela Embrapa, como BRS Platina e BRS Princesa, utilizados no mercado interno por apresentarem boas características morfoagronômicas (RIBEIRO et al., 2015; ROCHA et al., 2022a).

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar diploides melhorados e genótipos dos tipos Prata e Cavendish quanto a sua resistência à *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*, raças 1 e Subtropical 4, sob condições de casa de vegetação, mediante inoculação artificial e avaliações histológicas e históquímica.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Murcha de Fusarium

Em meio às doenças vasculares que afetam o cultivo de bananeira, a murcha de Fusarium destaca-se por estar presente em todas as regiões produtoras de banana (AMORIM et al., 2013). A murcha de Fusarium é causada pelo patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), um fungo de solo capaz de colonizar as raízes da planta e levá-las a morte. Essa doença é considerada uma ameaça econômica figurando-se entre as cinco doenças que mais afetam o setor econômico em todo o mundo (HADDAD et al., 2011; MINTOFF et al., 2021; PLOETZ, 2015).

Referente à etiologia da murcha de Fusarium, alguns estudos mostram que a doença teve origem no sudeste Asiático e Oceania, sua primeira comprovação foi relatada na Austrália por volta de 1874, futuramente foi disseminado pelos países da América do Norte e América do Sul. Existem cerca de 150 espécies de *Fusarium oxysporum* identificadas. Foi desenvolvida uma outra classificação para caracterizar o patógeno com base em grupos de compatibilidade vegetativa (VCG). São conhecidos 24 VCGs de Foc. A relação entre VCG e raças é complexa, já que uma raça pode estar associada a vários VCGs. Por exemplo, a raça R1 está associada aos VCGs 0120/15, 0123, 0124/5/8/20, 0126 e 01210; a raça R2 está associada ao VCG 0122, 0124/5/8/20; a raça STR4 compartilha o

VCG com a raça 1 (0120/15) e também possuios VCGs 0121, 0122, 0129/11, enquanto a raça R4T está associada ao VCG 01213/16. Estudos de diversidade demonstraram que o maior número de VCGs se encontra nas regiões consideradas o centro de origem de Foc, como Indonésia e Malásia. Porém, a distribuição dos VCGs depende de diferentes fatores. No Brasil, há uma suposta predominância de populações de Foc pertencentes à raça R1. No entanto, a presença dos VCGs 0120/15 e 0129/11 indica a existência da raça STR4 no país (PIOETZ, 2006; LOPES, 2018).

O *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyder & Hansen – (Foc) é um fungo mitospórico pertencente ao filo Ascomycota, classe Ascomycetes, ordem Hypocreales e família Tuberculariaceae, sendo o mesmo subdividido em seções conhecidas como *formae specialis* (f. sp.) e raças fisiológicas com isolados patogênicos morfologicamente semelhantes, porém diferenciam-se por ser específico ao infectar espécies hospedeiras distintas (COSTA et al., 2014; STAVER et al., 2020). Sua reprodução é de forma assexuada, tendo como esporos de reprodução os macroconídios, microconídios e clamidósporos, sendo este último, estruturas de resistência e sobrevivência do fungo. Já sua reprodução de forma sexuada ainda é um mistério. (DITA et al., 2018; SMITH, 2008). Por meio dos clamidósporos esse patógeno sobrevive no solo por muitos anos mesmo na ausência do seu hospedeiro (CHEN et al., 2019; DITA, 2018; GONÇALVES, 2019).

A variação patogênica do Foc divide-se em 3 raças, a citar: raça 1 que é considerada endêmica no Brasil e afeta a cultivar 'Gros Michel' (AAA), além das cultivares do subgrupo Prata e Maçã, a raça 2 que afeta cultivares do subgrupo Bluggoe, além das cultivares suscetíveis à raça 1, e por fim, a raça 4, sendo esta a mais destrutiva, por afetar todas as cultivares comerciais conhecidas até o momento (PLOETZ, 2006; DALY; WALDUCK, 2006; CHEN et al., 2019). O Foc R4T afeta Cavendish em condições tropicais (R4T) e subtropicais (STR4), e já foi identificado em regiões da Ásia, África e Austrália, além das regiões da América latina e Caribe, Venezuela, Peru e Colômbia (BUDDENHAGEN, 2009; PLOETZ, 2015; GARCIA et al., 2020; BATISTA et al., 2022; MARTINEZ et al., 2023). Já os isolados de Foc ST4 causa doença em cultivares do tipo Cavendish nos subtópicos quando há fatores predisponentes, tais como extremos de temperatura, déficit hídrico ou alagamentos (BUDDENHAGEN, 2009; BATISTA et al., 2022;).

A forma mais comum de contaminação por Foc é por meio das raízes em contato com esporos liberados por plantas contaminadas, presentes no solo ou por uso de material contaminado (ZHANG et al., 2018). Conídios e hifas podem ser vistos aderidos as raízes, podem crescer ao longo dos sulcos nas junções entre as células epidérmicas radiculares e colonizar as superfícies secundárias ou terciárias, alcançando posteriormente o xilema, onde ocorre abundante esporulação (DITA et al., 2018). Quando o fungo está alojado é realizada o processo de colonização do feixe vascular, impedindo a passagem de água e nutrientes, causando um desequilíbrio no desenvolvimento das plantas. Após a colonização do xilema, surge os sintomas da murcha foliar, rachaduras no pseudocaule e amarelecimento das folhas levando a planta a morte (MOORE et al., 2001; ZUO et al., 2018). A disseminação do *Fusarium* ocorre com maior frequência por meio do transporte de mudas contaminadas, águas de inundações, nematoides e broca do rizoma que colaboram para a incidência da doença (GARCIA; COSTA, 2000; DITA et al., 2018).

Por muitos anos o Foc R4T esteve restrito a região sudeste do continente asiático, mais a partir de 2010 o fungo tem atingido outros países ao sul, sudeste e oeste do continente. Um fator de grande preocupação, devido ao conhecimento limitado em relação a essa doença, é a susceptibilidade das cultivares do subgrupo Cavendish, principal subgrupo destinado à exportação, além de afetar outras cultivares de bananas que representam 80% da produção (DITA et al., 2018, ZHANG et al., 2018). Destaca-se que R4T é considerada uma praga quarentenária pelo Ministério da Agricultura e Pecuária brasileiro pois, até julho de 2023, não foi relatado no Brasil (GONÇALVES et al., 2019; ROCHA et al., 2020).

De acordo com os dados disponíveis, o Foc R4T tem causado impacto significativo em regiões endêmicas e em países que não implementaram medidas sanitárias eficazes para prevenção, estimando-se que já tenha afetado Milhares de ha ao redor do mundo. Nas Filipinas, especificamente, acredita-se que mais de 15.000 ha tenham sido perdidos, sendo que cerca de 73,3% destes pertencem a pequenos agricultores (MARTINEZ, 2023).

## 2.2. Mecanismos de resistência de plantas a patógenos

As plantas são constantemente expostas a estresses abióticos, tais como condições ambientais desfavoráveis e bióticos, como a exposição de agentes patogênicos. Diversos estudos são desenvolvidos buscando identificar as características que possibilitam as plantas se defenderem e diminuir as infecções produzidas por patógenos (ORDEÑANA, 2002).

A influência de fatores bióticos e abióticos causam alguns processos nas células vegetais, como percepção e transdução de sinais de ações realizadas por portadores secundários direta ou indiretamente pela proteína-g, possibilitando posteriormente a tradução desses sinais, acionando genes que possibilitam a síntese de proteína e conduzindo a ativação dos chamados mecanismos de defesa e logo, a resistência da planta (DEMOSTHENES, et al., 2011; GONÇALVES et al., 2019). A depender do conteúdo genético de cada organismo, é possível que aconteça diversas associações entre plantas e patógenos, onde as plantas em condições naturais estão em contato com uma grande diversidade de organismos (ORDEÑANA, 2002).

No processo resistência, as plantas e patógenos têm formado interações competitivas. Nas plantas, alguns mecanismos são ativados e caracterizados como pré-existentes ou pré-formados, como as barreiras físicas e químicas que impedem a entrada dos patógenos, e pós-formados, que só são induzidos mediante a invasão e reconhecimento dos agentes patogênicos (MEDEIROS et al., 2005; MARQUES, 2015).

A primeira linha de defesa é definida como *PAMP-triggered immunity* (PTI), onde as plantas detectam padrões moleculares associados a patógenos, por meio de receptores, responsáveis por desencadear a defesa basal ou não-hospedeira PTI, onde as plantas reconhecem padrões moleculares associados a patógenos. Esses padrões são reconhecidos como efetores e são reconhecidos por receptores localizados na superfície da membrana celular ou interior da célula, que desencadeiam uma cascata de sinalização ativando as respostas de defesa. A segunda linha de defesa é chamada

de *effector-triggered immunity* (ETI) ou resistência específica do hospedeiro, caracterizada pela defesa a partir de proteínas R, (PR) para ativar a imunidade desencadeada por efetores (FLOR, 1971; DEYOUNG, 2006; BARROS et al.,2010; MARQUES 2015; ZUO, 2019).

Após ativação dos processos de PTI e ETI, ambos compartilham vias de sinalização semelhantes, como espessamento da parede celular, alterações nos níveis de cálcio no citoplasma, produção de espécies reativas de oxigênio e cascata de sinalização via quinases, por meio de mensageiros secundários como ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET), por meio de Proteínas-G de formadireta ou indireta e ao final ocorre a tradução desses sinais permitindo a conversão dos sinais em respostas celulares específicas, resultando na ativação de genes de defesa e conseqüentemente na resistência sistêmica adquirida ou induzida (DEYOUNG, 2006; HE et al., 2007; COSTA 2013; GONCALVES et al., 2019).

Os Genes R são responsáveis por conferir resistência à varios tipos de patógenos, incluindo fungos, eles codificam proteínas similares com domínios NB- LRR nucleotídeos que possuem domínios: C e N-terminal responsável por reconhecer o patógeno e ativar um padrão de transdução de sinal importante na resposta de resistência, respectivamente, os processos de PTI e ETI induzem reações um pouco semelhantes (DEYOUNG, 2006; HE et al., 2007; COSTA 2013; ZUO et al., 2019; LI et al.,2020).

Varios mecanismos estão ligados ao processo de interação planta x patógeno, como a produção de compostos antimicrobianos, alterações morfológicas e bioquímicas. Os mecanismos de defesa do hospedeiro podem ser divididos em estruturais e bioquímicos, pré-formados e induzidos (pós- formados) (MARQUES 2015). Mecanismos estruturais estão presentes nas plantas independente da presença do patógeno, os mecanismos bioquímicos são substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno ou gerar condições adversas para a sobrevivência nos tecidos do hospedeiro. Mecanismos estruturais pré-formados podem ser exemplificados pela espessura da parede celular, espessura da cutícula, e presença de cera. Já o estrutural pós formados após desencadeados formam a camada de abscisão, camada de cortica, tiloses, calose, entre outros (MEDEIROS et al., 2003; BARROS et al.,2010).

Mecanismos de defesa bioquímicos pré-existente podem ser representados por substâncias presentes no hospedeiro independente da presença do patógeno como os fenóis, alcalóides glicosídicos, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores proteicos, quitinases e  $\beta$ -1,3 glucanases. Mecanismos bioquímicos induzíveis são as substâncias que surgem no hospedeiro após o contato com o patógeno, como fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese, espécies reativas de oxigênio, entre outros (MICHEREFF 200; MEDEIROS et al., 2005).

### 2.3.Melhoramento genético da cultura da bananeira

Inicialmente as pesquisa visando o melhoramento genético de bananeiras se deu na década de 1922 em Trinidad em decorrência da incidência da murcha de Fusarium que dizimou plantações de 'Gros Michel', na América Central e na

Jamaicadevidio ao Foc raça 1 (SILVA et al., 1998). Assim, a utilização de cultivares resistentes, seja pela seleção dentro dos recursos genéticos existentes, seja pela geração de novas cultivares por hibridação, tem se mostrado a medida de controle mais eficiente (AMORIM et al., 2011).

Centros de pesquisa pelo mundo, como a *Fundación Hondureña de Investigación Agrícola* (FHIA), localizada em Honduras; *Centre Africain de Recherches sur Bananiers et Plantains* (CARBAP) nos Camarões; *International Institute of Tropical Agriculture* (IITA) na Nigéria e Uganda; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) no Brasil; *National Banana Research Center* (NCRB) na Índia; *National Research Organization* (NARO) em Uganda; e *Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement* (CIRAD) na França, trabalham nabusca por cultivares resistentes utilizando-se de avaliações morfoagronômicas em materiais resistentes presentes em bancos de germoplasma (LI et al., 2014; LI et al., 2015; THANGAVELU et al., 2021; 2022; ZHAN et al., 2022; ROCHA et al., 2022).

O programa de melhoramento da Embrapa Mandioca e Fruticultura teve início a partir de 1983, pelo doutor Kenneth Shepherd responsável por realizar estudos em áreas de *Musa ssp.* e coletas de germoplasma; produto de coletas nacionais e internacionais. Após esse período a Embrapa desenvolveu inúmeras variedades utilizadas atualmente pelos agricultores brasileiros como a BRS Caprichosa, BRS Japira, BRS Pacovan Ken, BRS Preciosa, BRS Tropical, BRS Platina, recomenda-se ainda a BRS Pelipita, Fhia-1 e BRS Thap Maeo (Mysore), todas através do desenvolvimento de hibridações e a maioria resistentes ou moderadamente resistentes a murcha de *Fusarium* (AMORIM et al., 2016). As cultivares 'Prata Anã' e 'Pacovan', que são as cultivares mais utilizadas pelos agricultores brasileiros também foram desenvolvidas pela Embrapa em parceria com a Epagri (ALVES et al., 1985).

O Banco de Germoplasma Ativo de Bananeira da Embrapa compreende 323 acessos que inclui valiosas fontes de resistências às principais doenças da bananeira além de características de importância agrônômicas. O banco de germoplasma está em uso e atende as demandas dos programas de melhoramento genético da bananeira, além disso as atividades de coleta, caracterização e manutenção são indispensáveis para preservar e aumentar a variabilidade genética existente. Um passo importante para o desenvolvimento de novas variedades melhoradas é a identificação de fontes de resistências (SILVA et al., 2016; RIBEIRO et al., 2018). O programa utiliza diferentes métodos para o desenvolvimento de cultivares, bem como cruzamento de triploides com diploides selvagens ou melhorados; cruzamento de tetraploides com diploides selvagens ou melhorados; duplicação de cromossomos de diploides superiores; e indução de mutação (SILVA et al., 2013; AMORIM et al., 2016). O processo de melhoramento da bananeira é bastante complexo e pode levar bastante tempo para ser concluído. Diversos fatores, como ploidia, frutos com baixa ou nenhuma produção de sementes e a duração do ciclo de cultivo, tornam essa tarefa ainda mais desafiadora. Para identificar cultivares resistentes, a primeira estratégia é realizar uma seleção cuidadosa a partir dos recursos genéticos já disponíveis em coleções de germoplasmas. (SILVA et al., 2013; GONÇALVES., 2019).

Uma estratégia promissora desenvolvida pelos programas de melhoramento da bananeira têm sido a geração de híbridos tetraploides, obtidos por meio de cruzamentos entre cultivares triploides e diploides melhorados ou selvagens, que apresentam características de interesse, como porte reduzido,

resistência a pragas e doenças, qualidade físico-química dos frutos; além da geração de triploides secundários a partir do cruzamento entre tetraploides e diploides (ALVES et al., 1985; SILVA et al., 2013).

A triagem de diploides como estimativa da variabilidade genética disponível para o melhoramento são informações importantes, tanto na seleção de progenitores para cruzamentos entre genótipos divergentes visando explorar a heterose e desenvolver novos diplóides melhorados, bem como para o cruzamento destes com triploides, visando a obtenção de novos híbridos tetraploides de banana (SILVA et al., 2013; AMORIM et al., 2009).

A Embrapa desenvolve cruzamentos com cultivares comerciais a partir de híbridos diploides como parentais masculinos (doadores de pólen) em cruzamentos com cultivares comerciais (utilizadas como mães). Os diploides utilizados apresentam resistência à pragas como Sigatoka amarela e a murcha de Fusarium e alguns à Sigatoka-negra (AMORIM et al., 2013). Um conjunto de bananas silvestres e cultivadas foram descritas conferindo diferentes níveis de resistência à Raça 1 e TR4 (GARCÍA-BASTIDAS 2019; AHMAD et al., 2020).

### 3. REFERÊNCIAS

ALVES, E. J.; SHEPHERD, K.; FERREIRA, F. R. Cultivares de banana caracterizadas e avaliadas no Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura. Cruz das Almas: EMBRAPA, 1985. p. 1-8. (Comunicado Técnico).

AMORIM, E. P.; AMORIM, V. B. O.; SILVA, S. de O. Quality improvement of cultivated Musa. In: PILLAY, M.; TENKOUANO, A. (Org.). *Banana Breeding: Progress and Challenges*. New York: CRC Press, p.252-280, **2011**.

AMORIM, E.P. Melhoramento genético In: FERREIRA, C. F. et al (org) *O agronegócio da banana* 1. ed. Brasília-DF, Embrapa/ Cruz das Almas, p.173-200,**2016**.

AMORIM, E.P.; SANTOS-SEREJO, J.A.; AMORIM, V. B. O.; FERREIRA, C.F.; SILVA, S. Banana breeding at Embrapa Cassava and Fruits. **Acta Horticulturae**,v.986, p.171-176, 2013.

BARROS, F.C.; SAGATA, É; FERREIRA, L.C.C. Induction of resistance in plants against phytopathogens; juliatti, F.C. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 231-239,2010.

BATISTA, I.C.A.; HECK, D.W.; SANTOS, A.; ALVES, G.; FERRO, C.G.; DITA, M, HADDAD, F.; MICHEREFF, S.J.; CORREIA, K.C.; SILVA, C.F.B, MIZUBUTI, E.S.G.

The population of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense in Brazil is not structured byVCG or by geographic origin. **Phytopathology**.2022.

BUDDENHAGEN, I. Understanding the diversity of strains in *Fusarium oxysporum* f.sp. Cuban and history of introduction of the "Tropical Breed 4" to better manage banana production. **Acta Hortic**, v.828, 193-204,2009.

