



**TATIANA CARLA SILVA**

**LINHAGENS FILOGENÉTICAS DO  
COMPLEXO *Fusarium oxysporum* E *Fusarium  
udum* ASSOCIADAS À MURCHA DO  
MARACUJAZEIRO**

**LAVRAS - MG**

**2016**

**TATIANE CARLA SILVA**

**LINHAGENS FILOGENÉTICAS DO COMPLEXO *Fusarium oxysporum*  
E *Fusarium udum* ASSOCIADAS À MURCHA DO MARACUJAZEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador  
Dr. Ludwig H. Pfenning

**LAVRAS-MG**

**2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da  
Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pela própria autora.**

Silva, Tatiane Carla.

Linhagens filogenéticas do complexo *Fusarium oxysporum* e *Fusarium udum* associadas à murcha do maracujazeiro / Tatiane Carla Silva. –

Lavras : UFLA, 2016.

84 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de Lavras,  
2016.

Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning.

Bibliografia.

1. *Passiflora*. 2. Filogenia molecular. 3. Fusariose. I. Universidade  
Federal de Lavras. II. Título.

**TATIANE CARLA SILVA**

**LINHAGENS FILOGENÉTICAS DO COMPLEXO *Fusarium oxysporum*  
E *Fusarium udum* ASSOCIADAS À MURCHA DO MARACUJAZEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 8 de março de 2016.

Dra. Sarah da Silva Costa Guimarães UFLA

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros UFLA

Dr. Jorge Teodoro de Souza UFLA

Orientador  
Dr. Ludwig H. Pfenning

**LAVRAS - MG**

**2016**



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, inteligência superior, pela oportunidade e pelo elo de amor e disciplina do qual fui submetida nesse período de aprendizado.

Agradeço à minha família: Pai, mãe, irmãs, cunhados e sobrinhos pelo amor incondicional. Pai e mãe... Um dia quero retribuir tudo que fizeram por mim. Não tenho palavras para descrever o amor e a gratidão que tenho.

Agradeço aos amigos que fiz durante esse período de aprendizado: Manu, Giovana, Gilma, Mari, Rafa, Roberto, Wendel, Thiago, Larissa, Camila, Gláucia, Breno, Bianca, Mírian, Gilmara, Nevenka, Liza, Mari, Áurea, Babi, Thaís, Jacqueline, Shirley e Joyce. Tudo foi eufórico ao lado de pessoas como vocês.

Agradeço a todos os amigos de infância e da Agronomia que, mesmo distante, ainda mantemos um elo de amizade e carinho e que compreendem a minha ausência.

Agradeço a todos os meus professores, desde a minha alfabetização. Em especial, à professora Dra. Tatiana Rodrigues, quem me apresentou e me fez amar a Fitopatologia.

Ao professor Dr. Ludwig H. Pfenning, pela orientação, amizade e boas conversas.

À equipe do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos do DFP, pela colaboração na realização do trabalho especialmente ao Dr. Lucas M. Abreu à Dra. Sarah da Silva Costa Guimarães e Aceide Cardoso.

À professora Adelica Xavier, pela orientação e pelos bons momentos vividos junto a sua equipe na Universidade Estadual de Montes Claros.

À Universidade Federal de Lavras e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia por todo ensinamento durante o Mestrado.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro recebido (Proc. APQ 00875-13)

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Gratidão!



## **EPIGRAFE**

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se: tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

Paulo Beleki



## RESUMO GERAL

Em maracujá-azedo e o maracujá-doce, espécies de *Passiflora* amplamente cultivadas no Brasil, ocorre a murcha de *Fusarium*, cujo agente causal é descrito como *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*. Estudos preliminares já demonstraram que a maior parte das *formae speciales* no complexo de espécie *Fusarium oxysporum* - FOSC representa grupos não monofiléticos e que outros agentes causais de murcha em plantas cultivadas possuem características morfológicas idênticas a *F. oxysporum*. Nesse contexto, formulamos a hipótese que a *forma specialis*, que causa a murcha em maracujazeiro, é representada por linhagens filogenéticas distintas do FOSC e que existe mais de uma espécie associada à murcha do maracujazeiro no Brasil. Quarenta e seis isolados provenientes de plantas com sintomas de murcha foram avaliados por meio de análise filogenética da região TEF-1, testes de compatibilidade sexual, marcadores morfológicos e teste de patogenicidade. Os resultados obtidos por meio de análises filogenéticas demonstraram que três diferentes linhagens do FOSC ocorrem em associação com a murcha do maracujazeiro. Outros isolados agruparam-se com material de referência de *Fusarium udum*, espécie pertencente ao complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* - FFSC. O teste de patogenicidade demonstrou que isolados das três distintas linhagens do FOSC e de *F. udum* induziram sintomas de murcha em maracujazeiro e outras seis plantas testadas, a saber *Solanum lycopersicum*, *Phaseolus vulgaris*, *Gossypium hirsutum*, *Cucumis sativus*, *Cajanus cajan* e *Crotalaria ochroleuca*. Não existem marcadores morfológicos que diferenciem *F. oxysporum* de *F. udum*. A partir de cruzamentos de isolados obtidos do campo com testadores de *F. udum* foi possível identificar o *mating type* dos isolados e induzir a formação de peritécios férteis, confirmando a identidade do patógeno. *Fusarium udum* é registrado pela primeira vez como patógeno de *Passiflora* e das outras plantas avaliadas. Uma suposta especificidade da *forma specialis* não se confirma, já que isolados das três linhagens de *F. oxysporum* causaram doença em todas as plantas avaliadas. Os resultados obtidos podem subsidiar uma diagnose mais objetiva dos agentes etiológicos da doença, inclusive sua incidência, distribuição geográfica e gama de hospedeiros. Podem orientar, ainda, pesquisas futuras visando à seleção de genótipos com resistência a murcha.

Palavras-chave: *Passiflora*; Doença de planta; Filogenia molecular; *Mating population*.



## . GENERAL ABSTRACT

Sour and sweet passion fruit are species of the genus *Passiflora* widely cultivated in Brazil. Among the most important diseases is *Fusarium* wilt, whose causal agent is known as *Fusarium oxysporum* f. sp *passiflorae*. This disease is of great economic importance in areas with sandy soils and is transmitted from one orchard to another through infected seedlings, and between plants by contact between roots and irrigation water. Preliminary studies have shown that most *formae speciales* of the *Fusarium oxysporum* species complex FOOSC do not represent monophyletic groups, while other pathogens with morphological characteristics similar to *Fusarium oxysporum* cause wilt. In this context, we formulated the hypothesis that *formae specialis* that causes wilt in passion fruit is represented by distinct phylogenetic lineages and that there is more than one species associated with wilting of passion fruit in Brazil. Forty-six isolates from plants wilt symptoms were evaluated by phylogenetic analysis of the TEF-1 region, sexual compatibility tests, morphological markers and pathogenicity tests. The results obtained through phylogenetic analysis of TEF-1 region showed that three different phylogenetic lineages of the FOOSC are associated with wilting of passion fruit. Isolates obtained from passionfruit also grouped with reference material of *Fusarium udum*, a species belonging to *Fusarium fujikuroi* species complex FFSC. The pathogenicity test demonstrated that isolates from all three different lineages of the FOOSC and *F. udum* induced wilt symptoms in passionfruit and six other plants tested: *Solanum lycopersicum*, *Phaseolus vulgaris*, *Gossypium hirsutum*, *Cucumis sativus*, *Cajanus cajan* and *Crotalaria ochroleuca*. There are no morphological markers which help to separate different lineages of the FOOSC and *F. udum*. From crosses with *F. udum* testers strains and isolated obtained from the field, it was possible to identify the mating type and to induce the formation of fertile perithecia, confirming the identity of the pathogen. *Fusarium udum* is recorded for the first time as a pathogen of *Passiflora* and other evaluated plants. The supposed specificity of *formae speciales* is not confirmed, as the isolates caused disease in all tested plants. The results will support a more objective diagnosis of the etiological agent of *Fusarium* wilt, including its incidence, geographical distribution and host range. Future research aiming at the selection of genotypes with resistance to wilt will also be guided by these findings.

Key-words: *Passiflora*; Plant disease; Molecular phylogeny; Mating population



## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1 LINHAGENS FILOGENÉTICAS DO COMPLEXO <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Fusarium udum</i> ASSOCIADOS À MURCHA DO MARACUJAZEIRO .....</b>	<b>15</b>
<b>1</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA .....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>ESTADO DA ARTE .....</b>	<b>18</b>
	<b>CAPÍTULO 2 LINHAGENS FILOGENÉTICAS DO COMPLEXO <i>Fusarium oxysporum</i> ASSOCIADAS À MURCHA DO MARACUJAZEIRO E OUTRAS PLANTAS CULTIVADAS.....</b>	<b>25</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
<b>2.1</b>	<b>Obtenção de isolados .....</b>	<b>32</b>
<b>2.2</b>	<b>Caracterização morfológica.....</b>	<b>32</b>
<b>2.3</b>	<b>Sequenciamento e análise filogenética.....</b>	<b>33</b>
<b>2.4</b>	<b>Teste de patogenicidade.....</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Obtenção de isolados .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2</b>	<b>Caracterização morfológica .....</b>	<b>37</b>
<b>3.3</b>	<b>Análise filogenética .....</b>	<b>43</b>
<b>3.4</b>	<b>Teste de patogenicidade.....</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>53</b>
	<b>CAPÍTULO 3 <i>Fusarium udum</i> é um agente etiológico da murcha do maracujazeiro e outras plantas cultivadas .....</b>	<b>56</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>60</b>
<b>2.1</b>	<b>Obtenção de isolados .....</b>	<b>60</b>
<b>2.2</b>	<b>Caracterização morfológica.....</b>	<b>60</b>
<b>2.3</b>	<b>Sequenciamento e análises filogenéticas.....</b>	<b>61</b>

2.4	Determinação de <i>mating type</i> e cruzamentos .....	62
2.5	Teste de patogenicidade.....	63
3	<b>RESULTADOS</b> .....	65
3.1	Obtenção de isolados .....	65
3.2	Características morfológicas .....	68
3.2.1	Características morfológicas da fase assexuada .....	68
3.2.2	Indução da fase sexuada .....	69
3.2.3	Características morfológicas da fase sexuada.....	70
3.3	Análise filogenética .....	70
3.4	Teste de patogenicidade.....	72
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	78
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	80
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	82

**CAPÍTULO 1 LINHAGENS FILOGENÉTICAS DO COMPLEXO  
*Fusarium oxysporum* E *Fusarium udum* ASSOCIADAS À  
MURCHA DO MARACUJAZEIRO**



## 1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

O Brasil destaca-se como o maior produtor mundial de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), sendo a cultura um fator socioeconômico de destaque para o estado de Minas Gerais. Entretanto, doenças como a murcha-de-fusarium provocam significativo decréscimo na produtividade. *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* foi formalizado por Gordon (1965), mas a identidade dessa forma, sua distribuição geográfica e relação filogenética com outras *formae speciales* no Brasil ainda precisa ser esclarecida. Sem esse conhecimento não é possível identificar o patógeno com segurança e confiabilidade, nem estabelecer medidas de prevenção ou fitossanitárias. Procedimentos duradouros de melhoramento genético e o eventual desenvolvimento de técnicas moleculares de identificação também dependem dessa caracterização. Trabalhos evidenciam claramente que a identificação por marcadores morfológicos é insuficiente (Fourie et al. 2010; Secor et al. 2014).

Em virtude da escassez de literatura científica primária sobre a identidade e características biológicas dos agentes etiológicos da murcha do maracujazeiro no Brasil, este trabalho se propõe a responder às seguintes questões: (i) Existe mais de uma espécie associada à murcha do maracujazeiro no Brasil? (ii) A *forma specialis* de *Fusarium oxysporum*, que causa a murcha em maracujazeiro, é representada por linhagens filogenéticas distintas?

## 2 ESTADO DA ARTE

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá-amarelo há mais de duas décadas (Meletti 2011). A produção brasileira em 2010 foi de 920 mil toneladas, cerca de 70% da produção mundial. Dados da EMBRAPA sobre a produção brasileira do fruto em 2012 mostraram que o estado da Bahia foi campeão da produção com 320 mil toneladas. O Ceará aparece em segundo lugar no ranking, com 179 mil, seguido de Minas Gerais 39 mil, e Sergipe e Espírito Santo com 35 mil (IBGE 2012). No entanto, relatam-se perdas nos rendimentos devido a problemas de doenças, especialmente com a ocorrência de fusariose. Essa é uma doença de elevada importância para o maracujazeiro por causar a morte das plantas infectadas. A fusariose do maracujazeiro possui outras nomenclaturas, como: podridão do colo e podridão do pé, murcha, ou ainda morte prematura, e têm sido associadas às espécies de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* e *F. solani*. Estes fungos de solo podem ser confundidos em função dos sintomas reflexos que causam nas plantas. Porém, na maioria dos casos, *F. solani* está associado à podridão do colo, onde as plantas apresentam fendas na região do colo, e desenvolvimento de lesões deprimidas (Dariva 2011). Morfologicamente essas duas espécies se diferenciam principalmente pelas fiálides produzidas no micélio aéreo: *F. oxysporum* apresenta fiálides curtas e *F. solani*, fiálides longas.

