

Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) quanto à compatibilidade vegetativa e à patogenicidade em cultivares de bananeira diferenciadoras de raças no Brasil

Jurema do Socorro Azevedo Dias¹, Mário Sobral de Abreu², Mário Lúcio Vilela de Resende³

1. Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia. Mestre em Agronomia, Universidade Federal de Lavras. Pesquisadora da Embrapa-AP, Brasil. E-mail: jurema.dias@embrapa.br

2. Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Viçosa. Doutorado em Agronomia, Universidade Federal de Viçosa. Professor colaborador/voluntário, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Brasil. E-mail: msabreu@ufla.br

3. Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras. Ph.D. em Applied Biology and Biochemistry, University of Bath, Inglaterra. Professor Titular, Universidade Federal de Lavras, Brasil. E-mail: mlucio@ufla.br

RESUMO: Murcha de *Fusarium* é causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), um patógeno altamente variável. Porém, o efeito da heterocariose sobre a classificação taxonômica e a importância da formação de um heterocário entre isolados selvagens de espécies de *Fusarium* ainda não é clara e permanece amplamente debatida. Assim como a recombinação parassexual tem sido relatada em *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, para explicar as relações genéticas entre isolados pertencentes à mesma raça ou *formae specialis*. Grupos assexuais isolados geneticamente e identificados nestes estudos, são denominados de grupos de compatibilidade vegetativa (GCV). Porém, outra forma de determinação de raças deste patógeno, tem sido através de variedades indicadoras, utilizando-se as variedades Gros Michel para a Raça 1; Bluggoe para a Raça 2; Grande Naine para a Raça 4. O presente estudo teve como objetivos determinar a diversidade genética entre isolados de Foc, através destas duas técnicas, de forma a identificar quais as raças do patógeno, que de fato existem no Brasil. A análise genética, foi feita com base na técnica de UPGMA, utilizando-se o coeficiente de similaridade de Jaccard. A técnica de GCV permitiu agrupar os isolados das Regiões Nordeste e Sudeste do Brasil no GCV 1 e os da Região Norte, no GCV 2. Enquanto que, o teste de patogenicidade permitiu determinar a presença da raça 1, através de sua patogenicidade em Gros Michel e da raça 4, em Grande Naine. Além de, agrupá-las dentro dos mesmos GCV.

Palavras-chave: Murcha de *Fusarium*, mutantes nit, reprodução assexuada.

Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) for the vegetative compatibility and pathogenicity on differential cultivars of banana in Brazil Races

ABSTRACT: *Fusarium* wilt is caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) a highly variable pathogen. However, the effect of heterokaryosis on the taxonomic classification and the importance of the formation of a heterokaryon between wild isolates of *Fusarium* species is still unclear and remains widely debated. Just as parasexual recombination has been reported in *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, to explain the genetic relationships among isolates belonging to the same race or *formae specialis*. Asexual and genetically isolated groups identified in these studies are called vegetative compatibility groups (VCG). However, another way of determining races of this pathogen has been through indicator varieties, using the Gros Michel variety for Race 1; Bluggoe for Race 2; Great Naine for Race 4. The present study aimed to determine the genetic diversity among isolates of Foc, through these two techniques in order to identify the races of the pathogen, which do exist in Brazil. The genetics analysis was based on the technique of UPGMA, using the Jaccard similarity coefficient. The technique allowed VCG group the isolates from the Northeast and Southeast regions of Brazil in the VCG 1 and the Northern Region, the VCG 2. While the pathogenicity test allowed us to determine the presence of race 1, through its pathogenicity in Gros Michel and race 4 in Grand Naine. Besides, group them within the same VCG.

Keywords: *Fusarium* wilt, parasexual recombination, asexual reproduction.

1. Introdução

Fusarium é um gênero heterogêneo com uma distribuição muito ampla que inclui várias espécies as quais já foram descritas desde os árticos até as areias do Sahara. Uma característica comum de *Fusarium* spp. é a produção de macroconídios na forma de foice (WINDELS, 1991). O estágio sexual já foi detectado em algumas espécies de *Fusarium* e características morfológicas e patológicas sobre o gênero são pouco conhecidas e menos ainda se conhece a respeito da espécie *Fusarium oxysporum* (KURAMAE; SOUZA, 2002).

Micologistas e patologistas de plantas estão cientes de que espécies anamórficas de *Fusarium oxysporum* contêm ampla diversidade fenotípica e presumivelmente genotípica. Os conceitos de *formae specialis* e raças, baseados na patogenicidade, têm sido amplamente

usados somente para subdivisões de *F. oxysporum*, o que tem causado controvérsias e diferenças de opiniões devido à instabilidade fenotípica e diferenças metodológicas (JACOBSON; GORDON, 1991).

Três raças do patógeno que afetam a banana foram descritas e identificadas como 1, 2 e 4. Porém, com base na variabilidade patogênica sobre as raças 1 e 4, raças adicionais podem existir (STOVER; BUDDENHAGEN, 1986; SU et al., 1986).

