



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de mestrado

**DIVERSIDADE GENÉTICA, MORFOLÓGICA E
PATOGENICA DE ISOLADOS DE *FUSARIUM
OXYSPORUM* ASSOCIADOS À MURCHA EM
FEIJÃO-CAUPI**

Josiene Silva Veloso

**Recife – PE
2013**

JOSIENE SILVA VELOSO

**DIVERSIDADE GENÉTICA, MORFOLÓGICA E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE
FUSARIUM OXYSPORUM ASSOCIADOS À MURCHA EM FEIJÃO-CAUPI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Souza Lima (UAG/UFRPE)

Co-orientador: Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (DEPA/UFRPE)

**RECIFE- PE
FEVEREIRO - 2013**

Ficha Catalográfica

V432d Veloso, Josiene Silva
Diversidade genética, morfológica e patogênica de isolados de *Fusarium Oxysporum* associados à murcha em feijão-caupi / Josiene Silva Veloso. -- Recife, 2013.
49 f. : il.

Orientador (a): Cristiano Souza Lima.
Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2013.
Inclui referências e apêndice.

1. Caracterização molecular 3. Filogenia 4. *Vigna unguiculata* 5. Murcha-de-fusário 6. *Fusarium oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum* I. Lima, Cristiano Souza, Orientador II. Título

CDD 632

**DIVERSIDADE GENÉTICA, MORFOLÓGICA E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE
FUSARIUM OXYSPORUM ASSOCIADO À MURCHA EM FEIJÃO-CAUPI**

JOSIENE SILVA VELOSO

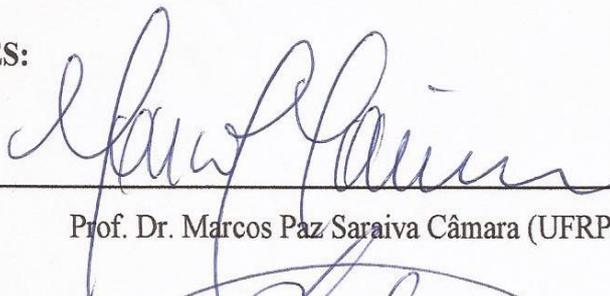
Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 18/02/2013

ORIENTADOR (A):



Prof. Dr. Cristiano Souza Lima (UAG/UFRPE)

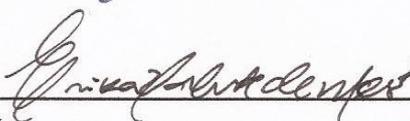
EXAMINADORES:



Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE)



Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)



Prof^a. Dr. Érica Valente Medeiros (UAG/UFRPE)

**RECFE-PE
FEVEREIRO – 2013**

À Deus!

OFEREÇO

Os meus melhores resultados às pessoas que eu mais amo

Meus pais, Cecílio e Leniciene

Minha irmã Josilane

Meus Avós Sebastião e Flora

Sem vocês, nada faz sentido...

Com vocês, tudo é possível...

Por vocês, tudo vale a pena...

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

A Deus, quem sirvo e amo acima de todas as coisas, por me guiar sem hesitar através de muitos obstáculos ao longo do meu caminho e por me manter determinada quando tudo parecia perdido.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia pela realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo concedida e pelo suporte para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, dos quais me orgulho muito, que estiveram do meu lado me incentivando a lutar, não sendo apenas pais, mas amigos e companheiros. A vocês devo meus melhores resultados.

À Josilane, minha preciosa Irmã, a quem admiro muito, sempre se prontificando a me ajudar em tudo que precisei. Amo você!

A Paulo, meu namorado, pelo companheirismo, incentivo, compreensão e amor acima de tudo. Não sei o seria de mim sem você e sei que nunca poderei te retribuir sua grande ajuda durante esta jornada. Te amo!!!

Aos meus orientadores, Cristiano Souza Lima e Sami Jorge Michereff pela paciência, exemplo de profissionalismo e por todo o apoio oferecido durante a realização deste trabalho. Serei sempre grata!

Às minhas amigas Dan e Gal por me apoiarem e estarem sempre comigo mesmo à distância.

À Geane e Celma, obrigada pela amizade e conforto que amenizam a dor da saudade de casa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UFRPE pelos conhecimentos transmitidos. Em especial ao Professor Marcos Pela amizade e atenção.

Aos Professores Carlos Ribeiro e Érica pelo apoio na realização deste experimento!

Aos amigos do Laboratório de Sistemática e Biologia de Fungos Fitopatogênicos, André, Dyana, Nielson, Maria e Géssica, especial ao Társsio pelo companheirismo e sua grande ajuda na condução dos experimentos.

A todos os amigos, Martin, Élica, Felipe, Eduardo, Hudson, Luciana e Natália pelos momentos de descontração, e em especial a Nicolle pelo amparo, quando cheguei para começar essa nova etapa de minha vida.

Ao Sr. Ivan, Dona Neide, Carla e Darcy pela amizade! Sempre me lembrai de vocês.

Dizer a vocês apenas obrigado nunca será suficiente para expressar meu sentimento de gratidão!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	VI
RESUMO GERAL	VIII
GENERAL ABSTRACT	IX
CAPÍTULO I	
INTRODUÇÃO GERAL	2
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
CAPÍTULO II	
CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE <i>FUSARIUM</i> <i>OXYSPORUM</i> ASSOCIADOS À MURCHA EM FEIJÃO-CAUPI	15
RESUMO.....	15
INTRODUÇÃO.....	16
MATERIAL E MÉTODOS.....	18
RESULTADOS	24
DISCUSSÃO	26
AGRADECIMENTOS	30
LITERATURA CITADA	31
CAPÍTULO III	
CONCLUSÕES GERAIS.....	41

RESUMO GERAL

O Feijão-caupi é uma leguminosa cultivada predominantemente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, apresentando baixo rendimento devido a uma diversidade de fatores, dentre eles a murcha-de-fusário, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. O presente estudo teve como objetivo caracterizar isolados de *F. oxysporum* associados à murcha em feijão-caupi por meio de observações de caracteres morfológicos, teste de patogenicidade e análise de sequências do gene fator de alongação 1- α (*tef1*). Os isolados apresentaram coloração variando do branco ao violeta com micélio aéreo bastante denso. Os microconídios apresentaram formato oval a elipsóide, ligeiramente curvado e sem septo, dispostos em falsas cabeças produzidos em monofialides curtas. Os macroconídios formados em esporodóquios apresentaram formato falcado, ligeiramente curvado com três a cinco septos. Dos 27 isolados de *F. oxysporum* analisados 20 se mostraram patogênicos ao feijão-caupi, causando doença com severidade variando de 1 a 99%. A análise de neighbor-joining baseada na região *tef1* agrupou os isolados em seis haplótipos independentemente de serem ou não patogênicos. Pode-se sugerir a partir dos resultados obtidos no presente estudo que a f. sp. *tracheiphilum* representa pelo menos três linhagens filogenéticas comportando-se como polifilética e parafilética, indicando assim terem origens evolucionárias independentes.

Palavras-chave: caracterização molecular, filogenia, *Vigna unguiculata*, murcha-de-fusário, *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*.

GENERAL ABSTRACT

The cowpea (*Vigna unguiculata*) is grown predominantly in the North and Northeast of Brazil, with low yields due to a variety of factors, including the fusarium wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. The present study aimed to characterize isolates of *F. oxysporum* associated with wilt in cowpea through observations of morphological characters, pathogenicity test and analysis of sequences of the translation elongation factor 1- α (*tef1*) gene. The colony color of the isolates varied from white to violet with dense aerial mycelium. The microconidia were oval to ellipsoid, slightly curved and unicellular, arranged in false heads formed on short monophyalides. The macroconidia formed on sporodochia were falcate, slightly curved with three to five septa. Of the 27 isolates of *F. oxysporum* analyzed 20 were pathogenic to cowpea, causing disease with severity ranging from 1 to 99%. The neighbor-joining analysis based on *tef1* grouped the isolates into six haplotypes that were not correlated with pathogenicity. It is suggested from the results of the present study that f. sp. *tracheiphilum* represents at least three phylogenetic lineages behaving as polyphyletic and paraphyletic, indicating they have independent evolutionary origins.

Keywords: molecular characterization, phylogeny, *Vigna unguiculata*, fusarium wilt, *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*.

CAPÍTULO I



Introdução Geral

DIVERSIDADE GENÉTICA, MORFOLÓGICA E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE *FUSARIUM OXYSPORUM* ASSOCIADOS À MURCHA EM FEIJÃO-CAUPI

INTRODUÇÃO GERAL

O feijão-caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp, é uma espécie de origem africana que foi introduzida no Brasil na segunda metade do século XVI pelos portugueses no Estado da Bahia (FREIRE FILHO, 1988), a partir do qual foi dispersada por todo o país. Embora esteja em expansão em outras áreas como o Centro-Oeste, onde passou a ser cultivado em larga escala a partir de 2006 por médios e grandes produtores altamente tecnificados (FREIRE FILHO et al., 2011), no Brasil, o feijão-caupi é explorado predominantemente nas regiões Norte e Nordeste principalmente por agricultores familiares que o tem como importante fonte de emprego e renda e um dos principais componentes da sua dieta alimentar (RAMOS et al., 2012).

Dados disponíveis na FAO (2013), sobre a produção mundial de feijão-caupi em 2011, indicam que a cultura atingiu 4,9 milhões de toneladas nos 10,4 milhões de hectares cultivados em 34 países, sendo a Nigéria o principal produtor participando com 1,8 milhão de toneladas, seguido do Níger, com 1,5 milhão de toneladas e Filipinas com 903 mil toneladas. Os dados da FAO não contemplam a produção brasileira possivelmente porque, embora o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2008), reconheça tecnicamente *Phaseolus vulgaris* (L.) juntamente com *V. unguiculata* como feijões, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas (IBGE, 2013) não distingue o feijão-comum do feijão-caupi em suas estimativas de produção. De acordo com Ruas (2012), nos últimos cinco anos, o feijão-caupi representou 10,4% de todo o feijão produzido no país e na safra 2011/12 alcançando uma produção de 302,5 mil toneladas.

Segundo estudos realizados por Freire Filho et al. (2011), a área cultivada com feijão-caupi no período de 2005 a 2009 correspondeu a aproximadamente 33,0% da área total de feijão na região Norte, 61,0% na região Nordeste e 18,0% na região Centro-Oeste. Pelos mesmos estudos, a produção de feijão-caupi correspondeu a 37,6% na região Norte, 45,7% na região Nordeste e 9,1% na região Centro-Oeste. Em termos nacionais, na média do período de 2005 a 2009, o feijão-caupi contribuiu com 37,5% da área colhida e 15,5% da produção (FREIRE FILHO et al., 2011).

