

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR,  
PATOGENICIDADE E TRANSMISSÃO PELA  
SEMENTE DE *Fusarium oxysporum* f. sp.  
*vasinfectum* EM ALGODOEIRO**

**DEJÂNIA VIEIRA DE ARAÚJO**

**2008**

**DEJÂNIA VIEIRA DE ARAÚJO**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, PATOGENICIDADE E  
TRANSMISSÃO PELA SEMENTE DE  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* EM ALGODOEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Prof. Dr. José da Cruz Machado

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Araújo, Dejânia Vieira de.

Caracterização molecular, patogenicidade e transmissão pela semente de  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em algodoeiro / Dejânia Vieira de  
Araújo. -- Lavras : UFLA, 2008.

102 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: José da Cruz Machado.

Bibliografia.

1. *Gossypium hirsutum*. 2. *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. 3.  
Fusariose do algodoeiro. 4. Caracterização molecular. 5. Fator de alongação-1 $\alpha$ .  
6.  $\beta$ -tubulina. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD - 633.51943

**DEJÂNIA VIEIRA DE ARAÚJO**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, PATOGENICIDADE E  
TRANSMISSÃO PELA SEMENTE DE  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* EM ALGODOEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 22 de fevereiro de 2008

Prof. Dr. Dauri José Tessmann	UEM
Profª. Dra. Maria Heloisa Duarte de Moraes	ESALQ
Prof. Dr. Ludwig Heinrich Pfenning	UFLA
Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende	UFLA

Prof. Dr. José da Cruz Machado  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus,

Por estar presente em todos os momentos da  
minha caminhada,

**OFEREÇO.**

A toda minha família, especialmente aos meus  
irmãos e meus pais, Cícero e Antonia, por toda  
força, apoio e confiança,

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia, pelo acolhimento e imensurável confiança.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor José da Cruz Machado, pelo incentivo, apoio e orientação.

Ao Professor Ludwig H. Pfenning, pelas valiosas sugestões, orientação e amizade.

À professora Antônia R. Figueira, pela orientação, dedicação e auxílio.

Aos professores, funcionários, colegas, mestrandos e doutorandos do Departamento de Fitopatologia, pelo companheirismo, amizade e momentos de grande descontração.

Aos pesquisadores Edivaldo Cia e Margarida F. Ito, do Instituto Agrônomo de Campinas, pela grandiosa colaboração, concedendo isolados e sementes.

Ao pesquisador Wirton Coutinho, do Centro Nacional de Pesquisa em Algodão – CNPA e Alice Costa, da Universidade Estadual do Maranhão, pela gentileza em fornecer os isolados.

À professora Andréia Quixabeira Machado, da Universidade de Várzea Grande, MT, pela gentileza em fornecer material vegetal coletado no Mato Grosso, de onde foram obtidos vários isolados.

Ao meu grande amigo Jadir B. Pinheiro, pelo companheirismo e cumplicidade nas horas de alegria e de tristeza.

À minha amiga Janine M. de Oliveira, pelos momentos de descontração nos últimos meses que passei em Lavras.

A todos que, em algum momento, contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

## SUMÁRIO

	Página
Resumo.....	i
Abstract.....	ii
<b>CAPÍTULO 1 – Caracterização molecular, patogenicidade e transmissão pela semente de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> em algodoeiro.....</b>	<b>1</b>
1 Introdução geral.....	2
2 Referencial teórico.....	4
2.1 Biologia e caracterização morfológica de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> .....	5
2.2. Sintomatologia da fusariose do algodoeiro.....	6
2.3 Disseminação e transmissão de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> .....	7
2.4 Técnicas moleculares empregadas em estudos de variabilidade de fungos..	8
3 Referências bibliográficas.....	12
<b>CAPÍTULO 2 - Patogenicidade de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> em plântulas de algodoeiro.....</b>	<b>18</b>
1 Resumo.....	19
2 Abstract.....	20
3 Introdução.....	21
4 Material e métodos.....	22
4.1 Obtenção e manutenção dos isolados.....	22
4.2 Teste de patogenicidade de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> .....	24
4.3 Peso seco de parte aérea e de raiz.....	26
4.4 Análise dos dados.....	26