Ao agente etiológico da murcha em maracujazeiro aplica-se o nome *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Gordon 1965; Gardner 1989; Silva et al., 2013). O patógeno caracteriza-se por afetar os vasos lenhosos a partir das raízes causando murcha generalizada e morte rápida das plantas. Antes de murcharem, as folhas mudam a coloração de verde-brilhante para verde-pálido ou verde-amarelado. Os frutos verdes murcham, enquanto aqueles que iniciaram a maturação atingem o final do processo quase que normalmente. Internamente, por meio de cortes no

caule, pode-se observar o escurecimento, marrom-avermelhado, dos tecidos do xilema, cujos vasos se encontram impedidos de transportar água por causa do crescimento do patógeno em seu interior. Em adiantado estágio da doença, o caule ou as hastes podem fender deixando à mostra os sinais do patógeno (Santos Filho 2003; Viana et al. 2003).

O termo *forma specialis* é atribuído quando há suposta especificidade de um fungo a uma espécie hospedeira ou família botânica. Porém, análises de filogenia molecular evidenciam que a maioria das *formae speciales* é representada por grupos não-monofiléticos. Além disso, o agrupamento em *formae speciales* pode omitir a variabilidade genética das populações, as verdadeiras relações filogenéticas, distribuição geográfica e variedade de hospedeiro desses patógenos (O'Donnell et al. 1998, 2009; Baayen et al. 2000). Por exemplo, *F. oxysporum* f. sp.  *cubense* é um complexo de no mínimo cinco distintas linhagens (Fourie et al. 2010). Uma genotipagem do complexo *F. oxysporum* (FOSC) baseado na região TEF-1 e IGS mostrou que *F. oxysporum* f. sp.  *passiflorae* é representado por no mínimo duas linhagens distintas e esses isolados se agruparam com *formae speciales* de distintos hospedeiros (O'Donnell et al. 2009).

Ao testar a origem monofilética de oito *formae speciales* dentro do complexo de espécies *Fusarium oxysporum* associadas à murcha e podridão em plantas ornamentais, os resultados demonstraram que a maior parte das *formae speciales* no FOSC não representam grupos monofiléticos e evidencia que esse conceito seja questionável quanto a sua consistência (Baayen et al. 2000).

O agente causal da murcha da beterraba açucareira (*Beta vulgaris* L.) era descrito como *F. oxysporum* f. sp.  *betae* por possuir os mesmos marcadores morfológicos de *F. oxysporum*. No entanto, a análise filogenética baseada em sequências de três regiões gênicas levou à conclusão que o agente causal da murcha é na verdade uma nova espécie do complexo de espécies *Fusarium*

*fujikuroi* FFSC (Secor et al. 2014). Sendo assim, é provável que vários outros agentes causadores de murcha em plantas cultivadas, que possuem o nome e características de *F. oxysporum*, possam ser espécies pertencentes a outros complexos.

Embora a morfologia seja importante para a descrição das espécies, a escassez de caracteres morfológicos dificulta a descrição dessas. Assim, análises filogenéticas e biológicas têm sido úteis na distinção e descrição de espécies dentro do complexo *Fusarium fujikuroi* (Lima et al. 2012).

Uma análise filogenética preliminar realizada usando a região fator de alongação (TEF-1) com dez isolados obtidos de maracujazeiro que possuíam características de *F. oxysporum* demonstrou a presença de isolados que agrupam com representantes de *Fusarium udum* do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* FFSC.

*Fusarium udum* é descrito como o agente causal de murcha em *Cajanus cajan* e espécies de *Crotalaria* (Armstrong & Armstrong 1951; Hillocks et al. 2000). O patógeno foi registrado pela primeira vez por Butler (1910) na Índia e é encontrado em muitas áreas de cultivo do feijão guandu, com elevadas incidências nas zonas orientais (Godwin et al. 2012; Karimi et al. 2012). A fase sexuada foi registrada na natureza associada a caules de *Cajanus* na Índia, denominada *Gibberella indica*. No Brasil, *F. udum* foi registrado causando murcha em *Crotalaria ochroleuca* (Melo, 2014). *Fusarium udum* é uma espécie que apresenta grande variabilidade morfológica e compartilha características morfológicas de *F. oxysporum*, como a produção de clamidósporos, fiálides curtas e forma dos macro- e microconídios.

Nesse contexto, o objetivo geral do presente estudo foi analisar isolados de uma coleção de fungos obtidos de maracujazeiro no Brasil com características morfológicas de *Fusarium oxysporum* e identificar espécies ou linhagens por meio de filogenia, morfologia e teste de patogenicidade.

## REFERÊNCIAS

Armstrong JK, Armstrong GM (1951) Physiological races of the *Crotalaria* wilt *Fusarium*. *Phytopathology* 41:714-721.

Baayen RP, O'Donnell K, Bonants PJ, Cigelnik E, Kroon LP, Roebroeck EJ, Waalwijk C (2000) Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic forma especiales causing wilt and rot disease. *Phytopathology* 90:891-900.

Butler EJ (1910) The wilt disease of pigeon pea and the parasitism of *Neocosmospora vasinfecta* Smith. *Memoirs of the Department of Agriculture in India. Botanical Series. Vol. II, no. 9, 1-64.*

Dariva JM (2011) Fusarioses do maracujazeiro: etiologia e sintomatologia. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Montes Claros. Janaúba MG.

Fourie G, Steenkamp ET, Gordon TR, Viljoen A (2009) Evolutionary relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Applied Environmental Microbiology* 75:4770-4781.

Gardner DE (1989) Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* to banana poka and other *Passiflora* spp. in Hawaii. *Plant Disease* 73:476-478.

Gordon WL (1965) Pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Canadian Journal of Botany* 43:1309-1318.

Hillocks RJ, Minja E, Silim SN, Subrahmanyam P (2000) Diseases and pests of Pigeonpea in eastern Africa. *International Journal of Pest Management* 46:7-18.

IBGE (2012) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal. Disponível em: <[https://www.embrapa.br/documents/1355135/1906106/b1\\_maracuja.pdf/874465e9-ce1b-4a94-8f65-83c7ead28ddd](https://www.embrapa.br/documents/1355135/1906106/b1_maracuja.pdf/874465e9-ce1b-4a94-8f65-83c7ead28ddd)>. Acesso em 1 novembro de 2014.

Karimi R, Owuoché JO, Silim SN (2012) Importance and management of fusarium wilt (*Fusarium udum* Butler) of pigeonpea. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research* 2:1-14.

Lamontagne-Godwin L, Reeder R, Buddie AG, James M (2012) First confirmed report of *Gibberella indica* on *Cajanus cajan* in Barbados, Lesser Antilles. *New Disease Reports* 26: 10

Lima CS, Pfenning LH, Costa SS, Abreu LM, Leslie JF (2012) *Fusarium tuiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. *Mycologia* 6:12-52.

Meletti LMM (2011) Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura* 33:83-91.

Melo MP (2014) Espécies biológicas e filogenéticas do complexo *Fusarium fujikuroi*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras. Lavras MG.

O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC (1998) 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 of the United States of America* 95: 2044-2049.

O'Donnell K, Gueidan C, Sink S, Johnston PR, Crous PW, Glenn A, Riley R, Zitomer NC, Colyer P, Waalwijk C, Van der Lee T, Moretti A, Kang S, Kim HS, Geiser DM, Juba JH, Baayen RP, Cromey MG, Bithell S, Sutton DA, Skovgaard K, Ploetz R, Kistler, HC, Elliott M, Davis M, Sarver BAJ (2009) A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens with in the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genetics Biology* 46:936-948.

Santos Filho HP, Santos CCF (2003) Doenças causadas por fungos. In: Santos Filho HP, Junqueira NTV. *Maracujá: fitossanidade*. Brasília DF. Embrapa Informação Tecnológica. pp. 12-21.

Secor GA, Rivera-Varas V, Christ DS, Mathew FM, Khan MFR, Varrelmann M, Bolton MD (2014) Characterization of *Fusarium secorum*, a new species causing *Fusarium* yellowing decline of sugar beet in north central USA. *Fungal Biology* 118:764-775.

Silva ADS, Oliveira EJD, Haddad F, Jesus OND, Oliveira SASD, Costa MAPDC (2013) Molecular fingerprinting of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* isolates using AFLP markers. *Scientia Agricola* 70:108-115.

Viana FMP, Freire FCO, Cardoso JE, Vidal JC (2003) Principais doenças do maracujazeiro na região Nordeste e seu controle. Fortaleza CE. Embrapa. Comunicado Técnico.



**CAPÍTULO 2** Linhagens filogenéticas do complexo *Fusarium oxysporum* associadas à murcha do maracujazeiro e outras plantas cultivadas.



## RESUMO

A incidência de fusariose em maracujazeiro pode resultar em perdas elevadas na produção e, em alguns casos, inviabilizar completamente a atividade produtiva. *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* é designado na literatura como um dos agentes causais da murcha em maracujazeiro. Em decorrência de trabalhos que demonstraram que a maioria das *formae speciales* é representada por grupos de distintas origens evolucionárias e que isolados de *F. oxysporum* obtidos de maracujazeiro se agrupam com outras *formae speciales*, inferimos que esse conceito pode omitir a variabilidade genética das populações, as verdadeiras relações filogenéticas, distribuição geográfica e variedade de hospedeiros. Por conseguinte, nesse estudo foi testada a hipótese de que *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* causa murcha no maracujazeiro e em outras plantas cultivadas e que existe mais de uma linhagem do FOSC associada à murcha do maracujazeiro no Brasil. Os resultados obtidos por meio de análises filogenéticas da região TEF-1 demonstraram que três diferentes linhagens do FOSC estão associadas a murcha do maracujazeiro. O teste de patogenicidade demonstrou que estas distintas linhagens induzem sintomas de murcha em maracujazeiro e outras plantas cultivadas. Não existe marcador morfológico para separar essas linhagens.



### ABSTRACT

The incidence of *Fusarium* on passion fruit may result in substantial loss of production and, in some cases, can completely cripple the productive activity. *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* is cited in the literature as the causal agent of wilt in passion fruit. As a result of studies that demonstrated that most *formae speciales* are represented by groups with different evolutionary origins and isolates of *F. oxysporum* obtained from passion fruit grouped with other *formae speciales*, we infer that this concept can omit the genetic variability of populations, true phylogenetic relationships, geographic distribution and host range. Therefore, in this study we tested the hypothesis that *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* cause wilt in passion fruit and other crops and that there is more than one lineage of the FOSC associated with wilting of passion fruit in Brazil. The results obtained by phylogenetic analyses of the TEF-1 region showed that three different phylogenetic lineages of the FOSC are associated with passion fruit wilt. The pathogenicity test demonstrated that all three lineages induce wilting symptoms in passion fruit and other crops. There is no morphological marker which helps to separate different lineages.



## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o primeiro produtor mundial de maracujá. Essa cultura está em franca expansão tanto para a produção de frutas para consumo "*in natura*" como para a produção de suco (Meletti, 2011). No entanto, a ocorrência de problemas fitossanitários reduz a vida útil dos plantios e pode ameaçar o sucesso da produção. Uma das principais doenças do maracujazeiro é a fusariose, que afeta as raízes da planta, provocada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, que se dissemina de uma planta para a outra. A doença corre em focos isolados, começando com murcha pelas extremidades do ramo, quando as raízes do maracujazeiro já estão apodrecidas. No interior do caule da planta, observam-se os tecidos escurecidos, no sentido do comprimento, a partir do colo (Viana et al. 2003).

*F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* foi formalizado por Gordon (1965), mas a identidade dessa forma, sua distribuição geográfica e relação filogenética com outras *formae speciales* no Brasil ainda precisa ser esclarecida. O patógeno foi registrado pela primeira vez por McKnight em 1951 em Queensland (Austrália), causando murcha em maracujazeiro.

O termo *forma specialis* é atribuído quando há suposta especificidade de um fungo a uma espécie hospedeira ou família botânica. No entanto, estudos filogenéticos mostraram que a maioria das *formae speciales* de *F. oxysporum* é representada por grupos não-monofiléticos (Baayen et al. 2000; O'Donnell et al. 2009; Fourie et al. 2010).

A proposta desse estudo é averiguar por meio de análise filogenética se a murcha do maracujazeiro é causada por uma ou mais linhagens do FOOSC, além de verificar a patogenicidade dos isolados por meio de inoculação em diferentes espécies de plantas.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção de isolados**

Amostras de plantas com sintomas de fusariose foram coletadas nas principais áreas produtoras do Brasil. O isolamento foi realizado de acordo com (Leslie & Summerell 2006). Para obtenção de culturas monospóricas, porções do isolamento fúngico em BDA foram transferidas para um tubo de ensaio com 5 mL de água destilada e esterilizada e agitada em vórtex. Uma pequena alíquota foi transferida para meio ágar-água e espalhada com uma alça de Drigalski. Após 24 h, realizou-se o cultivo monospórico onde as placas foram observadas em microscópio estereoscópio, onde se retirou um conídio com a presença de um tubo germinativo transferindo-o para meio BDA, seguido da incubação em BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 h por sete dias. Os isolados foram preservados e adicionados à coleção CML pelo método de criopreservação. Alguns isolados foram cedidos, provenientes da Coleção micológica Unimontes-Janaúba, Coleção de Maruzanete Melo, Coleção de Acleide Cardoso e Coleção da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

### **2.2 Caracterização morfológica**

A caracterização morfológica dos isolados foi realizada de acordo com a metodologia de Lima et al. (2009), sendo estes cultivados no meio BDA e ágar pobre em nutrientes (SNA). O meio BDA foi utilizado para avaliação da taxa de crescimento micelial e coloração da colônia. Para determinação da taxa de crescimento micelial, um disco de micélio de 5 mm foi transferido para o centro de uma placa de Petri contendo BDA, seguido de incubação a 25°C no escuro, por quatro dias. Após esse período foram tomadas medições do diâmetro

ortogonal das culturas crescidas. Para a avaliação da coloração da colônia um disco de micélio foi transferido para o centro de uma placa de Petri contendo BDA, e foi incubados a 20°C com fotoperíodo de 12 h de luz branca combinada com luz negra e 12 h no escuro, por 14 dias.