Apesar da sua rusticidade e capacidade de se desenvolver satisfatoriamente bem em solos de baixa fertilidade (OLIVEIRA et al., 2002), particularmente na região Nordeste do Brasil a produção dessa cultura não são satisfatórios (FREIRE FILHO et al., 2011). Isso se

deve a diversos fatores como o baixo nível tecnológico empregado durante todo o ciclo da cultura, a escassez e instabilidade pluviométrica, utilização de cultivares com potencial genético reduzido e também a ocorrência de pragas e doenças (AQUINO; NUNES, 1983; CASTRO, 2000; OLIVEIRA et al., 2002; ROCHA et al., 2007; XAVIER et al., 2008).

As doenças estão entre os mais importantes fatores limitantes à produção do feijão-caupi, sendo responsáveis por perdas qualitativas e quantitativas (RIOS, 1988). As principais doenças relatadas nesta cultura são o crestamento bacteriano [*Xanthomonas campestris* pv. *vignicola* (Burkholder) Dye], ferrugem [*Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger.], cercosporioses [*Mycosphaerella cruenta* Latham. (*Pseudocercospora cruenta* (Sacc.) Deigtom e *Cercospora canescens* Ellis & Martin)], Sarna [*Elsinoe phaseoli* Jenk. (*Sphaceloma* sp.)], oídio (*Erysiphe polygoni* DC.), rizoctoniose (*Rhizoctonia solani* Kühn), podridão radicular [*Fusarium solani* (Mart.) Sacc.] e a murcha-de-fusário [*Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (E.F. Smith) W.C. Snyder & H.N. Hansen] (PIO-RIBEIRO; ASSIS FILHO, 1997). A rizoctoniose e a murcha-de-fusário são as doenças mais frequentes e de maior relevância no Nordeste brasileiro (COELHO, 2001; PIO-RIBEIRO; ASSIS FILHO, 1997; RODRIGUES; MENEZES, 2006).

O agente etiológico da murcha-de-fusário é um fungo de solo que pode ser introduzido em novas áreas por meio de sementes infestadas, resíduos de culturas infectados ou ainda por implementos agrícolas contaminados. Este patógeno pode sobreviver no solo por vários anos mesmo na ausência de plantas hospedeiras mediante a produção de clamidósporos, o que dificulta sobremaneira sua erradicação (ASSUNÇÃO et al., 2003a; NELSON, 1981).

De acordo com Holliday (1970), os sintomas da murcha da murcha-de-fusário em feijão-caupi em plantas jovens se caracterizam pela rápida murcha, clorose e queda prematura das folhas, o que reflete na redução do seu crescimento. Em plantas mais desenvolvidas, a infecção por *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* causa nanismo e a clorose precede a queda das folhas e uma murcha gradual de toda a planta. Como se trata de um patógeno de solo, as raízes podem se apresentar mais severamente danificadas do que os sintomas apresentados na parte aérea da planta. Observa-se inicialmente um escurecimento dos vasos condutores que passam a castanho-escuros (ASSUNÇÃO et al., 2003b) e, em casos de infecções mais severas tornam-se necrosados culminando com a morte da planta (HOLLIDAY, 1970).

Dependendo da suscetibilidade da cultivar explorada, a murcha-de-fusário pode causar danos significativos na produção, como a epidemia relatada por Oyekan (1977), na qual 50% das plantas de um campo naturalmente infestado na Nigéria morreram. Na Índia, em regiões

secas e com altas temperaturas, onde as plantas estão mais sujeitas a estresse, foram registrados danos de até 75% da produção de feijão-caupi devido à murcha-de-fusário (ALLEN, 1983). Nos Estados Unidos, Pio-Ribeiro e Assis Filho (1997) relataram perdas de mais de 50%, enquanto que no Brasil, em parcelas experimentais artificialmente infestadas por *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, foram registradas perdas no rendimento de vagens superiores a 89% (ASSUNÇÃO et al., 2003b) e acima de 98% no rendimento de sementes de feijão-caupi (ELOY; MICHEREFF, 2003).

O gênero *Fusarium* compreende diversas espécies de fungos patogênicos ou saprófitas, habitantes de solo ou substratos orgânicos e que se encontram amplamente distribuídos em todo o mundo (BURGESS, 1981; LESLIE; SUMMERELL, 2006). Esse gênero foi descrito pela primeira vez em 1809 pelo micologista alemão Link, sendo classificado atualmente na família Nectriaceae, ordem Hypocreales, classe Sordariomycetes, filo Ascomycota e reino Fungi (INDEX FUNGORUM, 2013). A taxonomia de *Fusarium* tem sofrido profundas mudanças nos últimos anos e, conseqüentemente, o conceito de espécie também tem apresentado variações, envolvendo os conceitos morfológico, biológico e filogenético (LESLIE; ZELLER; SUMMERELL, 2001; SUMMERELL; SALLEH; LESLIE, 2003).

A espécie morfológica é baseada na similaridade dos caracteres morfológicos observáveis e considera que esses caracteres seguem certo padrão dentro da mesma espécie e que diferem entre espécies distintas (LESLIE; ZELLER; SUMMERELL, 2001). Tanto as características físicas quanto as fisiológicas têm sido empregadas para distinguir morfológicamente espécies de *Fusarium* (GUPTA; MISRA; GAUR, 2010; LESLIE; ZELLER; SUMMERELL, 2001). Os fungos desse gênero se caracterizam geralmente pelo rápido crescimento da colônia apresentando micélio denso de coloração que varia desde o branco ao violeta (SUMMERELL; SALLEH; LESLIE, 2003; LESLIE; SUMMERELL, 2006). Os microconídios, quando presentes, são produzidos em fiálides curtas, longas ou ramificadas, podendo ser solitários ou em cadeias, ao passo que os macroconídios originam-se de fiálides isoladas ou agrupadas em massas, crescendo diretamente do micélio vegetativo ou em esporodóquios, são hialinos, geralmente septados e possuem diferenciação entre as células basal e apical. Os clamidósporos, por sua vez, podem ser produzidos nos macroconídios ou formados intercaladamente ou no ápice das hifas (GERLACH; NIRENBERG, 1982; NELSON; TOUSSOUN; MARASAS, 1983; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Tradicionalmente o conceito de espécie morfológica foi predominante sobre os demais. Entretanto, como a identificação precisa dos fungos através de exame visual de critérios

morfológicos é muito difícil (VOIGT; GHERBAWY, 2010), nos últimos anos, os conceitos biológico (LESLIE, 1999; LESLIE; ZELLER; SUMMERELL, 2001), baseado na compatibilidade sexual entre membros da mesma espécie, e filogenético (GURJAR et al., 2009; O'DONNELL, 2000; O'DONNELL et al., 2000; LEONG; LATIFFAH; BAHARUDDIN, 2009; VEGA-BARTOL et al., 2011), baseado na análise de sequências gênicas, têm recebido maior atenção. Esses conceitos são mais fidedignos, uma vez que os parâmetros por eles utilizados são mais estáveis que aqueles empregados na caracterização morfológica. Todavia, as diferentes características morfológicas e patogênicas, somadas às variações fisiológicas, fenotípicas e mutagênicas em *Fusarium* (SUMMERELL; SALLEN; LESLIE, 2003), têm levado à criação de um sistema taxonômico complexo dividido em seções, *formae speciales* e raças (BENYON; BURGESS; SHARP, 2000; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

As *formae speciales* são assim divididas de acordo com a gama de hospedeiros que atacam (SNYDER; HANSEN, 1940), enquanto que a subdivisão em raças é baseada na virulência ou diferenciação de cultivares hospedeiras (CORRELL, 1991; RODRIGUES; MENEZES, 2006). Mais de 150 *formae speciales* já foram descritas no complexo *Fusarium oxysporum* Schlecht. ex Fries, sendo cada uma delas representada por grupos de isolados com habilidade de causar murcha em um hospedeiro específico (BAAYEN et al., 2000). Esse parece ser outro conceito controverso, tendo em vista que *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* além do feijão-caupi, também tem sido relatado causando murcha em soja, *Glycine max* (L.) Merr., crisântemo, *Chrysanthemum morifolium* Ramat (ARMSTRONG; ARMSTRONG, 1950, 1965; HOLLIDAY, 1970) e mais recentemente em gérbera, *Gerbera jamesonii* L. (TROIISI, GULLINO; GARIBALDI, 2010).

Na tentativa de esclarecer as controvérsias relacionadas à classificação de *Fusarium*, os estudos filogenéticos têm sido utilizados como importantes ferramentas na diferenciação de espécies, *formae speciales* e raças, sendo baseados na análise de sequências de regiões específicas do DNA, pela utilização de genes com alto sinal filogenético como o fator de alongação 1- α (*tef1*) ou pela combinação de duas ou mais regiões gênicas (AOKI et al., 2003; 2005; LI; TAM; HARTMAN, 2000; O'DONNELL et al., 2009). Dessa forma, além dos testes de patogenicidade e de grupo de compatibilidade vegetativa (VCG), diferentes *formae speciales* de *F. oxysporum* têm sido comparadas por marcadores moleculares e mediante análise do DNA nuclear ribossômico e mitocôndrico, rDNA e mtDNA, respectivamente (ALVES-SANTOS et al., 1999; LIEVENS; REP; THOMMA, 2008; MBOFUNG; HONG;

PRYOR, 2007; SKOVGAARD et al., 2001; O'DONNELL et al., 2009; WUNSCH et al., 2009). Ainda assim, a correta classificação das f. spp. de *F. oxysporum* é complicada, uma vez que diferentes isolados classificados em uma única *forma specialis* podem ter origens evolucionárias independentes, enquanto que isolados de diferentes *formae speciales* podem compartilhar o mesmo ancestral comum (KISTLER, 1997; O'DONNELL et al., 1998; BAAYEN et al., 2000; O'DONNELL et al., 2009).

Algumas sequências gênicas que codificam a beta-tubulina, calmodulina e o fator de alongação são comumente utilizadas em análise filogéticas (MULÉ et al., 2004). O fator de alongação 1- α (*tefl*) é um membro altamente conservado da família das GTPases, que incluem fatores protéicos envolvidos no início do alongamento e término da tradução (KEELING; INAGAKI, 2004). Devido à sua função essencial, *tefl* apresenta-se um gene “housekeeping” com região promotora forte (ELSALAM et al., 2005).

O *tefl* tem sido utilizado nas análises filogenéticas de diversos organismos, como por exemplo *Fusarium*, por ser altamente informativo (GEISER, 2004). A análise filogenética através do *tefl* demonstrou que isolados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* formaram um grupo distinto de outras *formae speciales* e de isolados não patogênicos, indicando que os isolados patogênicos compartilham um mesmo ancestral comum (JIMÉNEZ-GASCO; MILGROOM; JIMÉNEZ-DÍAZ, 2002). Adicionalmente, foi mostrado pela primeira vez, utilizando *tefl*, que a raça 3 do patógeno associado à murcha-do-grão-de-bico na Índia, na verdade se tratava de *F. proliferatum* e não de *F. oxysporum* (GURJAR et al., 2009). Baseando-se na genealogia de genes de *F. oxysporum* usando o *tefl* e o mtDNA, O'Donnell et al. (1998) sugeriram que o *F. oxysporum* f. sp. *cubense* possui pelo menos cinco linhagens filogenéticas, enquanto que Skovgaard et al. (2001), usando múltiplas geneologias, verificaram que oito raças de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* foram monofiléticas e duas apresentaram origens evolucionárias independentes.