CHEN, A.; SUN, J.; MATTHEWS, A.; ARMAS-Egas, L.; CHEN, N.; HAMILL, S.; MINTOFF, S.; TRAN-NGUYEN, L.T.T.; BATLEY, J.; AITKEN, E.A.B.

Assessing

variations in host resistance to *Fusarium oxysporum* f sp. cubense race 4 in Musaspecies, with a focus on the subtropical race 4. **Front. Microbiol**, 10, 1062, 2019.

CORDEIRO, Z. J. M et al.; Doenças fúngicas e bacterianas In: FERREIRA, C. F. etal (org.) **O agronegócio da banana**. 1 ed. Brasília-DF, Embrapa/ Cruz das Almas,p.547-575,2016.

COSTA, J.L. Estudos Histológicos e Moleculares da Interação Musa spp. x *Fusariumoxysporum* f. sp. cubense. Tese de mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil, 2013.

DALY, A.; WALDUCK, G. **Fusarium wilt of bananas (Panama disease)** Agnote 151. Australia: Northern Territory Government. 2006. Disponível em: [https://transact.nt.gov.au/ebiz/dbird/TechPublications.nsf/1717DB3D7CD580C06925723C004EA6DD/\\$file/786.pdf?OpenElement](https://transact.nt.gov.au/ebiz/dbird/TechPublications.nsf/1717DB3D7CD580C06925723C004EA6DD/$file/786.pdf?OpenElement) . Acesso em: 20 junho. 2022.

DEMOSTHENES, L.C.R.; BENTES, J.L.S. Fontes de resistência à murcha bacteriana em germoplasma de Capsicum spp. do estado do Amazona. v. 41(3) p.435 -438, 2011.

DITA, M.; BARQUERO, M.; HECK, D.; MIZUBUTE, E. S. G.; STAVAR, C. P. Fusarium wilt of banana: current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. **Frontiers of Plant Science**, v.9, p.1468,2018.

DEYOUNG, B.J. INNES. R.W. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. **Nature immunology**, v. 7, 1243–1249.2006.

FAOSTAT (2022). Resultados preliminares da análise do mercado de banana. Disponível em: online: <https://www.fao.org/faostat/en/#home> (acesso em 8 de março de 2023).

FAOSTAT (2023) Estatística da produção e de comércio. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#home> (Acesso em 16 de Março de 2023).

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAOSTAT – Crops - Download data - Banana (many years), 2019; Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> > (accessed on 23 Setember 2021).

FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, v.9, p.275-296, 1971.

GARCIA, A.; COSTA, J.N.M. Principais doenças fúngicas da bananeira em Rondônia: sintomatologia e controle /. Porto Velho (EMBRAPA-CPAF Rondônia.Circular Técnica, 53), 2000.

GARCIA, B.F.A.; VARGAS, J. C.Q.; VASQUEZ, M.A.T.; SCHERMER, M.F.; SEIDL, M. SANTOS-PAIVA, A.M. NOGUEIRA, C. AGUILERA-GALVEZ, A.; WITTENBERG, R.; HOFSTEDE, A.; SORENSE, G.H.J. Kema First Report of Fusarium Wilt Tropical Race 4 in Cavendish Bananas Caused by Fusarium odoratissimum in Colombia. **Planta Dis**, 104, 994,2020.

GONÇALVES, Z.S.; HADDAD, F.; AMORIM, V.B.O.; FERREIRA, C.F.; OLIVEIRA, S.A.S.; AMORIM, E.P. Agronomic characterization and identification of banana genotypes resistant to Fusarium wilt race 1. **Eur. J. Plant. Pathol**, 155, 1093–1103,2019.

GUERRA, A. G.; MEDEIROS, A.A. De.; SAMPAIO, L. M. B.; SAMPAIO, Y. de S.B.; MEDEIROS NETO, O. de. **Prospecção tecnológica para o**

**agronegócio dabanana no Rio Grande do Norte.** Natal, RN: EMPARN. 64p, 2009.

HADDAD, F.; OLIVEIRA, A. S. S.; PERITO, E.A **Coleção biológica de trabalho de *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense do laboratório de fitopatologia.** Cruz das Alma: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/info-teca/bitstream/doc/920961/1foldercolecaobiologicadetabalhodefusariumoxysporumINTERNET2.pdf>. Acesso em: 27 setembro. 2021.

HE, P.; SHAN, L.; SHEEN, J. Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. **Cellular Microbiology**. v. 9, p.1-12, 2007.

ICA., Instituto Colombiano Agropecuario. Accessed on; setembro 22, 2021.

LI, W.; GE, X.; WU, W.; WANG, W.; HU, Y.; MO, Y.; XIE, J. Identification of defense-related genes in banana roots infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4. **Euphytica**, Dordrecht, v.205, n.3, p.837- 849, 2015.

LI, WM.; DITA, M.; ROUARD, M. Deep RNA-seq analysis reveals key responding aspects of wild banana relative resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4. **Functional and Integrative Genomics** 20 p. 551–562, 2020.

MARQUES, A.C.G. **A sinalização por Ácido Jasmônico e a resistência a fungos biotróficos em videira.** Tese de mestrado, Biologia Molecular e Genética, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, 2015.

MARTINEZ, G.; OLIVARES, B.O.; REY, J.C.; ROJAS, J.; CARDENAS, J. MUENTES, C.; DAWSON, C. The Advance of Fusarium Wilt Tropical Race 4 in Musaceae of Latin America and the Caribbean: **Current Situation.** *Pathogens*, 12(2), 277, 2023.

MEDEIROS, R.B.; FERREIRA, M.A.S.V.; DIANESE, J.C. Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta patógeno. Ricardo. Editora Universidade de Brasília, p 290, 2003.

MINTOFF, T.V.; NGUYEN, C. K.; SAMANTHA, C. M. H.; ROBERT, W.; JEFFREY, W.D; LUCY, T.T. Tran-Nguyen. Triagem de campo de cultivares de banana para resistência a *Fusarium oxysporum* f.sp. Raça tropical cubense 4 na Território do Norte Sharl JL J. **Fungi**, 7, 627, 2021.

MOORE, N.Y, PEGG, K.G.; SMITH, L.J.; LANGDON, P.W.; BENTLEY, S. e SMITH, M.K. **“Fusarium wilt of banana in Australia”, em Banana Fusarium Wilt Gestão: Rumo ao cultivo sustentável.** Proceedings of the International Workshop on the Banana Fusarium wilt Disease, eds AB Molina, NH Nik Masdek e KW Liew (Los Baños: INIBAP), 64-75, 2001.

PLOETZ, R. C. Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens

referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. **Cubense**. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 6, p. 653-656, 2006.

PLOETZ, R. C. (2015). Management of *Fusarium* wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. **Crop Protection**, v.73, n.12, p.7-15, 2015.

PLOETZ, RC, editor Population biology of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Fusarium* wilt of banana; APS Press, 1990.

REBOUÇAS, T. A.; HADDAD, F.; FERREIRA, C. F.; OLIVEIRA, S. A. S. de; LEDO, C. A. D. S.; AMORIM, E. P. Identification of banana genotypes resistant to *Fusarium* wilt race 1 under field and greenhouse conditions. **Scientia Horticulturae**, v.239, p.308-313. 2018.

RIBEIRO, L. R.; SILVA, S. O.; OLIVEIRA, S. A. S.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; HADDAD, F. Sources of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in banana germplasm. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.40, n.1, p.1-8, 2018.

ROCHA, A.D.J.; SOARES, J.M.D.S.; NASCIMENTO, F.D.S.; SANTOS, A.S.; AMORIM, V.B.D.O.; FERREIRA, C.F.; HADDAD, F.; SANTOS-SEREJO, J.A.D.; AMORIM, E.P. Improvements in the Resistance of the Banana Species to *Fusarium* Wilt: A Systematic Review of Methods and Perspectives. **J. Fungi**. 2022a, v.7, 249.

ROCHA, A.D.J.; SOARES J.M.D.S.; NASCIMENTO, F.D.S.; ROCHA. A.J; AMORIM, V.B.O. D.; RAMOS, E.S.T.E; FERREIRA, C.F; HADDAD, F.; AMORIM, E.P. Molecular, histological and histochemical responses of banana cultivars challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* with different levels of virulence. **Plants**. v.11, p. 2339, 2022.

SILVA, S. de. O. E.; MATOS, A. P. De.; ALVES É. J. Melhoramento genético da bananeira. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v,33, n.5, p,693-703, 1998.

SILVA, S.O.; MATOS A.P.; 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 mal-do-Panamá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, p. 125-132, 2011.

SILVA, S. O. et al. Melhoramento genético da banana: estratégias e tecnologias disponíveis. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal*, v. 35, n. 3, p.919-931, set. 2013.

SILVA, P. R. O.; JESUS, O. N. de; BRAGANÇA, C. A. D.; HADDAD, F.; AMORIM, E. P.; FERREIRA, C. F. Development of a thematic collection of *Musa* spp accessions using SCAR markers for preventive breeding against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. *Genetics and Molecular Research*, v.15, n.1, p.3-9, 2016.

SILVA, S.O.; MORAIS, L.S.; SANTOS-SEREJO, J.A. **Melhoramento genético de bananeira para resistência a doenças**. In: ROMÃO, R.L.; RAMOS, S.R.R. (Ed.). Recursos genéticos vegetais no Estado da Bahia. Feira de Santana: UEFS, p.49-67.2005.

SCHEERER, L.; PEMSL, D. E.; DITA, M., PEREZ VICENTE, L., AND STAVAR, C. A quantified approach to projecting losses caused by Fusarium wilt tropical race 4. *ActaHortic.* 1196, 211–218, 2018a.

SMITH, L. J.; SMITH, M. K.; TREE, D.; KEEFE, D; KEEFE, and.; GALEA, V. J. Development of a small-plant bioassay to assess banana grown from tissue culture for consistent infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. **Australasian Plant Pathology**, 37, 171-179, 2008.

SMITH, M. K.; HAMILL, S. D.; LANGDON, P. W.; GILES, J. E.; DOOGAN, V. J.; & PEGG, K. G. Para o desenvolvimento de uma banana Cavendish resistente à raça 4 de murcha-de-fusário: irradiação gama de Parfitt anão micropropagado (*Musa* spp., grupo AAA, subgrupo Cavendish). *Jornal Australiano de Agricultura Experimental*, (2006).

STOVER R.H. Fusarial wilt (Panama disease) **of bananas and other Musa species**. UK: Commonwealth Mycological Institute; 117, p1962.

ORDEÑANA, K.M. **Mecanismos de defesa nas interações patógeno de planta Manejo Integrado de Pragas** (Costa Rica) No. 63 p. 2 2 - 3 2, 2002.

RAMAN, T.; SARASWATHI, M.S.; UMA, S.M.; BACKIYARANI, S.; DURAI. B.P.; RAJ, E.E.; MARIMUTH, N.; KANNAN, G.; SWENNEN, R. Identification of sources resistant to a virulent *Fusarium* wilt strain (VCG 0124) infecting Cavendish bananas. **Scientific reports**, 11(1), 3183, 2021.

ZHENG, S. J.; GARCÍA-BASTIDAS, F. A.; LI, X. D; ZENG, L.; BAI, T. T.; XU, S. T.; YIN, K. S.; LI, H. X. X.; FU, G.; YU, Y.C.; YANG, L.; NGUYEN, H.C.; DOUANGBOUPHA, B.; KHAING, A. A.; DRENTH, A.; SEIDL, M. F.; MEIJER, H. G. J.; KEMA, G. H. J. New incursions of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical Race 4 across the Greater Mekong Subregion. **Frontier in Plant Science**, v.4, n.5,p.208-218, 2018.

ZHAN, N.; KUANG, M.; HE, W.; DENG, G.; LIU, S.; LI, C.; ROUX, N.; DITA, M.; YI, G.; SHENG, O. Evaluation of Resistance of Banana Genotypes with AAB Genome to *Fusarium* Wilt Tropical Race 4 in China. **J. Fung**, 8, 1274, 2022.

ZUO, C.; DENG, G.; LI, B. Triagem de germoplasma de *Musa* spp para resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. **Eur J Planta Pathol** 4, p. 4–151 (723). 2018.

## CAPÍTULO I

**Resposta de diploides melhorados de bananeira na presença de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, raças 1 e subtropical 4, em casa de vegetação**

## **CAPÍTULO 1: Resposta de diploides melhorados de bananeira na presença de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, raças 1 e subtropical 4, em casa de vegetação**

**RESUMO.** A banana é um dos alimentos mais consumidos no mundo e uma das commodities agrícolas mais importantes para a economia mundial. No entanto, a incidência do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) é uma séria ameaça para a produção da fruta. O desenvolvimento de cultivares resistentes, por meio do melhoramento genético, é uma das estratégias mais eficazes para o controle dessa doença. Assim, este estudo objetivou avaliar 24 diploides melhorados de bananeira desenvolvidos pela Embrapa quanto a resistência a Foc raça subtropical 4 (ST4) e Foc raça 1 (R1), em casa de vegetação, mediante inoculação artificial. Aos 90 dias após a inoculação foi utilizada uma escala para sintomas internos e os genótipos foram categorizados de altamente resistentes à altamente suscetíveis. O diploide M53 foi considerado altamente resistente a Foc R1 e resistente a Foc ST4. Apenas o diploide CNPMF 0534 mostrou resistência completa a R1 e ST4, sendo que a resistência a esse último parece estar associada à penetração. Assim, os resultados aqui discutidos podem contribuir para o programa de melhoramento da bananeira e plátanos da EMBRAPA visto que os diploides selecionados podem ser utilizados em cruzamentos com cultivares comerciais para a obtenção de novos genótipos resistentes à Foc.

**Palavras chaves:** Musa spp; resistência genética; murcha de Fusarium.

## **CHAPTER 1: Behavior of improved banana diploids *against Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* races 1 and Subtropical 4 in a greenhouse**

**SUMMARY.** Banana is one of the most consumed foods in the world and one of the most important agricultural commodities for the world economy. However, the incidence of *Fusarium oxysporum* f. sp.  *cubense* (Foc) is a serious threat to fruit production. The development of resistant cultivars, through genetic improvement, is one of the most effective strategies for controlling this disease. Thus, this study aimed to evaluate 24 improved banana diploids developed by Embrapa for resistance to Foc subtropical race 4 (ST4) and Foc race 1 (R1), in a greenhouse, through artificial inoculation. At 90 days after inoculation, a scale for internal symptoms was used and genotypes were categorized from highly resistant to highly susceptible. The diploid M53 was found to be highly resistant to Foc R1 and resistant to Foc ST4. Only the diploid CNPMF 0534 showed complete resistance to R1 and ST4, and resistance to the latter seems to be associated with penetration. Thus, the results discussed here may contribute to EMBRAPA's banana and plantain breeding program, as selected diploids can be used in crosses with commercial cultivars to obtain new genotypes resistant to Foc.

**Keywords:** *Musa* spp; genetic resistance; *Fusarium* wilt.

## 1. INTRODUÇÃO

Bananas e plátanos (*Musa spp.*) são cultivados em mais de 150 países tropicais e subtropicais e exercem um papel importante principalmente na economia dos países em desenvolvimento (FAOSTAT, 2023). O cultivo de bananas é considerado um dos líderes na produção agrícola mundial, sendo a Índia o maior produtor, seguido da China, Indonésia e Brasil (FAOSTAT, 2023). Um dos principais fatores limitantes à produção de bananas e plátanos é a murcha de *Fusarium*, (PLOETZ et al., 2015; MINTOFF et al., 2021;). A doença é causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*(Foc), um fungo habitante de solo capaz de colonizar as plantas e levá-las a morte, adotando caminhos complexos para suprimir as defesas das plantas (PLOETZ, 2006;CHEN et al., 2019).

Os isolados de Foc patogênicos à bananeira estão inclusos dentro da *formaspecialis* (f. sp.) *cubense*, esses são divididos em três raças com base em suacapacidade de infectar diferentes cultivares (PLOETZ,2015; CHEN et al.,2019,). Raça 1 (R1) afeta cultivares dos subgrupos Gros Michel (AAA) e Maçã; a raça 2 (R2)tem como alvo cultivares do subgrupo Figo; e a raça 4 (R4) afeta todas as cultivaresdo subgrupo Cavendish (AAA) e todas as cultivares suscetíveis à R1 e à raça 2(PLOETZ, 2006; DITA et al., 2018; ROCHA et al., 2020). A raça 4 foi subdividida emraça tropical 4 (TR4) e raça subtropical 4 (ST4). TR4 afeta Cavendish em condições tropicais e subtropicais; já os isolados de Foc ST4 causam doença em cultivaresCavendish nos subtrópicos quando há fatores predisponentes, tais como extremos detemperatura ou estresse hídrico (BATISTA et al., 2022; BUDDENHAGEN, 2009). Asvariantes ST4 e TR4 podem ser distinguidas pelos grupos de contabilidade vegetativa(VCGs). Entre os 24 VCGs conhecidos de Foc, os VCGs 0120, 01201, 01202, 01209,01210, 01211, 01215, e 0120/15 estão associados ao Foc ST4; já em relação a FocTR4, apenas o VCG 01213/16 foi descrito (BUDDENHAGEN, 2009; DITA et al., 2018).

O Foc TR4 é uma séria ameaça ao cultivo de bananas e plátanos nas diversas áreas pelo mundo, além de ser amplamente disperso pelas regiões da Ásia, África e Austrália, tem se espalhado pelas áreas de cultivo das regiões da América Latina e Caribe, incluindo Venezuela, Peru e Colômbia (PLOETZ, 2015; GARCIA et al., 2020;MARTINEZ et al., 2023). Com essa ameaça, as pesquisas tomaram novos rumos, e os dados de prejuízos a bananicultura causados levaram à uma inquietação mundial e à busca por novas pesquisas com base em dados epidemiológicos, genéticos e de

manejo, tendo em vista que atualmente não há uma cultivar com um nível de resistência desejável que possa substituir as cultivares do subgrupo Cavendish (PLOETZ, 2015; ZHENG et al., 2018; DITA et al., 2018; ROCHA et al., 2022). Por isso, programas de melhoramento genético estão em busca de soluções para reduzir os impactos da murcha de *Fusarium*, bem como de pragas e estresses abióticos na cultura da bananeira (LI et al., 2015b; FERREIRA et al 2023).