Em SNA com fragmentos secos e esterilizados de folhas de cravo (*Dianthus caryophyllus*) foram observadas características micromorfológicas. Após 14 dias de incubação a 20°C, fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente combinada com luz negra e 12 horas no escuro, foi registrada a presença ou não e cor de esporodóquios; frequência, tamanho, formato e origem de microconídios e macroconídios; tipos de fiálides, presença ou não de clamidósporos, presença ou não de microconídios em cadeias.

### 2.3 Sequenciamento e análise filogenética

A extração do DNA foi realizada a partir dos isolados monospóricos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* crescidos em Meio Malte 4% líquido por três dias a 100 rpm em incubadora, a temperatura de 25° C com fotoperíodo 12h luz fluorescente e 12h escuro para a produção de biomassa. A biomassa foi filtrada e a extração do DNA procedeu utilizando-se o kit Wizard Genomic DNA Purification.

Fragmentos dos genes TEF-1 foram amplificados por PCR e purificados com o kit GoTaq® Colorless Master Mix e enviados para sequenciamento nas direções, sentido e anti-sentido, utilizando os primers EF-3 (5'-GTA-AGG-AGG-ATA-AGA-CTC-ACC-3') e EF-22 (5'-AGG-AAC-CCT-TAC-CGA-GCT-C-3') (O'Donnell et al., 2009). As condições de amplificação para TEF-1 foi 94°C, por 1 minuto; 34 ciclos: 94° C, por 30 segundos, 62°C, por 45 segundos, 72°C, por 1 minuto; 72°C, por 5 minutos (O'Donnell; Nirenberg, 1998a). Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o kit Wizard® SV Gel

and PCR Clean-Up System (Promega Brasil, São Paulo, BR) para posterior sequenciamento. Os fragmentos gênicos foram sequenciados, nas direções senso e antisenso, em um sequenciador automático empresa Macrogen, USA.

Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente utilizando Seqassem ver. 07/2008 (SequentiX - Digital DNA Processing, Klein Raden, Germany) (Hepperle 2011) e as sequências editadas foram comparadas com a base de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information - NCBI, por meio da ferramenta BLAST.

Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos de isolados de *Fusarium* obtidos nesse estudo foram gerados utilizando-se a ferramenta CLUSTALW (Thompson et al. 1994), implementada no programa MEGA 6. Os alinhamentos foram corrigidos manualmente. As análises filogenéticas foram realizadas pelo método de Máxima Verossimilhança por meio do programa MEGA 6 seguindo os modelos inferidos no programa JModelTest (Posada, 2008). Foi utilizado o modelo 'kimura-2 parâmetros + I' (Kimura 1980) . As sequências dos isolados foram depositadas no GenBank, NCBI e os alinhamentos estarão disponíveis junto aos autores.

Nessas análises foram incluídas as sequências de três isolados disponíveis no GenBank NRRL 22549, NRRL 38273 (O'Donnell et al. 2009) e o isolado CDF A591 (Rooney-Latham & Blomquist 2011) correspondentes aos genes TEF-1 para alinhamento com as sequências representadas no estudo.

## **2.4 Teste de patogenicidade**

Sete espécies de plantas hospedeiras foram utilizadas nos testes de patogenicidade: maracujazeiro (*Passiflora edulis*), tomateiro (*Solanum lycopersicum*), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), algodoeiro (*Gossypium hirsutum*), pepineiro (*Cucumis sativus*) feijão guandu (*Cajanus cajan*) e em crotalaria

(*Crotalaria ochroleuca*). Os ensaios foram realizados, na UNIMONTES Campus Janaúba, onde as mudas foram produzidas em bandejas de isopor de 200 células, contendo substrato e foram distribuídas as sementes das cultivares BRS Sol Cerrado (maracujá), Super Marmande (tomate), IAC Alvorada (feijão), Delta Opal (algodão), Shibata (pepino), feijão guandu (*Cajanus cajan*) e crotalaria (*Crotalaria ochroleuca*). As plântulas foram inoculadas quando apresentaram duas folhas verdadeiras totalmente expandidas.

A inoculação foi realizada pelo método de *dipping*: mudas com três pares de folhas definitivas, obtidas pela semeadura em bandejas plásticas contendo vermiculita estéril, foram retiradas do substrato para lavagem das raízes com água estéril. Em seguida, as raízes foram imersas durante 1 hora, na suspensão de conídios. Posteriormente, foi realizado o replantio em vasos plásticos de 4 litros, contendo uma mistura de solo esterilizado e vermiculita na proporção de 3:1, suplementada com superfosfato simples, ureia e cloreto de potássio na quantidade indicada pela análise de solo. (Silva et al. 2011).

Para o preparo da suspensão de esporos, os isolados monospóricos de *Fusarium oxysporum* foram repicados para placas de Petri contendo o meio malte (MA), e foram mantidos a 25°C em incubadora BOD no escuro por 15 dias, para a produção de esporos. Posteriormente, foi adicionado 40 mL de água destilada e autoclavada às placas, e com auxílio de um pincel, os esporos das colônias foram desagregados e mantidos em suspensão e, em seguida, essa foi calibrada para a concentração de  $10^5$  conídios / mL.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no delineamento de blocos casualizados (DBC). Cada tratamento foi composto por um isolado representativo de cada linhagem de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* de acordo com os resultados das análises filogenéticas. A testemunha foi constituída de plantas não inoculadas. Cada parcela foi composta por quatro vasos contendo uma planta cada. As irrigações foram realizadas diariamente, pela manhã e à

tarde, até que o teor de umidade do solo atingisse 60% da capacidade de campo. Cinco dias após a inoculação, foi realizada adubação com cálculos realizados de acordo com as indicações da quinta aproximação para Minas Gerais. As avaliações de incidência de plantas com sintomas foram realizadas diariamente após o transplante das mudas.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Obtenção de isolados

Foi composta uma coleção de 40 isolados de *F. oxysporum* obtidos de maracujazeiro (*Passiflora edulis*) nos estados de Minas Gerais, Bahia, Ceará, Piauí e Pará. Destes, oito isolados foram cedidos pela Embrapa Mandioca e Fruticultura (FOP) (Tab. 1)

#### 3.2 Caracterização morfológica

Todos os isolados avaliados apresentaram características típicas de *F. oxysporum* (Figura 1). As colônias apresentam um aspecto algodinoso com pigmentação variada, inicialmente a coloração é branca, tornando-se creme, salmão, rosa ou violeta. A taxa de crescimento micelial foi calculada considerando que 24h foi o tempo que se realizou a primeira leitura e que 96 horas foi o tempo que se realizou a segunda leitura. A taxa de crescimento micelial médio foi de 1,1 cm/dia, não havendo diferença significativa de crescimento entre os isolados.

Em todos os isolados observou-se a presença abundante de microconídios, geralmente unicelular, de forma fusiforme a reniforme, agregados em falsas cabeças, com tamanho variando entre 4,75-6,25 x 1,5-2,0  $\mu\text{m}$ , asseptados em todos os isolados. Os isolados possuem uma alta capacidade de produção de esporodóquio em fragmentos de folhas de cravo e também na superfície do meio SNA. Os macroconídios produzidos em fragmentos de folhas de cravo possuem formato falcado com presença de 3-5 septos (predominantemente 3), com tamanho variando 11,5-21,5 x 1,5-5  $\mu\text{m}$ . As fiáldes produzidas no micélio aéreo são curtas.

Tabela 1 Isolados de *Fusarium oxysporum* obtidos de maracujá (*Passiflora edulis*).

CML	Cod.	Espécie <b><i>F. oxysporum</i> f. sp.</b>	Hospedeiro	Origem geográfica	Coleta	Pt	TEF-1
	MR25	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Jaíba – MG	Ago/09	+	x
	MR32	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Jaíba– MG	Out/09	+	x
3228	MR78 A	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Sebastião Laranjeira – BA	Nov/09	+	x
	MR27	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Nova Porteirinha – MG	Ago/09		x
	LMT 01	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Campo Florido – MG	Out/13		x
	LMT 02	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Martinésia– MG	Nov/13		x
	AC01	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Carafbas – BA	Jan/14		x
	AC09	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	São Francisco da Glória - MG	Fev/14		x
	AC12	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	São Francisco da Glória - MG	Fev/14		x
	AC14	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	São Francisco da Glória - MG	Fev/14		x
	AC16	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	São Francisco da Glória - MG	Fev/14		x
	AC18	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	São Francisco da Glória - MG	Fev/14		x
	AC19	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	São Francisco da Glória - MG	Fev/14		x

AC21	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	São Francisco da Glória - MG	Fev/14	x
AC29	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Caraibas – BA	Jan/14	x
AC32	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Livramento de Nossa Senhora - BA	Fev/14	x
AC34	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Brumado – BA	Fev/14	x
AC35	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Brumado – BA	Fev/14	x
AC40	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Brumado – BA	Fev/14	x
AC58	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Cruzeiro dos Peixotos– MG	Jun/14	x
AC63	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Indianópolis – MG	Jun/14	x
AC65	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Parauapebas– PA	Set/13	x
AC67	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Distrito de Uberlândia – MG	Jun/14	x
AC69	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Distrito de Uberlândia – MG	Jun/14	x
AC71	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Distrito de Uberlândia – MG	Jun/14	x
AC72	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Distrito de Uberlândia – MG	Jun/14	x
AC91	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Ibiapaba – CE	Ago/14	x
AC92	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Ibiapaba – CE	Ago/14	x

AC93	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Ibiapaba – CE	Ago/14		x
AC96	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Ibiapaba – CE	Ago/14		x
AC98	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Pedro II – PI	Ago/14		x
FOP01	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Cruz das Almas-BA	-		x
FOP02	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Cruz das Almas-BA	-	+	x
FOP03	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Cruz das Almas-BA	-		x
FOP05	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Cruz das Almas-BA	-		x
FOP08	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Ubaíra-BA	-		x
FOP28	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Ubaíra-BA	-		x
FOP71	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Porto Seguro – BA	-		x
FOP72	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Livramento d Nossa Senhora - BA	-		x
CAJ	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Fortaleza-CE	Dez/15	+	x
NRRL 38273	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Austrália			FJ985362.1
NRRL 22549	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Brasil			AF008505.1
CDFA591	<i>passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i>	América do Norte			JF332039.1

NRRL 25437	<i>vasinfecutum</i>	<i>Gossypium</i> sp.	Brasil	-	-	FJ985280
NRRL 38585	<i>pernicosum</i>	<i>Albizia</i> <i>julibrissin</i>	Desconhecido	-	-	FJ985412
NRRL 26407	<i>allii</i>	<i>Alliumbakeri</i>	Japão	-	-	FJ985288.1
NRRL 26422	<i>meniscoideum</i>	<i>Nolina</i> sp.	Países baixos	-	-	FJ985293.1
NRRL 36135	<i>batatas</i>	Desconhecido	Desconhecido			FJ985332.1
NRRL 38279	<i>canariensis</i>	<i>Phoenix</i> <i>canariensi</i>	Califórnias, USA			FJ985365.1
NRRL 36102	<i>cubense</i>	<i>Musa</i> <i>sapientum</i>	Taiwan			J985325.1
NRRL 40185	<i>hebes</i>	<i>Hebe</i> sp.	Auckland, Nova Zelândia			FJ985423.1
NRRL 32897	<i>vasinfectum</i>	<i>Gossypium</i> sp.	AR-USA	-	-	FJ985318
NRRL 36389	<i>batatas</i>	Desconhecido	Países Baixos			FJ985352.1
NRRL 38302	<i>foetens</i>	<i>Pinus radiata</i>	Valdívia, Chile			FJ985444.1
NRRL 53153	<i>commune</i>	Desconhecido	Desconhecido			FJ985440.1
NRRL 38348	<i>commune</i>	Desconhecido	Filipinas			J985389.1

<sup>a</sup>Abreviações das siglas: Pt= Teste de patogenicidade confirmada por Silva, TC; Mt= Matingtype; TEF-1 Código do sequenciamento da região encontrada no Genbank.