Cultivares suscetíveis têm sido usadas como indicadoras em avaliações. Porém, metodologias mais seguras, baseadas no estudo de grupos de compatibilidade vegetativa (GCV) ou no uso de DNA, têm sido empregadas na identificação de raças deste fungo (PLOETZ; CORRELL, 1988; PLOETZ, 1990; PLOETZ et al., 1993; BENTLEY et al., 1995; CORDEIRO, 1997).

GCV têm sido utilizados no agrupamento de isolados de *F. oxysporum* incluindo *F. oxysporum* f. sp. *ubense* (Foc), mediante à habilidade de mutantes auxotróficos não utilizadores de nitrato (nit) em complementar com um outro para a utilização do nitrato (CORRELL et al., 1987).

Estudos sobre variabilidade em Foc avaliaram diferentes variáveis, visando estabelecer relações entre populações geográficas e patogenicamente distintas desse fungo. Dentre doze países, 11 GCV e raças 1, 2 e 4 foram determinados a partir de 96 isolados testados. Dentre os quais, dois isolados oriundos do Brasil de raças desconhecidas, retirados das cultivares Pacovan e Prata, foram alocados no GCV 0120. Pelo menos 20 GCV já foram descritos para esta *formae specialis*. A maioria dos isolados pertence a dois maiores GCV com uma distribuição pantropical, cada um contendo mais de uma raça do patógeno. GCV menores foram encontrados, com uma distribuição geográfica mais limitada. Segundo alguns autores, para um organismo que se reproduz assexuadamente como Foc, os isolados dentro de um GCV são geneticamente similares e representam populações clonais (PLOETZ, 1990; APPEL; GORDON, 1994; TANTAOUI et al., 1996).

No Brasil, a murcha de *Fusarium* teve seu primeiro registro em 1930, na cidade de Piracicaba, Estado de São Paulo e hoje apresenta-se em todas as regiões produtoras. A raça 1 é prevaletente, mas distúrbios provocados pela doença em cultivares do grupo Cavendish, em São Paulo, têm causado questionamentos quanto à estrutura racial do patógeno. Isolados de Foc do Brasil foram colocados no GCV 0120 e GCV 0124, grupos heterogêneos com representantes das raças 1 e 4 e 1 e 2, respectivamente (PLOETZ et al., 1993). No Estado da Bahia (BA), seis isolados foram agrupados em três GCV, mas sem a identificação de suas raças. Desde que uma nova variante do patógeno foi identificada, afetando cultivares Cavendish nos trópicos, dois tipos da raça 4 de Foc, raça 4 subtropical (ST4) e raça 4 tropical (TR4) foram designadas (BUDDENHAGEN, 2009).

Estudos através de marcadores moleculares RAPD e sequenciamento das regiões ITS1 e ITS2 (*internal transcribed spacer*) e do gene DNAr 5.8S têm sido utilizados para estimar a variabilidade genética existente entre *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* (*F. o. ubense*, *F. o. lycopersici*, *F. o. phaseoli* e *F. o. vasinfectum*) e entre raças de *F. o. lycopersici*. Da mesma forma, análises de GCV e AFLP têm sido realizadas para medirem a diversidade genética dentro de populações de uma nova linhagem de *Fusarium* no complexo de espécies de *Gibberella fujikuroi* e *F. sterilihyphosum* no Brasil (KURAMAE; SOUZA, 2002; LIMA et al., 2009).

Dita et al. (2010) desenvolveram uma ferramenta para detectar especificamente isolados do GCV 01213, também chamado de raça 4 tropical (TR4) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*, com base na região IGS, através de PCR.

Segundo os autores, estratégias de controle de TR4 são baseadas no monitoramento visual de sintomas, erradicação de plantas infectadas e isolamento de áreas infestadas para reduzirem a disseminação do patógeno. Entretanto, estas estratégias são frequentemente impraticáveis. Dessa forma, alternativas para a caracterização das variabilidades genética e patogênica

deste fungo são necessárias para subsidiarem programas de melhoramento genético da cultura.

O presente estudo teve como objetivos determinar a diversidade genética entre isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*, através de grupos de compatibilidade vegetativa e raças fisiológicas do patógeno, através da patogenicidade em três cultivares diferenciadoras de banana, oriundos de diferentes regiões do Brasil.

2. Material e Métodos

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Origem dos isolados: Com exceção dos isolados da Bahia (BA-1) e de Pernambuco (PE-1), todos os demais foram retirados diretamente de seções de pseudocaulis de bananeiras oriundos de diversos centros de pesquisa e ensino, especificamente da EMBRAPA/CPAA-AM, FCAP/PA, CEPLAC/BA, UFRPE/PE ou provenientes de áreas de produtores, tais como, Maria da Fé/MG e Janaúba/MG. Dos dez isolados, seis foram selecionados com base em seu comportamento ou caracterização como mutantes nit.

Isolamento: Para o isolamento de Foc, pequenos pedaços de vasos lenhosos com sintomas da doença foram retirados do interior de pseudocaulis, tendo suas superfícies esterilizadas em álcool 70% por 30 seg.; NaOCl 0,5% por 1 min.; posteriormente foram lavados duas vezes com água destilada estéril. Os pedaços de tecidos infectados foram secos em papel de filtro e transferidos para placas de Petri de 9cm de diâmetro com meio BDA. Cada isolado foi purificado através da técnica de cultura monospórica em ágar-água a 3%. Após um período de 24h, esporos simples germinados ou do topo de hifas, foram transferidos para placas com BDA e incubados em BOD sob fotoperíodo de 12h a 25±2°C. Subculturas monospóricas foram mantidas posteriormente em meio BDA, em geladeira a 5°C.