Centros de pesquisa pelo mundo, como a *Fundación Hondureña de Investigación Agrícola* (FHIA), localizada em Honduras; *Centre Africain de Recherches sur Bananiers et Plantains* (CARBAP), nos Camarões; *International Institute of Tropical Agriculture* (IITA), na Nigéria e Uganda; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária(EMBRAPA), no Brasil; *National Banana Research Center* (NCRB), na Índia; *National Research Organization* (NARO) em Uganda; e *Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le*

*Développement* (CIRAD), na França, trabalham na busca por cultivares resistentes (ROCHA et al., 2022).

Nas pesquisas com Foc TR4, foi identificado que a predominância de genótipos resistentes está associada aos genomas diploide. Esses resultados indicam que, até o momento, as fontes de resistência ao Foc TR4 são majoritariamente compostas por diploides selvagens ou melhorados que ainda não foram utilizados no desenvolvimento de cultivares comerciais via hibridação, diferentemente do Foc R1, que apresenta um amplo painel de cultivares resistentes disponíveis (ROCHA et al., 2022a). A fim de aumentar a diversidade genética das cultivares de bananeira e alcançar a resistência à murcha de *Fusarium*, pesquisadores em todo o mundo têm coletado germoplasma, inclusive de parentes silvestres. Embora muitos acessos tenham sido avaliados em casa de vegetação e no campo, a avaliação da resistência ao Foc TR4 em um grande número de genótipos de bananeira é bastante limitada (LI et al., 2015; ZUO et al., 2018).

A Embrapa utiliza diploides melhorados como progenitores masculinos em cruzamentos com cultivares comerciais para desenvolver híbridos. Esses diploides são desenvolvidos a partir do cruzamento entre diferentes diploides selvagens, que são resistentes a diversas doenças as principais doenças que afetam o cultivo de banas

, como Sigatoka-amarela, Sigatoka-negra e à murcha de *Fusarium*, além de possuírem outras características agrônômicas de interesse para o melhoramento (AMORIM et al., 2013). Alguns parentais dos diploides melhorados desenvolvidos pela Embrapa tem como parentais os diploides selvagens Malaccensis, Tjau Lagada, Calcutta 4, e Tuu Gia, todos resistentes a Foc R1 e Sigatoka-negra (GONÇALVES et al., 2019). Nas pesquisas com Foc R4T, os parentais Calcutta 4 e Tuu Gia foram considerados recursos valiosos de genes de resistência. Esses parentais podem ser opções para melhoramento de bananeiras e para o estudo dos mecanismos de resistência à murcha de *Fusarium* (ZUO et al. 2018; CHEN et al. 2019; ROCHA et al. 2022a).

Considerando que os diploides melhorados tem papel chave no desenvolvimento de híbridos comerciais de bananeira, o presente estudo teve como objetivo avaliar o comportamento de 24 diploides melhorados combinando análises de sintomatologia após inoculações com Foc R1 e ST4, em casa de vegetação, e por meio da avaliações histoquímicas e histológicas para identificação de respostas de defesa das plantas x patógeno.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Localização**

A pesquisa foi conduzido sob condições de casa de vegetação na Embrapa Mandioca e Fruticultura no município de Cruz das Almas. De clima tropical quente úmido, segundo a classificação de Köppen, com temperatura média anual de 24,5 °C, umidade relativa de 80% e precipitação média anual de 1250 mm (AGRITEMPO, 2021).

### **2.2 Cepas de *Fusarium***

Os isolados pertencentes a R1 e ST4 identificados na coleção biológica do Laboratório de Fitopatologia da EMBRAPA, definidos respectivamente como Foc 0801 e Foc 218A foram selecionados para este estudo. O Foc 0801 é utilizado como padrão para R1, servindo como base para realização de estudos (Rocha et al., 2022b). O isolado 218A foi coletado no estado de São Paulo, causando sintomas na cultivar Nanica (Cavendish), e em estudos anteriores foi caracterizado como pertencente ao VCG 0120, classificado como um isolado de Foc ST4 (BATISTA et al., 2022).

Os isolados de Foc R1 e ST4 foram multiplicados a partir de culturas em placas contendo ágar batata dextrose (BDA) incubado em BODs com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h. Após o crescimento da colônia foi preparado o meio de cultivo composto por 20 ml de suspensão de esporos e 500 g de arroz autoclavado. O meio de cultivo foi incubado sob as mesmas condições das placas. Após 20 dias, uma diluição em série do arroz infestado foi preparada e as unidades formadoras de colônia (UFC) contadas a fim de ajustar a concentração e verificar a viabilidade de esporos. As UFCs foram contadas usando a câmara de Neubauer e concentração ajustada para 10<sup>6</sup> CFU/g de substrato (MADIGAN et al., 2016; FERREIRA et al., 2020;).

### 2.3 Materiais vegetais e crescimento

Foram utilizados diploides melhorados desenvolvidos pela Embrapa, exceção apenas para SH 3362 e SH 3263 criados pela FHIA em Honduras e M53 na Jamaica. As plantas enraizadas foram transferidas para tubos contendo substrato e aclimatadas em casa de vegetação por 30 a 45 dias até atingirem aproximadamente 15 cm de altura. Vinte e quatro diploides melhorados com genoma AA foram utilizados, além da cultivar Maçã, que foi avaliada como testemunha. Foi conduzido o experimento em delineamento inteiramente casualizado com dez repetições por genótipo. Informações sobre cada genótipo encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1** Diploides melhorados de bananeira avaliados contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *cabense* raça Subtropical 4 e raça 1 em casa de vegetação.

| Genótipo  | Genealogia                                                            |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------|
| M53       | [(Malaccensis – Kedah x banksii- Samoa)] x [(Paka x Banksii - Samoa)] |
| 001016-01 | Borneo x Guyod                                                        |
| 013004-04 | Malaccensis x Madang                                                  |
| 013018-01 | Malaccensis x Sinwobogi                                               |
| 013018-02 | Malaccensis x Sinwobogi                                               |
| 042085-02 | M53 x [(Madu x Calcutta 4)]                                           |
| 050012-02 | M61 x Lidi                                                            |
| 058054-03 | [(Calcutta 4 x Pahang)] x [(Borneo x Madang)]                         |
| 086094-20 | [(Calcutta 4 x Galeo)] x SH3263                                       |
| SH3263    | -                                                                     |

|               |                                                                               |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| SH3362        | -                                                                             |
| 013019-01     | Malaccensis x Tjau Lagada                                                     |
| CNPMF<br>0557 | [(M61 x Pisang Lilin)] x [(Malaccensis x Tjau Lagada)]                        |
| CNPMF<br>0496 | [(M61 x Pisang Lilin)] x [(Terrinha x Calcutta 4)]                            |
| CNPMF<br>0536 | [(Calcutta 4 x Madang)] x [(Borneo x Guyod)]                                  |
| CNPMF<br>0542 | [(SH3263)] x [(Malaccensis x Sinwobogi)]                                      |
| CNPMF<br>0612 | [(M53 x Madu) x Madu] x SH3263                                                |
| CNPMF<br>0731 | [(Malaccensis x Madang)] x [(Tuugia x Calcutta 4)]                            |
| CNPMF<br>0998 | [(Borneo x Guyod)] x [(Borneo x Guyod) x SH3263]                              |
| CNPMF<br>1323 | [(Malaccensis x Sinwobogi)] x [(Calcutta 4 x Heva)]                           |
| CNPMF<br>0513 | [(M61 x Pisang Lilin)] x [(M53 x Kumburgh)]                                   |
| CNPMF<br>0519 | Self-fertilization (wild diploid Tambi)                                       |
| CNPMF<br>0534 | [(Calcutta 4 x Madang)] x [(Borneo x Guyod)]                                  |
| CNPMF<br>0993 | [(Borneo x Guyod) x (Tuugia x Calcutta 4)] x [(Khai x (Calcutta 4 x Madang))] |
| Maçã          | -                                                                             |

### 2.3 Inoculação de plantas

As plantas foram aclimatizadas em bandejas com substrato composto de fibrade coco. Após completar 40 dias de aclimatização em casa de vegetação, as plantas foram transferidas para vasos com capacidade de 3L, onde foram aclimatadas por 15 dias até ser realizada a inoculação. Para realizar a inoculação das mudas com Foc R1, utilizou-se o arroz infestado na concentração de  $10^6$  CFU/g, aplicando-se 40 g distribuídos em quatro orifícios em volta das plantas. Para a infestação com o isoladode Foc ST4 utilizamos caixas de polietileno (0,54 m de altura e 0,75 m de diâmetro de base e 1,25 m de raio) com capacidade para 310 L completas com solo autoclavado. Esse solo foi infestado com o inóculo previamente preparado e as mudas já aclimatadas foram plantadas.

### 2.4 Avaliação dos sintomas

Os sintomas internos foram avaliados 90 dias após a infestação (DAI). As medidas associadas com os sintomas internos foram realizadas a partir do corte transversal do rizoma e observação da descoloração do rizoma de acordo com a

escala proposta por Dita (2014), correspondente as seguintes notas: 1: Sem sintomas; 2: Descoloração inicial do rizoma; 3: Ligeira descoloração do rizoma ao longo de todo o sistema vascular; 4: Rizoma com a maioria dos tecidos internos apresentando necrose; 5: Rizoma totalmente necrótico (DITA et al., 2014). A partir dos dados obtidos, foi estimado o índice de severidade da doença (ID), baseada na fórmula descrita por McKinney (1923), sendo:

$$ID = \left[ \frac{\sum(\text{nota da doença} \times \text{número de plantas com a nota})}{\text{número de plantas avaliadas por genótipo} \times \text{maior nota adotada na escala}} \times 100 \right]$$
 (número de plantas avaliadas por genótipo × maior nota adotada na escala)

Os sintomas foram expressos pela média das notas em cada nível de pontuação e o desvio padrão. Para classificar os genótipos em diferentes classes de resistência foi utilizado uma adaptação da classificação feita por Chen et. al. (2019) que utilizou uma escala de notas quantitativa em suas avaliações. Como em nossos dados foi utilizada uma escala de notas qualitativa, a classificação foi a seguinte: notas 1: altamente resistente; nota 1-2: resistente; notas 2-3: moderadamente resistente; notas 3-4: suscetível; notas 4-5: altamente suscetível.

Utilizando os índices de sintomas internos (IDs) foi realizada uma análise de agrupamento hierárquico dos genótipos baseada em um mapa de calor que produz uma interpretação gráfica onde os dados referentes a cada genótipo são representados por cores; sendo tons de verde associados a níveis de resistência e os de vermelho indicando suscetibilidade. O pacote estatístico utilizado para as análises foi gplots, no software R (R Core Development Team, 2016).

Utilizando o pacote “Performance Analytics” no R, uma análise de correlação de Pearson foi realizada entre os IDs relacionados a Foc R1, Foc ST4 e entre a média dos IDs de ambas as raças.

## 2.5 Análises histológicas e histoquímicas

### 2.5.1 Clareamento e coloração de estruturas fúngicas em raiz

Ao completar 90 DAI, as plantas foram avaliadas e delas foram coletados fragmentos de raízes que foram imediatamente imersos em solução de FAA (formaldeído-ácido acético-álcool). A análise de clarificação e a coloração das raízes para avaliar a presença de estruturas fúngicas foi realizada de acordo com um método descrito por Phillips (1970) com modificações. Para realizar a clarificação, as raízes foram imersas em solução de KOH 10% (hidróxido de potássio) à temperatura ambiente por 48 horas e depois transferidas para uma solução de HCl 1% por 30 min. Após o descarte da solução, esses fragmentos foram corados em corante azul de Trypan em solução a 0,05% lactoglicerol (ácido láctico 2:1:1: glicerol: água) por 1 hora. Após a coloração e retirada do excesso de corante, as lâminas foram preparadas e os fragmentos microfotografados em microscópio de luz (Olympus Latin America Inc., Tóquio, Japão).

### 2.5.2 Análise Histoquímica

Aos 90 DAI pequenos fragmentos de raízes (1-2 cm) foram coletados e imersos na solução Karnovsky (KARNOVSKY, 1995). Os fragmentos permaneceram na solução Karnovsky por 48h; posteriormente foram desidratadas em série etílica de etanol crescente com intervalo de três horas cada (30-100%). Foi realizada a infiltração e embloamento com historesina (hidroxietil

metacrilato, Leica Helderberg, Alemanha). Após o processo de polimerização da historesina, foram obtidos cortes histológicos (8 µm) em micrótomo Leitz 1516. Foram montadas lâminas com os cortes coradas com o corante (JOHANSEN et al., 1940) azul de anilina (FOSTER, 1949) para avaliar a presença de calose. Os cortes histológicos foram analisados e fotografados em microscópio de fluorescência B x S1 (Olympus Latin America Inc., Tóquio, Japão).

### 2.5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

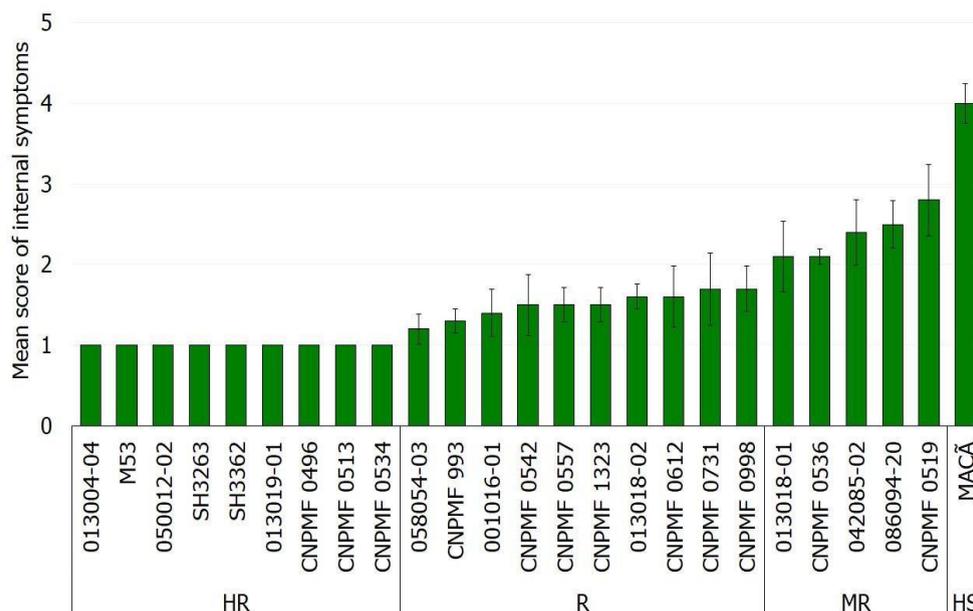
Foram coletadas amostras de raízes aos 90 DAI. Para iniciar o procedimento as amostras foram desidratadas em uma série de etanol e secas em um aparelho de ponto crítico (Leica EM CPD 030) usando CO<sub>2</sub> líquido. Em seguida, foram fixadas em um suporte metálico (*stubs*) com fita adesiva de carbono de dupla face e metalizadas com ouro em um dispositivo JEOL Smart Coater DII-29010SCTR. Após a metalização foram retiradas micrografias, realizadas com microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV no laboratório de microscopia eletrônica do Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador - BA.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Triagem para resistência à Foc R1

Ao final de três meses pós inoculação, e com base no corte do pseudocaulo próximo ao rizoma, foram classificados os genótipos considerando a presença de sintomas típicos de Foc R1, onde os diploides melhorados 013004-04, M53, 050012-02, SH3263, SH3362, 013019-01, CNPMF 0496, CNPMF 0513, CNPMF 0534 apresentaram resistência completa à Foc, uma vez que não foram observados sintomas de murcha de *Fusarium* (Figura 1). Os diploides melhorados 058054-03, CNPMF 0993, 001016-01, CNPMF 0542, CNPMF 0557, CNPMF 1323, 013018-02, CNPMF 0612, CNPMF 0731, e CNPMF 0998 apresentaram algumas pontuações ou descoloração ao redor do xilema e foram qualificados como resistentes. Na sequência foram identificados genótipos com leve descoloração do rizoma no seu sistema vascular, sendo então, classificados como moderadamente resistentes: 013018-01, CNPMF 0536, 042085-02, 086094-20, e CNPMF 0519.

Apenas a testemunha, representada pela cultivar Maçã, apresentou rizoma totalmente necrótico, o que a qualifica como altamente suscetível à Foc



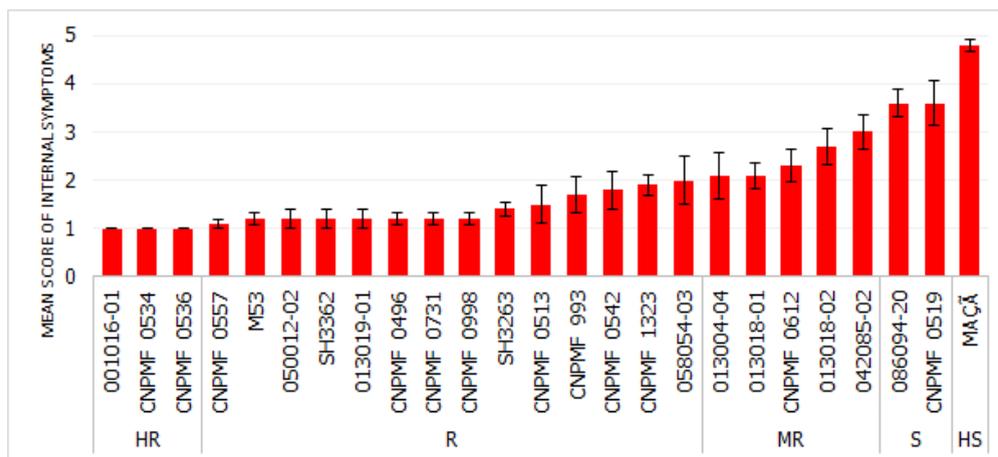
R1.