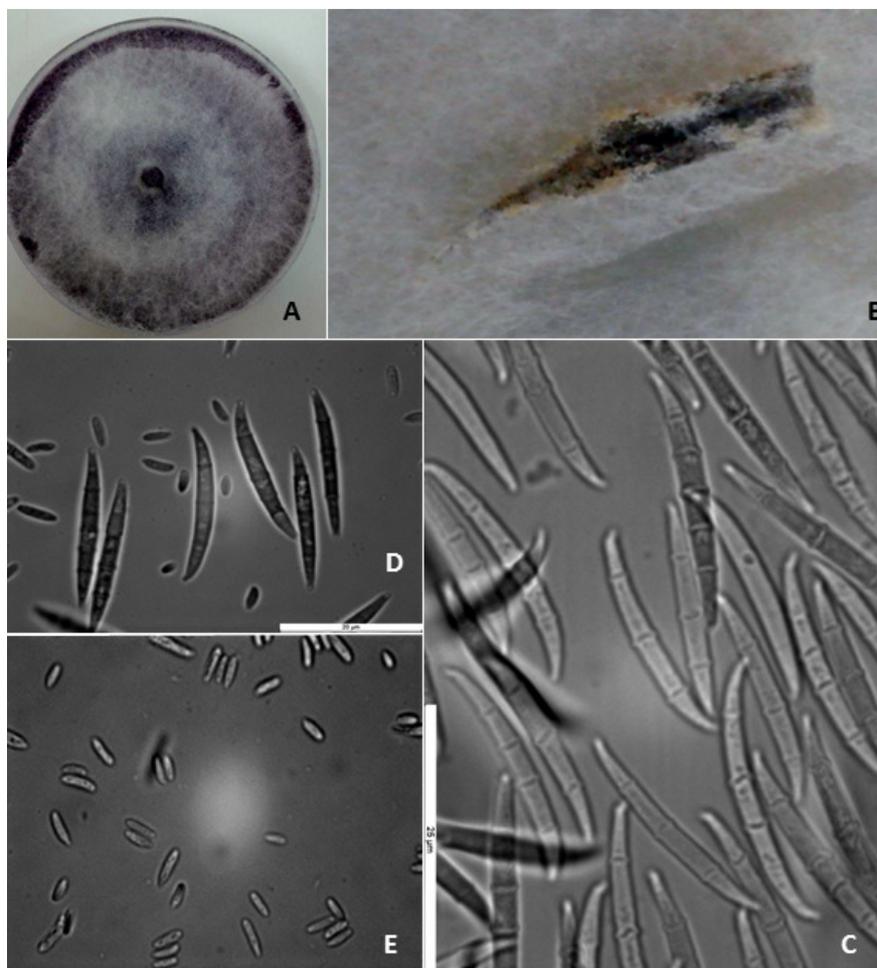
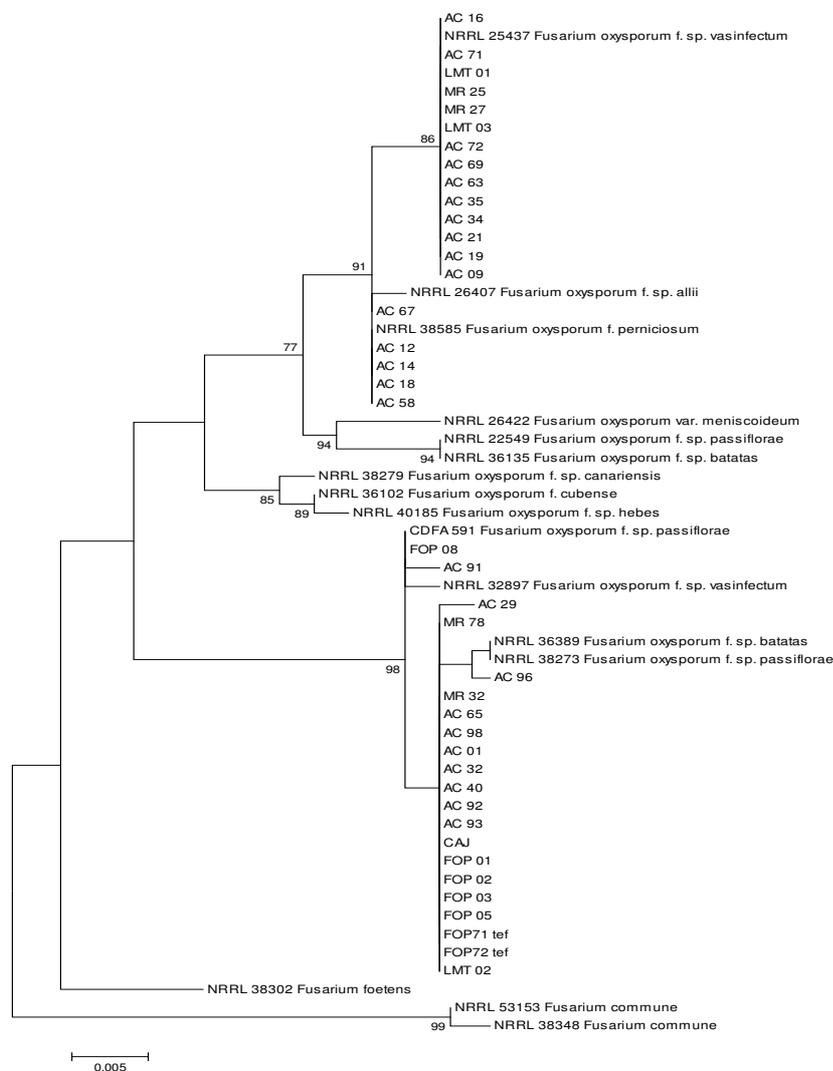


Figura 1 *Fusarium oxysporum*. A: Cultura em meio malte. B: Esporóquio em meio malte + folha de cravo. C: Macroconídios de 3-5 septos a partir do esporóquio. D-E: Macro e microconídio do micélio aéreo.

### 3.3 Análise filogenética

Os isolados de *Fusarium oxysporum* obtidos do maracujazeiro neste estudo agruparam em três diferentes linhagens filogenéticas do FOOSC. Quatorze dos isolados avaliados agruparam com os isolados NRRL 25437 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* com 86% de bootstrap. Cinco isolados agruparam próximos aos isolados NRRL 38585 de *F. oxysporum* f. sp. *perniciosum* e NRRL26407 *F. oxysporum* f. sp *allii*, porém sem suporte estatístico. Os demais isolados agruparam juntamente com *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* NRRL 38273 e CDFa 591 da Austrália e América do Norte respectivamente e *F. oxysporum* f. sp. *batatas*, com 98% de bootstrap. Nenhum isolado se agrupou com o isolado NRRL 22549 do Brasil utilizado no trabalho de O'Donnell et al. (2009).



**Figura 2** Árvore filogenética de máxima verossimilhança das espécies do complexo *Fusarium oxysporum* usando sequências de TEF-1 $\alpha$ . *F. foetens* e *F. commune*, utilizados como outgroup. Os valores de bootstrap, 1.000 repetições, são indicados em porcentagem acima e abaixo dos internódios, máxima parcimônia (MP) Abreviações: **AC** – Coleção Aceide Cardoso; **CAJ** - Coleção de Maruzanete Melo; **CDFA** - California Department of Food and Agriculture, Califórnia; **NRRL** - Northern Regional Research; **FOP**- Embrapa Mandioca e Fruticultura; **MR e LMT** – Coleção micológica Unimontes – Janaúba MG.

### 3.4 Teste de patogenicidade

Apoiado ao resultado filogenético e à hipótese de inconsistência do termo *forma specialis*, realizou-se o teste de patogenicidade com os isolados de representativos das duas linhas de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*. O teste de patogenicidade foi realizado três vezes. De acordo com a análise do teste Qui-quadrado. A porcentagem de plantas que apresentaram sintomas de amarelecimento com isolados de *F. oxysporum* variou de 25 a 42%. Na cultura do feijão guandu variou de 8 a 66%, *Crotalaria* de 8 a 33%, algodoeiro 50 a 83%, feijão-carioca 25 a 58%. No pepineiro e tomateiro a incidência foi 100%. As mesmas médias foram obtidas para murcha e morte das plantas (Tab. 2, 3 e 4). Em nenhum tratamento-testemunha foi observado a manifestação de sintomas de Fusariose.

Os isolados MR25, MR32, MR78 e CAJ, induziram sintomas de murcha em plantas de maracujazeiro após 30 dias da inoculação. Nessas repetições, as plantas mudaram a coloração das folhas de verde-brilhante a verde-pálido ou verde-amarelado e os sintomas evoluíram para murcha e morte das plantas (Figura 2).

Os mesmos isolados, quando inoculados em tomate e pepino, provocaram morte nas plantas entre 7-15 DAI e 7 a 37 DAI, respectivamente. Os sintomas da murcha iniciam-se pelas folhas basais que perdem a turgidez, tornam-se amareladas, apresentam crestamento do limbo e, finalmente, caíram. Nas raízes das plantas, pode-se observar o escurecimento dessas, onde evidenciou a presença do patógeno.

No algodoeiro, a incidência de murcha se manifestou 32-54 DAI. Os primeiros sintomas caracterizaram-se pela murcha de algumas folhas e ramos e observou-se uma severa redução de crescimento. Internamente, observou-se a descoloração dos feixes vasculares.

Em feijão guandu e feijão carioca, a murcha se manifestou 15-37 DAI. Os sintomas observados foram de clorose acompanhada de queda prematura das folhas que evoluiu para murcha e morte das plantas. Ao seccionar longitudinalmente os feixes o caule, pode-se perceber uma descoloração dos feixes vasculares com uma pigmentação castanha.

Em *Crotalaria*, a murcha se manifestou 47 DAI. O sintoma inicial foi o amarelecimento internerval nas folhas e plantas com murcha. Ao seccionar longitudinalmente o caule, pode-se perceber uma descoloração dos feixes vasculares. Foi realizado o reisolamento dos isolados inoculados o que confirmou a presença de *Fusarium* no sistema radicular com sintomas necróticos.

Tabela 2 Média percentual do número de plantas que apresentaram sintomas de amarelecimento nas três repetições do experimento.

Repetição Biológica	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<b>ISOLADO / % SINTOMAS ESPÉCIE</b>	<b>MR25 (%)</b>			<b>MR32 (%)</b>			<b>MR78 (%)</b>			<b>CAJ (%)</b>			<b>FOP02 (%)</b>			<b>TEST (%)</b>		
	0,4166			0,5			0,3333			0,5			0			0		
<i>Passiflora edulis</i>	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0	0	0	0	0	0
<i>Cajanus cajan</i>	0,0833			0,0833			1			0,6666			0,5			0		
	0	0,25	0	0	0,25	0	1	1	1	0,75	0,75	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0	0
<i>Crotalaria ochroleuca</i>	0,0833			0,3333			0,1666			0,3333			0			0		
	0	0,25	0	0	0,25	0,25	0	0	0,5	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cucumis sativus</i>	1			1			1			1			1			0		
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
<i>Gossypium hirsutum</i>	0,8333			0,8333			0,5			0,75			0,5			0		
	1	1	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	0,5	0,5	0,5	0	0	0
<i>Phaseolu vulgaris</i>	0,5			0,75			0,75			0,75			0,08333			0		
	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	1	0,75	0,75	0,5	0,75	0,75	1	0	0	0
<i>Solanum lycopersicum</i>	1			1			1			1			1			0		
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0

Tabela 3 Média percentual do número de plantas que apresentaram sintomas de murcha nas três repetições do experimento.

Repetição Biológica	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<b>ISOLADO / % SINTOMAS ESPÉCIE</b>	<b>MR25 (%)</b>			<b>MR32 (%)</b>			<b>MR78 (%)</b>			<b>CAJ (%)</b>			<b>FOP02 (%)</b>			<b>TEST (%)</b>		
	0,4166			0,5			0,3333			0,5			0			0		
<i>Passiflora edulis</i>	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0	0	0	0	0	0
<i>Cajanus cajan</i>	0,0833			0,0833			1			0,6666			0,5			0		
	0	0,25	0	0	0,25	0	1	1	1	0,75	0,75	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0	0
<i>Crotalaria ochroleuca</i>	0,0833			0,3333			0,1666			0,3333			0			0		
	0	0,25	0	0	0,25	0,25	0	0	0,5	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cucumis sativus</i>	1			1			1			1			1			0		
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
<i>Gossypium hirsutum</i>	0,8333			0,8333			0,5			0,75			0,5			0		
	1	1	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	0,5	0,5	0,5	0	0	0
<i>Phaseolu vulgaris</i>	0,5			0,75			0,75			0,75			0,8333			0		
	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	1	0,75	0,75	0,5	0,75	0,75	1	0	0	0
<i>Solanum lycopersicum</i>	1			1			1			1			1			0		
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0

Tabela 4 Média percentual do número de plantas que morreram nas três repetições do experimento.

Repetição	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<b>ISOLADO / %MORTE ESPÉCIE</b>	<b>MR25 (%)</b>			<b>MR32 (%)</b>			<b>MR78 (%)</b>			<b>CAJ (%)</b>			<b>FOP02 (%)</b>			<b>TEST (%)</b>		
<i>Passiflora edulis</i>	0,4166			0,5			0,3333			0,5			0			0		
<i>Cajanus cajan</i>	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0	0	0	0	0	0
<i>Crotalaria ochroleuca</i>	0	0,25	0	0	0,25	0	1	1	1	0,75	0,75	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0	0
<i>Cucumis sativus</i>	0,0833			0,3333			0,1666			0,3333			0			0		
<i>Gossypium hirsutum</i>	0	0,25	0	0	0,25	0,25	0	0	0,5	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Phaseolus vulgaris</i>	1			1			1			1			1			0		
<i>Solanum lycopersicum</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
	0,8333	0,8333			0,5			0,75			0,5			0				
	1	1	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	0,5	0,5	0,5	0	0	0
	0,5			0,75			0,75			0,75			0,8333			0		
	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	1	0,75	0,75	0,5	0,75	0,75	1	0	0	0
	1			1			1			1			1			0		
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0



Figura 3 *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* em raízes de plantas inoculadas. A: *Gossypium hirsutum* com o isolado CML3228 58DAI. B: *Phaseolus vulgaris* com o isolado CML 3228 32 DAI. C: *Passiflora edulis* com o isolado FOP2 58 DAI. D: *Cajanus cajan* com o isolado MR25 28 DAI. E: *Cucumis sativus* com o isolado MPM 61 12 DAI. F: *Crotalaria ochroleuca* com o isolado MPM 61 58 DAI. G: *Solanum lycopersicum* com o isolado MR 32 21 DAI.