5 Resultados e discussão.....	27
6 Conclusões.....	32
7 Referências bibliográficas.....	33
<b>CAPÍTULO 3 - Caracterização molecular de isolados de <i>Fusarium</i></b>	
<b><i>oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i></b> .....	35
1 Resumo.....	36
2 Abstract.....	37
3 Introdução.....	38
4 Material e métodos.....	40
4.1 Obtenção e manutenção dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> .....	40
4.2 Extração de DNA.....	40
4.3 Amplificação e purificação de DNA.....	42
4.4 Seqüenciamentos de DNA e caracterização molecular.....	43
5 Resultados e discussão.....	48
6 Conclusões.....	61
7 Referências bibliográficas.....	62
<b>CAPÍTULO 4 - Transmissibilidade e efeitos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> em sementes de algodoeiro</b> .....	
1 Resumo.....	66
2 Abstract.....	67
3 Introdução.....	68
4 Material e Métodos.....	70
4.1 Perfil fisiológico e sanitário das cultivares de algodoeiro.....	70
4.2 seleção dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> .....	71
4.3 Inoculação das sementes.....	71

4.4 Checagem preliminar da qualidade sanitária e da germinação das sementes inoculadas com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> .....	72
4.4.1 Teste de sanidade.....	72
4.4.2 Teste de germinação.....	73
4.5 Avaliação da transmissibilidade de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> em plantas de algodoeiro a partir de sementes inoculadas.....	73
4.5.1 Severidade da doença (ID) avaliada em plantas de algodoeiro.....	73
4.5.2 Taxa de infecção (TI) e de transmissão (TT) de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> a partir de sementes inoculadas.....	74
4.6 Efeito de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> na qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro.....	75
4.6.1 Índice de velocidade de emergência (IVE).....	75
4.6.2 Estandes inicial e final, altura de plântulas e peso seco da parte aérea.....	76
4.7 Análise dos dados.....	77
5 Resultados e discussão.....	78
5.1 Perfil inicial das sementes.....	78
5.2 Qualidade sanitária e germinação das sementes inoculadas com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> .....	78
5.3 Transmissibilidade de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> a partir de sementes inoculadas.....	82
5.4 Efeito de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> na qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro.....	88
6 Conclusões.....	96
7 Referências bibliográficas.....	97
Considerações finais.....	100

## RESUMO

ARAÚJO, Dejânia Vieira. **Caracterização molecular, patogenicidade e transmissão pela semente de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em algodoeiro.** 2008. 102p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.\*

Realizou-se este estudo com o objetivo de avaliar a virulência e a variabilidade genética de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (*Fov*), utilizando seqüências dos genes fator de alongação da transcrição-1 $\alpha$  (*tef1*) e  $\beta$ -tubulina (*tub2*), e a transmissão do patógeno a partir de sementes. Para a primeira parte do trabalho, foram utilizados 49 isolados de diversas regiões do país, os quais foram testados quanto à patogenicidade e à virulência. Os isolados foram inoculados em plântulas de algodoeiro da cv. Delta Opal. Após 30 dias, avaliaram-se a severidade da doença e o peso seco da parte aérea e da raiz. Para a caracterização molecular, utilizou-se a análise de seqüências de DNA dos genes *tef1* e *tub2* dos mesmos isolados. Dentre estes, foram selecionados 14 isolados representativos da população e as seqüências desses foram comparadas com seqüências de formas especiais de *F. oxysporum* e de representantes das raças de *Fov*, do GenBank. A transmissibilidade do patógeno, da semente para a planta, foi avaliada utilizando-se sementes das cultivares IAC 20-233 (resistente) e FM 966 (suscetível) inoculadas com os isolados *Fov* 102 e BA 06, em diferentes tempos de exposição, 0, 48, 72 e 108 horas. Aos 45 d.a.s., avaliaram-se a taxa de infecção e de transmissão, a germinação, a sanidade, o vigor, a altura de plântulas e o peso seco da parte aérea. Todos os isolados foram patogênicos a cv. Delta Opal, apresentando diferenças quanto à virulência. Os isolados *Fov* 102 e MT 22 apresentaram maior e menor severidade da doença, respectivamente, tanto na parte aérea quanto no sistema vascular. O aumento na severidade resultou no menor peso da parte aérea e da raiz. Na caracterização molecular, foi possível verificar a alta variabilidade genética da população de *Fov* do Brasil. O agrupamento, em dois clados, de apenas isolados do Brasil, evidenciou a possível ocorrência de populações distintas do patógeno que podem estar relacionadas ao hospedeiro ou a existência de novas raças de *Fov*. A transmissão do patógeno, bem como o efeito do mesmo no desempenho de sementes, foi maior com o aumento do potencial de inóculo, não havendo diferença entre os isolados. Por outro lado, houve diferença na reação das cultivares, em todas as variáveis analisadas. Essa diferença deve estar relacionada ao potencial genético da cv. IAC 20-233, quando comparada com a cv. FM 966.