**Figura 1.** Resposta de diferentes diploides melhorados de bananeira à *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raça 1 em casa de vegetação, com base na escala de notas proposta por Dita et al. (2014). HR: high resistant; R: resistant; MR: moderately resistant; HS: high susceptible

### 3.2. Triagem para resistência à Foc ST4

Três diploides melhorados, 001016-01, CNPMF 0534 e CNPMF 0536 apresentaram resistência completa à Foc ST4, uma vez que não apresentaram sintomas internos na doença (Figura 2). Outros quatorze genótipos foram classificados como resistentes, por apresentarem algumas pontuações ou descoloração ao redor do xilema. Os diploides 013004-04, 013018-01, CNPMF 0612 e 013018-02, 042085-02, apresentaram leve descoloração do rizoma junto de todo o sistema vascular e foram classificados como moderadamente resistentes.

Em relação a suscetibilidade à Foc ST4, os diploides 086094-20 e CNPMF 0519 foram suscetíveis, já a cultivar Maçã altamente suscetível, com base na escala de notas adotada na avaliação.

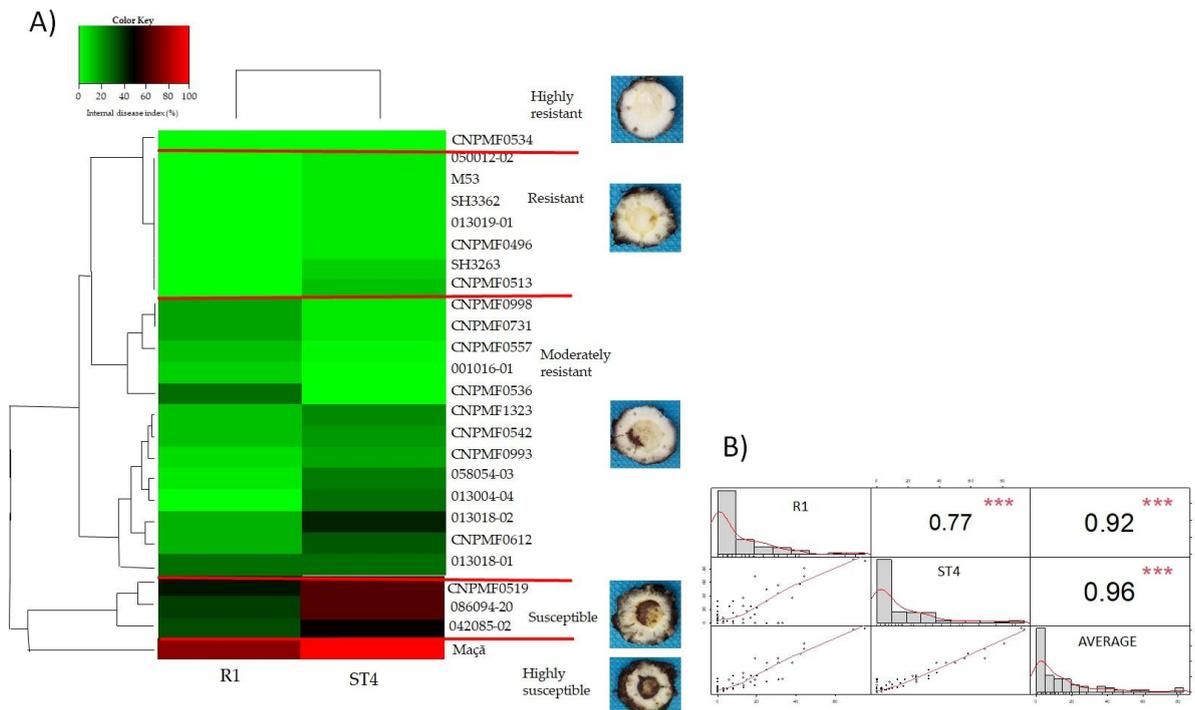


**Figura 2.** Resposta de diferentes diploides melhorados de bananeira a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raça subtropical 4 em casa de vegetação, com base na escala de notas proposta por Dita et al. (2014). HR: high resistant; R: resistant; MR: moderately resistant; S: susceptible; HS: high susceptible.

### 3.3. Análise de agrupamento entre os diploides para as respostas induzidas por FocR1 e Foc ST4

A análise de agrupamento explicado através do mapa de calor, considerandoos índices de doença estimados por genótipo nas avaliações para resistência a Foc R1 e Foc ST4 estão apresentados na Figura 3. Apenas o diploide melhorado CNPMF0534 apresentou alta resistência tanto a Foc R1 como ST4; os genótipos M53, 050012-02, SH3362, 013019-01, CNPMF 0496, SH3263, CNPMF 0513, 042085-02, foram resistentes e outros treze foram classificados como moderadamente resistentes. Os diploides 086094-20, e CNPMF 0519 agruparam-se como suscetíveis a cultivar Maçã formou grupo exclusivo como altamente suscetível, como já era esperado.

Uma análise de correlação entre os IDs das raças individualmente e da média de ambas, demonstrou alta correlação entre a avaliação de Foc R1 e ST4 (0,77), entre Foc R1 e a média dos IDs (0,92) e entre o Foc ST4 e a média (0,96) (Figura 3 B). Isso implica que os genótipos avaliados possuem resposta semelhante em relação a Foc R1 e ST4 e que é possível fazer a seleção considerando a média dos IDs das raças.

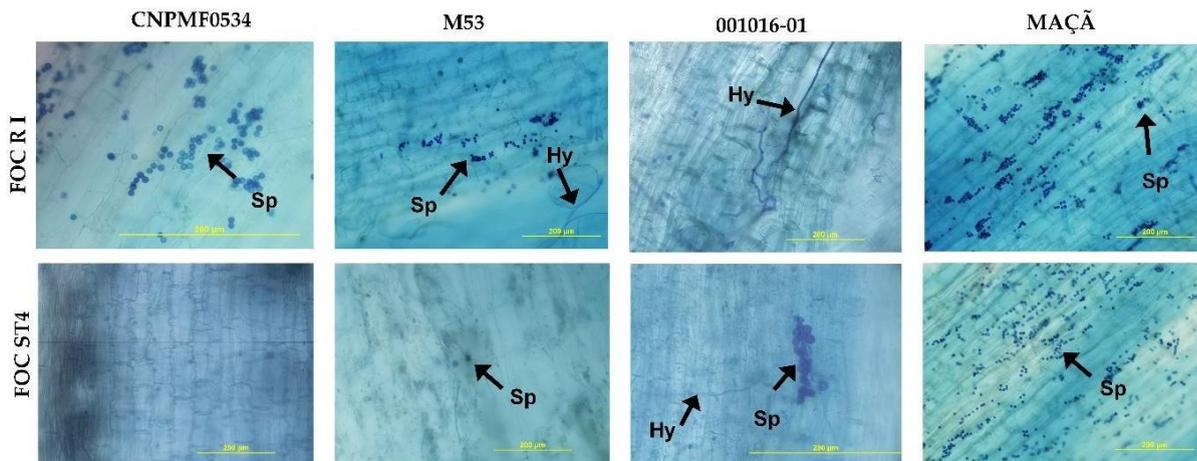


**Figura 3.** Análise de agrupamento entre diploides de bananeira quanto ao comportamento na presença de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* raças 1 e subtropical 4 em casa de vegetação (A). Análise de correlação de Person entre índices de sintomas internos de Foc raça 1 (R1), Foc subtropical 4 (ST4) e médias das raças (média) (B). HR: high resistant; R: resistant; MR: moderately resistant; S: susceptible; HS: high susceptible.

### 3.4. Análises Histológicas e Histoquímicas

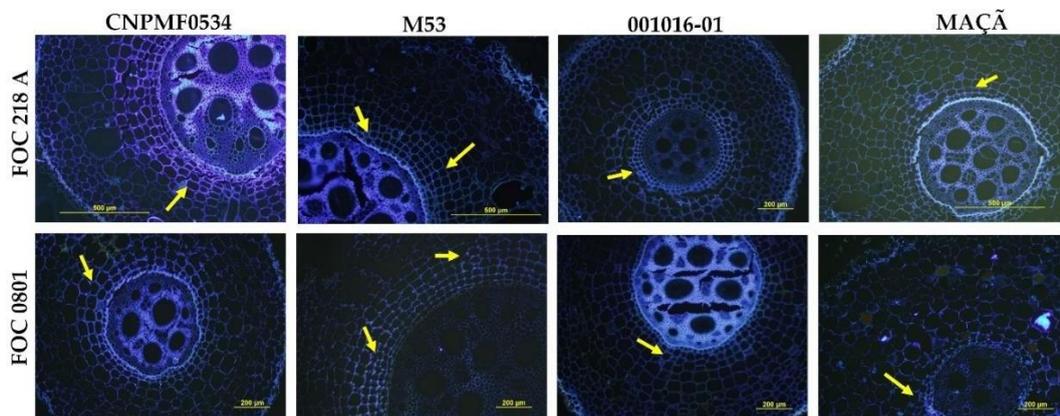
Independente do comportamento dos diploides, resistentes ou suscetíveis, observamos a presença de estruturas do patógeno nas raízes da grande maioria dos genótipos avaliados. Destaque para o diploide melhorado CNPMF 0534, altamente resistente, onde foram observados esporos, especificamente microconídios de Foc R1 nas raízes, os quais também foram observados na cultivar Maçã. Por outro lado, para Foc ST4, o referido diploide não apresentou estruturas de Foc nas raízes, fato que pode ter ocorrido pela ausência de penetração do fungo ou pela invalidade em colonizar os tecidos pós penetração (Figura 4).

No diploide M53 foi observada a presença de hifas fúngicas e esporos na interação com Foc R1; já em relação à interação com Foc ST4 foram vistos apenas esporos. No diploide 001016-01, avaliado como moderadamente resistente, foi observada a presença de esporos e hifas nos tecidos. Na cultivar Maçã houve a presença abundante de esporos na interação com ambos isolados (Figura 4).



**Figura 4.** Clareamento e coloração de estruturas fúngicas com corante azul Trypan em raízes de diploides melhorados de bananeira após infecção por isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* raças 1 e subtropical 4, 90 dias após a inoculação. SP: esporos; Hy: Hifas. Setas pretas indicam hifa (Hy) e esporos (SP). Foc: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*; R1: raça 1; e ST4: raça subtropical 4.

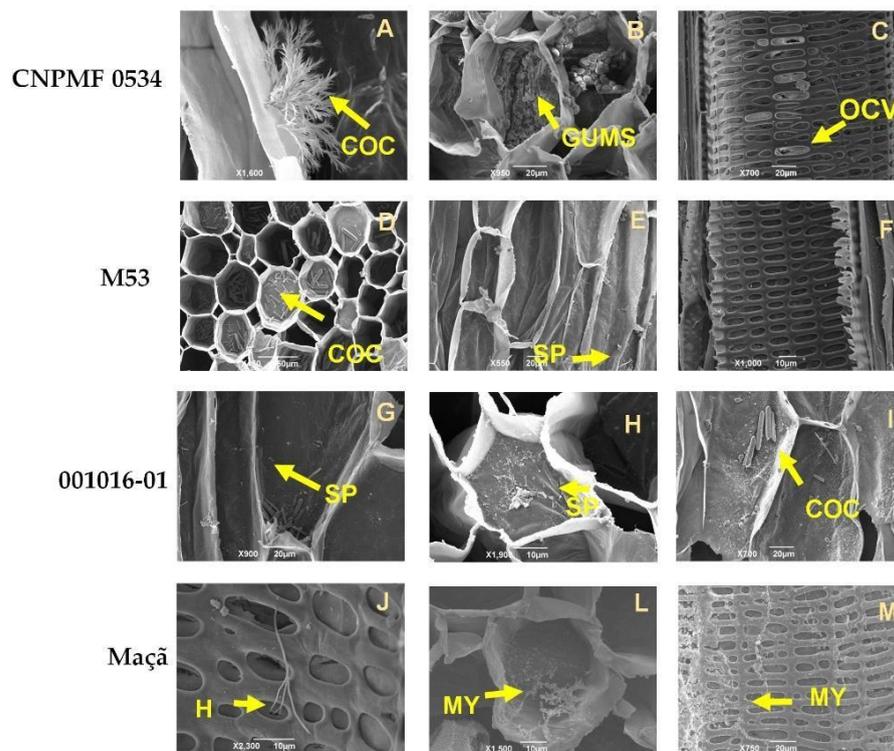
Ao realizar a coloração dos tecidos radiculares com o corante azul de anilina com o intuito de verificar a produção de calose, foi considerado que as amostras com a presença do mecanismo emitiram fluorescência azul-branca. No diploide CNPMF 0534 foi observada a emissão de fluorescência bem acentuada ao ser inoculado com os isolados Foc R1 e ST4 após 90 DAI (Figura 5); assim como também o diploide M53, avaliado como resistente, apresentou a fluorescência emitida pela planta indicando a presença de calose (Figura 5). O diploide 001016-01 avaliado como moderadamente resistente apresentou uma menor quantidade de emissão de calose. A cultivar Maçã, em resposta a inoculação com os isolados R1 e ST4, apresentou uma leve fluorescência indicando a presença de calose mesmo que em níveis baixos.



**Figura 5.** Seção transversal do rizoma de diploides melhorados de bananeira em micrografias de fluorescência e da cultivar Maçã infestadas por duas raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* 90 dias após inoculação e coradas com azul de anilina para detecção de calose. A fluorescência branco- azul indica a presença de calose nos tecidos. Foc: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*; R1: raça 1; ST4: raça subtropical 4; as setas amarelas indicam a produção de calose.

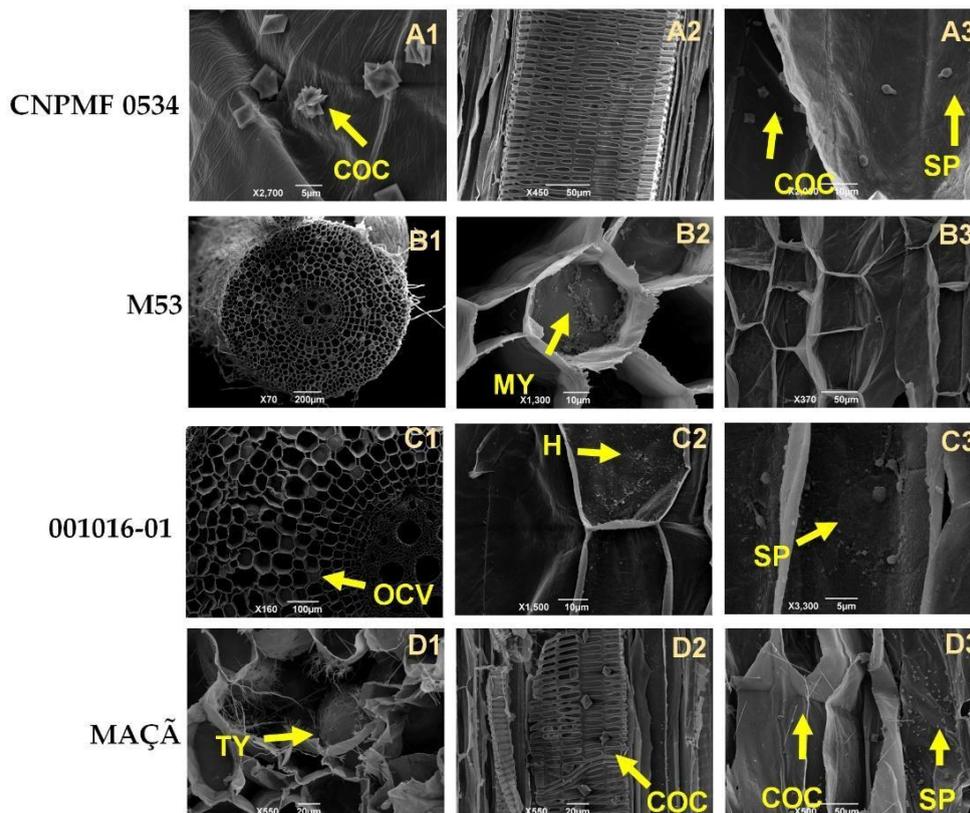
O estudo realizado por meio de MEV avaliou a interação de genótipos considerados contrastantes em relação a classificação de suscetibilidade ou resistência ao Foc R1 e ST4 em 90 DAI. Para ambos os casos, houve a percepção de uma variabilidade de estruturas e reações no tecido, incluindo a presença abundante de cristais de oxalato de cálcio que variaram em quantidade e formato, além de sinais de obstrução do tecido por gomas e estruturas do fungo, como micélio, hifas e esporos.

O diploide CNPMF 0534 avaliado como altamente resistente produziu cristais de oxalato de cálcio no tecido (Figura 7. A1), assim como gomas (Figura 7. A2) e oclusão de vasos (Figura 7. A3). No diploide M53, avaliado como resistente, foi observado uma grande deposição de cristais de oxalato de cálcio sobre os vasos, bem como de esporos do patógeno sobre o tecido (Figura 7. B1. B2). O diploide 001016-01, avaliado como moderadamente resistente, apresentou uma intensa infecção pelo Foc R1, sendo possível observar a concentração de esporos nos tecidos, como também a presença e alguns cristais de oxalato de cálcio (Figura 7. C1, C2, C3). Na cultivar Maçã observou-se o crescimento de hifas e micélio fúngico e obstrução dos vasos condutores (Figura 7. D1, D2, D3).



**Figura 7.** Seções longitudinais e transversais dos cortes de raízes de diploides melhorados de bananeira infestados por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raça 1 (R1). H: hifas; COC: cristais de oxalato de cálcio; MY: micélio; SP: esporos, GUMS: gomas, OCV: oclusão dos vasos.

Na interação dos genótipos com o Foc ST4, observou-se que o diploide CNPMF0534 apresentou uma intensa produção de cristais de oxalato de cálcio em formato de drusa (Figura 8. A1), além disso, não foram observadas obstruções de vasos, apenas esporos espalhados pelo tecido que ainda estavam em processo de germinação, indicando que o crescimento fúngico iniciou tardiamente, tendo em vista que essas análises foram realizadas aos 90 DAI (Figura 8. A2, A3). No diploide M53, classificado como resistente, foi observado pouca oclusão dos vasos, no entanto, onde houve o processo de oclusão foi observado o crescimento de micélios em alguns espaços (Figura 8. B2). No diploide 001016-01, avaliado como moderadamente resistente, foi observado a oclusão dos vasos e o crescimento de hifas (Figura 8. C2) além disso, foi observada a presença de cristais de oxalato de cálcio. Na cultivar Maçã, foi observada a presença de esporos, assim como a produção de cristais de oxalato de cálcio em formato de ráfide semelhante a uma agulha (Figura 8. D3), além da deposição de tilose (Figura 8. D1), que se caracteriza como o processo fisiológico de oclusão do xilema.