#### 4 DISCUSSÃO

Baseado nos resultados de análise filogenética da TEF, o agente etiológico da murcha do maracujazeiro é representado por três diferentes linhagens dentro do FOOSC. *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* foi formalizado por Gordon (1965) e neste estudo a identidade dessa forma, e relação filogenética com outras *formae speciales* no Brasil foi esclarecida. Isolados de *F. oxysporum* associado ao maracujazeiro tem origem polifilética e dentro de cada linhagem filogenética formada por estes isolados há a presença de isolados de outras *formae specialis*.

Assim como observado neste estudo com *F. oxysporum* associado ao maracujazeiro, Kim et al. (2005) observaram ampla diversidade genética e patogênica dos isolados *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* associado ao algodoeiro da Califórnia (EUA), que foram divididos em cinco linhagens. Fato também observado por Skovgaard et al. (2001) que, ao estudarem as oito raças existentes do patógeno, com base em seqüências do EF-1 $\alpha$  (*tef1*), da subunidade mitocondrial do rDNA (mtSSU rDNA), da fosfato permease (PHO) e da nitrato redutase (NIR), encontraram quatro linhagens distintas, distribuídas em, pelo menos, duas origens evolucionárias independentes. A análise combinada dos genes do fator de alongação 1- $\alpha$  e da mtSSU rDNA revelou a ocorrência de cinco linhagens distintas, indicando a origem evolucionária polifilética do agente etiológico do mal-do-panamá (O'Donnell et al. 1998a).

No FOOSC têm-se mostrado comportamentos variados das *formae speciales* deste complexo quanto à origem filogenética. A baixa diversidade genética de algumas *formae speciales* remete a evidências de formarem grupos monofiléticos, podendo ter evoluído juntamente com seus hospedeiros, ao passo que outras se apresentam com alta diversidade genética, comportando-se como um verdadeiro complexo de origem polifilética (O'Donnell et al. 1998b; Baayen et al. 2000).

Neste trabalho também foi mostrado que as diferentes linhagens filogenéticas de *F. oxysporum* patogênicas ao maracujazeiro também causaram doença em outras plantas, o que demonstra a não-especificidade dessas linhagens ao maracujazeiro. O agrupamento em *formae speciales* pode omitir a variabilidade genética das populações, as verdadeiras relações filogenéticas, distribuição geográfica e variedade de hospedeiro desses patógenos (Baayen et al. 2000; O'Donnell et al. 2009).

O conhecimento da real identidade de patógenos e sua gama de hospedeiro permitirá estabelecer medidas fitossanitárias e procedimentos duradouros de melhoramento genético e o eventual desenvolvimento de técnicas moleculares de diagnose.

## REFERÊNCIAS

Baayen RP, O'Donnell K, Bonants PJ, Cigelnik E, Kroon LP, Roebroeck EJ, Waalwijk C (2000) Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic forma especiales causing wilt and rot disease. *Phytopathology* 90:891-900.

Dariva JM (2011) Fusarioses do maracujazeiro: etiologia e sintomatologia. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Montes Claros. Janaúba MG.

Fourie G, Steenkamp ET, Gordon TR, Viljoen A (2009) Evolutionary relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Applied Environmental Microbiology* 75:4770-4781.

Kim Y, Hutmacher RB, Davis RM (2005) Characterization of California isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Plant Disease* 89:366-372.

Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

Leslie JF, Summerell BA (2006) *The Fusarium laboratory manual*. Sydney. Blackwell.

Lima CS, Pfenning LH, Costa SS, Abreu LM, Leslie JF (2012) *Fusarium tuiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. *Mycologia* 6:12-52.

McKnight T (1951) A wilt disease of the passion vines (*Passiflora edulis*) caused by a species of *Fusarium*. *The Queensland Journal of Agricultural Science* 8:1-4.

Meletti LMM (2011) Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura* 33:83-91.

Miranda IR (2000). Características morfofisiológicas e polimorfismo de DNA de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* do Nordeste do Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. Recife PE.

O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC (1998a) 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, USA 95:2044-2049.

O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg HI (1998b) Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90:465-493.

O'Donnell K, Gueidan C, Sink S, Johnston PR, Crous PW, Glenn A, Riley R, Zitomer NC, Colyer P, Waalwijk C, Van der Lee T, Moretti A, Kang S, Kim HS, Geiser DM, Juba JH, Baayen RP, Cromey MG, Bithell S, Sutton DA, Skovgaard K, Ploetz R, Kistler, HC, Elliott M, Davis M, Sarver BAJ (2009) A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. Fungal Genetics Biology 46:936-948.

Posada D (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. Molecular Biology and Evolution 25:1253.

Rooney-Latham S, Blomquist CL, Sheck HJ (2011) First report of Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* on passion fruit in North America. Plant Disease 95:1478.

Silva ADS, Oliveira EJD, Haddad F, Jesus OND, Oliveira SASD, Costa MAPDC (2013) Molecular fingerprinting of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* isolates using AFLP markers. Scientia Agricola 70:108-115.

Silva, AS, Oliveira, EJ, Laranjeira, FF, Jesus, ON (2011). Seleção de metodologias para inoculação da fusariose do maracujazeiro causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura. 20p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 51).

Skovgaard K, Nirenberg HI, O'Donnell K, Rosendahl S (2001) Evolution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races inferred from multigene genealogies. Phytopathology 91:1231-1237.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting positionspecific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22:4673-4680.

Viana FMP, Freire FCO, Cardoso JE, Vidal JC (2003) Principais doenças do maracujazeiro na região Nordeste e seu controle. Fortaleza CE. Embrapa. Comunicado Técnico.

**CAPÍTULO 3** *Fusarium udum* é um agente etiológico da murcha do maracujazeiro e outras plantas cultivadas

## RESUMO

*Fusarium udum* foi relatado como o agente etiológico de murcha em feijão guandu (*Cajanus cajan*) em regiões tropicais. Nesse estudo foi testada a hipótese se *F. udum* é também patógeno do maracujazeiro e outras plantas cultivadas. Isolados obtidos de maracujazeiro com sintoma de murcha foram avaliados por meio de análise filogenética da região TEF-1, testes de compatibilidade sexual, marcadores morfológicos e teste de patogenicidade. Isolados do maracujazeiro agruparam com isolados de referência de *F. udum*. Em cruzamentos, isolados avaliados formaram peritécios férteis com os isolados testadores. Marcadores morfológicos, tanto da fase sexuada como da fase assexuada, conferem com as descrições originais da literatura. Em testes de patogenicidade, os isolados avaliados causaram murcha em maracujazeiro (*Passiflora edulis*), tomateiro (*Solanum lycopersicum*), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), algodoeiro (*Gossypium hirsutum*), pepineiro (*Cucumis sativus*), feijão guandu (*Cajanus cajan*) e em crotalaria (*Crotalaria ochroleuca*). Os resultados obtidos permitiram concluir que *F. udum* é o agente etiológico da murcha em diferentes plantas cultivadas.

## ABSTRACT

*F. udum* has been reported as the causal agent of wilt in pigeonpea (*Cajanus cajan*) in tropical regions. In this study we tested the hypothesis that *Fusarium udum* is also a pathogen of passion fruit and other cultivated plants. Isolates obtained from passionfruit with wilting symptoms were assessed using phylogenetic analysis of EF-1 $\alpha$  region, sexual compatibility tests, morphological markers and pathogenicity test. Isolates from passion fruit clustered with reference isolates of *F. udum*. In the crossing experiments, field isolates formed fertile perithecia when crossed with available tester strains of *F. udum*. Morphological markers, both of the sexual and asexual stage are according to the descriptions in the literature. In pathogenicity tests, the tested isolates caused wilting in passion fruit (*Passiflora edulis*), tomato (*Solanum lycopersicum*), bean (*Phaseolus vulgaris*), cotton (*Gossypium hirsutum*), cucumber (*Cucumis sativus*), pigeon pea (*Cajanus cajan*) and crotalaria (*Crotalaria ochroleuca*). The results showed that *F. udum* is the potential etiologic agent of wilting of different crops, including passionfruit.

## 1 INTRODUÇÃO

*Fusarium udum* é um patógeno que causa murcha em feijão-guandu. O patógeno foi registrado pela primeira vez por Butler (1910) na Índia e é encontrado em muitas áreas de cultivo do feijão guandu, com elevada incidência em países do oriente (Godwin et al. 2012; Karimi et al. 2012). A fase sexuada foi registrada na natureza associada a caules de *Cajanus* na Índia, denominada *Gibberella indica*. No Brasil, *F. udum* foi descrito causando murcha em *Crotalaria ochroleuca* (Melo 2014).

Uma análise filogenética preliminar realizada desse trabalho, a partir região fator de alongação (TEF-1) de 10 isolados obtidos de maracujazeiro, com características morfológicas de *F. oxysporum* evidenciou a presença de isolados de *F. udum*, representante do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* FFSC. Observou-se que *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* e a fase assexuada de *F. udum* são idênticas morfológicamente, porém, *F. udum* é uma espécie biológica e assim, apresenta reprodução sexuada.

Portanto, objetivamos nesse trabalho, confirmar a identidade de isolados de *F. udum* obtidos de maracujazeiro por meio de análises filogenéticas da região EF-1 $\alpha$ , comprovar sua patogenicidade em maracujazeiro e outras plantas cultivadas e completar o postulado de Koch.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção de isolados

Amostras foram coletadas nas principais áreas produtoras do Brasil. O isolamento foi realizado de acordo com (Leslie & Summerell 2006). Para obtenção de culturas monospóricas, porções do isolamento fúngico em BDA foram transferidas para um tubo de ensaio com 5 mL de água destilada e esterilizada e agitada em vórtex. Uma pequena alíquota foi transferida para meio ágar-água e espalhada com uma alça de Drigalski. Após 24 h, as placas foram observadas em microscópio estereoscópio, onde retirou-se um conídio com a presença de um tubo germinativo transferindo-o para meio BDA, seguido da incubação em BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 h por sete dias.

### 2.2 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica dos isolados foi realizada de acordo com a metodologia de Lima et al. (2009), sendo estes cultivados no meio BDA e ágar pobre em nutrientes (SNA). O meio BDA foi utilizado para avaliação da taxa de crescimento micelial e coloração da colônia. Para determinação da taxa de crescimento micelial, um disco de micélio de 5 mm foi transferido para o centro de uma placa de Petri contendo BDA, seguido de incubação a 25°C no escuro, por três dias. Após esse período foram tomadas medições do diâmetro ortogonal das culturas crescidas. Para a avaliação da coloração da colônia um disco de micélio foi transferido para o centro de uma placa de Petri contendo BDA, e foi incubados a 20°C com fotoperíodo de 12 h de luz branca combinada com luz negra e 12 h no escuro, por 14 dias.

Em SNA com fragmentos secos e autoclavados de folhas de cravo (*Dianthus caryophyllus*) foram observadas características micromorfológicas,

Após 14 dias de incubação a 20°C, fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente combinada com luz negra e 12 horas no escuro, foi registrada a presença ou não e cor de esporodóquios; tamanho, formato e origem de microconídios e macroconídios; tipos de fiálides, presença ou não de clamidósporos, presença ou não de microconídios em cadeias.

### 2.3 Sequenciamento e análises filogenéticas

A extração do DNA foi realizada a partir dos isolados monospóricos de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* crescidos em Meio Malte 4% líquido por três dias a 100 rpm em incubadora, a temperatura de 25°C com fotoperíodo 12h luz fluorescente e 12h escuro para a produção de biomassa. A biomassa foi filtrada e a extração do DNA procedeu utilizando-se o kit Wizard Genomic DNA Purification.

Fragmentos dos genes TEF-1 foram amplificados por PCR e purificados com o kit GoTaq® Colorless Master Mix e enviados para sequenciamento nas direções, sentido e anti-sentido, utilizando os primers EF-3 (5'-GTA-AGG-AGG-ATA-AGA-CTC-ACC-3') e EF-22 (5'-AGG-AAC-CCT-TAC-CGA-GCT-C-3') (O'Donnell et al., 2009). As condições de amplificação para TEF-1 foi 94°C, por 1 minuto; 34 ciclos: 94°C, por 30 segundos, 62°C, por 45 segundos, 72°C, por 1 minuto; 72°C, por 5 minutos (O'Donnell; Nirenberg, 1998). Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Brasil, São Paulo, BR) para posterior sequenciamento. Os fragmentos gênicos foram sequenciados, nas direções senso e antisenso, em um sequenciador automático empresa Macrogen, USA.

Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente utilizando Seqassem ver. 07/2008 (SequentiX - Digital DNA Processing, Klein Raden, Germany) (Hepperle 2011) e as sequências editadas foram comparadas com a base de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information -

NCBI, por meio da ferramenta BLAST. Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos de isolados de *Fusarium* obtidos nesse estudo foram gerados utilizando-se a ferramenta CLUSTALW (Thompson et al. 1994), implementada no programa MEGA 6. Os alinhamentos foram corrigidos manualmente. As análises filogenéticas foram realizadas pelo método de Máxima Verossimilhança por meio do programa MEGA 6 seguindo os modelos inferidos no programa JModelTest (Posada 2008). Foi utilizado o modelo 'kimura-2 parâmetros + G' (Kimura 1980). As sequências dos isolados foram depositadas no GenBank, NCBI e os alinhamentos estarão disponíveis junto aos autores.