Em virtude da importância do feijão-caupi para a região Nordeste do Brasil e demais países que o exploram, bem como dos danos causados pela murcha-de-fusário a essa cultura, somada à complexidade envolvida na classificação de *F. oxysporum*, o presente trabalho teve como finalidade caracterizar morfológica, patogênica e molecularmente, isolados de *F. oxysporum* coletados de plantas de feijão-caupi apresentando sintomas de murcha, cultivadas no Agreste Meridional de Pernambuco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, D. J. **The pathology of tropical food legumes: disease resistance in crop improvement.** New York: John Wiley & Sons, 1983. 413 p.

ALVES-SANTOS, F.; M; BENITO, E. P.; ESLAVA, A. P.; DÍAZ-MÍNGUEZ, J. M. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 8, p. 3335–3340, 1999.

AOKI, T.; O'DONNELL, K.; HOMMA, Y.; LATTANZI, A. R. Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex—*F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. **Mycologia**, Lawrence, v. 95, n. 4, p. 660–684, 2003.

AOKI, T.; O'DONNELL, K.; SCANDIANI, M. M. Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. **Mycoscience**, Tokyo, v. 46, p. 162–183, 2005.

AQUINO, S. F.; NUNES, R. P. Estrutura genética de populações de caupi e suas implicações no melhoramento genético através da seleção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 4, p. 399–412, 1983.

ARMSTRONG, G. M.; ARMSTRONG, J. K. Biological races of *Fusarium* causing wilt of cowpeas and soybeans. **Phytopathology**, Lancaster, v. 40, n. 2, p. 181–193, 1950.

ARMSTRONG, G. M.; ARMSTRONG, J. K. Wilt of chrysanthemum caused by Race 1 of the cowpea *Fusarium*. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 49, n. 7, p. 673–676, 1965.

ASSUNÇÃO, I. P. A.; MICHEREFF, S. J.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; ELOY, A. P.; ROCHA JÚNIOR, O. M.; DUDA, G. P.; NASCIMENTO, C. W. A.; NASCIMENTO, R. S. M. P.; RODRIGUES, J. J. V. Caracterização de solos de Pernambuco quanto a supressividade à murcha-de-fusário do caupi. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, n. 2, p. 161-167, 2003a.

ASSUNÇÃO, I. P.; MICHEREFF, S. J.; MIZUBUTI, E. S. G.; BROMMONSCHENKEL, S. H. Influência da intensidade da murcha-de-fusário no rendimento do caupi. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 615–619, 2003b.

BAAYEN, R. P.; O'DONNELL, K.; BONANTS, P. J. M.; CIGELNIK, E.; KROON, L. P. N. M.; ROEBROECK, E. J. A.; WAALWIJK, C. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic *formae speciales* causing wilt and rot disease. **Ecology and Population Biology**, v. 90, n. 8, p. 891–900, 2000.

BENYON, F. H. L.; BURGESS, L. W.; SHARP, P. J. Molecular genetic investigations and reclassification of *Fusarium* species in sections *Fusarium* and *Roseum*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 10, p. 1164–1174, 2000.

BURGESS, L. W. General ecology of the Fusaria. In: NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; COOK, R. J. (Eds.). *Fusarium: disease, biology and taxonomy*. University Park: The Pennsylvania State University Press, 1981. p. 225–235.

CASTRO, N. R. **Caracterização fisiológica de *Cercospora cruenta* Sacc. e controle genético de cercosporiose em caupi**. Recife: 2000. 48 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

COELHO, R. S. B. Doenças fúngicas do caupi. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO CAUPI, 5., 2001, Teresina. **Anais...** Teresina: Embrapa Meio Norte, 2001. p. 321–322.

CORRELL, J. C. The relationship between *formae speciales*, races, and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 9, p. 1061–1064, 1991.

ELOY, A. P.; MICHEREFF, S. J. Redução no rendimento do caupi em duas épocas de plantio devido à murcha-de-fusário. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, n. 4, p. 330–333, 2003.

ELSALAM, K. A.; ALY, M. A.; ABDEL-SATAR, M. S.; VERREET, E. J. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. **Africano Journal of Biotechnology**, Nigéria, vol. 2, n. 4, p. 96–103, 2003.

FAO. **Faostat** – agricultural statistics database. [online]. Rome: World Agricultural Information Centre, 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 25 jan. 2013.

FREIRE FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi. In: ARAÚJO, J. P.; WATT, E. E. (Eds.). **O caupi no Brasil**. Brasília: EMBRAPA-IITA, 1988. p. 26–46.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E. V. Produção, melhoramento genético e potencialidades do feijão-caupi no Brasil. In: REUNIÃO DE BIOFORTIFICAÇÃO NO BRASIL, 4., 2011, Teresina. **Palestras e Resumos...** Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos; Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 1 CD-ROM.

GEISER, D. M.; JIMÉNEZ-GASCO, M. M.; KANG, S.; MAKALOWSKA, I.; EERARAGHAVAN, N.; WARD, T. J.; ZHANG, N.; KULDAU, G. A.; O'DONNELL, K. Fusarium-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 473–479, 2004.

GERLACH, W.; NIRENBERG, H. **The genus *Fusarium*: a pictorial atlas**. Berlin, Germany: Biol. Bundesanst für Land-u Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, 1982. 406 p.

GUPTA, V. K.; MISRA, A. K.; GAUR, R. K. Growth characteristics of *Fusarium* spp. Causing wilt disease in *Psidium guajava* L. in India. **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, n. 4, p. 452–462, 2010.

GURJAR, G.; BARVE, M.; GIRI, A.; GUPTA, V. Identification of Indian pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with gene specific, ITS and random markers. **Mycologia**, Lawrence, v. 101, n. 4, p. 480–491, 2009.

HOLLIDAY, P. ***Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum***. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1970. 1 p. (C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, 220).

INDEX FUNGORUM, 2013. Disponível em:
<<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>> Acesso em 31 de janeiro de 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 31 jan. 2013.

JIMÉNEZ-GASCO, M. M.; MILGROOM, M. G.; JIMÉNEZ-DIAZ, R. M. Gene genealogies support *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* as a monophyletic group. **Plant Pathology**, London, v. 51, p. 72–77, 2002.

KEELING, P. J.; INAGAKI, Y. A Class of eucakaryotic GTPase with a punctuate distribution suggesting multiple functional replacements of translation elongation factor 1 α . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 101, n. 43, p. 15380–15385, 2004.

KISTLER, H. C. Genetic diversity in the plant–pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 4, p. 474–479, 1997.

LEONG, S. K.; LATIFFAH, Z.; BAHARUDIN, S. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* of banana. **American Journal of Applied Sciences**, v. 7, n. 7, p. 1301–1307, 2009.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Ames: Blackwell, 2006. 388 p.

LESLIE, J. F. Genetic status of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **The Plant Pathology Journal**, v. 15, n. 5, p. 259–269, 1999.

LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; SUMMERELL, B. A. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, p. 107–117, 2001.

LI, S.; TAM, Y. K.; HARTMAN, G. L. Molecular differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* from other *F. solani* based on mitochondrial small rDNA sequences. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 5, p. 491–497, 2000.

LIEVENS, B.; REP, M.; THOMMA, B. Recent developments in the molecular discrimination of formae speciales of *Fusarium oxysporum*. **Pest Management Science**, v. 64, n. 8, p. 781–788, 2008.

MBOFUNG, G. Y.; HONG, S. G.; PRYOR, B. M. Phylogeny of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* inferred from mitochondrial small subunit, elongation factor 1- α , and nuclear ribosomal intergenic spacer sequence data. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n.1, p. 87–98, 2007.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 12 de 28 mar. 2008. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 31 mar. 2008. Seção 1, p. 11–14.

MULÉ, G.; SUSEA, A.; STEA, G.; MORETTI, A. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. **European Journal of Plant pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 6, p. 495–502, 2004.

NELSON, P. E. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In: MACE, M. E.; BELL, A. A.; BECKMAN, C. H. (Eds.). **Fungal wilt diseases of plants**. New York: Academic Press, 1981. p. 51–80.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium* species**: an illustrated manual for identification. University Park: The Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.

O'DONNELL, K. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca* – *Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, Lawrence, v. 92, n.5, p. 919–938, 2000.

O'DONNELL, K.; NIRENBERG, H. I.; AOKI, T.; CIGELNIK, E. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**, Tokyo, v. 41, n. 1, p. 61–78, 2000.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; KISTLER, H. C.; PLOETZ, R. C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, n. 5, p. 2044–2049, 1998.

O'DONNELL, K.; GUEIDAN, C.; SINK, S.; JOHNSTON, P. R.; CROUS, P. W.; GLENN, A.; RILEY, R.; ZITOMER, N. C.; COLYER, P.; WAALWIJK, C.; VAN DER LEE, T.; MORETTI, A.; KANG, S.; KIM, H. S.; GEISER, D. M.; JUBA, J. H.; BAAYEN, R. P.; CROMEY, M. G.; BITHELL, S.; SUTTON, D. A.; SKOVGAARD, K.; PLOETZ, R.; KISTLER, H. C.; ELLIOTT, M.; DAVIS, M.; E SARVER, B. A. J. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. **Fungal Genetics Biology**, v. 46, p. 936–948, 2009.

OLIVEIRA, A. P.; TAVARES SOBRINHO, J.; NASCIMENTO, J. T.; ALVES, A. U.; ALBUQUERQUE, I. C.; BRUNO, G. B. Avaliação de linhagens e cultivares de feijão-caupi, em Areia, PB. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 180–182, 2002.

OYEKAN, P. O. Occurrence of cowpea wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* in Nigeria. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 59, n. 6, p. 488–490, 1977.

PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, F. M. Doenças do feijão caupi. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE J. A. M. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 3. ed. São Paulo: Ceres, v. 2, 1997. p. 222–232.

RAMOS, H. M. M.; BASTOS, E. A.; JÚNIOR, A. S. A.; MAROUELLI, W. A. Estratégias ótimas de irrigação do feijão-caupi para produção de grãos verdes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 2, p. 576–583, 2012.

RIOS, G. P. Doenças fúngicas e bacterianas do caupi. In: ARAÚJO, J. P.; WATT, E. E. (Eds.). **O caupi no Brasil**. Brasília: EMBRAPA-IITA, 1988. p. 549–589.

ROCHA, M. M.; FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; CARVALHO, H. W. L.; BELARMINO FILHO, J.; RAPOSO, J. A. A.; ALCÂNTARA, J. P.; RAMOS, S. R. R.; MACHADO, C. F. Adaptabilidade e estabilidade produtiva de genótipos de feijão-caupi de porte semi-ereto na região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 9, p. 1283–1289, 2007.

RODRIGUES, A. C.; MENEZES, M. Identificação e caracterização patogênica de espécies endofíticas de *Fusarium* de sementes de caupi. **Anais...** Recife: Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica, 2006. vol. 3, p. 203–215.