**Figura 8.** Seções longitudinais e transversais dos cortes de raízes de diploides melhorados de bananeira infestadas pelo isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* 90 DAP após inoculação (IRAS). Foc: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*; ST4: raça subtropical 4; H: hifas; COC: cristais de oxalato de cálcio; MY: micélio; SP: esporos; TY tiloses, OCV oclusão dos vasos.

#### 4. DISCUSSÃO

Neste estudo, 24 híbridos diploides melhorados de bananeira desenvolvidos pela Embrapa (exceções SH 3362, SH 3263 e M53) foram pela primeira vez avaliados para resistência a Foc R1 e ST4, em casa de vegetação. A classificação em diferentes categorias, a partir da escala de notas, propiciou a divisão dos diploides em altamente resistentes, resistentes, moderadamente resistentes, suscetíveis e altamente suscetíveis. De cada categoria foi selecionado um diploide para comparação por meio de análises histológicas e histoquímicas, sendo eles: CNPMF 0534 (altamente resistente), M53 (resistente), 001016-01 (moderadamente resistente) e a cultivar Maçã (altamente suscetível), utilizada como testemunha. Desses, apenas o híbrido diploide CNPMF 0534 apresentou resistência para ambas as raças, não apresentando a característica de descoloração dos feixes vasculares no rizoma, tendo todas as 10 plantas apresentado nota 1.

Utilizando a média das notas obtidas e o desvio padrão de dez repetições para o perfil de resposta dos diploides em relação as duas raças, observamos que dez genótipos foram agrupados na categoria altamente resistente na avaliação com Foc R1. Em contrapartida, apenas três foram agrupados nessa categoria quando avaliados para o Foc ST4 (Figuras 1 e 2). Além disso, houve diferenças relacionadas as categorias, pois na interação com o Foc ST4, dois diploides foram classificados como suscetíveis, com notas de 3 a 4, sendo que na interação com Foc R1 nenhum apresentou essa classificação.

Esses dados estão relacionados com a conhecida virulência e agressividade de isolados de ST4 em condições ambientais de extremos de temperatura, como frio intenso, característicos de algumas regiões do Brasil (BATISTA et al., 2022; ROCHA et al., 2022b). Além disso, esses dados reforçam a importância da utilização de isolados de Foc apropriados na seleção de genótipos resistentes, bem como dos métodos que exerçam a pressão de seleção necessária para acurácia das conclusões sobre a resistência em casa de vegetação para posterior análise em campo, como realizado em outros estudos (ZUO et al., 2018; CHEN et al., 2019; NDAYIHANZAMASO et al., 2020). Em uma análise de agrupamento e correlação, utilizando os IDs estimados de Foc R1 e de Foc ST4, demonstramos que os híbridos são classificados nas mesmas categorias para ambas as raças e que existe correlação positiva entre avaliações dos IDs de Foc R1 e ST4, bem como da média de ambos (Figura 3 B).

Em estudos realizados anteriormente, Gonçalves et al (2019) descreveu a capacidade de resistência dos diploides melhorados desenvolvidos pela Embrapa frente a Foc R1 em condições de campo, onde foi possível observar que os diploides CNPMF 1323, CNPMF 0612 e CNPMF 0534, CNPMF 0536, CNPMF 0998, CNPMF 0731, CNPMF 0542 apresentaram resistência a Foc R1, corroborando com os resultados do presente trabalho. Esses diploides melhorados têm como parentais os diploides Calcutta 4, M53, Malaccensis, Tjau Lagada, M61, e Tuu Gia, todos com resistência a raça 1 e ST4 confirmadas (RIBEIRO et al., 2018; ZUO et al., 2018; GONÇALVES et al., 2019; ROCHA et al., 2022a).

A partir de análises histológicas demonstramos que não há diferença entre genótipos altamente resistentes e suscetíveis para a presença de Foc R1 dentro

dos tecidos após o clareamento e coloração com azul de Trypan, confirmando os dados de que a penetração ocorre em ambos os casos, e que possivelmente as estratégias de defesa que distinguem os genótipos resistentes dos suscetíveis são após o processo de penetração, o que concorda com Li et al., (2015); Rocha et al. (2020); Ferreira et al., (2020); Rocha et al., (2022b). Diferentemente, na interação com Foc ST4, foi possível perceber diferença no diploide CNPMF 0534 que não apresentou estruturas do patógeno no interior do tecido, fato que pode estar associado à ausência de penetração ou do avanço na colonização, uma vez que foi considerado altamente resistente. Esses dados são confirmados na análise por MEV, sendo vistos apenas cristais de oxalato de cálcio no interior do tecido e seus esporos ainda estavam em processo de germinação nesse diploide, indicando um retardo na infecção (Figura 8 A1. e A3).

Tais descobertas foram semelhantes às obtidas em um estudo de interação de genótipos com Foc ST4 para selecionar e avaliar somaclones de bananeira resistentes. Os autores observaram que a ausência de estruturas do patógeno nos tecidos radiculares sugere que os somaclones resistentes podem ter desenvolvido barreiras físicas e/ou químicas para bloquear a penetração do patógeno (FERREIRA et al., 2020; REBOUCAS et al., 2021).

Em relação as análises por MEV, observamos que é constante a presença de cristais de oxalato de cálcio, além disso, a quantidade e distribuição no tecido parece estar associada com genótipos classificados como resistentes. Embora não existam dados específicos de que esses cristais tenham influência direta na resistência, foi documentado que suas formas e funções já foram associadas a mais de 215 famílias de plantas e outros dados revelam que esses cristais desempenham um papel importante, cuja degradação pode produzir espécies reativas de oxigênio que são relacionadas à resposta à infecção por patógenos e à inibição da infecção (NAKATA, 2003; CEITA et al., 2007).

Nosso resultado é consistente com outros que mostraram cristais de oxalato de cálcio produzidos em abundância na cultivar BRS Platina, híbrido tetraploide de bananeira do subgrupo Prata, inoculado com Foc ST4 que podem desempenhar papéis importantes na resistência (ROCHA et al., 2022b). Ademais, consideramos importante estudos posteriores para investigar o papel dos cristais de oxalato de cálcio não só na resistência de genótipos de bananeira à murcha de *Fusarium*, mas seu papel e diferenças em genótipos de diploides selvagens, considerando que são a base para o melhoramento genético vegetal e fonte primária de variabilidade genética existente nas espécies de *Musa* spp.

Nas análises histoquímicas, considerando que as plantas respondem ao ataque fúngico com a produção de alguns compostos químicos, foi realizada a avaliação de calose. Todos os genótipos apresentaram fluorescência indicando a presença desse composto, mas no diploide CNPMF 0534, identificado como altamente resistente, foram observados altos níveis de fluorescência, indicando um possível aumento da produção nas interações com Foc R1 e Foc ST4 (Figura 5). Isso pode ser associado ao fato de que o processo de deposição de calose é induzido por vários fatores, sobretudo os estresses bióticos e abióticos, como ataque de patógenos, metais pesados e ferimentos (ZAVALIEVE et al., 2010). A formação de calose, géis e tiloses nos vasos infestados foi relatada em plantas de bananeira resistentes como forma de imobilização dos esporos ao redor do local que contribui para impedir a invasão do patógeno durante a interação patógeno-hospedeiro (DONG et al., 2020; GARCÍA-VELASCO et al., 2020).

Os diploides melhorados CNPMF006; 013004-04, 013018-01, 013018-02,

013019-01, CNPMF0542, CNPMF0612, CNPMF1323 são resultado do cruzamento entre diploides selvagens, como, por exemplo, os genótipos diploides Malaccensis, Pahang, Calcutta-4, Pisang Lilin e Tuu Gia, que integram a genealogia de alguns deles. Esses diploides foram relatados na literatura com relação a resistência à Foc TR4 (ROCHA et al. 2022a). O diploide Malaccensis é promissor para uso em cruzamentos com cultivares elite visando transferir os alelos de resistência a Foc, uma vez que também possuem características relevantes para o melhoramento. Além disso, a resistência desse diploide pode ser verificada pelo isolamento de um gene de resistência (R) do tipo putativo de ligação a nucleotídeos e repetição rica em leucina (NB-LRR), oriundo de *Musa acuminata* ssp. *Malaccensis*, que já foi utilizado em experimentos transgênicos (PERAZA-ECHEVERRIA et al., 2008; DALE et al., 2017). Além do diploide Malaccensis, dez genótipos foram considerados resistentes à murcha de Fusarium, incluindo quatro diploides selvagens (Jaran, Birmanie, Pipit) e um híbrido tetraploide do tipo Maçã desenvolvido pela Embrapa, denominada BRS Princesa oriunda do cruzamento entre a Yangambi N<sup>o</sup>2 (AAB) e o diploide M53 (AA). O diploide Pahang foi amplamente estudado e apresentou resistência comprovada a Foc TR4 em experimentos em casa de vegetação e em campo (D'HONT et al., 2012; ZUO et al., 2018; ZHANG et al., 2018). No estudo de Zuo et al., (2018) além desse diploide, 129 acessos contidos em banco de germoplasma foram avaliados quanto à resistência ao Foc TR4 em casa de vegetação e em campo, identificando os acessos DH Phang, Tuu Gia, Calcutta 4 e Borneo como altamente resistentes. Esses genótipos também compõem a genealogia de alguns diploides melhorados avaliados neste estudo, como 013019-01, CNPMF0557, CNPMF0496, CNPMF0731, todos caracterizados como resistentes a Foc R1 e ST4.

O conjunto de análises realizadas no presente estudo permite inferir que a característica de resistência, principalmente a Foc ST4 de alguns diploides melhorados analisados, pode ser proveniente de parentais utilizados como seus progenitores. Os diploides CNPMF 0534 e CNPMF 0536, considerados altamente resistentes a Foc ST4, têm em sua genealogia o diploide Calcutta 4 e alguns diploides agrupados como resistentes têm em sua genealogia os diploides Malaccensis e Tuu Gia (Tabela 1). Esses parentes silvestres das bananas comestíveis já foram relatados como recursos valiosos de genes de resistência a Foc TR4 (ZUO et al., 2018; LI et al., 2020; ROCHA et al., 2022). Além disso, os híbridos diploides avaliados neste estudo CNPMF 0519, CNPMF 0557 e CNPMF 0612, apresentaram resistência total à Sigatoka-negra e têm potencial para uso em cruzamentos com cultivares comerciais suscetíveis, com o objetivo de transferir alelos de resistência para o germoplasma comercial (GONÇALVES et al., 2019). O diploide M53, genitor em cruzamentos para gerar algumas cultivares de interesse comercial foi avaliado como resistente a Foc R1 (GONÇALVES et al., 2019; RIBEIRO et al., 2018) e outros estudos já relataram sua resistência a Foc TR4 em campo severamente infestado (BETTER BANANAS, 2018).

Assim, os resultados aqui discutidos podem contribuir para programas de melhoramento de banana visto que os diploides melhorados avaliados como resistentes têm potencial e podem ser utilizados em cruzamentos com cultivares comerciais, sendo eles CNPMF 0519, CNPMF 0557 e CNPMF 0612 altamente resistentes a Foc ST4 e 013004-04, M53, 050012-02, SH3263, SH3362, 013019-01, CNPMF 0496, CNPMF 0513 e CNPMF 0534 altamente resistentes a Foc R1. Ademaisos híbridos diploides avaliados para ambas as raças como resistentes ou moderadamente resistentes, e que apresentaram um baixo nível de pontuação de sintomas de murcha de Fusarium, podem ser considerados com uma resistência quantitativa, e muito uteis na transferência de alguns genes de efeito menor, mas questão facilmente selecionáveis, além de serem eficientes em um sistema de cultivo baseado no manejo integrado.

## **5. CONCLUSÕES**

A triagem realizada neste estudo, para as condições avaliadas, permitiu selecionar os híbridos diploides CNPMF 0519, CNPMF 0557 e CNPMF 0612 altamente resistentes a Foc ST4 e 013004-04, M53, 050012-02, SH3263, SH3362, 013019-01, CNPMF 0496, CNPMF 0513 e CNPMF 0534 altamente resistentes a FocR1 que não apresentaram sintomas de murcha de Fusarium em casa de vegetação. O diploide CNPMF0534 apresenta resistência completa à ambas as raças avaliadas, sendo que para o Foc ST4 a resistência pode ser à inibição da penetração do fungo na planta.

## 6. REFERÊNCIAS

AMORIM, E.P.; SANTOS-SEREJO, J.A.; AMORIM, V. B. O.; FERREIRA, C.F.; SILVA, S. Banana breeding at Embrapa Cassava and Fruits. **Acta Horticulturae**,v.986, p.171-176, 2013.

AMORIM, E.P. Melhoramento genético In: FERREIRA, C. F. et al (org) O agronegócio da banana 1. ed. **Brasília-DF**, Embrapa/ Cruz das Almas.p.173-200,2016.

BETTER BANANAS. Panama TR4 Variety Screening Trial (December 2018) Sub-Trial Results (Plant and First Ratoon). Available online: <https://betterbananas.com.au/2022/03/04/panama-tr4-variety-screening-trial-december-2018-sub-trial-results-plant-and-first-ratoon/> (acesso em 3 janeiro 2023).

BATISTA, I.C.A.; HECK, D.W.; SANTOS A.; ALVES G.; FERRO, C.G.; DITA, M.;HADDAD, F.; MICHEREFF, S.J.; CORREIA, K.C.; DA SILVA C.F.B.; MIZUBUTIE.S.G. A População de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* no Brasil Não é Estruturada por Grupo de Compatibilidade Vegetativa ou por Origem Geográfica.**Fitopatologia**. 2022.

BUDDENHAGEN, I. Understanding the diversity of strains in *Fusarium oxysporum* f.sp. Cuban and history of introduction of the "Tropical Breed 4" to better manage banana production. **Acta Hortic.** v.828, 193-204, 2009.

CEITA, G.D.O.; MACEDO, J.N.A.; SANTOS, T.B.; ALEMANNI, L.; GESTEIRA,A.D.; MICHELI, F.; MARIANO, A.C.; GRAMACHO, K.P.; SILVA, D.D.C.; MEINHARDT, L.; et al. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Sci.** 173, 106–117, 2007.

CHEN, A.; SUN, J.; MATTHEWS, A.; ARMAS-EGAS, L.; CHEN, N.; HAMILL, S.;MINTOFF, S.; TRAN-NGUYEN, L.T.T.; BATLEY, J.; AITKEN, E.A.B. Assessing variations in host resistance to *Fusarium oxysporum* f sp. *cubense* race 4 in *Musa* species, with a focus on the subtropical race 4. **Front. Microbiol.**v.10, p.1062, 2019.

DALE, J., JAMES, A; PAUL, J. Y; KHANNA, H; SMITH, M; PERAZA-ECHEVERRIA, S. Transgenic cavendish bananas with resistance to *Fusarium* wilt tropical race 4.Nat. Commun. 8:1496 (2017).

D'HONT, A.; DENOEUDE, F.; AURY, J. M.; BAURENS, F. C.; CARREEL, F.; GARSMEUR, O.; NOEL, B.; BOCS, S.; DROC, G.; ROUARD, M.; DA SILVA, C.; JABBARI, K.; CARDI, C.; POULAIN, J.; SOUQUET, M.; LABADIE, K.; JOURDA, C.;LENGELLÉ, J.; RODIER-GOUD, M.; ALBERTI, A.; WINCKER, P. O genoma da bananeira (*Musa acuminata*) e a evolução das plantas monocotiledôneas.

*Natureza*, 488(7410), 213–217. (2012).

DITA, M.; BARQUERO, M.; HECK, D.; MIZUBUTE, E.S.G.; STAVAR, C.P.  
Fusarium

wilt of banana: current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. **Frontiers of Plant Science**. v.9, p.1468, 2018.

DITA, M.A.; PÉREZ, V.L.; MARTINEZ DE LA PARTE, E. Inoculation of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense causal agent of Fusarium wilt in banana. In Technical Manual: Prevention and Diagnostic of Fusarium Wilt (Panama Disease) of Banana Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Tropical Race 4 (TR4); VICENTE, L.P.; DITA, M.A.R.; MARTÍNEZ, E. Eds.; United Nations:FAO: Rome, Italy. p. 55–58, 2014.

DONG, H.; YE, Y.; GUO, Y.; LI, H. Comparison transcriptome analysis revealed resistance differences of Cavendish bananas to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 1 and race 4. **BMC Genom**. v.21.122, 2020.

FAOSTAT (2023) Estatística da produção e de comércio. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#home> (Acesso em 16 de Março de 2023).

FERREIRA, M.D.S.; MOURA, E.R.D.; LINO, L.S.M.; AMORIM, E.P.; SANTOS-SEREJO, J.A.D.; HADDAD, F. Selection of somaclonal variants of the cultivar 'Prata-Anã' for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 1. **Rev. Bras. Frutic**. v.42, 2020.

FERREIRA, M.D.S.; ROCHA, A.D.J.; NASCIMENTO, F.D.S.; OLIVEIRA, W.D.D.S.; SOARES, J.M.D.S.; REBOUÇAS, T.A.; MORAIS LINO, L.S.; HADDAD, F.; FERREIRA, C.F.; SANTOS-SEREJO, J.A.D.; et al. The Role of Somaclonal Variation in Plant Genetic Improvement: A Systematic Review. *Agronomy*, 13, 730, 2023.

FOSTER, A.S. *Practical plant anatomy*. 2. ed. Toronto. Van Nostrand. p. 228, 1949.

GARCIA, B.F.A.; QUINTERO-VARGAS, J.C.; AYALA-VASQUEZ, M.; SCHERMER, T.; SEIDL, M.F.; SANTOS-PAIVA, M.; NOGUERA, A.M.; AGUILERA-GALVEZ, C.; WITTENBERG, A.; HOFSTEDE, R. First report of wilt of *Fusarium* Tropical Breed 4 in Cavendish bananas caused by *Fusarium odoratissimum* in Colombia. **Planta Dis**. 2020.

GARCÍA-VELASCO, R.; PORTAL-GONZÁLEZ, N.; SANTOS-BERMÚDEZ, R.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, A.; COMPANIONI-GONZÁLEZ, B. Melhoramento genético para resistência à murcha de *Fusarium* em banana. **Revista Mexicana de Fitopatologia**, [S.l.], v. 39, n. 1, 2020.