Testes de compatibilidade vegetativa: Para a realização da análise de Grupos de Compatibilidade Vegetativa (GCV), mutantes nit de Foc, foram recuperados utilizando-se o procedimento preconizado por Leslie (1993). Blocos miceliais (2mm³) de 20 subculturas monospóricas para cada isolado foram transferidos para meio mínimo (MM) modificado (PUHALLA; SPIETH, 1983) adicionado com uma solução estoque de elementos traço (COOPER; WOOD, 1975) e incubados por 4 - 5 dias a 25 ± 2°C. Após o crescimento das colônias, um bloco micelial (2 mm³) foi colocado em meio acrescido com clorato modificado (MM + 50g/L de Clorato de Potássio e 1,6 g/L de L-Asparagina) e incubados por 2-3 semanas a 25 ± 2°C, em BOD. Setores resistentes ao clorato foram subcultivados em MM, que continha nitrato como única fonte de nitrogênio, por 1-2 semanas.

A maioria dos setores resistentes ao clorato cresceu sobre o meio MM de forma muito fina, quase imperceptível, indicando sua inabilidade em reduzir nitrato. Todos os isolados que apresentaram crescimento do tipo selvagem em BDA, e este tipo de crescimento em MM, foram considerados como mutantes nit. Após a geração dos mutantes nit em NaNO₃, seus fenótipos

fisiológicos foram determinados e interpretados com base na identificação de mutantes nit de *Fusarium oxysporum*, utilizando-se nitrato de sódio (0,4 g/L) e hipoxantina (0,5 g/L), segundo Correll *et al.* (1987). Procedeu-se posteriormente, a transferência de um bloco de 2mm³ de cada colônia de mutantes nit para cada um dos meios. Incubando-os por 1-2 semanas a 25 ± 2°C em BOD.

Para o teste de complementação para formação de grupos de compatibilidade vegetativa (GCV), procedeu-se ao pareamento dos diferentes mutantes nit (nit1, nit3 e nitM), inicialmente, entre linhagens dentro de um mesmo isolado. Após este pareamento, aquelas linhagens que se complementaram, demonstrando um crescimento robusto na união dos micélios (anastomose de hifas), foram utilizadas em novos pareamentos, desta vez entre linhagens de diferentes isolados, sob todas as combinações possíveis em meio mínimo (MM). Os mutantes nit foram pareados colocando-se dois blocos de micélios de 2mm³ dentro de uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro, separados com pelo menos 2 cm de distância entre eles. As culturas pareadas incubadas a 25 ± 2°C em BOD, foram observadas por cerca de quatro semanas, após as quais, aquelas linhagens que se complementaram, foram consideradas compatíveis vegetativamente e incluídas no mesmo GCV.

A partir de uma matriz de zero e um, construída por 31 variáveis (isolados), a estimativa de similaridade genética (S_{ij}) entre cada par de linhagens (ij) foi efetuada pelo coeficiente de Jaccard (OLIVIERI; JAIN, 1977; citado por ALFENAS *et al.*, 1991). Este coeficiente omite as concordâncias negativas (00), no caso de GCV, incompatibilidade vegetativa (-). Estas análises foram realizadas no programa NTSYS-PC segundo Rohlf (1992), citado por Machado (1999). A presença ou ausência de complementação entre isolados, foram tratadas como dados binários e sujeitas à análise fenética baseada no Método não-ponderado de agrupamento aos pares utilizando médias aritméticas (UPGMA) (SNEATH; SOKAL, 1973).

Teste de patogenicidade: Os testes de patogenicidade foram conduzidos no telado da EPAMIG, Lavras, MG. O material vegetativo foi proveniente do Centro Nacional de pesquisa de Mandioca e Fruticultura – CNPMF e Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnológicos - CENARGEN, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, em forma de mudas do tipo chifrinho e também de explantes *in vitro*.

A inoculação foi feita no laboratório de cultura de tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). E, posteriormente, os explantes foram multiplicados através da Empresa Multiplanta Tecnologia Vegetal Ltda., em Andradadas-MG.

Para a produção de inóculo do fungo, os isolados monospóricos, preservados em geladeira, foram repicados para BDA. Após o crescimento das colônias em BOD a 25 ± 2°C por cerca de sete dias, foram preparadas as suspensões de esporos. Obteve-se ao final, uma suspensão com uma concentração de 3,5x10⁵ esporos/mL, da qual foram vertidos 100 mL, derramando-os sobre o solo ao redor da planta, após o ferimento na base do rizoma com uma lâmina inoxidável. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em telado, sob irrigação, seguindo-se um regime de três regas diárias. Isto permitiu a manutenção da umidade ambiental

próxima de 100% durante a noite, voltando a cair, durante o dia, para níveis próximos aos 60%, ocorrendo assim, uma flutuação entre períodos de alta e média umidade, com a temperatura variando numa faixa de 20°C a 30°C.