---

\*Comitê orientador: José da Cruz Machado – UFLA (Orientador); Ludwig H. Pfenning – UFLA; Antonia dos Reis Figueira – UFLA

## ABSTRACT

ARAÚJO, Dejânia Vieira. **Molecular characterization, pathogenicity and transmission by seeds of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in cotton.** 2008. 102p. Thesis (Doctorate in Phytopatology). Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.\*

The objective in this work was to evaluate the virulence and genetic variability of *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (*Fov*) isolates using sequences of the Translation Elongation Factor 1-  $\alpha$  (*tef1*) and  $\beta$ -Tubulin (*tub2*) genes, as well as, to evaluate the transmission of the pathogen from seeds. Forty-nine isolates of several locates in Brazil were used and tested for pathogenicity and virulence. Ten-day-old cotton seedlings, cv. Delta Opal, were inoculated with all isolates and measuring the disease severity and shoot and root dry weights, 30 days after sowing. The same isolates were characterized by partial sequences of *tef1* and *tub2* genes and 14 representative isolates from population were selected and compared with other *F. oxysporum* formae speciales and with sequences of *Fov* races from GenBank data base. Pathogen transmissibility, from seed to plant, was evaluated using seeds of the cv. IAC 20-233 (resistant) and FM 966 (susceptible). Seeds were inoculated with the *Fov* 102 and BA 06 isolates, using physiological conditioning technique. Seeds were exposed to the pathogen for 0, 48, 72 and 108 h. Transmission and infection rates, germination, seed health, vigour, seedling height and the shoot dry weight, were measured 45 d.a.s. All strains were considered pathogenic to cv. Delta Opal showing differences on virulence. *Fov* 102 and MT 22 isolates presented higher and lower disease severity in both, shoot and vascular system. The increase in severity resulted in lower shoot and root weights. Considering the molecular characterization, it was possible to verify high genetic variation into pathogen population from Brazil. The grouping in two clades of only Brazilian isolates is an indication of occurrence of different pathogen populations that may be related to host or to new *Fov* races. Pathogen transmission and its effect on seed performance were higher when inoculum potential was increased without any difference between isolates. On the other hand, there was difference between cultivars in all variables analyzed. This difference may be related to genetic potential verified at the cv. IAC 20-233 in comparison with cv. FM 966.

---

\*Advising Committee: José da Cruz Machado – UFLA (Adviser); Ludwig H. Pfenning – UFLA; Antonia dos Reis Figueira – UFLA

## **CAPÍTULO 1**

# **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, PATOGENICIDADE E TRANSMISSÃO PELA SEMENTE DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* EM ALGODOEIRO**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O alto grau tecnológico das lavouras algodoeiras, principalmente na região Centro-Oeste, proporcionou ao Brasil uma das maiores produtividades mundiais desta cultura, nos últimos anos (Agrianual, 2007). Juntamente com a alta tecnologia de produção e com o melhoramento genético, visando à obtenção de variedades adaptadas às diversas condições climáticas do país, inúmeros patógenos, na sua grande maioria, veiculados por sementes, ganharam importância nos campos de produção.