GONÇALVES, Z.S.; HADDAD, F.; AMORIM, V.B.O.; FERREIRA, C.F.; OLIVEIRA, S.A.S.; AMORIM, E.P. Agronomic characterization and identification of banana genotypes resistant to *Fusarium* wilt race 1. *Eur. J. Plant. Pathol.* 155, 1093–1103, 2019.

JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**; Mc Graw Hill: New York, NY, USA, p. 523, 1940.

KARNOVSK, M.J. A formaldehydeglyutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell Biol**, v.27, 137, 1965.

LI, W.; G.E, X.; WU, W.; WANG, W.; HU, Y.; MO, Y.; XIE, J. Identification of defense-related genes in banana roots infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4. *Euphytica*, Dordrecht. v.205, n.3, p.837- 849, 2015b.

LI, W.M.; DITA, M.; ROUARD, M.; WU, W.; ROUX, N.; XIE, J.H.; GE, X.J. Deep RNA-seq analysis reveals key responding aspects of wild banana relative resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4. **Funct. Integr. Genom.** v.20, 551–562, 2020.

MINTOFF, T.V.; NGUYEN, C.K.; SAMANTHA, C.M.H.; ROBERT, W.; JEFFREY, W.D E LUCY, TT Tran-Nguyen. Field screening of banana cultivars for resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. Cuban tropical breed 4 in the North Shar.JL Territory. *J. Fungi*, v.7, p.627, 2021.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; BENDER, K.S.; BUCKLEY, D.H.; STAHL, D.A. *Microbiologia de Brock*. 14.ed. Porto Alegre: **Artmed Editora**, 2016.

NAKATA, P.A. Advances in our understanding of the formation and function of plasma calcium oxalate crystals. **Protoplasma**. 2003.

NDAYIHANZAMASO, P.; MOSTERT, D.; MATTHEWS, M.C.; MAHUKU, G.; JOMANGA, K.; MPANDA, H.J.; MDUMA, H.; BROWN, A.; UWIMANA, B.; SWENNEN, R.; et al. Evaluation of Mchare and Matooke Bananas for Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Race 1. **Plants**. v. 9, 1082, 2020.

MARTÍNE, G.; OLIVARES, B.O.; REY, J.C.; ROJAS J.; CARDENS. J.; MUENTES, C.; DAWSON, C. The Advance of *Fusarium* Wilt Tropical Race 4 in Musaceae of Latin America and the Caribbean: Current Situation. *Pathogens*, v.12(2), 277, 2023.

MCKINNEY, H.H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**. v.26, n.5, p.195-217, 1923.

PERAZA- ECHEVERRIA, S; DALE, J. L; HARDING, R. M; COLLET, C. Molecular cloning and in silico analysis of potential *Fusarium* resistance genes in banana. **Mol. Breed**. 23, 431–443 (2009).

PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Trans. Br. Mycol. Soc.** v.55, 158–161, 1970.

PLOETZ, R.C. Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as fusarium oxysporum f. sp. Cubense. *Phytopathology*, **Saint Paul**. v. 96, n. 6, p. 653-656, 2006.

PLOETZ, R.C. (2015). Management of Fusarium wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. **Crop Protection**. v.73, n.12, p.7-15, 2015.

RIBEIRO, L. R.; OLIVEIRA, S DE O.; OLIVEIRA, S.S.A. S DE.; AMORIM, E.P.; SEREJO, JAS; HADDAD. F. SOURCES OF RESISTANCE TO *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* IN BANANA GERMPLASM. **Rev. Bras. Frutic**, 2018.

REBOUÇAS, T.A.; HADDAD, F.; FERREIRA, C.F.; OLIVEIRA, S.A.S. DE.; LEDO, CADS.; AMORIM, E. P. Identification of banana genotypes resistant to Fusarium wilt race 1 under field and greenhouse conditions. **Scientia Horticulturae**. v.239, p.308-313, 2018.

REBOUÇAS, T. A., DE JESUS ROCHA, A., CERQUEIRA, T. S., ADORNO, P. R., BARRETO, R. Q., FERREIRA, M. D. S., MORAIS LINO, L. S., BATISTA DE OLIVEIRA AMORIM, V., ALMEIDA DOS SANTOS-SEREJO, J., HADDAD, F., FERREIRA, C. F., & AMORIM, E. P. Pre-selection of banana somaclones resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, subtropical race 4. *Crop protection (Guildford, Surrey)*, 147, 105692, (2021).

ROCHA, A.J.; FERREIRA, M.S.; ROCHA, L.S.; OLIVEIRA, S.A.; AMORIM, E.P.; MIZUBUTI, E.S.; HADDAD, F. Interaction between *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and *Radopholus similis* may lead to changes in the resistance of banana cultivars to Fusarium wilt. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht. v.4, p.1-15, 2020.

ROCHA, A.D.J.; SOARES, J.M.D.S.; NASCIMENTO, F.D.S.; SANTOS, A.S.; AMORIM, V.B.D.O.; FERREIRA, C.F.; HADDAD, F.; SANTOS-SEREJO, J.A.D.; AMORIM, E.P. Improvements in the Resistance of the Banana Species to Fusarium Wilt: A Systematic Review of Methods and Perspectives. **J. Fungi**. v.7, 249, 2022a.

ROCHA, A.D.J.; SOARES J.M.D.S.; NASCIMENTO, F.D.S.; ROCHA; AMORIM, V.B.O.D.; RAMOS, E.S.T.E; FERREIRA, C.F; HADDAD, F.; AMORIM, E.P. Molecular, histological and histochemical responses of banana cultivars challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* with different levels of virulence. **Plants**. (b), v.11, 2339, 2022b.

ZUO, C.; DENG, G.; LI, B.; HUO, H.; LI, C.; HU, C.; KUANG, R.; YANG, Q.; DONG, T.; SHENG, O.; et al. Germplasm screening of *Musa* spp. for resistance to

*Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4 (Foc TR4). **Eur. J. Plant. Pathol.** v.151, 723–734, 2018.

ZHENG, S.J.; GARCÍA-BASTIDAS, F.A.; LI, X.D.; ZENG, L.; BAI, T.T.; XU, S.T.; YIN, K.S.; LI, H.X.X.; FU, G.; YU, Y.C.; YANG, L.; NGUYEN, H.C.; DOUANGBOUPHA, B.; KHAING, A.A.; DRENTH, A.; SEIDL, M.F.; MEIJER, H.G.J.; KEMA, G.H.J. New incursions of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical Race 4 across the Greater Mekong Subregion. **Frontier in Plant Science.** v.4, n.5, p.208-218, 2018.

ZAVALIEV, R.; UEKI, S.; EPEL, B.L.; CITOVSKEY, V. Biologia do turnover de calose( $\beta$ -1,3-glucano) em plasmodes mata. 2010.

## **CAPÍTULO II**

**Avaliação da resistência de genótipos de bananeira tipo Prata e Cavendish contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* raça Subtropical 4 em casa de vegetação**

## **CAPÍTULO 2: Avaliação da resistência de genótipos de bananeira tipo Prata e Cavendish contra *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raça Subtropical 4 em casa de vegetação**

**RESUMO.** A bananicultura é uma das atividades agrícolas de maior relevância para o setor agrícola, cultivada em muitos países, encontra-se entre as atividades agrícolas de maior expressão econômica e social. No Brasil, um grande contingente da produção se dá pelo cultivo realizado por pequenos produtores. As cultivares do subgrupo Prata são as mais difundidas no Brasil, com maior aceitação no mercado interno; já as cultivares do subgrupo Cavendish são mais aceitas para exportação. No entanto, doenças que acometem a produção de bananas, como a murcha de *Fusarium*, vem comprometendo seu cultivo. Nesse sentido, o desenvolvimento de cultivares resistentes à murcha de *Fusarium* é o foco de diversos programas de melhoramento. Assim, este estudo objetivou a análise de genótipos de bananeira tipo Prata e Cavendish coletados em fazendas de diferentes regiões do Brasil, para verificar a existência de variabilidade genética relacionada à resistência à Foc ST4. Os genótipos foram avaliados em casa de vegetação e noventa dias após o processo de inoculação, por meio de escalas de notas para avaliar sintomas internos, foram classificados como altamente resistentes, resistentes, moderadamente resistentes, suscetíveis e altamente suscetíveis. Entre os genótipos tipo Prata, o híbrido Embrapa 02 foi caracterizado como altamente resistente e os genótipos Embrapa 03 e BGB 170, como moderadamente resistentes. Entre os genótipos tipo Cavendish, o BGB 271, BGB 151, BGB 268 foram classificados como resistentes; o BGB 150 e o BGB 154 como moderadamente resistentes. Pelos resultados é possível afirmar que existe variabilidade quanto a resposta à Foc ST4 entre os tipos Prata e Cavendish tradicionalmente cultivado em fazendas em diferentes regiões do Brasil.

Palavras-chave: Bananeira, controle genético, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

## **CHAPTER 2: EVALUATING THE RESISTANCE OF PRATA AND CAVENDISH BANANA GENOTYPES AGAINST FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. CUBENSE RACE SUBTROPICAL 4 IN GREENHOUSE**

**SUMMARY.** Banana farming is one of the most relevant agricultural activities for the agricultural sector, cultivated in many countries, it is among the agricultural activities with the greatest economic and social expression. In Brazil, a large part of the production comes from cultivation carried out by small producers. The cultivars of the Prata subgroup are the most widespread in Brazil, with greater acceptance in the domestic market, the cultivars of the Cavendish subgroup are more accepted for export. However, diseases that affect banana production, such as Fusarium wilt, have been compromising the crop. In this sense, the development of cultivars resistant to fusarium wilt is the focus of several breeding programs. Thus, this study aimed to analyze genotypes of Prata and Cavendish bananas traditionally cultivated for several years on farms in different regions of Brazil, in order to verify the existence of genetic variability related to resistance to Foc ST4. The genotypes were evaluated in a greenhouse ninety days after the inoculation process, using rating scales to assess internal symptoms, classifying them as highly resistant, resistant, moderately resistant, susceptible and highly susceptible. The selection was carried out considering the average of the grades and the standard deviation. Among the Prata-type genotypes, the Embrapa 2 hybrid was characterized as highly resistant and the Embrapa 3 and BGB170 genotypes as moderately resistant. Among the Cavendish genotypes, BGB 271, BGB 151, BGB 268 was categorized as resistant, BGB 150, BGB 154 was characterized as moderately resistant. From the results it is possible to affirm that there is variability regarding the response to Foc ST4 among the Silver types; and Cavendish traditionally cultivated on farms in different regions of Brazil.

**Key words:** Banana, genetic control, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

## 1. INTRODUÇÃO

A banana é uma das frutas mais produzidas, comercializadas e consumidas em todo o mundo com aproximadamente 105 milhões de toneladas produzidas a cada ano (FAOSTAT, 2023). O cultivo da fruta ocorre em mais de 150 países, com destaque para as regiões da Ásia, Américas e da África respondendo respectivamente por 52,1%, 29,4% e 16,6% dos rendimentos mundiais (FAOSTAT, 2022). De acordo com o último levantamento da FAO, os cinco países que mais produzem bananas são Índia com aproximadamente 33,1 milhões de toneladas, a China com 11,7 milhões, a Indonésia com 8,7 milhões, o Brasil com 6,8 milhões e Equador com 6,6 milhões de toneladas (FAOSTAT 2023). O cultivo de banana ocorre geralmente em regiões de clima tropical, onde é responsável pela geração de renda, e por dinamizar a economia local (RAMBO et al., 2015). No ano de 2017 o Brasil foi responsável por uma produção equivalente a 6,7 milhões de toneladas, essa produção ocupou uma área de 517 mil hectares, o que levou a bananicultura a se considerar no ano de 2018 um dos cultivos de maior importância social e econômica, por isso considerado um dos 10 alimentos básicos (FAO, 2022; DITA et al., 2018; IBGE, 2022). No ano de 2020 a área de produção de banana correspondeu a 456 mil hectares, desse cultivo foi colhido 6,0 milhões de toneladas de frutos (IBGE, 2022).

Parte da produção de bananas do Brasil é cultivada em áreas marginais devido à incidência de patógenos, esse cultivo está relacionado às cultivares Prata, e seda (cv 'Maçã') que são as mais consumidas pelos brasileiros. No ano de 2017 a região localizada no Oeste da Bahia, Bom Jesus da Lapa banhada pelo rio São Francisco, destacou-se por ser a maior região produtora de Bananas do Brasil, produzindo 21.000 toneladas por hectare (IBGE, 2021).

Existem mais de 1000 variedades de bananas cultivadas em todo o mundo, subdivididas em 50 grupos dos quais cerca de 40% são do tipo Cavendish respondendo por aproximadamente 50% da produção global, que é destinada quase que exclusivamente à exportação (FAO 2022; THANGAVELU et al. 2021). O restante da produção, é composta por uma ampla gama de variedades de bananas e plátanos cultivadas por agricultores familiares para consumo próprio e comércio local (DALE et al. 2017). No Brasil existem vários tipos de bananas cultivadas, com destaque para os tipos de "Maçã", Nanica (Cavendish), Prata, Ouro e Pacovan, que estão distribuídas em diferentes regiões e Estados como São Paulo, Bahia, Minas Gerais e Santa Catarina (IBGE, 2021; COLTRO E KARASKI, 2019; HADDAD et al. 2018).

Em todas as regiões globais a produção de bananas está seriamente ameaçada pela raça tropical 4 (R4T) que é uma cepa altamente virulenta do patógeno fúngico *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), causador da murcha de Fusarium. Informações oficiais indicam que R4T está atualmente confirmado em 21 países e a avaliação indicativa do impacto potencial econômico da doença na produção e comércio mundial mostraram que uma maior disseminação de R4T implicaria na perda considerável de renda e emprego no setor bananeiro principalmente nos países afetados, bem como preços significativamente mais elevados para o consumidor nos países importadores (FAO 2022).

Embora existam muitos esforços para o controle de Foc R4T, infelizmente

nemos fungicidas, devido aos altos custos e riscos à saúde humana, nem o controle cultural ou biológico, devido a dinâmica do inóculo primário, foram suficientemente eficazes para a produção sustentável de cultivares suscetíveis em solos infestados, apenas para a produção de cultivares com a resistência quantitativa, onde o inóculo primário pode ser afetado por práticas culturais como a destruição de plantas infectadas ou uso de material de propagação limpo (PLOETZ, 2006a; LI et al., 2014; DITA et al. 2018). Nesse sentido, a identificação de fontes de resistência em germoplasma ou em cultivares comerciais, a fim de caracterizar genótipos altamente resistentes é atualmente a forma mais aceita para dar continuidade ao cultivo por ciclos mais longos, sobretudo em solos infestados.

Nesse sentido, avaliações de acessos de bananeira silvestres e cultivares em casa de vegetação e em campo foram realizadas por diferentes instituições de pesquisa para determinar a resistência a Foc (LI et al., 2014; LI et al., 2015; THANGAVELU et al., 2021; ROCHA et al., 2022; ZHAN et al., 2022). Dentre o conjunto de acessos avaliados, alguns parentes silvestres de bananas comestíveis, como *M. itinerans*, Pahang, Calcuta 4, DH Pahang e Tuu Gia, foram relatados como fonte de genes de resistência que podem ser usados em programas de melhoramento para obtenção de cultivares resistentes (ZUO et al., 2018; ROCHA et al., 2022). A exemplodisso, as bananas triploides referidas como East African Highland bananas (EAHB), como por exemplo, os híbridos Mchare e Matooke são resistentes a Foc raça 1 e R4T (NDAYIHANZAMASO et al. 2020; ZUO et al., 2018; ROCHA et al., 2022; ZHAN et al., 2022). Outros híbridos identificados como resistentes a Foc R4T em testes de campo foram desenvolvidos pela Fundação Hondurenha de Investigação Agrícola (FHIA), como FHIA-01, FHIA-18 e FHIA-25, que compartilham do mesmo genitor masculino SH-3142 (MINTOFF et al., 2021).

A caracterização de germoplasma resistente a murcha de Fusarium no Brasil identificou a existência de variabilidade genética em bancos de germoplasma em relação a resistência a Foc R1 (RIBEIRO et al., 2016; SILVA et al., 2013). Alguns diploides como Jaran, Birmanie, Pipit e Malaccensis foram relatados como opções para uso em cruzamentos por possuírem alelos de resistência à Foc raça 1 (REBOUÇAS et al. 2018). Uma avaliação em área de campo infestada artificialmente com Foc R1 selecionou alguns híbridos diploides e tetraploides do tipo Prata e Pacovan resistentes, utilizando diferentes índices de seleção (GONÇALVES et al., 2019).

No estudo atual, genótipos de bananeira tipos Prata e Cavendish cultivados tradicionalmente por vários anos em fazendas de diferentes regiões do Brasil, e que apresentaram diferentes características agrônômicas, como maior produtividade e qualidade do cacho, foram amostrados e testados para verificar a existência de variabilidade genética relacionada a resistência à Foc ST4. Este é o primeiro estudo com um painel de genótipos representativos dos tipos Prata e Cavendish no Brasil visando fazer uma prospecção sobre uma possível resistência à Foc ST4 e será importante para indicar os riscos e as medidas de prevenção contra Foc R4T, já que grande parte dos genótipos testados desempenham papel importante na segurança alimentar e de subsistência.

## 2. METODOLOGIA

## 2.1. Localização

O experimento foi conduzido sob condições de casa de vegetação na Embrapa Mandioca e Fruticultura no município de Cruz das Almas. O clima é classificado como tropical quente úmido, com temperatura média anual de 24,5 °C, umidade relativa de 80% e precipitação média anual de 1250 mm (AGRITEMPO, 2021).

## 2.2. Cepa de Foc e preparo de inóculo

O isolado selecionado para este estudo foi proveniente de um acervo de isolados de Foc do laboratório de fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura,

representativos de várias regiões do Brasil e está sob o código Foc 229A. Esse isolado foi coletado na região sudeste do país, especificamente em fazendas no estado de São Paulo, sua caracterização foi através de grupos de compatibilidade vegetativa, afirmando pertencer ao VCG 0120, associado a Foc ST4, por isso, tomaremos em nosso estudo o isolado Foc 229A como ST4 (COSTA et al., 2014; ROCHA et al., 2022b).