Aos sessenta dias após a inoculação, as mudas foram retiradas dos sacos plásticos, observando-se o interior dos rizomas. A severidade da doença foi avaliada mediante a utilização de uma escala diagramática, com base no percentual de área atacada, com cinco graus de severidade, a seguir: 0 - Nenhuma descoloração vascular; 1 - Descoloração com manchas esparsas restritas à região do cilindro central, atingindo menos de 25% do rizoma; 2 - Descoloração vascular com manchas extensas atingindo o cilindro central de 26-50% do rizoma; 3 - Descoloração vascular com manchas atingindo de 51-75% do cilindro central; 4 - Necrose completa do rizoma; 76-100%. Antes da análise estatística, os valores obtidos nas avaliações, foram transformados em índice de doença pela fórmula de McKinney, citada por Rodrigues (1994).

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados (DBC), em esquema fatorial 6x3 (6 isolados x 3 cultivares), com 4 repetições e 10 plantas por parcela. Os tratamentos testados foram as três cultivares (Gros Michel, Bluggoe, Grand Naine) x os isolados monospóricos (AM-1.8, PA-1.1, BA-1.12, PE-1.14 e JAN-1.4 e a testemunha). A análise estatística foi feita utilizando-se o teste de Scott-Knott para as comparações múltiplas de médias. Em virtude dos dados não seguirem uma normalidade, optou-se por transformá-los através da equação: $Y = (s + 0,5)^{-0,4}$; citada por Cordeiro (1997), onde *s* é a severidade observada, embora estes tenham sido mantidos na forma original, quando citados nas tabelas.

3. Resultados e Discussão

Grupos de Compatibilidade Vegetativa

Recuperação de mutantes nit: Setores resistentes ao clorato foram recuperados de todos os seis isolados de Foc, a uma frequência média entre 0,50 e 1,40 setores por colônia, quando cultivados em meio com clorato (MMC) em uma concentração de 50g/L de clorato (KClO₃). Verificou-se que a maioria dos mutantes nit recuperados foi de mutantes nit 1 em relação aos demais mutantes, onde a maior frequência destes mutantes foi obtida pelo isolado do Amazonas (AM-1) e a menor pelo isolado do Pará (Tabela 1).

Tabela 1. Frequências e classes de mutantes nit recuperados em Meio Mínimo acrescido de Clorato (MMC).

Isolados	Nº de setores/colônias recuperados de 20 monospóricas ^a	Nits ^b (%)	Nº de nits examinados	Classes de nits ^c		
				nit1 (%n)	nit3 (%)	nitM (%)
MF-1	0,50	70	07	57,1	42,9	0
AM-1	1,40	85,7	24	62,5	37,5	0
PA-1	0,95	68,4	13	7,7	0	7,7
JAN-1	1,35	51,9	14	35,7	0	0
PE-1	1,15	43,5	10	40,0	0	10
BA-1	0,95	68,4	13	30,8	15,4	15

^aFrequência média de setores resistentes ao clorato por colônias. ^bPercentual de setores resistentes ao clorato que cresceram como finas e expansivas colônias sobre meio mínimo. ^cFenótipos de mutantes nit determinados de acordo com o crescimento sobre meio básico adicionado com diferentes fontes de nitrogênio. nit 1 = mutação em um locus estrutural da nitrato redutase; nit 3 = mutação em um locus regulador específico da via metabólica de assimilação do nitrato; nit M = mutação em um dos cinco loci que afetam o cofator contendo molibidênio necessário à atividade da nitrato redutase.

Leslie (1993), afirmou ter recuperado menos setores resistentes ao clorato em um meio composto com 30 a 45g/L de KClO₃ e mais setores resistentes em um meio composto com 15g/L de KClO₃. Enquanto que Puhalla (1985) observou que ao utilizar uma concentração de 15g/L de KClO₃ nos meios de KMM e KPS, houve a recuperação em média de 60% de mutantes sobre KPS.

O crescimento de isolados do tipo selvagem sob as condições em estudo, foi geralmente restrito, menos que 1 cm por semana, presumivelmente porque o clorato foi reduzido à clorito tóxico pela nitrato redutase ou porque o clorato cessou o metabolismo do nitrogênio, levando à ausência do mesmo (GARRETT, 1978).

Do total de 138 setores recuperados, 64,49% foram resistentes ao clorato, considerando-se inaptos em utilizar o nitrato (NaNO₃) como única fonte de nitrogênio, crescendo como finas colônias, com micélios não aéreos sobre MM. Enquanto que 35,50%, mostraram-se resistentes ao clorato e aptos a utilizarem o nitrato. Segundo Leslie (1993), estes mutantes são caracterizados como mutantes Crn e em sua maioria, cerca de 60%, são heterocários, com composição variada de mutantes nit e componentes nucleares do tipo selvagem, não sendo assim utilizados em estudos de complementação vegetativa.