A qualidade sanitária de sementes utilizadas nos campos de produção é uma das questões fitossanitárias que vêm sendo debatidas no Brasil há vários anos. A normatização, que limita o uso de sementes fora dos padrões de qualidade sanitária, foi uma proposta colocada em discussão e aprovada, por Portaria própria, em 1999 (Portaria nº 71, de 22 de fevereiro de 1999). Neste documento se encontram as determinações pertinentes ao uso de padrões de tolerância para alguns patógenos transmitidos por sementes, que representam risco para a produção nacional.

No algodoeiro, as doenças de etiologia fúngica são as maiores responsáveis por perdas na produção. Dentre as doenças fúngicas, a fusariose do algodoeiro, cujo agente etiológico é *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *vasinfectum* (Atk.) W.C. Snyder & H.N. Hans, surgiu como um alerta nos campos de produção, principalmente nas áreas onde ainda não havia relatos da doença (Machado et al., 2003). Por se tratar de um patógeno colonizador dos tecidos vasculares, a forma de disseminação a longa distância deixa forte evidência de ser a semente sua principal via.

A identificação de *F. oxysporum* em análise de rotina, baseada na morfologia do patógeno, apresenta dificuldade devido à semelhança deste com outras espécies não patogênicas de *Fusarium* de outras seções que, da mesma

forma, encontram-se associadas às sementes. O desenvolvimento de métodos mais específicos ou semi-seletivos, para a detecção de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro, é um objetivo que se persegue, tendo em vista o enquadramento deste patógeno como organismo não quarentenário regulamentável, pelo Programa Nacional de Controle de Qualidade Sanitária de Sementes, cujo propósito é recomendar a análise de rotina para esse organismo.

O uso de métodos baseados em técnicas moleculares, para estudar patógenos associados às sementes, tem como uma das justificativas o aprimoramento do teste de sanidade, sendo este objeto de estudos do grupo de pesquisadores de sementes da Universidade Federal de Lavras, nos últimos anos (Carvalho, 2005; Freitas, 2006). Entretanto, para se obter resultados satisfatórios quanto ao uso de métodos moleculares na detecção de patógenos, é de grande importância caracterizar a variabilidade da população desses organismos.

Estudos empregando técnicas moleculares têm se apresentado como uma alternativa para a caracterização de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, com a finalidade de se obter mais informações sobre a filogenia desse complexo (Skovgaard et al., 2001; Kim, et al., 2005). Dessa forma, objetivou-se, com este trabalho, a) avaliar a virulência e a transmissibilidade de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* provenientes de diversas regiões do país e b) estudar a variabilidade genética desses isolados, utilizando seqüências dos genes fator de alongação da transcrição-1 $\alpha$  (*tef1*) e  $\beta$ -tubulina (*tub2*), com o propósito de caracterizar a população e, assim, obter informações genéticas mais consistentes que possam ser usadas no desenvolvimento de um marcador molecular para detectar o patógeno em sementes de algodoeiro.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

A produtividade e a qualidade da produção do algodoeiro podem ser afetadas por diversos fatores, dependendo das circunstâncias nas quais os cultivos são realizados. No contexto de mercado internacional, o agronegócio brasileiro do algodão tem apresentado, nos últimos anos, sinais de instabilidade em função de aspectos sanitários, dos quais as doenças constituem um grupo de alta preocupação. Neste contingente, os patógenos de etiologia fúngica, associados à cultura, são destaques pela sua maior frequência e intensidade de danos. Dentre os patógenos fúngicos de maior importância, encontra-se *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, o agente etiológico da fusariose do algodoeiro. Esta doença encontra-se disseminada em todas as regiões produtoras do mundo e causa perdas consideráveis na produção do algodão (Assigbetse et al., 1994).

A murcha de fusarium do algodoeiro foi primeiramente identificada, em 1892, em plantas de algodão cultivadas em solos arenosos e ácidos do Alabama, Estados Unidos (Atkinson, 1892 citado por Davis et al., 2006). A partir do início do século XX, a doença foi relatada em várias regiões do mundo, como Egito, Índia, Tanzânia, Sudão, Israel, Brasil, China e Austrália (Davis et al., 2006). No Brasil, a fusariose do algodoeiro foi detectada, pela primeira vez, no estado da Paraíba, em 1935 (Veigas, 1935). A partir de então, se disseminou por vários outros estados do país, sendo considerada a mais importante para a cultura algodoeira, no estado de São Paulo, na década de 1970 (Cia, 1977). Atualmente, já é encontrada em praticamente todas as regiões produtoras do país, tendo registro de ocorrência em locais até então considerados livres da doença (Machado et al., 2003).