RUAS, J. F. Feijão. In: **CONAB - Estudos de prospecção de mercado, Safra 2012/2013**. Brasília: CONAB, 2012. p. 63–70.

SKOVGAARD, K.; NIRENBERG, H. I.; O'DONNELL, K.; ROSENDAHL, S. Evolution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races inferred from multigene genealogies. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n.12, p. 1231–1237, 2001.

SNYDER, W. C.; HANSEN, H. N. The species concept in *Fusarium*. **American Journal of Botany**, v. 27, p. 64-67, 1940.

SUMMERREL, A. B.; SALLEN, B.; LESLIE, F. J. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 2, p. 117–127, 2003.

TROISI, M.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. *Gerbera jamesonii*, a new host of *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 1, p. 8–14, 2010.

VEGA-BARTOL, J. J.; MARTÍN-DOMÍNGUEZ, R.; RAMOS, B.; GARCÍA-SÁNCHEZ, M. A.; DÍAZ-MÍNGUEZ, J. M. New virulence groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*: The expression of the gene coding for the transcription factor *ftf1* correlates with virulence. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, n. 4, p. 470–479, 2011.

VOIGT, W.; GHERBAWY, V. **Molecular Identification of Fungi**. 1. ed. New York: Springer, 2010. p. 131–158.

WUNSCH, M. J.; BAKER, A. H.; KALB, D. W.; BERGSTROM, G. C. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *loti* forma specialis nov., a monophyletic pathogen causing vascular wilt of birdsfoot trefoil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 93, p. 58–66, 2009.

XAVIER, T. F.; ARAÚJO, A. S. F.; SANTOS, V. B.; CAMPOS, F. L. Inoculação e adubação nitrogenada sobre a nodulação e a produtividade de grãos de feijão-caupi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 2037–2041, 2008.

CAPÍTULO II

Caracterização patogênica e molecular de isolados de *Fusarium oxysporum* associados à murcha em feijão-caupi

Caracterização patogênica e molecular de isolados de *Fusarium oxysporum* associados à murcha em feijão-caupi

Josiene Silva Veloso¹, Tássio Maurício Esdras Bezerra², André Ângelo Medeiro Gomes¹, Dyana de Albuquerque Tenório¹, Sami Jorge Michereff¹ & Cristiano Souza Lima^{2*}.

¹ Departamento de Agronomia – Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife, PE.

² Universidade Federal Rural de Pernambuco UFRPE - Unidade Acadêmica de Garanhuns, Av. Bom Pastor, s/n, 55292-270, Garanhuns-PE.

*Autor para correspondência (cristiano@uag.ufrpe.br)

RESUMO

Veloso, J. S., Bezerra, T. M. E., Gomes, A. A. M., Tenório, A. D., Michereff, S. J., Lima, C.S. 2013. Caracterização patogênica e molecular de isolados de *Fusarium oxysporum* associados à murcha em feijão-caupi. *Phytopathology*.

A murcha-de-fusário causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* é uma doença economicamente importante para as regiões produtoras de feijão-caupi em todo o mundo, provocando consideráveis perdas no rendimento dessa cultura. O presente estudo teve como objetivo caracterizar isolados de *F. oxysporum* associados à murcha em feijão-caupi no Agreste de Pernambuco. Não foi possível distinguir os isolados com base nas características culturais e micromorfológicas nem correlacioná-las à patogenicidade. Dos 27 isolados analisados, sete não causaram doença e 20 se mostraram patogênicos ao feijão-caupi sendo, portanto, confirmados como f. sp. *tracheiphilum*. A análise de neighbor-joining baseada na região *tefl* agrupou os isolados em seis haplótipos independentemente de serem ou não patogênicos, demonstrando que estes estão intimamente relacionados geneticamente. A f. sp.

tracheiphilum parece ter origens evolucionárias independentes representadas por pelo menos três linhagens filogenéticas que se comportam como polifiléticas e parafiléticas.

Palavras chave: filogenia, diversidade genética, caracterização molecular, *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, *Vigna unguiculata*.

INTRODUÇÃO

O feijão-caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp, é cultivado predominantemente por pequenos e médios produtores nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, onde se constitui como um dos principais componentes da alimentação básica da população. Apesar de sua adaptabilidade às condições edafoclimáticas dessas regiões, essa cultura apresenta baixa produtividade em função do baixo nível tecnológico empregado, pela utilização de cultivares com potencial genético reduzido e à alta incidência de doenças (5).

A murcha-de-fusário causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (E.F. Smith) W.C. Snyder & H.N. Hansen é uma das principais doenças da cultura e se caracteriza pelos sintomas de rápida murcha, clorose e queda prematura das folhas em plantas jovens, o que reflete na redução do seu crescimento. Em plantas mais desenvolvidas, ocorre o nanismo e a clorose precede a queda das folhas e uma murcha gradual de toda a planta. Como se trata de um patógeno de solo, as raízes podem se apresentar mais severamente danificadas do que os sintomas apresentados na parte aérea da planta. Observa-se inicialmente um escurecimento dos vasos condutores que passam a castanho-escuros e, em casos de infecções mais severas, tornam-se necrosados culminando com a morte da planta (5, 14). Esta doença tem sido relatada como uma das principais ameaças dessa cultura na Austrália (14, 36), Nigéria (1),

Estados Unidos (34) e no Brasil (5, 10, 30), devido à elevada agressividade e à capacidade do patógeno sobreviver no solo mesmo na ausência de plantas hospedeiras.

O gênero *Fusarium* compreende importantes espécies fitopatogênicas às leguminosas, causando principalmente podridões radiculares, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., e murchas vasculares, *Fusarium oxysporum* Schlecht. ex Fries (25, 37, 41). As variações morfológicas e patogênicas de *Fusarium* têm resultado em uma classificação complexa dividida em seções, *formae speciales* e raças, de forma que a correta identificação das espécies desse gênero requer observação de muitas variáveis (18). As *formae speciales* são assim classificadas de acordo com a sua gama de hospedeiros (2, 35), enquanto que a subdivisão das *formae speciales* em raças é baseada na virulência ou diferenciação de cultivares hospedeiras (8). A dinâmica taxonomia de *Fusarium* também sofre modificações de acordo com o conceito de espécie adotado: espécie morfológica, quando considera a similaridade de caracteres morfológicos como tamanho e forma dos esporos produzidos; biológica, que requer que membros da mesma espécie sejam sexualmente compatíveis e gerem descendentes férteis; ou filogenética, quando seus representantes compartilham a mesma tendência evolucionária (17).

Fusarium oxysporum é considerado um complexo de espécies (FOSC) que abriga várias linhagens filogenéticas, que na maior parte dos casos não correlacionam com a aplicação do conceito de *forma specialis* (6, 27, 28). Mais de 150 *formae speciales* já foram descritas no FOSC, cada uma consistindo de um ou mais grupos de compatibilidade vegetativa e distintas raças patogênicas (6).

Os estudos filogenéticos têm sido utilizados como importantes ferramentas para elucidação das relações filogenéticas dentro do FOSC, especialmente em relação às *formae speciales* e raças, sendo baseados na análise de sequências de DNA de genes como β -tubulina, fator de alongação 1- α (*tef1*), subunidades mitocondriais (mtSSU) e espaço intergênico do DNA ribossômico (IGS) (6, 20, 27, 28, 32, 42). O gene *tef1* é o mais indicado para estudos

filogenéticos de f. spp. de *F. oxysporum*, visto que outras regiões gênicas podem apresentar sequências não-ortólogas como é o caso da região IGS do rDNA (28).

Considerando que o adequado manejo de qualquer doença passa necessariamente pela correta identificação do seu agente etiológico e tendo em vista a heterogeneidade do complexo *F. oxysporum*, objetivou-se com este trabalho caracterizar patogênica, morfológica e molecularmente, isolados de *F. oxysporum* obtidos a partir de plantas de feijão-caupi apresentando sintomas de murcha.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de isolados de *Fusarium oxysporum*. Entre outubro e dezembro de 2011, plantas de feijão-caupi com sintomas de murcha-de-fusário foram coletadas em diferentes propriedades rurais do município de São João, PE (08°52'15" S, 36°21'28" W), sendo acondicionadas em sacos de papel e encaminhadas ao laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unidade Acadêmica de Garanhuns, onde se procedeu o isolamento dos patógenos associados.

Para tanto, foram coletados fragmentos da região de transição entre os tecidos doente e sadio de plantas com tecido vascular escurecido. Esses fragmentos foram submetidos a desinfestação superficial para eliminação dos microrganismos saprófitas e contaminantes, a partir da imersão em álcool a 70% por 30 s, seguido da imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% de cloro ativo por 2 min e tríplice lavagem em água destilada e esterilizada para remoção do excesso das soluções empregadas anteriormente. Para remoção do excesso de água, os fragmentos vegetais foram dispostos sobre papel de filtro esterilizado e em seguida transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura Ágar-Água (20 g de Ágar em 1 L de água destilada). Tais placas foram então acondicionadas em incubadora do tipo B.O.D.

regulada à temperatura de 25 ± 2 °C, e fotoperíodo de 12:12h (Luz: Escuro) até se observar o crescimento micelial sobre os tecidos vegetais infectados.

Uma vez detectado o crescimento micelial característico de *Fusarium*, este foi transferido para uma nova placa de Petri contendo meio de cultura BDA (200g de batata; 20 g de dextrose; e 20 g de Ágar em 1 L de água destilada) para crescimento das colônias. Em seguida, fragmentos de micélio dessas colônias foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura SNA (Ágar Pobre em Nutriente), para posterior identificação dos isolados ao nível de espécie com base em caracteres morfológicos como presença de falsas cabeças, formato de micro e macroconídios e célula conidiogênica do tipo monofiálide curta e também pela associação hospedeira.

Obtenção de cultura monospórica de *Fusarium oxysporum*. Para obtenção das culturas monospóricas, cada isolado de *F. oxysporum* obtido anteriormente foi plaqueado em meio de cultura Ágar-Água, onde se observou, em microscópio ótico, a presença de conídios individualizados. Em seguida, utilizando-se um estilete de ponta fina, um único conídio de cada isolado foi retirado e transferido para placas de Petri contendo meio de cultura BDA para crescimento das colônias, a partir das quais foram realizados os demais bioensaios.

Os isolados obtidos no presente estudo encontram-se preservados em água destilada e esterilizada e depositados na Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos de Garanhuns – CCG, do Laboratório de Sistemática e Biologia de Fungos Fitopatogênicos, Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns-PE.

Caracterização morfológica. Neste experimento cada isolado foi caracterizado quanto à pigmentação da colônia, ao crescimento micelial e às características micromorfológicas (18).