#### **2.4 Determinação de *mating type* e cruzamentos**

Os cruzamentos foram realizados de acordo com a metodologia padrão para estudo de compatibilidade sexual do FFSC (Leslie & Summerell 2006). Isolados testadores previamente identificados como *F. udum*, pertencentes ao FFSC (CML 2554 e CML 2608) foram cruzados com isolados do campo obtidos de maracujazeiro. Os isolados usados como parental masculino (isolados do campo) foram cultivados em tubo de ensaio contendo meio completo, enquanto que os testadores, usados como parental feminino, foram cultivados em placas de Petri (60x15 mm) contendo meio cenoura-ágar. A incubação foi realizada a 20°C sob 12h de luz fluorescente combinada com luz negra e 12h de escuro por 7 dias. Após este período foi obtida uma suspensão de esporos do parental masculino, pela adição de 2 mL de solução de Tween 80 a 2,5%. Sendo a liberação dos esporos feita pela fricção da superfície da colônia. Em seguida, essa suspensão foi adicionada à superfície da colônia do parental feminino. Com uma alça de Drigalski, espalhou-se a suspensão de forma uniforme para umedecer o micélio. Os cruzamentos foram incubados a 20°C, com fotoperíodo de 12 horas de luz branca fluorescente combinada com luz negra, por um período de cinco semanas. Foram considerados férteis os cruzamentos que

produziram peritécios com exsudação de ascósporos. Os cruzamentos foram repetidos três vezes, para confirmação dos resultados.

## 2.5 Teste de patogenicidade

Sete espécies de plantas hospedeiras foram utilizadas nos testes de patogenicidade: maracujazeiro (*Passiflora edulis*), tomateiro (*Solanum lycopersicum*), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), algodoeiro (*Gossypium hirsutum*), pepineiro (*Cucumis sativus*), feijão guandu (*Cajanus cajan*) e em crotalaria (*Crotalaria ochroleuca*). Foram utilizados três isolados de *F. udum* provenientes de maracujazeiro: CML 3223, CML 3227 e CML 3230 e dois isolados de *F. udum*, provenientes de crotalaria: CML 2554 e CML 2608.

Os ensaios foram realizados na UNIMONTES Campus Janaúba, onde as mudas foram produzidas em bandejas de isopor de 200 células, contendo substrato e foram distribuídas as sementes das cultivares BRS Sol Cerrado (maracujá), Super Marmande (tomate), IAC Alvorada (feijão), Delta Opal (algodão) e Shibata (pepino), feijão guandu (*Cajanus cajan*) e crotalaria (*Crotalaria ochroleuca*). As plântulas foram inoculadas quando apresentarem duas folhas verdadeiras totalmente expandidas.

A inoculação foi realizada pelo método de *dipping*: mudas com três pares de folhas definitivas, obtidas pela semeadura em bandejas plásticas contendo vermiculita estéril, foram retiradas do substrato para lavagem das raízes com água estéril. Em seguida, as raízes foram imersas durante 1 hora, na suspensão de conídios. Posteriormente, foi realizado o replantio em vasos plásticos de 4 litros, contendo uma mistura de solo esterilizado e vermiculita na proporção de 3:1, suplementada com superfosfato simples, ureia e cloreto de potássio na quantidade indicada pela análise de solo. (Silva et al. 2011).

Para o preparo da suspensão de esporos, os isolados monospóricos de *F. udum* foram transferidos para placas de Petri contendo o meio malte (MA), e

foram mantidos a 25°C em incubadora BOD no escuro por 15 dias, para a produção de esporos. Posteriormente, foi adicionado 40 mL de água destilada e autoclavada às placas, e com auxílio de um pincel, os esporos das colônias foram desagregados e mantidos em suspensão e, em seguida, essa foi calibrada para a concentração de  $10^5$  conídios / mL.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no delineamento de blocos casualizados (DBC). Cada tratamento foi composto por isolados representativos de *F. udum* de acordo com os resultados das análises filogenéticas. A testemunha foi constituída de plantas não inoculadas. Cada parcela foi composta por quatro vasos contendo uma planta cada. As irrigações foram realizadas diariamente, pela manhã e à tarde, até que o teor de umidade do solo atingisse a capacidade de campo. Cinco dias após a inoculação, foi realizada adubação com cálculos realizados de acordo com as indicações da quinta aproximação para Minas Gerais. As avaliações de incidência de plantas com sintomas foram realizadas diariamente após o transplante das mudas.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Obtenção de isolados

Sete isolados de *F. udum* foram obtidos de maracujazeiro (*Passiflora edulis*) coletados nos estados de Minas Gerais e Bahia. Além destes, foram incluídos neste trabalho isolados de *F. udum* cedidos Agri-Food Toxigenic Fungi Culture Collection, Institute of Sciences of Food Production, Bari, Italy (ITEM), Julius Kühn Institut, Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics, Berlin & Braunschweig, Germany (BBA), CABI Bioservices, Egham, Surrey, UK (IMI), Coleção de Fungos Fitopatogênicos Maria Menezes, UFRPE, Recife, Brasil (CMM) (Tabela 1).

Tabela 1 Isolados de *Fusarium udum* e sequências de isolados de referência utilizados neste estudo.

CML	Cod.	Espécie	Hospedeiro	Origem geográfica	Pt	EF-1 $\alpha$
CML 3227	MR 10	<i>F. udum</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Januária – MG	+	x
CML 3219	MR 13	<i>F. udum</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Jaíba–MG		x
CML 3225	MR 17	<i>F. udum</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Jaíba– MG		x
CML 3214	MR 30	<i>F. udum</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Jaíba– MG		x
CML 3226	MR 33	<i>F. udum</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Jaíba – MG		x
CML 3230	MR 35	<i>F. udum</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Jaíba– MG	+	x
CML 3223	MR 77	<i>F. udum</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Sebastião Laranjeira-BA	+	x
CML 2554	MP 211	<i>F. udum</i>	<i>Crotalaria ochroleuca</i>	Lavras_MG	+	x
CML 2608	CMM 3104	<i>F. udum</i>	<i>Crotalaria ochroleuca</i>	Recife-PE	+	x
CML 2617		<i>F. udum</i>	<i>Crotalaria ochroleuca</i>	Lavras-MG, 2013		x
CML 2616		<i>F. udum</i>	<i>Crotalaria paulinea</i>	Terra Roxa PR, 2012		x
CML 2614		<i>F. udum</i>	<i>Crotalaria paulinea</i>	Seropédica RJ, 2012		x
CML 2612		<i>F. udum</i>	<i>Crotalaria ochroleuca</i>	Lavras-MG, 2012		x
CML 2598		<i>F. udum</i>	<i>Crotalaria ochroleuca</i>	Terra Roxa PR, 2012		x
CML2601		<i>F. udum</i>	<i>Crotalaria paulinea</i>	Terra Roxa PR, 2013		x
CML2609		<i>F. udum</i>	<i>Crotalaria ochroleuca</i>	Lavras-MG, 2012		x
CML 2600		<i>F. udum</i>	<i>Crotalaria sp.</i>	São Luis MA, 2013		x
CML 262		<i>F. tuiense</i>	<i>Mangifera indica</i>	Brasil		DQ452859
CML2592	ITEM 3586	<i>F. udum</i>	<i>Crotalaria juncea</i>	Índia		x
CML 3240 ET	NRRL 25194	<i>F. udum</i>	<i>Cajanus indius</i>	Índia, 1979		x
CML 3238	NRRL 25199	<i>F. udum</i>	<i>Cajanus cajan</i>	Índia		x
CML 2645	NRRL 22949	<i>F. udum</i>	Desconhecido	Alemanha, 1925		AF160275

<b>CML 3239</b>	NRRL 25313	<i>F. udum</i>	<i>Crotalaria juncea</i>	Índia	x
	NRRL 25118	<i>F. acutatum</i>	<i>Homoptera</i>	Paquistão	JF740744.1
<b>CML405</b>	NRRL 25331	<i>F. circinatum</i>	<i>Pinusradiata</i>	EUA	U61547
	NRRL 22016	<i>F. subglutinans</i>	<i>Zea mays</i>	EUA	U34417
	NRRL 25623	<i>F. sterilihyphosum</i>	<i>Mangifera indica</i>	Desconhecido	AF160344
	NRRL 25059	<i>F. musae</i>	<i>Musa</i> sp.	Honduras	FN552086
	NRRL 22045	<i>F. thapsinum</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	África do Sul	AF160270
	NRRL 13566	<i>F. fujikuroi</i>	<i>Oryza sativa</i>	Taiwan	U34415
	NRRL 22944	<i>F. proliferatum</i>	<i>Cattleya</i> sp.	Alemanha	U34416
	NRRL 38273	<i>F. oxysporum</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Austrália	FJ985362.1
	NRRL 22549	<i>F. oxysporum</i>	<i>Passiflora edulis</i>	Brasil	AF008505.1
	CDFA 591	<i>F. oxysporum</i>	<i>Passiflora edulis</i>	América do Norte	JF332039.1
<b>CML 3242</b>	IMI 275452	<i>F. udum</i>	<i>Cajanus cajan</i>	Malawi 1983	AM295295.1
	MRC 8544	<i>F. konzum</i>	<i>Sorgh astrumnuttans</i>	EUA	EU220234
	FGSC 7600	<i>F. verticilioides</i>	<i>Zea mays</i>	EUA	FN552074.1
	MUCL 52450	<i>F. temperatum</i>	Desconhecido	Bélgica	HM067695
	NRRL 22540	<i>F. udum</i>	<i>Crotalaria</i> sp.	Brasil	AM295809-1
	NRRL 13617	<i>F. phyllophilum</i>	<i>Dracena derremensis</i>	Itália	AF160274.1
	FCRL-400	<i>F. xylarioides</i>	<i>Coffea canephora</i>	Uganda	AY707135.1

<sup>a</sup>Abreviações das siglas: Pt= Teste de patogenicidade confirmada por Silva, TC; Mt= Matingtype; TEF-1 Código do sequenciamento da região encontrada no Genbank

## 3.2 Características morfológicas

### 3.2.1 Características morfológicas da fase assexuada

Todos os isolados avaliados apresentaram características típicas de *F. udum* (Figura 1). Seu micélio é abundante, difuso e possui pigmentação variada: os isolados apresentaram inicialmente a coloração branca, tornando-se salmão, alaranjada ou violeta. A taxa de crescimento micelial tem a média de 1,1 cm/dia. Seus clamidósporos são globosos, formados nas hifas ou suas extremidades de coloração cinza-escuro, podendo ser isolados ou aos pares, com paredes duplas e verrugosas. Similar a *F. oxysporum*, apresenta fiálides curtas. Outros caracteres morfológicos avaliados foram: o tamanho dos esporos, forma e septação. Microconídios estavam presentes em todos os isolados, agregados em falsas cabeças, apresentando formato fusiforme e reniforme com tamanho variando entre 5,0-6,5 x 1,5-2,0, com 0-1 septos (predominantemente asseptado) em todos os isolados. Todos os isolados apresentaram macroconídios de tamanho variando entre 10,5-22,5 x 1,05-3,5µm. Os isolados possuem uma alta capacidade de produção de esporodóquio em fragmentos de folhas de cravo e também na superfície do meio SNA. Os macroconídios produzidos em fragmentos de folhas de cravo possuem formato falcado com presença de 3-5 septos. A célula apical do macroconídio é pouco pronunciada, assim como a célula pé. Já os macroconídios produzidos no micélio aéreo possuem morfologia muito variável, com 3-5 septos (predominantemente 3), célula apical fortemente curvada e célula pé evidente.

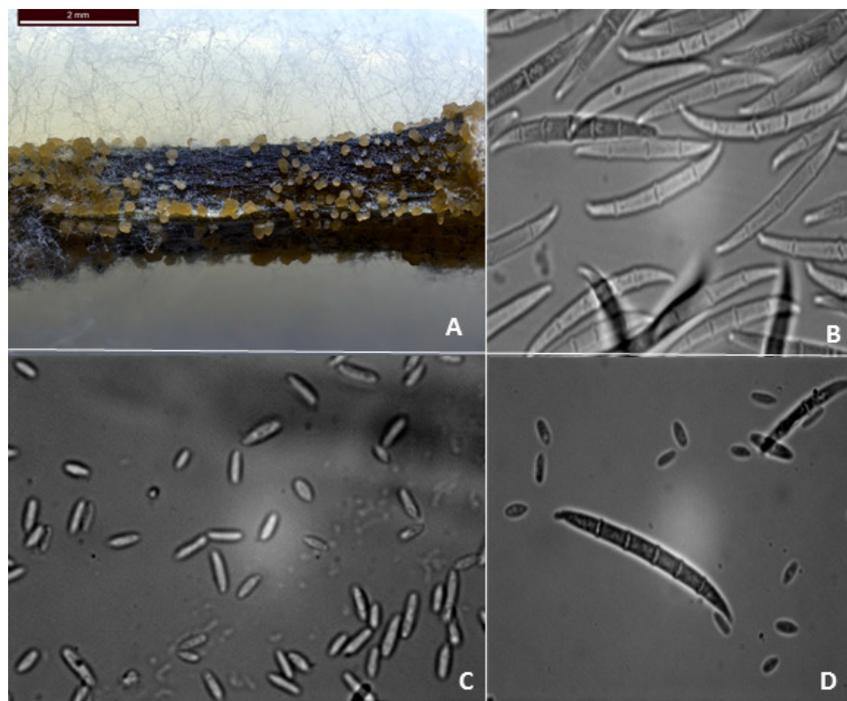


Figura 1 *Fusarium udum*. A: Esporodóquio formado em meio de cultura SNA + folha de cravo. B: Macroconídios de 3-5 septos formados a partir do esporodóquio. C-D: Macro- e microconídios formados no micélio aéreo.