Este fato pode ser considerado com um alerta aos produtores, uma vez que, estabelecido na área, dificilmente se consegue eliminar o patógeno do solo. Há relatos da presença de estruturas de resistências de *F. oxysporum* f. sp.

*vasinfectum* em solos por até 12 anos na ausência da cultura (Smith & Snyder, 1975), reforçando ainda mais a necessidade de se evitar a entrada do patógeno em áreas de cultivo.

## **2.1 Biologia e caracterização morfológica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum***

*Fusarium oxysporum* é considerado uma espécie heteromórfica, por não apresentar uma única origem filogenética. As múltiplas origens podem ter surgido a partir da associação de um fenótipo virulento com mais de um grupo de compatibilidade vegetativa e do polimorfismo do DNA existente dentro do complexo *F. oxysporum* (Katan & Katan, 1988; Kim et al., 1993; Skovgaard et al., 2001; Jiménez-Gasco et al., 2003; Lori et al., 2004; Abo et al., 2005).

Na literatura, há relatos da existência de mais de 150 formaes especiales catalogadas para o complexo *F. oxysporum*, com um ou mais grupos de compatibilidade vegetativa (VCGs) (Baayen et al., 2000). A forma specialis *vasinfectum* é patogênica a todas as espécies cultivadas do algodoeiro. Além das espécies do gênero *Gossypium*, o patógeno possui ampla gama de hospedeiros abrangendo espécies pertencentes às famílias Leguminosae, Malvaceae e Solanaceae (Armstrong & Armstrong, 1978; Assigbetse et al., 1994).

Além de permanecer por vários anos no solo na ausência da cultura, existem isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, não patogênicos, capazes de colonizar raízes e vasos condutores, de forma assintomática e por meio de crescimento saprofítico em matéria orgânica (Smith et al., 1981; Gordon & Martyn, 1997). De maneira geral, o patógeno é caracterizado, por apresentar microconídios, macroconídios e clamidósporos. Os microconídios são unicelulares produzidos, abundantemente, em fiálides curtas, formando falsas

cabeças. Os macroconídios são falcados quase retos, apresentando de 3 a 5 septos (Nelson et al., 1983, Mathur & Kongsdal, 2003).

A detecção do patógeno torna-se ainda mais dificultada devido à ocorrência de outras espécies do gênero *Fusarium*, associadas às sementes de algodoeiro. Dentre essas espécies destaca-se *F. solani* (Mart.) Sacc., cuja característica morfológica é de difícil distinção quando comparada com *F. oxysporum*.

A maioria das doenças relacionadas com a espécie *F. oxysporum* é controlada com o uso de variedades resistentes. No entanto, esta forma de controle é, freqüentemente, comprometida pelo aparecimento de novas raças que estão relacionadas com a virulência do patógeno a um determinado genótipo do hospedeiro (Gordon & Okamoto, 1992). Com base em testes de patogenicidade, já foram identificadas oito raças de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* com diferentes origem geográficas (Assigbetse et al., 1994; Davis et al, 2006), sendo a raça 6 originária do Brasil (Armstrong & Armstrong, 1978). A diferenciação entre as raças é feita mediante a patogenicidade verificada nas espécies domesticadas de algodoeiro (*Gossypium arboreum* L., *G. barbadense* L., *G. herbaceum* L. e *G. hirsutum* L.). Além destas espécies, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* é patogênico a alfafa (*Medicago sativa* L.), soja (*Glycine max* L.), fumo (*Nicotiana tabacum* L.), lupino (*Lupinus luteus* L.) e quiabeiro (*Hibiscus esculentus* L.), sendo estes hospedeiros utilizados como diferenciadores de raças do patógeno (Armstrong & Armstrong, 1978; Davis et al., 2006).