Para averiguação da taxa de crescimento micelial, um disco de micélio de 5,0 mm de diâmetro de cada isolado foi transferido para uma placa de Petri de 6,0 cm de diâmetro contendo BDA. Em seguida, as placas foram incubadas a 25 °C no escuro por três dias,

quando então foi tomada a medida do diâmetro ortogonal das colônias formadas. O mesmo procedimento descrito acima foi adotado para avaliar a pigmentação das colônias, diferindo nas condições de incubação cuja temperatura foi de 20 °C e fotoperíodo de 12 h por 10 a 14 dias. Foram empregados 27 tratamentos (=isolados) tanto para o crescimento micelial (n= 6 repetições) quanto para a coloração das colônias (n=3 repetições)., mas apenas os dados do crescimento micelial foram submetidos ao teste de Scott-knott ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa ASSISTAT Versão 7.6 beta (4).

Para a caracterização micromorfológica, um disco de micélio de cada isolado foi transferido para placa de Petri com meio de cultura SNA contendo fragmentos secos e esterilizados de folhas de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.). Essas placas foram incubadas a 25 °C e fotoperíodo de 12 h por 14 dias, quando então foram observadas as características como a presença ou não e cor de esporodóquios; frequência, tamanho, formato e origem de micro e macroconídios; tipos de fiálides; presença ou não de clamidósporos e presença ou não de microconídios em falsas cabeças. O comprimento e largura dos micro e macroconídios foram medidos através do programa Axion vision LE versão 4.8.2.0.

Teste de patogenicidade. Neste experimento foi determinado o nível de virulência das populações de *Fusarium* associadas à murcha-de-fusário do feijão-caupi (isolados listados na Tabela 1). Para tanto, colônias de cada um dos 26 isolados provenientes do município de São João, mais o isolado CMM 732, obtido junto à Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos “Prof Maria Menezes” – CMM, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, foram cultivadas por sete dias em placas de Petri contendo meio de cultura BDA incubadas sob as mesmas condições anteriormente especificadas. Após esse período, foi preparada uma suspensão de esporos de cada isolado por meio da adição de água destilada e esterilizada sobre a superfície da colônia e raspagem com lâmina de vidro. As suspensões de esporos e micélio foram filtradas em gaze e as concentrações ajustadas a 1×10^6 conídios.mL⁻¹

em câmara de Neubauer. Como hospedeiro foram utilizadas plantas de feijão-caupi da variedade BR17-Gurguéia com sete dias de idade cultivados em casa de vegetação em bandejas contendo areia lavada e autoclavada (120 °C, 1 atm, 60 min por dois dias consecutivos).

A inoculação dos diferentes isolados foi efetuada pelo método de corte de raízes (“deeping”) (29). O sistema radicular das plantas foi lavado em água corrente e cortado em 1/3 do seu comprimento, sendo posteriormente imerso durante 10 min na suspensão padronizada de conídios. Como testemunhas foram utilizadas plantas que tiveram seu sistema radicular mergulhado apenas em água destilada e esterilizada ou em suspensão de conídios de *F. oxyporum* f. sp. *cubense* (CMM 807), constituindo-se assim nas testemunhas absoluta e relativa, respectivamente.

Após a inoculação, as plantas foram transplantadas para vasos de plástico com capacidade aproximada de 3L contendo areia lavada e distribuídos aleatoriamente sobre bancadas em casa de vegetação. Cada tratamento (n=29) foi representado por 25 plantas, entretanto, para fins de análises, foram utilizadas apenas cinco repetições, considerando cada repetição a média de cinco plantas. Durante a condução do bioensaio as plantas foram irrigadas com água e solução nutritiva completa de Hogland em dias alternados, ou seja, em um dia as plantas foram irrigadas com água e no outro com a solução acima (19).

Os sintomas da doença foram avaliados aos 21 dias após a inoculação das plantas utilizando uma escala de 0 a 4 de acordo com os níveis de severidade, onde 0 = ausência de sintomas; 1 = ausência de sintomas externos de murcha e presença de escurecimento vascular confinada à raiz principal; 2 = sintomas iniciais da doença (amarelecimento e murcha) e escurecimento vascular atingindo o terço inferior do caule; 3 = sintomas bem definidos da doença (amarelecimento, murcha, lesões foliares e seca de folhas) e escurecimento vascular atingindo o terço médio da planta; e 4 = sintomas bem definidos da doença e escurecimento

vascular atingindo o terço superior da planta ou plantas mortas (24). Após a avaliação da severidade, fragmentos das plantas com sintomas foram coletados e reisolados como descrito anteriormente para confirmação do agente etiológico.

A partir dos dados obtidos com a escala de notas acima, foi calculado o índice de severidade da doença (SVD) (24) pela expressão: $SVD = [(N_1) + (N_2 \times 2) + (N_3 \times 3) + (N_4 \times 4) / (N_0 + N_1 + N_2 + N_3 + N_4)] \times 100$, onde N_0 = número de plantas com doença na categoria 0; N_1 = número de plantas com doença na categoria 1; N_2 = número de plantas com doença na categoria 2; N_3 = número de plantas com doença na categoria 3 e N_4 = número de plantas com doença na categoria 4. Posteriormente, apenas os dados dos isolados que se mostraram patogênicos ao feijão-caupi foram submetidos ao teste de Scott-knott ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa ASSISTAT Versão 7.6 beta (4).

Caracterização molecular. Inicialmente foi preparada uma suspensão de esporos de cada isolado de *F. oxysporum* crescidos por sete dias em tubos de ensaio contendo meio BDA. Em seguida, essa suspensão foi transferida para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio líquido BD (Batata-Dextrose) para crescimento do fungo. Após dois dias em temperatura ambiente ($25\text{ }^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$), a massa micelial formada foi coletada, filtrada em papel de filtro, lavada três vezes em água destilada e esterilizada, e armazenada a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

O micélio coletado foi congelado em nitrogênio líquido e então macerado em cadinho. Em seguida, o micélio triturado foi submetido a extração de DNA, que foi realizada seguindo um protocolo baseado em CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônia) (23).

Quantidade de DNA nas amostras foi verificada utilizando 5 μL de DNA, adicionando-se 2 μL de tampão de amostra (Blue Juice, Invitrogen) e 4 μL de água destilada e autoclavada e analisadas em gel de agarose a 1%, corado com Syber Safe, Invitrogen a 13 μL /100mL. Após a corrida, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta, utilizando-se transiluminador UV. As amostras de DNA foram quantificadas por comparação da intensidade das bandas com

marcador 1Kb ladder (Invitrogen) e as concentrações ajustadas para $\sim 1-20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Em seguida, foram mantidas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ até a realização das reações de PCR.

Sequenciamento do fragmento de *tef1* e análise filogenética. Fragmentos do gene *tef1* dos isolados de *F. oxysporum* obtidos de feijão-caupi foram amplificados utilizando os *primers* específicos Ef-1 (forward; 5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') e Ef-2 (reverse; 5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') (27, 28).

As reações para amplificação foram submetidas à desnaturação inicial por 1 min a $94 \text{ }^\circ\text{C}$, seguidas de 35 ciclos. Cada ciclo consistiu de uma etapa de desnaturação (1 min a $94 \text{ }^\circ\text{C}$), uma etapa de anelamento (30 s a $62 \text{ }^\circ\text{C}$), e uma etapa de extensão (1 min a $72 \text{ }^\circ\text{C}$) e, por fim, uma extensão final (5 min a $72 \text{ }^\circ\text{C}$). O produto da amplificação foi analisado em gel e agarose de gel a 1%, corado com Syber Safe, Invitrogen a $13 \mu\text{l}/100 \text{ ml}$. Os produtos amplificados por PCR foram enviados para purificação e sequenciamento nas direções senso e anti-senso utilizando os *primers* descritos anteriormente, pela empresa Macrogen sediada na Coréia do Sul.

Os eletroferogramas foram analisados visualmente utilizando o programa BioEdit e as sequências obtidas foram comparadas na base de dados do National Center for Biotechnology Information-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando o programa BLAST. Os alinhamentos múltiplos das sequências dos isolados de *F. oxysporum* associados à murcha do feijoeiro e sequências de referência de f. spp. de *F. oxysporum* (28) foram corrigidos manualmente utilizando o programa BioEdit. As análises filogenéticas neighbor-joining foram realizadas no programa PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) versão 4.0b10. As análises de bootstrap foram baseadas em 1000 repetições e como outgroup foi utilizado *Fusarium foetens* (autoridades). O Programa PAUP agrupou os isolados mostrando o nível de similaridade genética entre eles (haplótipos).

RESULTADOS

Caracterização morfológica. Os 27 isolados de *F. oxysporum* avaliados neste estudo apresentaram variabilidade quanto à coloração das colônias, crescimento micelial, formato e tamanho dos micro e macroconídios produzidos (Tabela 2). De modo geral, esses isolados apresentaram micélio aéreo bastante denso com coloração tanto na superfície superior quanto inferior da colônia variando de branco (3,7%), salmão (51,9%), vermelho (3,7%) a violeta (40,7%). Eles foram separados em quatro grupos de acordo com o diâmetro da colônia formada após três dias de incubação (Tabela 2). O primeiro grupo incluiu apenas CCG3 e CCG7 com diâmetro maior que 3,0 cm, enquanto que o segundo reuniu CCG1, CCG6, CCG10, CCG11, CCG14, CCG18, CCG25 e CCG26, cujos diâmetros variaram de 2,7 a 3,0 cm. Aproximadamente 40,7% dos isolados apresentaram crescimento entre 2,5 e 2,7 cm, enquanto que os outros 29,6% restantes tiveram crescimento $\leq 2,4$ cm (Tabela 2).

A morfologia dos micro e macroconídios também apresentou considerável grau de variação entre os isolados estudados. Os microconídios, sempre mais abundantes que os macroconídios, apresentaram comprimento entre 5,5 e 10,0 μm e largura de 2,3 a 4,0 μm , formato oval a elipsóide, ligeiramente curvado e sem septo, dispostos em falsas cabeças produzidos em monofiálides curtas. Os macroconídios, por sua vez, produzidos em conidióforos ou na superfície de esporodóquios, apresentaram formato falcado, moderadamente curvado com três a cinco septos e medindo de 22, 2 a 45,0 μm de comprimento por 5,4 a 3,2 μm de largura. Após 10 dias de crescimento em meio SNA, foi observada abundante produção de clamidósporos de forma globosa a oval, formados nas extremidades ou intercalados às hifas ocorrendo em pares, solitários ou em cadeias. Os esporodóquios, quando produzidos, foram de coloração alaranjada a partir de 20 dias de incubação.

Teste de Patogenicidade. Foram coletados e identificados 26 isolados de *F. oxysporum*, dos quais 19, somados ao isolado obtido da CMM, se mostraram patogênicos ao feijão-caupi causando doença com diferentes níveis de severidade ($F_{19, 80} = 68,96$; $P < 0,01$) e por isso foram considerados como f. sp. *tracheiphilum*. As plantas inoculadas com os isolados CMM 732, CCG 4, CCG 13 e CCG 24 apresentaram doença com severidade $\geq 80\%$, ao passo que CCG 5, CCG 16 e CCG 2 causaram doença com severidade entre 58% e 69% (Tabela 3). Já os isolados CCG 15, CCG 22 e CCG 25 incitaram doença com severidade entre 10 e 19%, enquanto que para CCG 6, CCG 7, CCG 9, CCG 10, CCG 11, CCG 14, CCG 17, CCG 19, CCG 21 e CCG 23 a severidade variou de 1% a 7% (Tabela 3). Semelhantemente às testemunhas absoluta e relativa, os isolados CCG 1, CCG 3, CCG 8, CCG 12, CCG 18, CCG 20 e CCG 28, embora obtidos de plantas sintomáticas coletadas em campo, não incitaram doença quando inoculados em plantas de feijão-caupi cultivadas em casa de vegetação sendo, portanto, considerados não patogênicos.