### 3.2.2 Indução da fase sexuada

Todos os isolados tiveram o *mating type* identificado, sendo quatro do idiomorfo *MAT-1* e três *MAT-2*. Esses isolados, quando cruzados com os testadores do *mating type* oposto CML 2554 (*MAT-1*) e CML 2608 (*MAT-2*) formaram protoperitécios após sete dias; após 15 dias foram observados peritécios e a exsudação de cirros de ascósporos foi observada a partir de 21 dias. Os ascósporos germinaram em meio SNA.

### 3.2.3 Características morfológicas da fase sexuada

Os peritécios produzidos em condições de laboratório foram superficiais, agregados ou solitários, não apresentando base estromática, com formato obovóide 355-520  $\mu\text{m}$  de altura e 311-375  $\mu\text{m}$  de largura. Os ascos possuem oito ascósporos, com 1 septo predominantemente, com presença de uma leve constrição nos septos. Ascósporos obtidos de cruzamentos assim como de substrato natural germinaram em SNA, produzindo culturas típicas de *F. udum* (Figura 2).

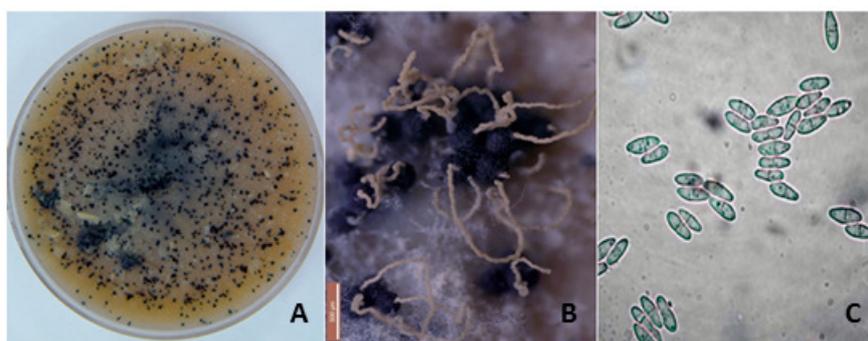


Figura 2 *Fusarium udum*. A: Peritécios formados a partir de cruzamento em meio cenoura-ágar. B: Peritécios exsudando ascósporos. C: Ascósporos.

### 3.3 Análise filogenética

Os isolados de *Fusarium udum* obtidos do maracujazeiro agruparam com os isolados de referências (ITEM 3586 e NRRL 22540) oriundos de *Crotalaria*. Na análise filogenética do gene TEF-1 formou um subgrupo apenas com os isolados de *Passiflora edulis* e de *Crotalaria* obtidos do Brasil e Índia. Outros isolados de *Fusarium udum*, provenientes da Índia e África, obtidos de *Cajanus*, formaram dois subgrupos distintos (Figura 3).

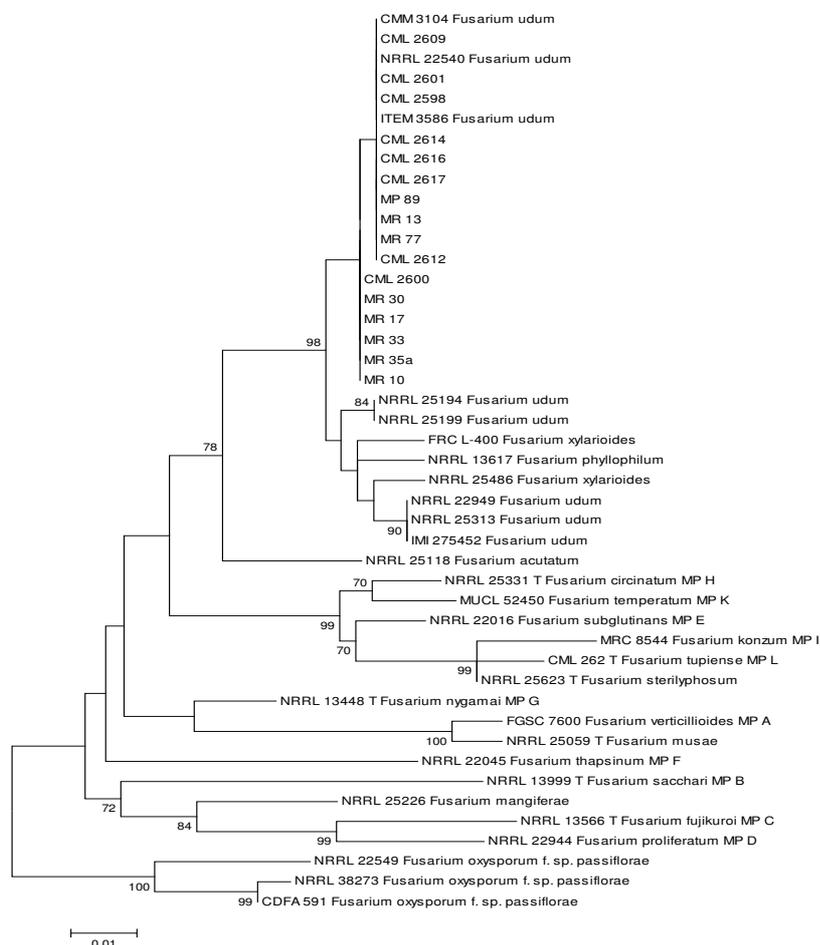


Figura 3 Árvore filogenética de máxima verossimilhança das espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* usando sequências de TEF-1. *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* foi utilizado como outgroup. Os valores de bootstrap, 1.000 repetições, são indicados em porcentagem acima e abaixo dos internódios, máxima parcimônia (MP) Abreviações: **AC** - Coleção Acleide Cardoso; **CDFA** - California Department of Food and Agriculture, Califórnia; **CML** - Coleção Micológica de Lavras; **FOP** - Embrapa Mandioca e Fruticultura; **FGSC** = Fungal Genetics Stock Center, Missouri, Kansas City; **ITEM**, Agri-Food Toxigenic Fungi Culture Collection, Institute of Sciences of Food Production, Bari, Itália; **MR** - Coleção micológica Unimontes- Janaúba; **MRC**, Medical Research Council, Tygerberg, África do Sul; **MUCL**, Mycotheque de l'Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Bélgica; **IMI**, CABI Bioservices, Egham, Surrey, UK; **NRRL** - Northern Regional Research.

### 3.4 Teste de patogenicidade

Apoiado no resultado filogenético realizou-se o teste de patogenicidade com os isolados de *Fusarium udum*, fundamentando a hipótese que esse também poderia induzir sintomas em outras plantas cultivadas. O teste de patogenicidade foi realizado três vezes. De acordo com a análise do teste Qui-quadrado. A porcentagem de plantas que apresentaram sintomas de amarelecimento com isolados de *F. udum* causando sintomas de amarelecimento no maracujazeiro variou de 16 a 41%. Na cultura do feijão guandu 16 a 66%, *Crotalaria* 25 a 83%, pepineiro 100%, algodoeiro 50 a 83%, feijão-carioca 25 a 58%, tomateiro 92 a 100% (Tab. 2, 3 e 4).

A porcentagem de plantas que apresentaram amarelecimento variou de 16 a 41% no maracujazeiro, feijão guandu 25 a 83%, *Crotalaria* 16 a 66%, pepineiro 100%, algodoeiro 50 a 83%, feijão carioca 33 a 58% e tomateiro 92 a 100%. Não foram observadas incidência ou patogenicidade de *F. udum* nas testemunhas.

O sistema radicular de todas as plantas inoculadas apresentou sintomas necróticos visíveis. Obteve-se os isolados com as mesmas características morfológicas completando o postulado de Koch (Figura 1). Os sintomas de murcha apresentados nas plantas de maracujazeiro foi entre 20-58 dias pós a inoculação. As plantas mudaram a coloração das folhas de verde-brilhante a verde-pálido ou verde-amarelado onde os sintomas evoluíram para murcha e morte das plantas.

Os mesmos isolados, quando inoculados em tomate e pepino, provocaram morte nas plantas entre 7-12 DAI e 7 a 40 DAI, respectivamente. Os sintomas de murcha iniciam-se pelas folhas basais que perdem a turgidez, tornam-se amareladas, apresentam crestamento do limbo e, finalmente, caíram. Nas raízes das plantas, pode-se observar o escurecimento dessas, onde evidenciou a presença do patógeno.

No algodoeiro, a murcha se manifestou 30-51 DAI. Os primeiros sintomas caracterizaram-se pela murcha de algumas folhas e ramos e observou-se uma severa redução de crescimento. Internamente, observou-se a descoloração dos feixes vasculares.

Em feijão guandu e feijão carioca, a murcha se manifestou 17-39 DAI. Os sintomas observados foram de clorose acompanhada de queda prematura das folhas onde evoluiu para murcha e morte das plantas. Ao seccionar longitudinalmente os feixes o caule, pode-se perceber uma descoloração dos feixes vasculares com uma pigmentação castanha.

Em *Crotalaria*, a murcha se manifestou 38 DAI. O sintoma inicial foi o amarelecimento internerval nas folhas e plantas com murcha. Ao seccionar longitudinalmente os feixes o caule, pode-se perceber uma descoloração. Em nenhum tratamento testemunha foi observado a manifestação de sintomas de Fusariose.

Tabela 2 Média percentual do número de plantas que apresentaram sintomas de amarelecimento nas três repetições do experimento.

Repetição	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
ISOLADO / % MORTE ESPÉCIE	CML 3227 (%)			CML 3230 (%)			CML 3223 (%)			CML 2554 (%)			CML 2608 (%)			Testemunha (%)		
<i>Passiflora edulis</i>	16,66			33,33			33,33			33,33			41,66			16,66		
	25	25	0	50	50	25	25	0	50	50	25	25	0	50	50	0	0	0
<i>Cajanus cajan</i>	25			50			33,33			33,33			83,33			0		
	50	25	0	50	50	50	25	0	50	50	50	25	0	50	50	0	0	0
<i>Crotalaria ochroleuca</i>	16,66			50			58,33			66,66			66,66			0		
	25	25	0	50	50	25	25	0	50	50	25	25	0	50	50	0	0	0
<i>Cucumis sativus</i>	100			100			100			100			100			0		
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0
<i>Gossypium hirsutum</i>	50			50			50			75			83,33			0		
	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	0	0	0
<i>Phaseolus vulgaris</i>	25			33,33			41,66			33,33			58,33			0		
	25	50	0	50	50	25	50	0	50	50	25	50	0	50	50	0	0	0
<i>Solanum lycopersicum</i>	91,66			100			100			100			100			0		
	100	75	100	100	100	100	75	100	100	100	100	75	100	100	100	0	0	0

Tabela 3 Média percentual do número de plantas que apresentaram sintomas de murcha nas três repetições do experimento.

Repetição	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
ISOLADO / % MORTE ESPÉCIE	CML 3227 (%)			CML 3230 (%)			CML 3223 (%)			CML 2554 (%)			CML 2608 (%)			Testemunha (%)		
<i>Passiflora edulis</i>	16,66			33,33			33,333			33,33			41,66			16,66		
	25	25	0	50	50	25	25	0	50	50	25	25	0	50	50	0	0	0
<i>Cajanus cajan</i>	25			50			33,33			33,33			83,33			0		
	50	25	0	50	50	50	25	0	50	50	50	25	0	50	50	0	0	0
<i>Crotalaria ochroleuca</i>	16,66			50			58,33			66,66			66,66			0		
	25	25	0	50	50	25	25	0	50	50	25	25	0	50	50	0	0	0
<i>Cucumis sativus</i>	100			100			100			100			100			0		
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0
<i>Gossypium hirsutum</i>	50			50			50			75			83,33			0		
	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	0	0	0
<i>Phaseolus vulgaris</i>	25			33,33			41,66			33,33			58,33			0		
	25	50	0	50	50	25	50	0	50	50	25	50	0	50	50	0	0	0
<i>Solanum lycopersicum</i>	91,66			100			100			100			100			0		
	100	75	100	100	100	100	75	100	100	100	100	75	100	100	100	0	0	0

Tabela 4 Média percentual do número de morte de plantas nas três repetições do experimento.