## **2.2 Sintomatologia da fusariose do algodoeiro**

A infecção por *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* inicia-se com a penetração pelas pontas das raízes, radículas ou pêlos absorventes do hospedeiro. A oclusão do tecido vascular e, conseqüentemente, a ocorrência da murcha, está

relacionada ao efeito causado por metabólitos do fungo e à produção de compostos de defesa, abrangendo um conjunto de respostas, constitutivas e induzidas pela planta. Entre estes compostos estão as fitoalexinas, os fenólicos e a deposição de barreiras físicas (Shi et al., 1992; Dowd et al., 2004).

Os sintomas da doença podem aparecer em qualquer estágio de desenvolvimento, podendo ocorrer desde a emergência até a fase adulta da planta. Em plântulas, os primeiros sintomas são: epinastia, descoloração dos cotilédones e de folhas jovens e paralisação do crescimento, culminando com a murcha e queda de folhas. As plântulas, quando afetadas, morrem facilmente. Em alguns casos, os sintomas podem ser confundidos com tombamento (*damping off*), causado por outros patógenos. Geralmente, em infecções precoces, o patógeno está presente somente no córtex da raiz, não evidenciando os sintomas. Em plantas adultas, inicialmente, ocorre perda de turgescência e, em seguida, as folhas apresentam lesões irregulares de coloração amarelada evoluindo para necrose. A principal característica da doença é a ocorrência de coloração marrom-avermelhada ao longo do xilema (Cia, 1977; Davis et al., 2006). A murcha generalizada ocorre devido ao desbalanço hídrico, causado pelo ácido fusárico produzido em plantas infectadas, resultando em mudanças nas propriedades semipermeáveis da membrana. Os sintomas de senescência e escurecimento dos vasos podem estar relacionados com a produção de etileno e a oxidação de fenóis (Smith et al., 1981).

### **2.3 Disseminação e transmissão de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum***

O patógeno é disseminado dentro e entre lavouras pelo movimento de solo infestado, restos culturais, água de irrigação, equipamentos agrícolas e sementes contaminadas, evidenciando ainda mais a importância do controle, com base em medidas de exclusão para evitar a entrada do patógeno em áreas

isentas. A disseminação é mais acentuada em solos arenosos e potencializada na presença de nematóides, principalmente das espécies *Meloidogyne incognita*, *Rotylenchulus reniformis* e *Pratylenchus brachyurus* (Starr et al., 1989; DeVay et al., 1997; Koenning et al., 2004; Cia & Fuzatto, 2005).

A transmissibilidade do patógeno pela semente ainda não está bem esclarecida, havendo relatos conflitantes com relação à porcentagem de transmissão da planta à semente. Em alguns desses relatos, sementes oriundas de plantas com murchas apresentaram 9,9% e 47% de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em campos de produção na Índia e Tanzânia, respectivamente (Kulkarni, 1934; Perry, 1962). No Brasil, Veigas (1935) verificou a ocorrência do patógeno em apenas 0,6% das sementes analisadas. Sendo assim, a dificuldade na detecção, é freqüentemente subestimada, principalmente devido à ocorrência de outras espécies do gênero.

Por isso, o uso de sementes livres do patógeno, evitando a disseminação e o uso de variedades resistentes, em áreas nas quais já ocorreu a introdução do patógeno, são as medidas mais recomendadas. Entretanto, o sucesso da utilização de variedades resistentes, como medida de controle, depende do conhecimento da variabilidade patogênica do fungo (Smith et al., 1981). Outra medida seria a rotação de culturas, no entanto, existem várias culturas hospedeiras do patógeno, tais como quiabo e soja, que poderão acarretar maiores danos (Menezes et al., 1979).

#### **2.4 Técnicas moleculares empregadas em estudos de variabilidade de fungos**

Métodos baseados em seqüências de DNA possibilitam análise mais precisa da variação genética, detectada por alterações mutacionais em regiões codificadoras. Marcadores baseados em reação em cadeia da polimerase (PCR) são altamente sensíveis, reproduzíveis e podem ser facilmente usados na

identificação e na caracterização de fungos, caso *primers* específicos sejam desenvolvidos (Lee et al., 2001). Dessa forma, trabalhos foram realizados para a caracterização molecular de fungos fitopatogênicos, baseados na amplificação de fragmentos de DNA, por meio da técnica de PCR (Assigbetse et al., 1994; Silva-Hanlin et al., 1999; Geiser et al., 2005; Kim et al., 2005).