Assim como a severidade, os sintomas apresentados pelas plantas infectadas também foram muito variáveis, observando-se inicialmente perda da turgescência, amarelecimento e queda das folhas, características estas denominadas sintomas reflexo. A desfolha teve início com as folhas mais velhas das plantas e, em alguns casos, progrediu até a região apical levando-as à morte. A partir do corte longitudinal da raiz principal e da haste das plantas infectadas, também foi possível observar sintomas internos como o escurecimento e/ou necrose do sistema vascular, principalmente naquelas com severidade $\geq 80\%$.

Caracterização molecular. A partir do sequenciamento do gene *tef1* dos 26 isolados de *F. oxysporum* obtidos no presente estudo mais o CMM 732, somado a sequências de referência de 31 *formae speciales* (28), obtidas junto ao GenBank, foi gerada uma árvore de neighbor-joining com 1.000 repetições de bootstrap. A árvore filogenética gerada teve a topologia muito semelhante àquela publicada por O'Donnell et al. (28), onde podem ser observados

quatro clados bem definidos com bom suporte de bootstrap (Figura 1). A maioria dos isolados se agruparam no Clado 4 juntamente com dois isolados de referência de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (NRRL 22554 e NRRL 38277) e as f. spp. *vasinfectum*, *cucumerinum*, *gladioli*, *lupini*, *raphani*, *fabae*, *cubense*, *dianthi*, *arctii*, *pisii*, *niveum*, *melongenae*, *conglutinans*, *cassiae*, *lini* e *melonis*, formando o Sub-Clado 4A com 86% de suporte. O outro isolado de referência de f. sp. *tracheiphilum*, NRRL 36284, por sua vez, agrupou-se no Clado 3 com 98% de suporte de bootstrap juntamente com as f. spp. *perniciosum*, *vasinfectum*, *canariensis*, *cubense* e *hebes*. O isolado CCG19 foi altamente divergente dos demais, agrupado-se no Clado 1 suportado com 91% de bootstrap junto às f. spp. *betae*, *lupini* e *conglutinans*.

Considerando o nível de resolução da árvore gerada, verifica-se que os 27 isolados de *F. oxysporum* analisados, independentemente de serem ou não patogênicos ao feijão-caupi, representaram seis haplótipos [H1 (CCG 22, CCG 25), H2 (CCG 20, CCG 1), H3 (CCG 4), H4 (CCG 9), H5 (CCG 3, CCG 6, CCG 12, CCG 2, CCG 18, CCG 5, CCG 16, CCG 15, CCG 17, CMM 732, CCG 26, CCG 7, CCG 23, CCG 14, CCG 24, CCG 11, CCG 10, CCG 8, CCG 13 e CCG 21) e H6 (CCG 19)] considerando o gene *tef1* (> 50% de bootstrap) e se relacionaram filogeneticamente com isolados específicos de outros hospedeiros.

DISCUSSÃO

No presente estudo foram empregadas tanto as características morfológicas quanto teste de patogenicidade e sequenciamento do gene *tef1* para examinar a relação entre isolados de *F. oxysporum* coletados de plantas de feijão-caupi apresentando sintomas de murcha. Os aspectos culturais apresentados pelos isolados testados como micélio aéreo abundante e denso com cores variando do branco ao violeta e diferentes taxas de crescimento micelial foram semelhantes aos relatados para *F. oxysporum* (18, 26). As características micromorfológicas

observadas nos isolados coletados em feijão-caupi também são semelhantes a outras descrições envolvendo *F. oxysporum* (3, 12, 26). Essas, ainda que somadas às características culturais, não fornecem subsídio suficiente para diferenciar as diversas *formae speciales* e raças dentro do complexo *Fusarium* (26, 37), mas são comumente utilizadas para diferenciar as espécies desse gênero por serem relativamente mais fáceis de se aplicar (31). Não foi possível correlacionar os caracteres morfológicos e a patogenicidade, mas, de modo geral, os isolados patogênicos ao feijão-caupi produziram menos macroconídios que aqueles não patogênicos, semelhantemente ao relatado para isolados de *F. oxysporum* f. sp. *betae* (13).

Mesmo sendo inoculados numa cultivar altamente suscetível à f. sp. *tracheiphilum*, nem todos os isolados de *F. oxysporum* avaliados causaram murcha no feijão-caupi, assim como não se constatou desenvolvimento de murcha em plantas da cultivar BR17-Gurguéia inoculadas com isolados de *F. oxysporum* coletados em sementes de feijão-caupi (31). Esses não são casos isolados, tendo em vista que, dentre 166 isolados de *F. oxysporum* coletados de plantas sintomáticas de feijão-comum numa mesma região, apenas quatro se confirmaram como f. sp. *phaseoli* (9) e de 36 isolados dessa espécie coletados de plantas sintomáticas de beterraba, apenas nove se confirmaram como f. sp. *betae* quando submetidos a testes de patogenicidade (13). Além da variação quanto à patogenicidade, os isolados confirmados como f. sp. *tracheiphilum*, por sua vez, diferiram quanto à virulência causando doença com diferentes níveis de severidade, semelhantemente ao relatado para isolados de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em feijão-comum (40) e para isolados de *Fusarium udum* em feijão-guandú, *Cajanus cajan* L (22).

Os isolados não patogênicos podem se tratar de outras f. spp., como por exemplo a f. sp. *phaseoli*, uma vez que nas propriedades onde foram realizadas as coletas o cultivo do feijão-caupi se alterna com o do feijão-comum. Podem ainda estar associados endofiticamente ou ser simplesmente saprófitas que, incapazes de penetrar até o sistema vascular (11), permanecem

aderidos à camada mais superficial das raízes e durante o processo de isolamento contaminam as colônias patogênicas em desenvolvimento.

As relações filogenéticas baseadas no gene *tef1* entre isolados de *F. oxysporum* obtidos de feijão-caupi, também não se correlacionaram com a patogenicidade, uma vez que os haplótipos reuniram indistintamente tanto isolados patogênicos com diferentes níveis de virulência quanto aqueles não patogênicos. A falta de correlação entre genótipo e patótipo pode ocorrer pela inativação total ou parcial dos genes virulentos que resulta na perda de patogenicidade sem, contudo, alterar a estrutura filogenética geral (33). Essa falta de correlação sugere que os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* podem ter se originado de uma população não patogênica pré-existente ou então que isolados patogênicos perderam essa capacidade ao longo da evolução, como já observado para *F. oxysporum* (11). O genoma dessa espécie é constituído por várias famílias de elementos transponíveis que são frequentemente reiteradas, o que pode contribuir para a quebra e rearranjo de cromossomos (15) e, com isso, influenciar na sua patogenicidade.

Estudo realizado com 54 isolados de *F. oxysporum* coletados de *Pisum sativum* L. e do solo de diferentes origens geográficas também não demonstrou correlação entre a filogenia e a patogenicidade (33). Por outro lado, em outros estudos os marcadores moleculares RFLP e RAPD permitiram distinguir isolados patogênicos de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* de isolados supostamente não-patogênicos coletados em diferentes regiões (9,41), enquanto que os padrões de RAPD não foram capazes de correlacionar a patogenicidade às raças fisiológicas 1 e 3 de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* coletadas de *Gerbera jamesonii* L. (38). Através de comparações das sequências de DNA nuclear e genes mitocondrial, as relações filogenéticas de quatro f. spp. de *F. oxysporum* foram analisadas, chegando-se à conclusão de que a f. sp. *cubense* abriga pelo menos cinco linhagens com origens evolucionárias independentes (27). Em contrapartida, a relação filogenética da f. sp. *ciceris* baseada na filogenia das sequências

de *tef1*, β - tubulina, histonas, actinas e calmodulina, originou um agrupamento distinto de outras f. spp. e isolados não patogênicos, indicando que a f. sp. *ciceris* trata-se de um grupo monofilético (18).

Diferentemente dos resultados obtidos neste trabalho, a diversidade filogenética de *Fusarium redolens* – *F. hostae* mostrou-se pequena, uma vez que os 37 isolados avaliados foram representados por apenas três haplótipos com base em *tef1* e dois háplotipos baseados na análise do mtDNA (7). Ainda de acordo com esses autores, os isolados de *F. redolens* f. sp. *asparagi* e os de *F. redolens* f. sp. *dianthi* foram praticamente homogêneos quando os caracteres moleculares foram combinados. Dos seis haplótipos formados a partir da filogenia baseada no gene *tef1* dos 27 isolados de *F. oxysporum* avaliados, um apresentou tanto isolados patogênicos como não patogênicos ao feijão-caupi, ao passo que três haplótipos reuniram apenas os isolados patogênicos, indistintamente do seu nível de virulência. Enquanto que, apenas um haplótipo apresentou somente isolados não patogênicos (Figura 1).

Essa elevada diversidade de haplótipos observada no presente estudo pode ser indício da ocorrência de recombinação gênica, onde a troca de material genético se dá através do mecanismo parassexual (18, 33), uma vez que espécies de *F. oxysporum* não possuem estágio sexual conhecido (18). Outra explicação para uma alta diversidade genética em uma população restrita geograficamente seria várias introduções do patógeno na área de coleta das amostras, possivelmente associados às sementes de caupi que foram levadas a essa região, pois essa planta não é originária do Brasil. A alta variabilidade genética dentro da f. sp. *tracheiphilum* pode ocorrer ainda pela co-evolução do fitopatógeno com o hospedeiro, tendo em vista que as práticas culturais e condições ambientais, bem como a estrutura e umidade do solo, influenciam no ciclo biológico do patógeno, incluindo a sua capacidade de causar doença (39).

A f. sp. *tracheiphilum* parece ter origens evolucionárias independentes, uma vez que não forma grupos exclusivos dentro da filogenia molecular, comportando-se como polifilética e parafilética. Pode-se sugerir a partir dos resultados obtidos no presente estudo que a f. sp. *tracheiphilum* apresenta pelo menos três linhagens filogenéticas representadas pelos cladogramas 1, 3 e 4 (Figura 1). A alta diversidade genética intraespecífica de *F. oxysporum* associado ao feijão-caupi pode representar sérios riscos a esta cultura, tornando-se necessário a adoção de medidas de manejo que impeçam a sua disseminação. Para esclarecer melhor a estrutura genética de *F. oxysporum* associado à murcha em feijão-caupi recomenda-se a utilização de outros marcadores gênicos, estudos sobre grupos de compatibilidade vegetativa e avaliação de uma população maior e com ampla distribuição geográfica.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão de bolsa de estudo. Ao Dr. Félix (IPA-Recife) e Dr. Milton Cardoso e Edson Bastos (EMBRAPA - Meio Norte: Teresina) pela concessão de sementes da cultivar BR17-Gurguéia. À Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, ao Prof. Carlos Ribeiro e à Profa. Érika Valente Medeiros pela estrutura fornecida para condução desse experimento. Aos produtores rurais do município de São João por permitirem as coletas em suas lavouras.