Identificação dos fenótipos dos mutantes nit: Os fenótipos dos mutantes nit de FOC foram determinados pela morfologia de suas colônias sobre meios contendo nitrito de sódio (NaNO₂) e hipoxantina (Figura 1). Os mutantes nit obtidos, foram divididos em três classes fenotípicas (nit1, nit3 e nitM), concordando assim com a classificação proposta por Correll et al. (1987) para *Fusarium oxysporum*. Pois, segundo esses autores estas classes representam uma mutação no locus estrutural da nitrato redutase (nit 1), locus estrutural específico da via metabólica de assimilação do nitrato (nit 3) e o locus que afeta o cofator que contém o molibdênio necessário à atividade da nitrato redutase e da dehidrogenase purínica (nit M), na via metabólica de *Fusarium*.

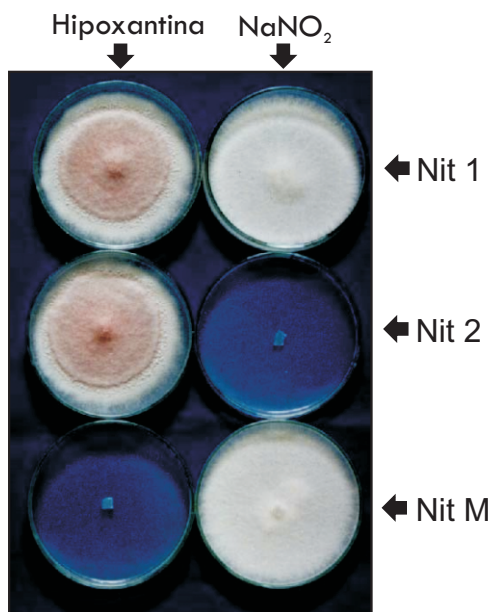


Figura 1. Identificação de mutantes nit de FOC pelo crescimento sobre diferentes fontes de nitrogênio. Nit1, crescimento micelial aéreo, tanto em hipoxantina, quanto em nitrito de sódio; nit3, crescimento micelial aéreo em hipoxantina e imperceptível em nitrito de sódio; e nitM, crescimento imperceptível em hipoxantina e crescimento micelial aéreo em nitrito de sódio.

Teste de complementação. Verificou-se que as linhagens oriundas dos isolados da Bahia (BA-1), Janaúba (JAN-1) e Maria da Fé (MF-1) e Pernambuco (PE-1) compatibilizaram entre si, formando assim um grupo mais amplo (GCV 1). Enquanto que, as linhagens dos isolados do Pará (PA-1), compatibilizaram com os isolados do Amazonas (AM-1), formando um grupo mais restrito, denotando uma distribuição geográfica mais limitada (GCV 2) (Figura 2).

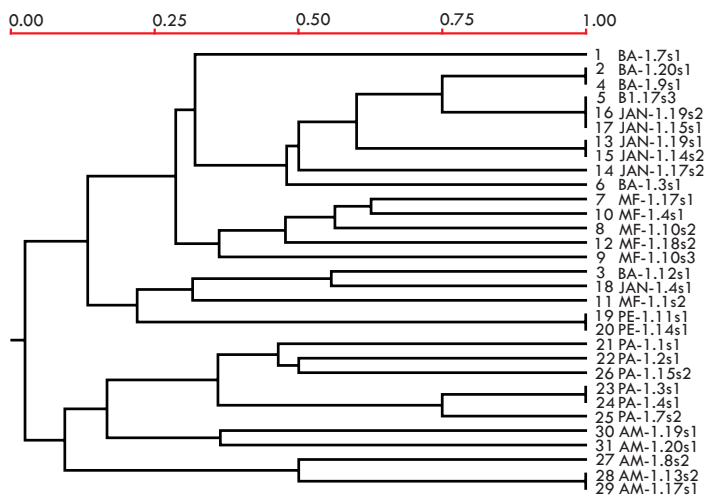


Figura 2. Dendrograma com as 31 linhagens de Foc agrupadas pelo método UPGMA com base na técnica de Grupos de Compatibilidade Vegetativa (GCV). BA=Bahia; JAN=Janaúba (MG); MF=Maria da Fé (MG); PE=Pernambuco; PA=Pará; AM=Amazonas.

Variabilidade patogênica de isolados de Foc através de cultivares diferenciadoras de raças do patógeno: De acordo com a Tabela 2, verificou-se que os isolados provenientes do Pará (PA-1), Janaúba (JAN-1) e Amazonas (AM-1), não diferiram estatisticamente entre si, mas diferiram da testemunha, denotando patogenicidade diferencial sobre as cultivares Gros Michel e Grande Naine, sendo estes agrupados dentro das raças 1 e 4. Por outro lado, o isolado da Bahia, não diferiu estatisticamente dos isolados do Pará (PA-1), Janaúba (JAN-1) e Amazonas (AM-1), mas diferiu da testemunha, causando patogenicidade diferencial somente em Gros Michel, definindo-o como pertencente à raça 1. O isolado de Pernambuco (PE-1) não causou patogenicidade diferencial sobre nenhuma cultivar. Não sendo possível definir a sua raça. O que pode ser explicado pela perda de patogenicidade, em função de diversas repicagens do isolado. Também nenhum isolado, causou patogenicidade diferencial sobre a cultivar Bluggoe. Não sendo nenhum deles agrupados dentro da raça 2 do patógeno, de acordo com a classificação de Persley e De Langhe (1986).