As dificuldades atribuídas ao uso de métodos moleculares em trabalhos rotineiros de laboratório estão sendo amenizadas em consequência do desenvolvimento de novas estratégias de obtenção e purificação de DNA. Além disso, a redução nos custos de seqüenciamentos e a adequação da bioinformática para analisar e gerenciar grandes quantidades de dados favoreceram as pesquisas relacionadas à biologia molecular de fitopatógenos (Robbertse et al., 2006).

Em estudos filogenéticos de fungos, a aplicação de técnicas moleculares tem sido de extrema relevância. A alta similaridade entre algumas espécies de fungos e entre populações dentro destas espécies tem feito com que métodos mais precisos e consistentes de identificação destes organismos sejam disponibilizados. Exemplo de organismos que apresentam alta variabilidade genética é o gênero *Fusarium*, que inclui o complexo de espécies, objeto neste estudo. Para os estudos de filogenia dos fungos, algumas técnicas moleculares têm sido utilizadas com sucesso. Parte destas técnicas é baseada em *fingerprinting* ou a análise de seqüências nucleotídicas (Wang et al., 2006).

Técnicas de *fingerprinting*, tais como RAPD (DNA polimórfico de amplificação ao acaso), RFLP (polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição) e AFLP (polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados), foram utilizadas no intuito de detectar variabilidade genética dentro do complexo *F. oxysporum* (Kim et al., 1993; Bentley et al., 1994; Assigbetse et al., 1994; Edel et al., 1995; Baayen et al., 2000; Jiménez-Gasco et al., 2001; Jiménez-Gasco & Jiménez-Díaz, 2003; Abd-Elsalam et al., 2003; Wang et al., 2006). O AFLP é um marcador robusto e efetivo para determinar a variabilidade

genética intra-específica em fungos. Por meio de digestão com enzimas de restrição, a técnica gera um grande número de fragmentos que representam o genoma inteiro, sem a necessidade de conhecimento prévio da origem genética do organismo (Majer et al., 1996)

Em outra vertente, encontram-se as técnicas moleculares que utilizam seqüências nucleotídicas de genes conservados para estudar a filogenia de fungos. A análise filogenética de seqüências de DNA fornece informações importantes sobre relações intra e interespecíficas, além de ser uma ferramenta atualmente indispensável na identificação de isolados desconhecidos e de poder ser utilizada no mapeamento dos perfis de toxinas em espécies ou grupos de espécies (O'Donnell et al., 1998c). A análise deve ser feita utilizando-se isolados bem caracterizados com base na morfologia, preferencialmente acompanhados pelas descrições das características específicas dos isolados, tais como, hospedeiro, patogenicidade e origem geográfica, dentre outros. A inclusão, em estudos filogenéticos, de isolados erroneamente identificados, pode aumentar as dificuldades em delimitar as relações evolucionárias entre as espécies ou grupos de uma mesma espécie (Kristensen et al., 2005).

Vários trabalhos citam genes do DNA ribossomal e mitocondrial como informativos em análise filogenética. As regiões espaçadoras transcritas (ITS1 e ITS2) que separam os genes 5.8S, 18S e 28S do DNA ribossomal, e a região espaçadora intergênica (IGS) foram objeto de estudos da variabilidade genética de formaes especiais de *F. oxysporum* (Silva-Hanlin et al., 1999; Lori et al., 2004; Abo et al., 2005). No entanto, trabalhos mais detalhados a respeito da região ITS comprovam a existência de dois tipos de ITS2 dentro de um mesmo organismo, o que pode resultar em ambigüidade ao se fazer a análise filogenética de fungos, principalmente do gênero *Fusarium* (O'Donnell & Cigelnik, 1997; O'Donnell et al., 1998a).