O inóculo foi preparado em placas contendo ágar batata dextrose (BDA) incubado em BODs com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12h. Após o crescimento das colônias foi preparada uma suspensão de esporos e o inóculo foi produzido utilizando arroz como meio de cultivo (20 ml de suspensão de esporos e 500 g de arroz autoclavado). O meio de cultivo foi incubado em BOD em temperatura de 25 °C e passados 20 dias foram contabilizadas as unidades formadoras de colônia (UFC) pela contagem do número de esporos em câmara de Neubauer onde foi realizado o ajuste do inóculo para  $10^6$  CFU/g de substrato.

## 2.3. Material vegetal e crescimento

Foram selecionados para este estudo genótipos de bananeira coletados em áreas de produtores, formando uma amostra representativa da variabilidade de campo de cultivares pertencentes aos subgrupos dos tipos Prata e Cavendish. Além disso, foram avaliados três novos híbridos tetraploides do tipo Prata desenvolvidos pela Embrapa. Após o enraizamento em cultivo in vitro, os genótipos foram transferidos para bandejas contendo substrato de fibra de coco, onde foram aclimatizados por 45 dias em casa de vegetação até atingir aproximadamente 15 cm de altura. Foram avaliados 20 genótipos, além das cultivares Grande Naine e Prata Anã avaliadas como testemunhas controle. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com dez repetições por genótipo.

**Tabela 1.** Genótipos de bananeira Tipo Prata e Cavendish avaliados para teste de resistência a Foc ST4 em casa de vegetação.

| <b>Nome</b> | <b>Ploidia</b> | <b>Subgrupo</b> | <b>Nome</b>  | <b>Ploidia</b> | <b>Subgrupo</b> |
|-------------|----------------|-----------------|--------------|----------------|-----------------|
| BGB159      | AAB            | Prata           | BGB 150      | AAA            | Cavendish       |
| BGB166      | AAB            | Prata           | BGB 268      | AAA            | Cavendish       |
| BGB170      | AAB            | Prata           | BGB 271      | AAA            | Cavendish       |
| BGB179      | AAB            | Prata           | BGB 151      | AAA            | Cavendish       |
| BGB208      | AAB            | Prata           | BGB 304      | AAA            | Cavendish       |
| BGB167      | AAB            | Prata           | BGB 154      | AAA            | Cavendish       |
| BGB168      | AAB            | Prata           | Zelig        | AAA            | Cavendish       |
| BGB188      | AAB            | Prata           | Grande Naine | AAA            | Cavendish       |
| Embrapa 01  | AAAB           | Prata           |              |                |                 |
| Embrapa 02  | AAAB           | Prata           |              |                |                 |
| Embrapa 03  | AAAB           | Prata           |              |                |                 |
| Prata-Anã   | AAB            | Prata           |              |                |                 |

#### 2.4. Inoculação de plantas e avaliação de sintomas

Após aclimação, as mudas foram transferidas para vasos com capacidade de 3L contendo substrato de fibra de coco. Para realizar a inoculação, foi utilizado um total de 40 g de arroz infestado com Foc através de quatro orifícios em torno das plantas expondo as raízes e adicionado 10 g em cada furo. Os sintomas internos foram analisados 90 dias após inoculação, a partir do corte transversal do rizoma, de acordo com a escala correspondente a notas de 1 a 5, onde: 1: correspondia a planta sem sintomas; 2: Descoloração inicial do rizoma; 3: Ligeira descoloração do rizoma ao longo de todo o sistema vascular; 4: Rizoma com a maioria dos tecidos internos apresentando necrose; e 5: Rizoma totalmente necrótico (DITA et al. 2014). Os sintomas foram expressos pela média das notas em cada nível de pontuação e seu desvio padrão. Os genótipos foram classificados em diferentes classes de resistência, e foi realizada uma adaptação da classificação feita por Chen et. al. (2019) por meio de uma escala de notas quantitativa em suas avaliações. Como em nossos dados foi utilizada uma escala de notas qualitativa, a classificação foi a seguinte: notas 1: altamente resistente; nota 1-2: resistente; notas 2-3: moderadamente resistente; notas 3-4: suscetível; notas 4-5: altamente suscetível.

#### 2.5. Análises histológicas e histoquímica

Aos 90 dias após a inoculação, fragmentos de raízes foram coletados com aproximadamente 2,0 cm para realização de clareamento e coloração de estruturas fúngicas em raiz de acordo com um método descrito por Phillips (1970)

com modificações. Os fragmentos foram imediatamente imersos em solução de FAA (formaldeído-ácido acético-álcool) para fixação dos tecidos. Para clarificação, as raízes foram imersas em solução de KOH 10% (hidróxido de potássio) à temperatura ambiente por 48h e depois em solução de HCl 1% por um período de 30 min. As raízes foram coradas com o corante azul de trypan em solução a 0,05% (ácido láctico: glicerol: água; 2:1:1; v: v: v) permanecendo ali por 1h, o corante foi descartado e as raízes foram imersas em solução de lactoglicerol (ácido láctico: glicerina: água; 2:1:1; v: v: v) para retirada do excesso do corante. Após esse processo, as lâminas foram preparadas e os fragmentos microfotografados em microscópio de luz (Olympus Latin America Inc., Tóquio, Japão).

Para análise histoquímica os fragmentos de raízes foram imersos na solução Karnovsky (Karnovsky, 1995). Após um período de 48h na solução Karnovsky os fragmentos foram desidratados em série etílica de etanol crescente com intervalo de três horas cada (45-100%). Posteriormente, foi realizado o processo de infiltração e emblocagem com historesina (hidroxietil metacrilato, Leica Helderberg, Alemanha). Após o processo de polimerização da historesina, foram obtidos em micrótomo Leitz 1516, cortes histológicos (8 µm). Foram montadas lâminas com os cortes e coradas com solução 0,01% azul de anilina durante 10 min para avaliação de calose. Para análise do material os cortes histológicos foram fotografados em microscópio de fluorescência B x S1 (Olympus Latin America Inc., Tóquio, Japão) (JOHANSEN et al., 1940; FOSTER, 1949).

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Avaliação de genótipos tipo Prata**

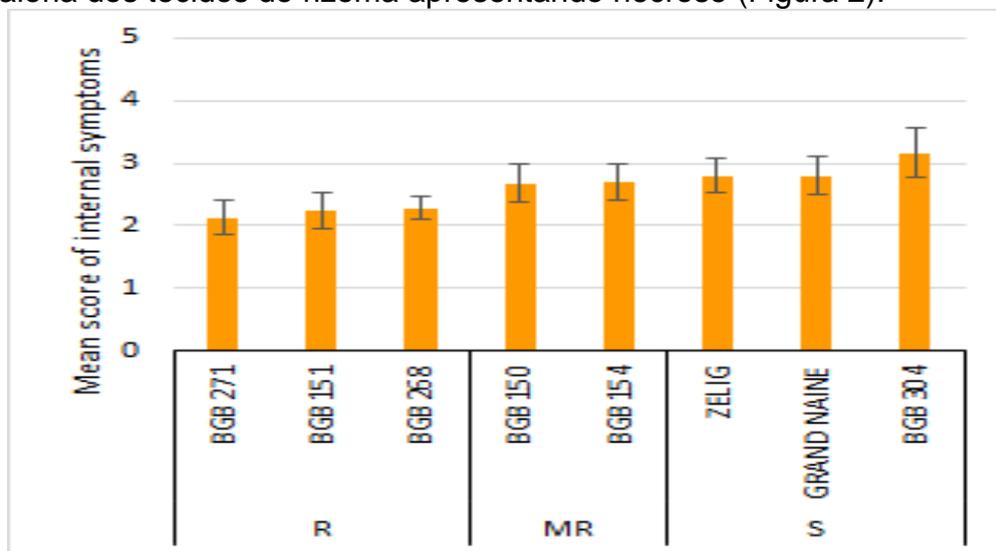
Entre os onze genótipos tipo Prata, apenas o híbrido Embrapa 02 foi caracterizado como altamente resistente, não apresentando sintomas internos no rizoma após 90 dias de inoculação, com apenas notas 1. Os genótipos Embrapa 03 e BGB 170 foram classificados como moderadamente resistentes com notas variando de 2 a 3; o BGB 208 foi caracterizado como suscetível por obter notas entre 3 e 4. Já o híbrido Embrapa 01 e os genótipos BGB188, BGB 159, BGB 167, BGB 179, BGB 168 e BGB 166 foram classificados como altamente suscetíveis, incluindo atestemunha Prata Anã que apresentaram plantas com notas entre 4 e 5 (Figura 1).



**Figura 1.** Resposta de diferentes genótipos de bananeira tipo “Prata” a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raça Subtropical 4, em casa de vegetação. Os sintomas internos foram avaliados usando uma escala de notas, baseada em sistema de pontuação de acordo com a porcentagem de descoloração do rizoma (Dita et. al 2014). HR: high resistant; MR: moderately resistant; S: susceptible; HS: high susceptible

### 3.2. Avaliação de genótipos tipo Cavendish

Entre os oito genótipos tipo Cavendish, foi possível classificar os genótipos BGB271, BGB 151 e BGB 268 como resistentes. Os genótipos BGB 150, BGB 154, foram classificados como moderadamente resistentes, e os genótipos Zelig, BGB 304 e a cultivar Grande Naine foram caracterizados como suscetíveis, com a maioria dos tecidos do rizoma apresentando necrose (Figura 2).



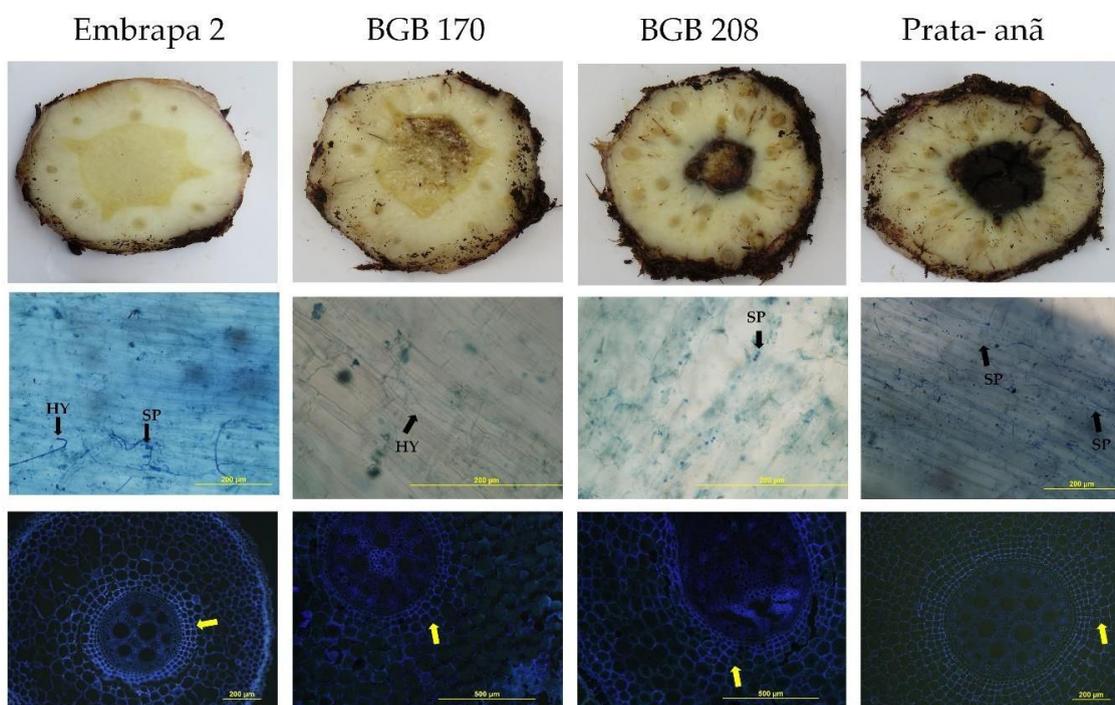
**Figura 2.** Resposta de diferentes genótipos de bananeira tipo Cavendish a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raça Subtropical 4 em casa de vegetação. Os sintomas internos foram avaliados usando uma escala de notas, baseada em sistemas de pontuação de

acordo com a porcentagem de descoloração do rizoma (Dita et.al 2014). Foi utilizado arroz colonizado com a cepa do Foc ST4, misturado na quantidade de 40 g em cada vaso de 3 L. R: resistente; MR: moderately resistant; S: susceptible.

### 3.3. Avaliação da interação Foc ST4 e genótipos tipo Prata

O híbrido Embrapa 02 não apresentou descoloração do rizoma, caracterizado como altamente resistente, no entanto, a análise de clareamento e coloração das raízes e estruturas fúngicas demonstrou que o Foc ST4 penetrou o interior dos tecidos, pois haviam estruturas, como hifas e esporos (Figura 3). No BGB 170, caracterizado como moderadamente resistente, o corte transversal do rizoma demonstra uma descoloração inicial, e na análise de clareamento e coloração, foi observada presença de hifas fúngicas. No BGB 208, caracterizado como suscetível, o rizoma estava mostrando necrose em quase sua totalidade e no interior dos tecidos houve grande produção de esporos (Figura 3). Na cultivar Prata Anã foi observado um alto grau de suscetibilidade com a necrose de todo o tecido do rizoma e vasos do xilema, o que foi confirmado pela alta quantidade de esporos e hifas na análise de clareamento e coloração com azul de Trypan (Figura 3).

Observamos nas microfotografias dos genótipos classificados como altamente resistentes que o patógeno penetrou os tecidos das raízes, porém não foi possível completar o processo com a colonização do mesmo, diferença nítida observada em relação as cultivares avaliadas como suscetíveis. Foi avaliada a emissão de calose no híbrido Embrapa 02 resistente, onde foi observado uma emissão significativa da fluorescência, indicando a presença do mecanismo de resistência; já no BGB 170, caracterizado como moderadamente resistente, e no BGB 208, caracterizado como suscetível, assim como na cultivar Prata Anã, identificada como altamente suscetível, houve emissão da fluorescência, porém sem diferença acentuada entre os genótipos.

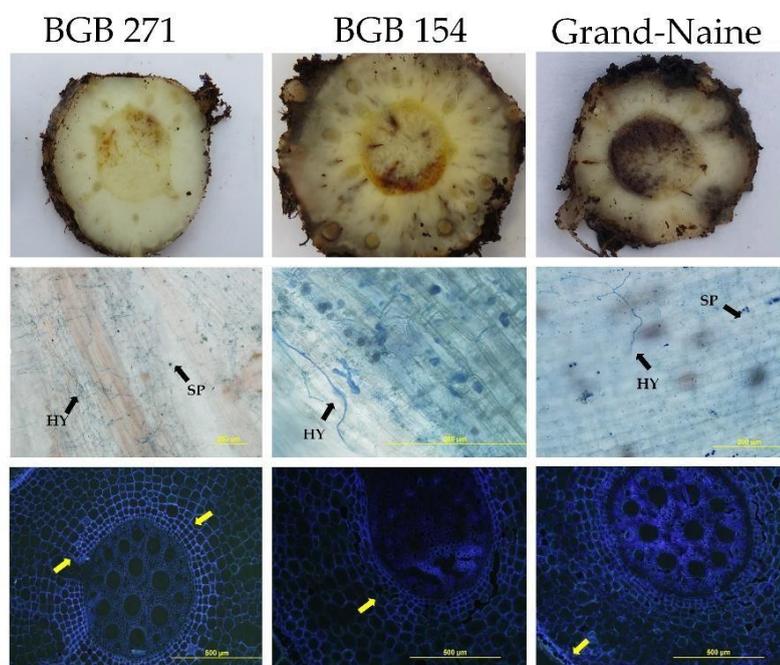


**Figura 3.** Análise de sintomatologia, clareamento e coloração de estruturas fúngicas com corante azul Trypan em raízes de genótipos de bananeira tipo Prata após infecção por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raça subtropical 4, 90 dias após a inoculação. Setas indicam hifa (Hy) e esporos (SP). A fluorescência branco-azul indica a presença de calose nostercidos indicada pelas setas amarelas, micrografias de fluorescência foram coradas com azul de anilina para detecção de calose.

### 3.4. Avaliação da interação Foc ST4 e genótipos tipo Cavendish

No BGB 271 classificado como resistente foi observada uma leve descoloração do rizoma no corte transversal e na análise de clareamento e coloração das raízes foram observados esporos e hifas fúngicas (Figura 4). No BGB 150 moderadamente resistente, foi possível observar ligeira descoloração do rizoma ao longo de todo o sistema vascular e na análise de clareamento e coloração foi observada a presença de esporos fúngicos. Na cultivar Grande Naine, suscetível, a necrose de quase todos

os vasos do xilema foi observada, o que foi confirmado pela presença de esporos e hifas na análise de clareamento e coloração (Figura 4). Na análise por microscopia de fluorescência foi observada a presença de calose a partir da fluorescência branco-azul BGB271 (tipo Cavendish) em maior concentração em relação ao genótipo BGB 159 (tipo Prata) e a cultivar Grande Naine.



**Figura 4.** Análise de sintomatologia clareamento e coloração de estruturas fúngicas com corante azul Trypan em raízes de genótipos de bananeira tipo Cavensdish após infecção por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raça subtropical 4, 90 dias após a inoculação. Setas indicam hifa (Hy) e esporos (SP). A fluorescência branco-azul indica a presença de calose nos tecidos indicada pelas setas amarelas.

#### 4. DISCUSSÃO

Onze genótipos do tipo Prata e sete genótipos do tipo Cavendish, além de duas testemunhas foram avaliados a partir da utilização de escala de notas e categorizados como altamente resistentes, moderadamente resistentes, suscetíveis e altamente suscetíveis a Foc ST4. Para realização de análises histológicas e histoquímicas posteriores selecionamos um genótipo de cada categoria, sendo do tipo Prata, o híbrido Embrapa 02, altamente resistente, BGB 170, moderadamente resistente, BGB 208 suscetíveis, e a cultivar Prata-Anã, altamente suscetível. Os genótipos tipo Cavendish selecionados foram BGB 271 resistente, BGB 150 moderadamente resistente e a cultivar Grande Naine, suscetível.