Tabela 2. Valores médios da severidade do Mal-do-Panamá observada através de sintomas no rizoma, aos 60 dias após a inoculação de isolados de FOC, sobre três variedades diferenciadoras.

Cultivares	Isolados					Test.
	BA-1.12	PA-1.1	JAN-1.4	PE-1.14	AM-1.8	
GNa	0,71 b C ¹	2,14a B	4,82 a B	1,42 b A	3,57 a B	0,00 b B
GMi	85,35 a A	68,55 a A	26,42 a A	4,64 b A	59,46 a A	1,78 c B
Blu	6,42 a B	5,89 a B	1,42 a C	9,64 a A	2,67 a B	2,32 a A

Dados transformados pela equação: $Y = (s + 0,5)^{-0,4}$, onde s é a severidade observada (Cordeiro, 1997). CV=37,73%. ¹As médias seguidas da mesma letra, minúscula na horizontal e/ou maiúscula na vertical, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. GNa = cultivar Grand Naine; GMi = cultivar Gros Michel; Blu = cultivar Bluggoe. BA-1.12 = isolado monospóric proveniente do Estado da Bahia; PA-1.1 = isolado monospóric proveniente do Estado do Pará; JAN-1.4 = isolado proveniente do Município de Janaúba, do Estado de Minas Gerais; PE-1.14 = isolado monospóric proveniente do Estado de Pernambuco; AM-1.8 = isolado proveniente do Estado do Amazonas; Test. = testemunha.

Estes resultados corroboraram com a afirmativa de Ploetz et al. (1993), de que a raça 1 é prevalecente no Brasil, mas que quebra de resistência em cultivares do grupo Cavendish, no Estado de São Paulo, possam ter permitido o ataque dessas cultivares pela raça 4 do patógeno. De acordo com Pegg et al. (1996), raças são grupos de linhagens, os quais têm demonstrado ser patogênicos a um particular hospedeiro no campo, sendo evidente segundo os autores, que variações patogênicas tenham existido dentro de cada uma das três raças e afetado a banana. Desse modo, outras raças de Foc poderão aparecer se cultivares hospedeiras forem incluídas no reconhecido grupo diferencial.

GCV x raças do patógeno: Neste estudo, foi possível estabelecer uma relação entre GCV e patogenicidade, através da inoculação dos isolados em cultivares diferenciadoras de raças do patógeno (Tabela 3).

Tabela 3. Isolados, raça, GCV, origens das cultivares hospedeiras, origem geográfica e cultivares diferenciadoras determinados em estudo.

Isolados Selvagens de FOC	Raça	GCV	cultivares hospedeiras originais	Origem Geográfica	Cultivares diferenciadoras
AM-1	1 e 4	GCV2	Maçã	Rio da Eva, AM	Gros Michel e Grande Naine
PA-1	1 e 4	GCV2	Maçã	Monte Alegre, PA	Gros Michel e Grande Naine
PE-1	1	GCV1	Pacovan	Orobó, PE	Gros Michel
BA-1	1	GCV1	-	Santa Luzia, BA	Gros Michel
JAN-1	1 e 4	GCV1	Prata	Janaúba, MG	Gros Michel e Grande Naine
MF-1	-	GCV1	Prata	Maria da Fé, MG	-

Verificou-se a existência de dois GCV em estudo, os quais agruparam isolados tanto da Raça 1 quanto da Raça 4, de forma conjunta ou isolada. Três isolados foram agrupados em dois GCV, com a identificação de suas raças: Dois isolados provenientes da cultivar Maçã, oriundos dos estados do Amazonas (AM-1) e do Pará (PA-1), foram agrupados tanto na Raça 1, quanto na raça 4 e no GCV 2; quatro (4) isolados, oriundos da Bahia (BA-1), de cultivar desconhecida; de Pernambuco (PE-1), oriundo da cultivar Pacovan, mas sem raça determinada; de Janaúba (JAN-1) e Maria da Fé (MF-1), do Estado de Minas Gerais, oriundos da cultivar Prata, foram agrupados dentro da raça 1 e no GCV 1. Os isolados da Bahia, foram identificados como raça 1. Verificou-se ainda um isolamento genético e uma distribuição geográfica limitada, demonstrados pelos isolados dos Estados da região Norte, Pará (PA) e Amazonas (AM), componentes do GCV 2.

Estes resultados concordaram com os obtidos por outros estudos (JACOBSON; GORDON, 1991; PLOETZ et al., 1993; APPEL; GORDON, 1994; TANTAOUI et al., 1996), os quais afirmaram que a maioria dos isolados estudados pertencia a dois maiores GCV, apresentando uma distribuição pantropical, e que em cada um continha mais de uma raça do patógeno. Além disso, os menores GCV encontrados apresentaram uma distribuição geográfica

mais limitada. Segundo os autores, para um organismo que se reproduz assexuadamente como *F. oxysporum* f. sp. *cabense*, geralmente os isolados dentro de um mesmo GCV, são geneticamente similares e representam populações clonais.