LITERATURA CITADA

1. Armstrong, G. M., e Armstrong, J. K. 1980. Cowpea wilt *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* Race 1 from Nigeria. *Plant Dis.* 64:954–955.
2. Armstrong, G. M., e Armstrong, J. K. 1981. Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. p. 391–399. In Nelson, P. E., Toussoun, T. A., and Cook, R. J. eds.). *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. Pennsylvania State University, University Park.
3. Arruda, G. M. T., Miller R. N. G., Ferreira M. A. S. V., e Café-Filho A. C. 2005. Morphological and molecular characterization of the sudden death syndrome pathogen of soybean in Brazil. *Plant Pathol.* 54:53–65.
4. Assistat Versão 7.6 beta. 2011 – Disponível em: <http://www.assistat.com>.
5. Assunção, I. P., Michereff, S. J., Mizubuti, E. S. G., e Brommonschenkel, S. H. 2003. Influência da intensidade da murcha-de-fusário no rendimento do caupi. *Fitop. Bras.* 28:615–619.
6. Baayen, R. P., O'Donnell, K., Bonants, P. J. M., Cigelnik, E., Kroon, L. P. N. M., Roebroek, E. J. A., e Waalwijk, C. 2000. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathology* 90:891–900.
7. Baayen, R. P., O'Donnell, K., Breeuwsma, S., Geiser, D. M., e Waalwijk, C. 2001. Molecular relationships of fungi within the *Fusarium redolens*–*F. hostae* clade. *Phytopathology* 91:1037–1044.
8. Correll, J. C. 1991. The relationship between formae speciales, races, and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 81:1061–1064.

9. Cramer, R. A., Byrne P. F., Brick, M. A., Panella, L., Wickliffe, E., e Schwartz, H. F. 2003. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from common bean and sugar beet using pathogenicity assay and random-amplified polymorphic DNA markers. *J. Phytopathol.* 151:352–360.
10. Eloy, A. P., e Michereff, S. J. 2003. Redução no rendimento do caupi em duas épocas de plantio devido à murcha-de-fusário. *Summa Phytopat.* 29: 330–333.
11. Gordon, T. R., e Martyn, R. D. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35:111–28.
12. Gottwald, S., Germeter, C. U., e Ruhmann, W. 2001. Computerized image analysis in *Fusarium* taxonomy. *Mycol. Res.* 105:206–214.
13. Hanson, L. E., e Hill., A. L. 2004. *Fusarium* species causing fusarium yellows of sugarbeet. *J. Sugar Beet Res.* 41:163–178.
14. Holliday, P.1970. *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1 p. (C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, 220).
15. Hua-Van, A., Daviére, J. M., Kaper, F., Langin, T., e Dadoussi, M. J. 2000. Genome organization in *Fusarium oxysporum*: clusters of class II transposons. *Curr. Genet.* 37: 339–347.
16. Jiménez-Gasco, M. M., Milgroom, M. G., e Jiménez-Díaz, R. M. 2002. Gene genealogies support *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* as a monophyletic group. *Plant Pathol.* 51:72–77.
17. Leslie, J. F., Zeller, K. A., e Summerell, B. A. 2001. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 59:107–117.
18. Leslie, J. F., e Summerell, B. A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Press. 1:388.

19. Maringoni, A.C., e Lauretti, R.L.B. 1999. Reação de genótipos de feijoeiro comum a *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Phaseoli*, *Macrophomina phaseolina* e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Pesqui. agropecu. Bras.* 34:4535–542.
20. Mbofung, G. Y., Hong, S.G., e Pryor, B.M. 2007. Phylogeny of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* inferred from mitochondrial small subunit, elongation factor 1- α , and nuclear ribosomal intergenic spacer sequence data. *Phytopathology* 97: 87–98.
21. McKinney, H. H. 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *J. Agric.Res.* 26:195–218.
22. Mesapogu, S., Bakshi, A., Babu, B.K., Reddy, S.S., Saxena, S., e Arora, D.K. 2012. Genetic diversity and pathogenic variability among Indian isolates of *Fusarium udum* infecting pigeonpea *Cajanus cajan* (L.) millsp.). *Inter. Res. J. Agric. Sci. and Soil Sci.* 2:051–057.
23. Murray, M. G., e Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research, Oxford* 8: 4321–4325.
24. Nascimento, S.R.C., Kurozawa, C., e Maringoni, A.C. 1995. Avaliação de raças fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Fitop. Bras.* 20:214–217.
25. Nelson, P.E., Toussoun, T.A., e Cook, R.J. (eds.). 1981. *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. Pennsylvania State University, University Park.
26. Nelson, P.E., Toussoun, T.A., e Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium species: an illustrated manual for identification*. University Park: The Pennsylvania State University Press, 1983. 193p.
27. O'Donnell, K., Cigelnik, E., Kistler, H.C., e Ploetz, R.C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *P. Natl. Acad. Sci.* 95:2044–2049.

28. O'Donnell, K., Gueidan, C., Sink, S., Johnston, P. R., Crous, P. W., Glenn, A., Riley, R., Zitomer, N. C., Colyer, P., Waalwijk, C., van der Lee, T., Moretti, A., Kang, S., Kim, H. S., Geiser, D. M., Juba, J. H., Baayen, R. P., Crome, M. G., Bithell, S., Sutton, D. A., Skovgaard, K.; Ploetz, R., Kistler, H. C., Elliott, M., Davis, M., e Sarver, B. A. J. 2009. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genet. Biol.* 46:936–948.
29. Pastor-Corrales, M .A., e Abawi, G. S.1987. Reactions of selected bean germplasms to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Plant Dis.* 71: 990–993.
30. Rios, G. P.188 Doenças fúngicas e bacterianas do caupi. In: ARAÚJO, J. P.; WATT, E. E. (Eds.). O caupi no Brasil. Brasília: EMBRAPA-IITA 1: 549–589.
31. Rodrigues, A. C., e Menezes, M. 2006. Identificação e caracterização patogênica de espécies endofíticas de *Fusarium* de sementes de caupi. Recife: Academia Pernambucana de Ciência Agronômica 3 (Anais): 203–215.
32. Skovgaard, K., Nirenberg, H. I., O'Donnell, K., and Rosendahl, S. 2001. Evolution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races inferred from multigene genealogies. *Phytopathology* 91: 1231–1237.
33. Skovgaard, K., Bodker, L., e Rosendahl, S. 2002. Population structure and pathogenicity of members of the *Fusarium oxysporum* complex isolated from soil and root necrosis of pea *Pisum sativum* L.). *Fems. Microbiol. Ecol.* 42:367–374.
34. Smith, S.N., Helms, D.M., Temple, S.R., e Frate, C. 1999. The distribution of *Fusarium* wilt of blackeyed cowpeas within California caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* Race 4. *Plant Dis.* 83:694–694.
35. Snyder, W.C., e Hansen, H.N. 1940. The species concept in *Fusarium*. *Am. J. Bot.* 27:64–67.

36. Summerell, B.A., Leslie, J.F., Liew, E.C.Y., Laurence, M.H., Bullock, S., Petrovic, T., Bentley, A.R., Howard, C.G., Peterson, S.A., Walsh, J.L., e Burgess, L.W. 2011. *Fusarium* species associated with plants in Australia. *Fungal Divers.* 46:1–27.
37. Summerell, B.A., Salleh, B., e Leslie, J.F. 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Dis.* 82:117–128.
38. Troisi, M., Gullino, M.L., e Garibaldi, A. 2010. *Gerbera jamesonii*, a new host of *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. *Phytopathology* 158:8–14.
39. Tu, J.C. 1994. Effects of soil compaction, temperature, and moisture on the development of the *Fusarium* root rot complex of pea in southwestern Ontario. *Phytoprotection* 75:125–131.
40. Vega-Bartol, J.J., Martín-Dominguez, R., Ramos, B., García-Sánchez, M.A., e Díaz-Mínguez, J.M. 2011. New virulence groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*: The expression of the gene coding for the transcription factor *ftf1* correlates with virulence. *Phytopathology* 101:470–479.
41. Woo, S.L., Zoina, A., Del Sorbo, G., Lorito, M.; Nanni, B., Scala, F., e Noviello, C. 1996. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs, and RAPD. *Phytopathology* 86:966–973.
42. Wunsch, M.J., Baker, A.H., Kalb, D.W., and Bergstrom, G.C. 2009. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *loti* forma specialis nov., a monophyletic pathogen causing vascular wilt of birdsfoot trefoil. *Plant Dis.* 93: 58–66.

TABELA 1. Relação de isolados de *Fusarium oxysporum* associados à murcha em feijão-caupi coletados no município de São João, Pernambuco.

Áreas*	Código CCG**	Coordenadas	Altitude (m)
A1	CCG 1	08°51'5,4'' S	697,0
	CCG 2	36°22'35,1'' W	
	CCG 3		
A2	CCG 4	08°51'33'' S 36°22'40'' W	719,0
A3	CCG 5	08°51'31,4'' S	710,0
	CCG 6	36°22'40,2'' W	
A4	CCG 7	08°51'24,4'' S	724,0
	CCG 8	36°22'40,5'' W	
A5	CCG 9	08°51'24,2'' S	722,0
	CCG 10	36°22'38,8'' W	
	CCG 11		
A6	CCG 12	08°51'24,4'' S	718,0
	CCG 13	36°22'41,2'' W	
	CCG 14		
A 7	CCG 15	08°51'24,5'' S 36°22'31,3'' W	717,0
A8	CCG 16	08°51'24,4'' S 36°22'26,01'' W	719,0
A 9	CCG 17	08°51'24,0'' S 36°22'16,02'' W	714,0
A10	CCG 18	08°54'5,2'' S	738,0
	CCG 19	36°21'19,1'' W	
A11	CCG 20	08°54'3,4'' S	729,0
	CCG 21	36°21'12,70'' W	
A12	CCG 22	08°53'30,0'' S	769,0
	CCG 23	36°21'2,8'' W	
A13	CCG 24	08°51'33,2'' S	702,0
	CCG 25	36°32'16'' W	
A14	CCG 26	08°51'33,2'' S 36°32'16'' W	702,0
–	CMM 732***	09°15'29,7'' S 36°35'58,2'' W	–

* Áreas no município de São João-PE, onde foram coletadas plantas de feijão-caupi com sintomas de murcha.

**CCG = Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos , UAG/UFRPE, Garanhuns-PE.

***CMM = Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos “Profa. Maria Menezes”- Setor de Fitossanidade, Departamento de Agronomia, UFRPE, Recife-PE.

TABELA 2. Coloração das colônias e médias \pm EP das demais características morfológicas de isolados de *Fusarium oxysporum* associados à murcha em feijão-caupi.