Foi possível classificar, por meio dos sintomas os 11 genótipos tipo Prata, onde Embrapa 02 foi considerado altamente resistente, já os genótipos Embrapa 03 e BGB170 foram considerados moderadamente resistentes. Os genótipos Embrapa 02 e Embrapa 03 são híbridos tetraploides que tem como parental masculino o híbrido diploide M53, cuja resistência a Foc 1, Foc ST4 e Foc R4T já foi confirmada (RIBEIRO et al., 2018; GONÇALVES et al., 2019; ROCHA et al., 2022). Além disso, o M53 também é parental da cultivar híbrida do tipo Prata BRS Platina (AAAB), que também foi caracterizada como resistente a Foc ST4 pela expressão de genes de defesa (Rocha et al. 2022b). Assim, sugerimos que o perfil de resistência dos genótipos Embrapa 02 e Embrapa 03 sejam devido a sua genealogia.

Entre os oito genótipos tipo Cavendish avaliados, três foram classificados como resistentes, o BGB 271, o BGB 151 e o BGB 268, dois foram considerados moderadamente resistentes, o BGB 150 e o BGB 154 e três foram classificados como suscetíveis, Zelig, Grande Naine e BGB 304 (Figura 2). Embora os genótipos tipo Cavendish tenham uma base genética estreita por serem compostos por clones, o que torna difícil a seleção de material resistente devido à baixa diversidade genética, encontramos variação na resposta de resistência dos genótipos testados a Foc ST4, com três genótipos promissores para testes futuros em campo. Esses dados são importantes especialmente pela superioridade dos genótipos resistentes em relação a cultivar Grande Naine que é utilizada para exportação, sendo possível aventar a possibilidade de alcançar um genótipo “tipo” Cavendish com resistência.

Outro estudo realizado pela Fundação Hondurenha de Investigación Agrícola utilizou progênies tetraploides selecionadas em cruzamentos com diploides melhorados para o desenvolvimento de híbridos triploides de segunda geração, obtendo dois híbridos pré-selecionados com resistência à Sigatoka-negra e murcha de Fusarium raça 1, com desempenho semelhante as cultivares Cavendish conhecidas. Esses dados reforçam que é possível fazer introgressão de características desejáveis em cultivares Cavendish por meio de melhoramento convencional, uma vez que a capacidade dessas cultivares em obter sementes não é limitada e já foi relatada, superando a baixa fertilidade conhecida (AGUILAR-MORÁN et al., 2013).

Na análise histológica, a partir do clareamento e coloração das estruturas fúngicas no híbrido do tipo Prata Embrapa 02, foi observado estruturas do patógeno; no entanto, na análise sintomatológica não houve descoloração do rizoma, sinalizando assim, que houve o processo de penetração sem sucesso no avanço da colonização dos tecidos das plantas. Nos genótipos caracterizados

como moderadamente resistentes, suscetível e altamente suscetível houve a colonização dos tecidos pelo patógeno, não havendo diferença entre esses. Na cultivar Prata Anã, utilizada como testemunha, houve uma alta esporulação no interior dos tecidos, reafirmando a sua suscetibilidade ao isolado de Foc ST4 observada nas análises sintomatológicas e em estudos anteriores. Rocha et al (2022b), por meio de análises de microscopia de varredura, concluiu que 30 dias após a inoculação do patógeno, a cultivar Prata Anã apresenta um alto nível de suscetibilidade a Foc ST4, com a oclusão de vasos, presença de hifas e esporos, demonstrando as falhas nas respostas de defesa, o que foi observado também no presente estudo.

A partir das análises histoquímicas podemos observar a deposição de calose, identificada por fluorescência azul-branca após coloração com azul de anilina. Entre os genótipos tipo Prata foi observada a presença de calose em todas as amostras analisadas com presença mais acentuada no híbrido resistente Embrapa 02. Entre os genótipos tipo Cavendish o BGB 271 avaliado como resistente, apresentou uma maior fluorescência indicativa de calose em comparação com o genótipo suscetível (Figura 4). Esses resultados estão relacionados ao fato de que a calose possui funções importantes no desenvolvimento vegetal e na resposta a vários estresses bióticos e abióticos (ZAVALLIEVE et al., 2010). Algumas pesquisas indicam que quando o patógeno inicia o processo de penetração com hifas ou haustórios a planta responde ao ataque com a síntese de carboidratos como calose e celulose (COSTA, 2013; ZUO et al., 2018).

No processo de interação planta-patógeno a parede celular apresenta-se como barreira onde os patógenos necessitam penetrar para completar a infecção e interagir com o hospedeiro (DITA et al., 2018). A calose por sua vez é depositada na membrana plasmática e na parede celular após o dano mecânico, químico, fisiológico ou biótico causado, impedindo o avanço da infecção (CHEN, KIM 2009; COSTA, 2013). Assim, podemos afirmar que houve sucesso na deposição de calose nos genótipos classificados como resistentes, apesar de haver penetração como pode ser observada na Figura 3 e 4, considerando assim, que o avanço da infecção foi contido.

O desencadeamento desse tipo de resposta também foi observado em um estudo realizado recentemente com cultivares diploides incluindo 'Pahang' e 'Calcutta 4,' caracterizados como altamente resistentes, onde foi observada a inibição do crescimento de Foc por meio de barreiras físicas e químicas para bloquear a progressão do patógeno em diferentes estágios durante o processo de infecção, incluindo o fortalecimento da parede celular por lignificação e suberização, formação de papilas nos locais de penetração, acúmulo de tiloses e produção de compostos antifúngicos (CHEN et al., 2019).

O híbrido Embrapa 02 é um tetraploide experimental desenvolvido a partir da cultivar Prata Anã (AAB) e o diploide M53 (AA); assim como a cultivar BRS Platina, cuja resistência a Foc ST4 foi demonstrada anteriormente, por meio de análises histológicas, histoquímicas e moleculares, mostra-se promissor para uso em áreas com a presença do patógeno (ROCHA et al., 2022b). O diploide M53 se destaca por fazer parte da genealogia de outros híbridos já difundidos no mercado brasileiro, como BRS Princesa, BRS Preciosa e BRS Pacovan Ken (BATTER BANANAS, 2018; RIBEIRO et al., 2018; ROCHA et al., 2022b).

No estudo atual, confirmamos a existência de variabilidade genética relacionada a resistência a Foc ST4 em genótipos de bananeira tipos Prata e

Cavendish, tradicionalmente cultivados em fazendas de diferentes regiões do Brasil. Destacamos entre esses, o híbrido Embrapa 02 que se mostrou imune ao isolado de ST4 submetido por três meses em casa de vegetação. Em relação aos genótipos tipo Cavendish, foi encontrada variabilidade genética entre o conjunto avaliado, tendo em vista que os genótipos BGB 271, BGB 151, BGB 268 se comportaram como resistentes e apenas o genótipo BGB 304, como suscetível. Assim, diante da necessidade da indústria de exportação de bananas, que não possui cultivares resistentes a Foc R4T para substituir as cultivares do subgrupo Cavendish, e diante da crescente ameaça de dispersão do patógeno, este estudo contribui como os estudos empenhados na obtenção de cultivares resistentes, o que pode oferecer uma medida segura e duradoura no enfrentamento de RT4. Nesse sentido, os genótipos tipo Cavendish que foram classificados resistentes, poderão ser estudados em experimentos de campo para avaliar se apresentam também resistência à Foc R4T. Considerando que o conjunto de genótipos avaliados corresponde a uma amostra representativa da variabilidade dos tipos Prata e Cavendish presentes em áreas de cultivo em fazendas do Brasil, este estudo indica e reforça a importância de alargar o painel de cultivares resistentes a Foc. Destaque para o híbrido do tipo Prata Embrapa 02 que se comportou como imune a Foc ST4, que é conhecidamente mais virulento e agressivo do que Foc R1, endêmica nos solos do Brasil. No geral, esses resultados reforçam a eficácia do programa de melhoramento por hibridação como medida para enfrentamento da murcha de Fusarium, independente da raça fisiológica presente. Nossos resultados podem servir de base para pesquisas futuras com o híbrido Embrapa 02, incluindo testes em áreas de países vizinhos ao Brasil afetadas por Foc TR4, como a Colômbia, Perú ou Venezuela. Ademais, informações sobre o comportamento desses genótipos em relação a resistência a Foc ST4 podem apoiar as análises de risco e políticas fitossanitárias relacionadas a produção de bananas no Brasil.

## **5. CONCLUSÕES**

A partir do método de classificação adotado no presente estudo o híbrido do tipo Prata denominado Embrapa 02 comportou-se como altamente resistente e os genótipos Embrapa 03 e BGB170 como moderadamente resistentes a Foc ST4. Para genótipos tipo Cavendish, o método adotado para classificação distinguiu os genótipos BGB 271, BGB 151, BGB 268 como resistentes e os genótipos BGB 150 e BGB 154 como moderadamente resistentes.

## 6. REFERÊNCIAS

AGRITEMPO. Agritempo: sistema de monitoramento agrometeorológico 2018. Acesso em: 21/ setembro, 2021.

AGUILAR-MORÁN, J.F. Improvement of 'Cavendish' banana cultivars through conventional breeding. **Acta Hortic**, 986, 205–208, 2013.

BETTER BANANAS. Panama TR4 Variety Screening Trial (December 2018) Sub-Trial Results (Plant and First Ratoon). Available online: <https://betterbananas.com.au/2022/03/04/panama-tr4-variety-screening-trial-december-2018-sub-trial-results-plant-and-first-ratoon/> (acesso em 3 janeiro 2023).

COSTA, J.L. Estudos Histológicos e Moleculares da Interação *Musa* spp. x *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Tese de mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil, 2013.

COSTA, S.N.; BRAGANÇA, C.A.D.; RIBEIRO, L.R.; AMORIM, E.P.; OLIVEIRA, S.A.S.; DITA, M.A.; LARANJEIRAS, F.F.; HADDAD, F. Genetic structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in different regions from Brazil. **Plant pathology**. 2015.

COLTRO, L.; KARASKI, T. U. Environmental indicators of banana production in Brazil: *Cavendish* and *Prata* varieties. **Journal of Cleaner Production** P. 363-378, 2019.

CHEN, X.Y.; KIM, J-Y. Callose synthesis in higher plants. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 4, n. 6, p. 489-492, 2009.

CHEN, A.; SUN, J.; MATTHEWS, A.; ARMAS-EGAS, L.; CHEN, N.; HAMILL, S.; MINTOFF, S.; TRAN-NGUYEN, L.T.T.; BATLEY, J.; AITKEN, E.A.B. Assessing variations in host resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 in *Musa* species, with a focus on the subtropical race 4. **Front. Microbiol.** v.10, p.1062, 2019.

DALE, J; JAMES, A; PAUL, JY. Transgenic Cavendish bananas with resistance to *Fusarium* wilt tropical race 4. *Nat Commun* 8, 1496, 2017.

DITA, M. A.; PÉREZ, V. L.; MARTINEZ DE L.P, E. Inoculation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causal agent of *Fusarium* wilt in banana. In *Technical Manual: Prevention and Diagnostic of Fusarium Wilt (Panama Disease) of Banana Caused by Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 (TR4); Vicente, L.P., Dita, M.A.R., Martínez, E., Eds.; United Nations: FAO: Rome, Italy, pp. 55–58, 2014.

DITA, M.; BARQUERO, M.; HECK, D.; MIZUBUTE, E. S. G.; STAVER, C. P. *Fusarium* wilt of banana: current knowledge on epidemiology and research

needs toward sustainable disease management. **Frontiers of Plant Science**, v.9, p.1468,2018.

FERREIRA, M. D. S.; MOURA, E. R. D.; LINO, L. S. M.; AMORIM, E. P.; SANTOS- SEREJO, J. A. D.; HADDAD, F. Selection of somaclonal variants of the cultivar 'Prata-Anã' for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 1. **Rev. Bras.Frusic**. v42, 2020.

FERREIRA, M.D.S.; ROCHA, A.D.J.; NASCIMENTO, F.D.S.; OLIVEIRA, W.D.D.S.; SOARES, J.M.D.S.; REBOUÇAS, T.A.; MORAIS LINO, L.S.; HADDAD, F.; FERREIRA, C.F.; SANTOS-SEREJO, J.A.D.; et al. The Role of Somaclonal Variation in Plant Genetic Improvement: A Systematic Review. *Agronomy* , 13, 730, **2023**.

FAO. 2022. Banana Market Review – Preliminary results 2022. Rome. Disponível em: <https://www.fao.org/3/cc3421en/cc3421en.pdf>

FAOSTAT (2023) Estatística da produção e de comércio. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#home> (Acesso em 16 de Março de 2023).

FOSTER, A. S. *Practical plant anatomy*. 2. ed. Toronto. Van Nostrand.p.228,p.1949.

GONÇALVES, Z.S.; HADDAD, F.; AMORIM, V.B.O.; FERREIRA, C.F.; OLIVEIRA, S.A.S.; AMORIM, E.P. Agronomic characterization and identification of banana genotypes resistant to *Fusarium* wilt race 1. *Eur. J. Plant. Pathol.* 155, 1093–1103,**2019**.

HADDAD, F., ROCHA, L. S., SOARES, A. C. F., MARTINS, I. P. S., TEIXEIRA, L. A. J., STAVER, C., et al. Management of *Fusarium* wilt of bananas in Minas Gerais, Brazil. *Acta Horti*, 137–146, 1196, 2018.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. LSPA, **Levantamento sistemático da Produção Agrícola**. 2019. Disponível em: < [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_201212.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201212.pdf)>. Acesso em setembro de 2021.

JOHANSEN, D. A. *Plant Microtechnique*; Mc Graw Hill: New York, NY, USA, p. 523,1940.

LI, W. M.; DITA, M.; WU, W.; HU, G. B.; XIE, J. H.; Ge, X. J. Resistance sources to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 in banana wild relatives. **Plant Pathology**, 64(5), 1061-1067, 2015.

MINTOFF, S. J. L.; NGUYEN, T.V.; KELLY, C.; CULLEN, S.; HEARNDEN, M.; WILLIAMS, R.; DANIELLS, J. W.; TRAN-NGUYEN, L.T.T. Banana Cultivar Field Screening for Resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense Tropical Race 4 in the Northern Territory. *J. Fungi*, 7, 627, 2021.

- NDAYIHANZAMASO, P; MOSTERT, D; MATTHEWS, M.C; MAHUKU, G; JOMANGA, K; MPANDA, H.J; MDUMA, H; BROWN, A; UWIMANA, B; SWENNEN, R; et al. Evaluation of Mchare and Matooke Bananas for Resistance to *Fusariumoxysporum* f. sp.  *cubense* Race 1. *Plants* 2020, 9, 1082.
- PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc*, v.55, 158–161,1970.
- PLOETZ R.C. Panama disease: an old nemesis rears its ugly head. Part 2. The Cavendish era and beyond. *Plant Health Progress*, 2006a.
- KARNOVSK, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol*, v.27, 137, 1965.
- RAMBO, J.R. et al. Análise financeira e custo de produção de banana maçã: um estudo de caso em tangará da serra, estado do Mato Grosso. *Informações Econômicas*, São Paulo, n. 545, p.29-39. 2015.
- RIBEIRO, L.R.; SILVA, S de O.; OLIVEIRA, S. A. S de.; AMORIM, E.P.; SEREJO, J. A. S.S.; HADDAD, F. SOURCES OF RESISTANCE TO *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* IN BANANA, GERMPASM. *Rev. Bras. Frutic*, 2018.
- REBOUÇAS, T.A.; HADDAD, F.; FERREIRA, C.F.; OLIVEIRA, S.A.S. DE.; LEDO, CADS.; AMORIM, E. P. Identification of banana genotypes resistant to *Fusarium wilt* race 1 under field and greenhouse conditions. *Scientia Horticulturae*. v.239, p.308-313, 2018.
- REBOUÇAS, T. A., ROCHA, A. de J; CERQUEIRA, T. S; ADORNO, P. R., BARRETO, R. Q; FERREIRA, M. D. S; MORAIS LINO, L. S; BATISTA DE OLIVEIRA AMORIM, V; ALMEIDA DOS SANTOS-SEREJO, J; HADDAD, F; FERREIRA, C. F., & AMORIM, E. P. Pre-selection of banana somaclones resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp.  *cubense*, subtropical race 4. *Crop protection (Guildford, Surrey)*, 147, 105692, (2021).
- ROCHA, A.D.J.; SOARES, J. M. D. S.; NASCIMENTO, F. D. S.; SANTOS, A.S.; AMORIM, V. B. D. O.; FERREIRA, C. F.; HADDAD, F.; SANTOS-SEREJO, J. A. D.; AMORIM, E. P. Improvements in the Resistance of the Banana Species to *Fusarium Wilt*: A Systematic Review of Methods and Perspectives. *J. Fungi*, v.7, 249, 2022a.
- ROCHA, A. D. J.; SOARES J. M. D. S.; NASCIMENTO, F. D. S.; ROCHA, A.D; AMORIM, V. B.O. D.; RAMOS, E. S. T. E; FERREIRA, C. F.; HADDAD, F.; AMORIM, E.P. Molecular, histological and histochemical responses of banana cultivars challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp.  *cubense* with different levels of virulence. *Plants*

THANGAVELU, R.; SARASWATHI, M.S.; UMA, S. et al. Identification of sources resistant to a virulent *Fusarium* wilt strain (VCG 0124) infecting Cavendish bananas. *Sci Rep* 11, 3183, 2021.

ZAVALIEV, R.; UEKI, S.; EPEL, B. L.; CITOVSKEY, V. Biologia do turnover de callose( $\beta$ -1,3 glucano) em plasmodes mata. 2010.

ZHAN, N.; KUANG, M.; HE, W.; DENG, G.; LIU, S.; LI, C.; ROUX, N.; DITA, M.; YI, G.; SHENG, O. Evaluation of Resistance of Banana Genotypes with AAB Genome to *Fusarium* Wilt Tropical Race 4 in China. *J. Fungi*, 8, 1274, 2022.

ZUO, C.; DENG, G.; LI, B.; HUO, H.; LI, C.; HU, C.; KUANG, R.; YANG, Q.; DONG, T.; SHENG, O.; et al. Germplasm screening of *Musa* spp. for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4 (Foc TR4). **Eur. J. Plant. Pathol.** v.151,723–734, 2018.