De acordo com Andrade et al. (2013) a única alternativa eficiente para o controle da doença tem sido a utilização de variedades resistentes, o que nem sempre é possível. Diante disto, o surgimento de novas raças é preocupante e constante. Segundo os autores, dentro da classificação por raças fisiológicas, a raça 4 foi dividida em subtropical e tropical para diferenciar populações que afetam a variedade 'Cavendish' nestas condições.

Análises de grupos de compatibilidade vegetativa (GCV) (CORRELL et al., 1987; PLOETZ; CORRELL, 1988; MOORE et al., 1993) e estudos filogenéticos baseados em dados moleculares (KOENIG et al., 1997; O'DONNELL et al., 1998; GROENEWALD et al., 2006; FOURIER et al., 2009) têm revelado uma maior variação genética em Foc. De fato, pelo menos 21 diferentes GCV de Foc têm sido caracterizados, com a maioria dos grupos presentes na Ásia (PLOETZ; PEGG, 1997; FOURIER et al., 2009). Isolados TR4 têm sido incluídos dentro do GCV 01213 (ou GCV 01216, o qual é uma designação diferente para o mesmo GCV) e isolados ST4 dentro dos GCV 0120, 0121, 0122, 0129 e 01211 (BUDDENHAGEN, 2009). Apesar de que GCV tenham sido usados para diagnose de TR4, requerem tempo para a geração, para a caracterização de mutantes *nit* e viabilização de coleções de testes padrões.

Neste sentido, Dita et al. (2010), têm recomendado a utilização de um diagnóstico rápido, realizável e específico para Foc TR4/GCV 01213 por PCR, realizado através da detecção de TR4 em tecidos de banana cv. Grand Naine. De acordo com os autores, este método apresenta maior eficiência em comparação com o tradicional plaqueamento em ágar e purificação do patógeno de amostras infectadas, análises de GCV e testes de patogenicidade. Ao contrário dos demais métodos que levam semanas ou meses para a obtenção de resultados, o método molecular pela detecção em tecidos de planta leva cerca de 6 h. Assim, os autores também recomendam que tal metodologia seja utilizada para dar suporte a medidas quarentenárias nacionais e internacionais de forma a impedir a disseminação de TR4. Esta metodologia segundo Andrade et al. (2013) tem sido implementada pelo laboratório de fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, o qual encontra-se apto a oferecer tal diagnóstico. Apresentando-se assim, como mais uma opção para o monitoramento da mesma no Brasil.

4. Conclusões

O uso da técnica de compatibilidade vegetativa permitiu verificar correlações entre GCV e distribuição geográfica, sendo esta demonstrada através do agrupamento dos isolados em dois grupos de compatibilidade vegetativa geneticamente diferentes, as Regiões Nordeste e Sudeste, no GCV 1 e a Região Norte, no GCV 2.

Foi possível determinar a presença da raça 1 e a raça 4 agrupando-as através da patogenicidade nas cultivares diferenciadoras Gros Michel, para a Raça 1 e Grande Naine, para a Raça 4.

Foi possível agrupar a Raça 1 e a raça 4 dentro de um mesmo GCV e em mais de um GCV.

A inoculação através de ferimentos na base de rizomas, em telado, possibilitou a avaliação da patogenicidade dos isolados nas plantas, de forma mais rápida, ao comparar-se à avaliação de campo.