Repetição	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
ISOLADO / %MORTE ESPÉCIE	CML 3227 (%)			CML 3230 (%)			CML 3223 (%)			CML 2554 (%)			CML 2608 (%)			Testemunha (%)		
<i>Passiflora edulis</i>	16,66			33,33			33,333			33,33			41,66			16,66		
	25	25	0	50	50	25	25	0	50	50	25	25	0	50	50	0	0	0
<i>Cajanus cajan</i>	25			50			33,33			33,33			83,33			0		
	50	25	0	50	50	50	25	0	50	50	50	25	0	50	50	0	0	0
<i>Crotalaria ochroleuca</i>	16,66			50			58,33			66,66			66,66			0		
	25	25	0	50	50	25	25	0	50	50	25	25	0	50	50	0	0	0
<i>Cucumis sativus</i>	100			100			100			100			100			0		
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0
<i>Gossypium hirsutum</i>	50			50			50			75			83,33			0		
	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	0	0	0
<i>Phaseolus vulgaris</i>	25			33,33			41,66			33,33			58,33			0		
	25	50	0	50	50	25	50	0	50	50	25	50	0	50	50	0	0	0
<i>Solanum lycopersicum</i>	91,66			100			100			100			100			0		
	100	75	100	100	100	100	75	100	100	100	100	75	100	100	100	0	0	0

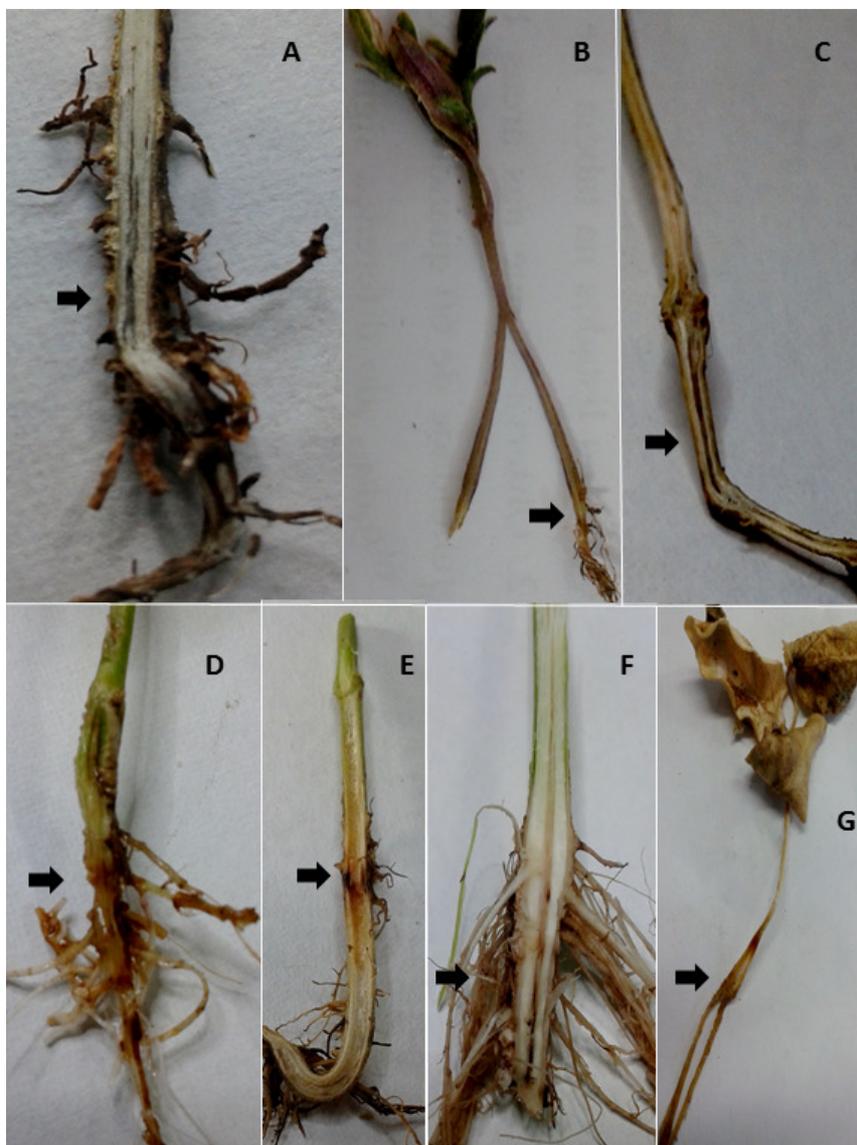


Figura 4 *F. udum* inoculado em raízes de plantas. A: *Cajanus cajan* com o isolado CML 2608 30 DAI. B: *Solanum lycopersicum* com o isolado CML 3230 15 DAI. C: *Gossypium hirsutum* com o isolado CML 2608 58DAI. D: *Passiflora edulis* com o isolado CML 3227 58 DAI. E: *Phaseolus vulgaris* com o isolado CML 3223 45 DAI. F: *Crotalaria ochroleuca* com o isolado CML 3230 58 DAI. G: *Cucumis sativus* com o isolado CML 3223 15 DAI.

## 4 DISCUSSÃO

Análise de filogenia, compatibilidade sexual, caracterização morfológica e teste de patogenicidade evidenciaram que *F. udum* induz sintomas de murcha nas plantas avaliadas. O filograma demonstrou que os isolados de *F. udum* não formaram um grupo monofilético, tendo *F. phyllophilum* e *F. xylarioides* no mesmo clado, o que evidencia que a análise da região EF-1 $\alpha$  não foi suficiente para separar essas espécies. Resultados semelhantes foram obtidos por Geiser et al. (2005), onde a árvore resultante da região EF-1 $\alpha$  indicou uma relação filogenética muito próxima entre *F. udum*, *F. phyllophilum* e *F. xylarioides* com o apoio de 98% de bootstrap.

No entanto, análises de Máxima Parcimônia (MP) de sequências combinadas de EF-1 $\alpha$  e RPB2, os isolados de *F. udum* de *Cajanus cajan* e *Crotalaria* spp. formaram um clado único com isolados de referência da Índia, Malawi e Alemanha, tendo como grupo irmão *F. phyllophilum* e *F. xylarioides* (Melo, 2014). Sendo assim, inferimos que a inclusão de outras regiões gênicas possa melhorar a resolução da árvore.

Na caracterização morfológica pode-se observar que a fase assexuada de *F. udum* possui marcadores morfológicos que são idênticos aos representantes das distintas linhagens de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*: coloração das colônias, formato e tamanho de fiálides, forma e septação dos conídios. Nesse contexto, torna-se ímprobo separá-las a partir da morfologia.

No teste de patogenicidade em maracujazeiro, os resultados das variáveis avaliadas: amarelecimento, murcha e morte de plantas não variaram entre os isolados, pois, apesar do baixo número de plantas mortas, os isolados foram capazes de infectar os tecidos das plantas inoculadas e manifestar sintomas necróticos nas raízes, confirmando a associação patógeno-hospedeiro pelo postulado de Koch. Resultados semelhantes foram relatados por Dariva

(2011). A sintomatologia apresentada também foi semelhante a *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* descrita por Viana et al. (2003).

A sintomatologia de *F. udum* nas outras plantas inoculadas foi similar à causada pelas *formae speciales* descrita em cada cultura. Em tomateiro, assemelha-se a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Reis et al. 2005), em pepineiro a *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (Jacobson & Gordon 1991), em feijão guandu e feijão carioca a *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Pereira et al. 2013); no algodoeiro a *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Silva et al. 2007) e em *Crotalaria* são compatíveis aos sintomas observados por Melo (2014).

A partir da média dos parâmetros de morte de plantas pode-se inferir a sensibilidade dessas culturas a *F. udum*, que não é apenas um patógeno de crotalaria e feijão guandu, como reportado anteriormente. Os resultados deste trabalho contribuirão para o melhor conhecimento sobre a biologia do fungo e poderá auxiliar em trabalhos futuros de melhoramento genético e métodos de controle.

.

## REFERÊNCIAS

Butler EJ (1910) The wilt disease of pigeon pea and the parasitism of *Neocosmospora vasinfecta* Smith. Memoirs of the Department of Agriculture in India. Botanical Series. Vol. II, no. 9, 1-64.

Dariva JM (2011) Fusarioses do maracujazeiro: etiologia e sintomatologia. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Montes Claros. Janaúba MG.

Geiser DM, Lewis Ivey ML, Hakiza G, Juba JB, Miller S (2005) *Gibberella xylarioides* (anamorph: *Fusarium xylarioides*), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is a previously unrecognized member of *G. fujikuroi* species complex. Mycologia 97:191-201.

Godwin L, Reeder R, Buddie AG, James M (2012) First confirmed report of *Gibberella indica* on *Cajanus cajan* in Barbados, Lesser Antilles. New Disease Report 26: 10.

Jacobson DJ, Gordon TR (1991) *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*: a case study of diversity within a *forma specialis*. Phytopathology 81:1064-1067.

Karimi R, Owuoche JO, Silim SN (2012) Importance and management of fusarium wilt (*Fusarium udum* Butler) of pigeonpea. International Journal of Agronomy and Agricultural Research 2:1-14.

Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16:111-120.

Leslie JF, Summerell BA (2006) The Fusarium laboratory manual. Sydney. Blackwell.

Melo MP (2014) Espécies biológicas e filogenéticas do complexo *Fusarium fujikuroi*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras. Lavras MG.

Miranda IR (2000) Características morfofisiológicas e polimorfismo de DNA de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* do Nordeste do Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. Recife PE.

O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg HI (1998) Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:465-493.

Pereira AC, Cruz MFA, Paulo Júnior TJ, Rodrigues FA, Carneiro JES, Vieira RF, Carneiro PCS (2013) Infection process of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* on resistant, intermediate and susceptible bean cultivars. *Tropical Plant Pathology* 38:323-328.

Reis A, Costa H, Boiteu LS, Lopes CA (2005) First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 30:426-428.

Silva ADS, Oliveira EJD, Haddad F, Jesus OND, Oliveira SASD, Costa MAPDC (2013) Molecular fingerprinting of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* isolates using AFLP markers. *Scientia Agricola* 70:108-115.

Viana FMP, Freire FCO, Cardoso JE, Vidal JC (2003) Principais doenças do maracujazeiro na região Nordeste e seu controle. Fortaleza CE. Embrapa. Comunicado Técnico.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fusariose é uma das doenças mais devastadoras do maracujazeiro, pois provoca interrupção da absorção de água, murcha imediata, colapso e morte das plantas, independente do estágio de desenvolvimento, reduzindo de forma significativa a vida útil dos pomares, antes mesmo de iniciar o ciclo de produção. O agente causal da murcha do maracujazeiro foi descrito como *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, por possuir as mesmas características morfológicas de *Fusarium oxysporum*. Porém, a análise filogenética do nosso trabalho, através do sequenciamento da região fator de alongação (TEF-1) demonstrou que esses isolados formaram 3 linhagens distintas dentro do complexo de espécies *F. oxysporum* e também que 7 isolados se agruparam com *Fusarium udum*, espécie pertencente ao complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. A partir desse resultado, objetivamos comprovar a patogenicidade desses isolados ao maracujazeiro e outras plantas cultivadas. Duas metodologias foram utilizadas para inoculação de *F. oxysporum* e *F. udum*.

No primeiro procedimento foi utilizada a metodologia proposta por Oliveira et al. (2014): os isolados MR 77, CML 2608, CML 2554, MR 10, MR 35a (*F. udum*) MR 32, MR 78, MR 25, FOP 2 e CAJ (*F. oxysporum*) foram multiplicados em placas de Petri contendo meio Malte, as quais foram mantidas em BOD a 25°C no escuro por 15 dias. Após esse período, os esporos contidos nas colônias foram colocados em suspensão, transferidas para hemacitômetro e, a concentração ajustada ao microscópio óptico para  $7,0 \times 10^5$  esporos mL<sup>-1</sup>. Em seguida a suspensão de conídios foi transferida aos vasos com solo arenoso de forma que ele atinja 70% da capacidade de campo. Em cada vaso foram semeadas quatro sementes das cultivares BRS Sol Cerrado (maracujá), Super Marmande (tomate), IAC Alvorada (feijão), Delta Opal (algodão) e Shibata (pepino). O ensaio foi mantido em casa de vegetação e o solo foi irrigado 24 horas após a infestação. Após a emissão de um par de folhas verdadeiras, foi

realizado o desbaste deixando apenas uma planta por vaso. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no delineamento de blocos casualizados (DBC). Cada tratamento foi composto por um isolado representativo de cada linhagem ou espécie de acordo com os resultados das análises filogenéticas. A testemunha foi constituída de plantas não inoculadas. Cada parcela foi composta por quatro vasos contendo uma planta cada. As irrigações foram realizadas diariamente, pela manhã, até que o teor de umidade do solo atingisse 60% da capacidade de campo. As avaliações de incidência de plantas com sintomas foram realizadas durante 60 dias. Nessa metodologia, nenhum sintoma foi observado nas plantas, então, consideramos que essa foi inadequada para o nosso teste. Com a metodologia 2 (Silva et al. 2011) descrita nesse trabalho, conseguimos observar sintomas típicos de Fusariose.

A avaliação dos marcadores morfológicos demonstrou que isolados de *F. oxysporum* e a fase assexuada *F. udum* possuem características morfológicas idênticas. Sendo assim, não existem marcadores morfológicos para separar esses patógenos. Este trabalho é o primeiro relato de *F. udum* associado à murcha do maracujazeiro no Brasil. Inferimos que muitos outros patógenos que causam murcha em plantas cultivadas que possuem as mesmas características morfológicas de *F. oxysporum* possam ser, na verdade, espécies pertencentes a outros complexos.

### **CURRÍCULO DA AUTORA**

Tatiane Carla Silva é natural de Januária MG, onde nasceu em 1988. Em 2008 ingressou no curso de Agronomia do Instituto Federal do Norte de Minas Gerais, campus Januária, onde foi bolsista de iniciação científica no Departamento de Fitopatologia sob orientação da professora Tatiana Tozzi Rodrigues. No ano de 2012 foi bolsista do Programa Ciências sem Fronteiras do Governo Federal na Pontifícia Universidad Católica de Chile, em Santiago, Chile. Concluída a graduação em 2014, obteve no mesmo ano uma vaga no curso de mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Lavras, Lavras MG, sob orientação do professor Ludwig H. Pfenning.