Isolados	Coloração da colônia*	Crescimento micelial **	Microconídios		Macroconídios	
			Comprimento	Largura	Comprimento	Largura
CCG 3	Violeta	3,3 \pm 0,11 a	5,5 \pm 0,32	2,3 \pm 0,22	33,5 \pm 1,23	5,0 \pm 0,19
CCG 7	Salmão	3,3 \pm 0,11 a	8,8 \pm 0,18	3,2 \pm 0,09	31,4 \pm 0,72	4,1 \pm 0,10
CCG 1	Violeta	3,0 \pm 0,05 b	7,4 \pm 0,35	2,3 \pm 0,09	42,5 \pm 0,70	3,5 \pm 0,12
CCG 6	Salmão	3,0 \pm 0,06 b	7,8 \pm 0,18	2,7 \pm 0,09	26,0 \pm 1,09	4,2 \pm 0,13
CCG 26	Salmão	3,0 \pm 0,14 b	7,4 \pm 0,20	3,5 \pm 0,08	32,2 \pm 1,06	4,1 \pm 0,19
CCG 25	Salmão	2,9 \pm 0,11 b	9,3 \pm 0,39	3,7 \pm 0,14	41,2 \pm 0,47	5,3 \pm 0,12
CCG 18	Salmão	2,8 \pm 0,06 b	6,0 \pm 0,16	3,2 \pm 0,11	35,0 \pm 0,74	5,3 \pm 0,18
CCG 10	Salmão	2,8 \pm 0,12 b	8,7 \pm 0,19	3,6 \pm 0,08	39,0 \pm 0,76	5,0 \pm 0,11
CCG 11	Violeta	2,7 \pm 0,07 c	10,0 \pm 0,23	4,0 \pm 0,10	41,1 \pm 0,60	4,8 \pm 0,09
CCG 14	Salmão	2,7 \pm 0,08 c	7,5 \pm 0,34	3,3 \pm 0,15	36,0 \pm 0,79	4,9 \pm 0,13
CCG 4	Salmão	2,6 \pm 0,02 c	7,4 \pm 0,38	2,4 \pm 0,12	31,0 \pm 0,90	3,3 \pm 0,13
CCG 8	Branco	2,6 \pm 0,13 c	9,4 \pm 0,43	4,0 \pm 0,14	38,0 \pm 0,67	4,2 \pm 0,10
CCG 12	Violeta	2,6 \pm 0,12 c	8,5 \pm 0,30	4,0 \pm 0,10	45,0 \pm 0,88	4,5 \pm 0,10
CCG 16	Salmão	2,6 \pm 0,08 c	6,8 \pm 0,23	3,5 \pm 0,10	26,4 \pm 1,92	3,6 \pm 0,20
CCG 23	Violeta	2,6 \pm 0,26 c	7,3 \pm 0,18	3,7 \pm 0,11	30,4 \pm 1,67	5,4 \pm 0,23
CCG 13	Salmão	2,5 \pm 0,19 c	6,4 \pm 0,24	3,0 \pm 0,34	26,4 \pm 1,47	4,0 \pm 0,15
CCG 19	Violeta	2,5 \pm 0,04 c	8,8 \pm 0,26	3,6 \pm 0,10	37,1 \pm 0,54	4,0 \pm 0,45
CCG 20	Salmão	2,5 \pm 0,06 c	6,8 \pm 0,73	3,0 \pm 0,81	38,0 \pm 0,16	3,9 \pm 0,07
CCG 21	Violeta	2,5 \pm 0,08 c	5,7 \pm 0,17	3,0 \pm 0,10	34,3 \pm 0,66	4,1 \pm 0,16
CCG 2	Salmão	2,4 \pm 0,17 d	6,3 \pm 0,37	2,2 \pm 0,10	22,2 \pm 0,92	3,2 \pm 0,19
CCG 9	Vermelho	2,3 \pm 0,06 d	6,0 \pm 0,16	3,0 \pm 0,10	39,0 \pm 0,68	4,5 \pm 0,09
CCG 15	Salmão	2,3 \pm 0,03 d	6,3 \pm 0,18	3,5 \pm 0,13	29,0 \pm 0,57	3,4 \pm 0,15
CCG 17	Violeta	2,3 \pm 0,07 d	8,7 \pm 0,19	4,0 \pm 0,11	32,2 \pm 0,88	4,3 \pm 0,11
CCG 24	Violeta	2,3 \pm 0,06 d	7,2 \pm 0,17	3,2 \pm 0,82	40,7 \pm 1,35	5,2 \pm 0,23
CMM 732	Violeta	2,3 \pm 0,09 d	6,2 \pm 0,21	2,0 \pm 1,04	37,3 \pm 1,03	3,2 \pm 0,06
CCG 22	Violeta	2,1 \pm 0,08d	6,7 \pm 0,17	3,0 \pm 0,81	30,9 \pm 1,24	4,6 \pm 0,10
CCG 5	Salmão	2,1 \pm 0,06 d	7,3 \pm 0,38	2,9 \pm 0,16	25,5 \pm 1,50	3,9 \pm 0,21
Estatística	–	F _{26, 135} = 8,99; p < 0,01	–	–	–	–

* coloração das colônias tanto na superfície inferior quanto superior

** Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-knott ($P > 0,05$).

TABELA 3. Índice de severidade da doença entre isolados de *Fusarium oxysporum* associados à murcha-de-fusário em feijão-caupi utilizados.

Isolados	Índice de severidade
CMM 732	99 a
CCG 4	89 b
CCG 13	83 b
CCG 24	80 b
CCG 2	69 c
CCG 16	66 c
CCG 5	58 c
CCG 25	19 d
CCG 15	13 d
CCG 22	12 d
CCG 17	7 d
CCG 19	6 d
CCG 6	5 d
CCG 10	4 d
CCG 14	4 d
CCG 11	3 d
CCG 21	3 d
CCG 9	2 d
CCG 7	1 d
CCG 23	1 d
CCG 1	Não patogênico
CCG 3	Não patogênico
CCG 8	Não patogênico
CCG 12	Não patogênico
CCG 18	Não patogênico
CCG 20	Não patogênico
CCG 26	Não patogênico
Estatística	F _{19,80} = 68,96; p < 0,01

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-knott ($P > 0,05$).

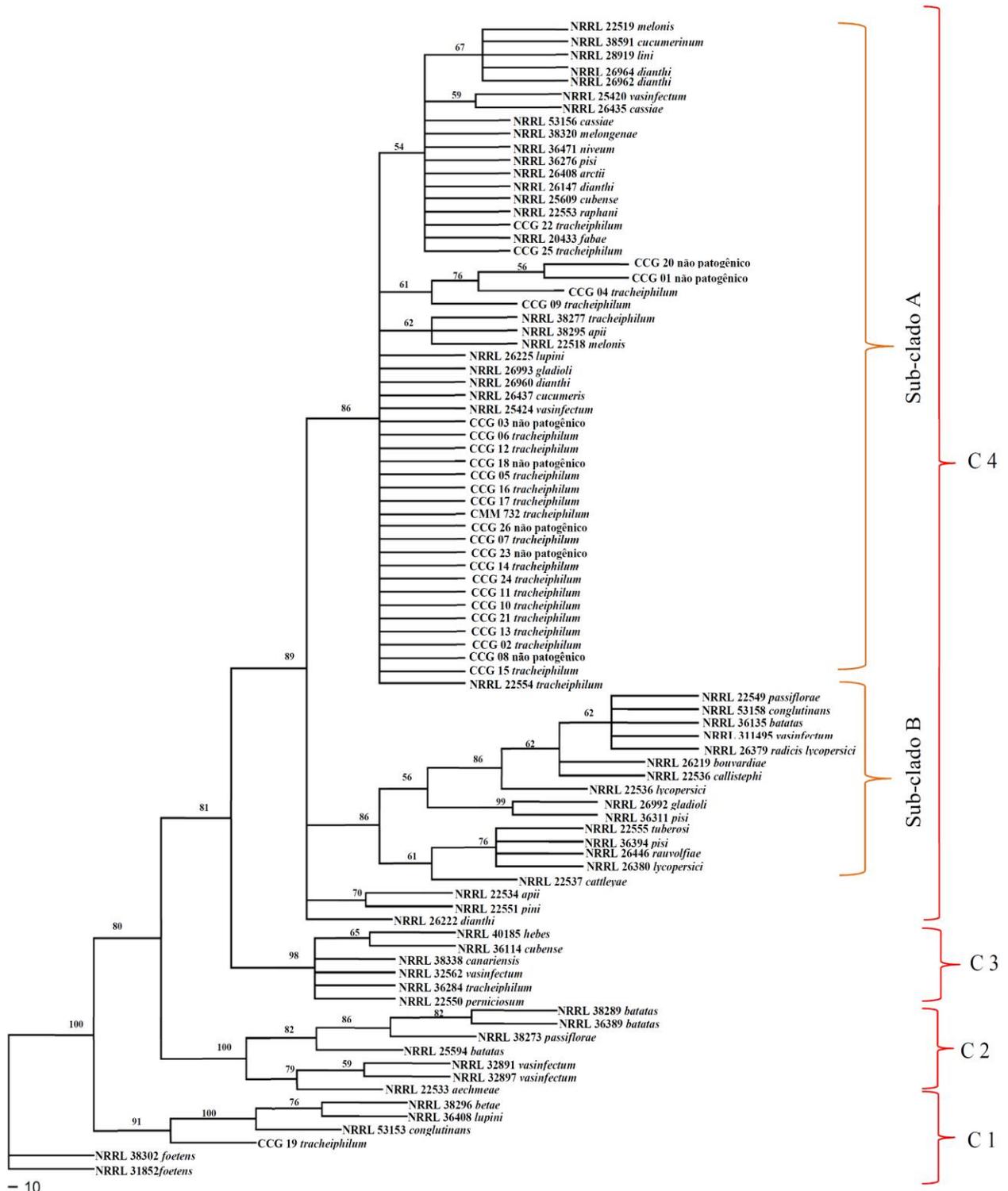


FIGURA 1. Árvore filogenética de neighbor-joining baseada no gene *tef1* de isolados de *F. oxysporum* associados à murcha-de-fusário em feijão-caup. Os números acima dos internódios representam o suporte de bootstrap do agrupamento para 1.000 repetições. C 1 = Clado 1; C 2 = Clado 2; C 3 = Clado 3; C 4 = Clado 4".

CAPÍTULO III



Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

O agente causal da murcha-de-fusário do caupi no Agreste Meridional de Pernambuco é *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* e é representado por pelo menos duas linhagens filogenéticas.

Uma nova linhagem de f. sp. *tracheiphilum* foi encontrada e é representada pelo isolado CCG 19.

A diversidade genética de f. sp. *tracheiphilum* no Agreste Meridional de Pernambuco é representada por seis haplótipos considerando-se o gene *tefl*.

Isolados patogênicos e não patogênicos de *Fusarium oxysporum* geneticamente muito próximos e com origem evolutiva comum co-existem nas áreas de cultivo de feijão-caupi do Agreste Meridional de Pernambuco.