5. Referências Bibliográficas

- ANDRADE, J. N. B.; COSTA, S. N.; OLIVEIRA, S. A. S.; AMORIM, E. P.; HADDAD, F. Implementação de diagnóstico por PCR para *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (raça 4). 7^o Jornada Científica – Embrapa Mandioca e Fruticultura. Cruz das Almas, BA. 2013.
- ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa, SIF, 242p. 1991.
- APPEL, D. J.; GORDON, T. R. Local and regional variation in populations of *Fusarium oxysporum* from agricultural field soils. **Phytopathology**, v. 84, n. 7, p. 786-791, 1994.
- BENTLEY, S.; PEGG, K. G.; DALE, J. L. Genetic variation among worldwide collection of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* analyzed by RAPD-PCR fingerprinting. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, p. 1378-1384, 1995.
- BUDDENHAGEN, I. W. Understanding strain diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* and history of introduction of tropical race 4 to better manage banana production. In: JONES, D.; VAN DEN BERGH, I. eds. Proceeding of the International Symposium on recent Advances in banana Crop Protection for Sustainable Production and Improved Livelihoods, White River, South Africa. ISHS. **Acta Horticulture**, v. 828, p. 193-204, 2009.
- COOPER, R. M.; WOOD, R. K. S. Regulation of synthesis of cell-wall degrading enzymes by *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Physiological plant Pathology**, v. 5, p. 135-156, 1975.
- CORDEIRO, E. J. M. Variabilidade patogênica de isolados de *Mycosphaerella musicola* e resistência induzida e genética em genótipos de bananeira. Piracicaba. 118 p. 1997. (Tese de Doutorado).
- CORRELL, J. C.; KLITICH, C. J. R.; LESLIE, J. F. Nitrate non utilizing mutante of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. **Phytopathology**, 77:1640-1646. 1987.
- DITA, M. A.; WAALWIJK, C.; BUDDENHAGEN, I. W.; SOUZA JR, M. T. A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana *Fusarium* wilt pathogen. **Plant Pathology**, v. 59, n. 2, p. 348-357, 2010.
- FOURIER, G.; STEENKAMP, E. T.; GORDON, T. R.; VILJOEN, A. Evolutionary relationships among the vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 4770-81, 2009.
- GARRETT, R. H.; AMY, N. K. Nitrate assimilation in fungi. **Adv. Microb. Physiol.** 18:1-65. 1988.
- GROENEWALD, S.; VAN DEN BERG, N.; MARASAS, W. F. O.; VILJOEN, A. The application of high-throughput AFLP's in assessing genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. **Mycological Research**, v. 110, p. 297-305, 2006.
- JACOBSON, D. J.; GORDON, T. R. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*: A case study of diversity within a *formae specialis*. **Phytopathology**, v. 81, n. 9, p. 1064-1067, 1991.
- KOENIG, R. L.; PLOETZ, R. C. KISTLER, H. C. *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* consist a small number divergent and globally distributed clonal lineages. **Ecology and population Biology. Phytopathology**, v. 87, n. 9, p. 915-923, 1997.
- KURAMAE, E. E.; SOUZA, N. L. de; Variabilidade genética entre *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA. **Acta Scientiarum**. Maringá, v. 24, n. 5, p. 1481-1485, 2002.
- LESLIE, J. F. Vegetative compatibility in fungi. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 31, p. 127-151, 1993.
- LIMA, C. S.; MONTEIRO, J. H. A.; CRESPO, N. C.; COSTA, S. S.; LESLIE, J. F.; PFENNING, L. H. VCG and AFLP analyses identify the same groups in the causal agents of mango malformation in Brasil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 123, p. 17-26, 2009.
- MACHADO, C. de F. Procedimentos para a escolha de genitores de feijão. UFLA Lavras, MG. p. 94. 1999. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- MOORE, N. Y.; PEGG, K. G.; ALLEN, R. N.; IRWIN, J. A. G. vegetative compatibility And distribution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* in Australian. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 33, p. 797-802, 1993.
- O' DONNELL, K.; KISTLER, H. C.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R. C. Multiple Evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the national Academy of Sciences**, v. 95, p. 2044-9, 1998.
- PEGG, K. G.; MOORE, N. Y.; BENTLEY, S. *Fusarium* wilt of banana in Australia: a review. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 47, n. 5, p. 637-50, 1996.
- PERSLEY, G. J.; DE LANGHE, E. A. Banana and plantains breeding strategies. In. INTERNATIONAL WORKSHOP HELD AT CAIRS, 21, 1986. Camberra. Proceeding... Camberra: ACITAR, P. 13-17.
- PLOETZ, R. C. Variability in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. **American Journal of Botany**, v. 68, p. 1357-1363, 1990.
- PLOETZ, R. C.; CORRELL, J. C. Vegetative compatibility among races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. **Plant Disease**, v. 72, p. 325-328, 1988.
- PLOETZ, R. C.; HERBERT, J.; SEBASIGARI, K.; HERNANDEZ, J. H.; PEGG, K. G.; VENTURA, J. A.; MAYATO, L. S. Importance of *Fusarium* wilt in different banana- growing regions. In: PLOETZ, R. C. *Fusarium* wilt of Banana. APS PRESS. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. Second printing, 1993.
- PLOETZ, R. C.; PEGG, K. *Fusarium* wilt of banana and Wallace's line: was the disease originally restricted to his Indo-Malayan region? **Australasian Plant pathology**, v. 26, p. 239-49, 1997.
- PUHALLA, J. E. Classification of isolates of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. **Canadian Journal of Botany**, v. 63, p. 179-183, 1985.
- PUHALLA, J. E.; SPIETH, P. T. Heterokariosis in *Fusarium moniliforme*. **Experimental Mycology**, v. 7, p. 328-335, 1983.
- RODRIGUES, E. J. R. Micropropagação da bananeira e avaliação de métodos de inoculação de *Fusarium oxysporum* schlecht. f. sp. *ubense* (E.F.Smith) Syd ; Hans. Viçosa, MG, UFV, 54p. 1994 (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: The Principles and Practice of numerical classification**. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573p.
- STOVER, R. H.; BUDDENHAGEN, L. W. Banana breeding, polyploidy, disease resistance and productivity. **Fruits**, v. 41, n. 3, p. 175-191, 1986.
- SU, H. J.; HWANG, S. C.; KO, W. H. *Fusarium* wilt of Cavendish bananas in Taiwan. **Plant Disease**, v. 70, p. 814-818, 1986.
- TANTAOU, A.; OUINTEN, M.; GREIGER, J. P.; FERNANDEZ, D. Characterization of a single clonal lineage of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedines* causing Bayoud disease of date palm in Marocco. **Phytopathology**, v. 86, n. 7, p. 787-792, 1996.
- WINDELS, C. E. Current status of *Fusarium* taxonomy. **Phytopathology**, v. 81, n. 9, p. 1048-1051, 1991.