Dentre os genes mais estudados estão os que codificam para proteínas essenciais, como as  $\beta$ -tubulinas que, em conjunto com as  $\alpha$ -tubulinas, formam os microtúbulos durante a divisão celular, e as histonas, formadoras do nucleossoma, além do gene do fator de elongação da transcrição-1 $\alpha$  (*tef1*). A seqüência nucleotídica desse gene vem sendo bastante analisada, em estudos filogenéticos, como marcador eficiente para distinguir espécies de *Fusarium* (O'Donnell et al., 1998b; Baayen et al., 2000; Skovgaard et al., 2001; Leslie et al., 2001; Jiménez-Gasco et al., 2002; O'Donnell, et al., 2004; Kim et al., 2005; Geiser et al., 2005; Kristensen et al., 2005).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELSALAM, K. A.; SCHNIEDER, F.; KHALIL, M. S.; ASRAN-AMAL, A.; VERREET, J-A. Use of AFLP fingerprinting to analyze genetic variation within and between populations of *Fusarium* spp. Derived from Egyptian cotton cultivars. **Journal of Plant Pathology**, Berlin, v. 85, n. 2, p. 99-103, 2003.

ABO, K.; KLEIN, K. K.; EDEL-HERMANN, V.; GAUTHERON, N.; TRAORE, D.; STEINBERG, C. High genetic diversity among strains of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* from cotton in Ivory Coast. **Phytopathology**, St. Paul, v. 95, n. 12, p. 1391-1396, Dec. 2005.

AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira. 2007. p. 163-175.

AINSWORTH G. C.; HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N. (Ed.). **Dictionary of the fungi**. Wallingford: CAB International, 1995. 616 p.

ARMSTRONG, G. M.; ARMSTRONG, J. K. A new race (race 6) of the cotton-wilt *Fusarium* from Brazil. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 62, n. 5, p. 421-423, May 1978.

ASSIGBETSE, K. B.; FERNANDEZ, D.; DUBOIS, M. P.; GEIGER, J. P. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, n. 6, p. 622-626, June 1994.

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

BENTLEY, S.; PEGG, K. G.; DALE, J. L. Optimization of RAPD-PCR fingerprinting to analyze genetic variation within population of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 142, n. 1, p. 64-78, 1994.

CARVALHO, E. M. **Relações de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro: efeitos de inibidores da germinação em testes de sanidade e caracterização molecular do patógeno.**

2005. 105 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CIA, E. Ocorrência e conhecimento das doenças de algodoeiro anual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.3, n. 3, p. 167-193, 1977.

CIA, E.; FUZATTO, M. G. Controle das doenças do algodoeiro. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 5., 2001, Lavras. **Palestras...** Lavras: UFLA-DFP-NEFIT, 2005.

DAVIS, R. M.; COLYER, P. D.; ROTHROCK, C. S.; KOCHMAN, J. K. *Fusarium* wilt of cotton: population diversity and implications for management. **Plant Disease**, v. 90, n. 6, p. 692-708, June 2006.

DeVAY, J. E.; GUTIERREZ, A. P.; PULLMAN, G. S.; WAKEMAN, R. J.; GARBER, R. H.; JEFFERS, D. P.; SMITH, S. N.; GOODELL, P. B.; ROBERTS, P. A. Inoculum densities of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* and *Meloidogyne incognita* in relation to the development of Fusarium Wilt and the phenology of cotton plants (*Gossypium hirsutum*). **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n.3, p. 341-346, Mar. 1997.

DOWD, C.; WILSON, L.W.; McFADDEN, H. Gene expression profile changes in cotton root and hypocotyl tissues in response to infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 6, p. 654-667, 2004.

EDEL, V.; STEINBERG, C.; AVELANGE, I.; LAGUERRE, G.; ALABOUVETTE, C. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 5, p. 579-585, May 1995.

FREITAS, M. A. **Variabilidade, danos e detecção de *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* em sementes demilho**. 2006. 164 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GEISER, D. M.; IVEY, M. L. L.; HAKIZA, G.; JUBA, J. H.; MILLER, S.A. *Gibberella xylarioides* (anamorph: *Fusarium xylarioides*), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is a previously unrecognized member of the *G. fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 1, p. 191-201, Jan./Feb. 2005.

GORDON, T. R.; OKAMOTO, D. Population structure and the relationship between pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 8, n. 1, p. 73-77, Jan. 1992.

GORDON, T. R.; MARTYN, R. D. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. **Annual Review Phytopathology**, v. 35, p. 111-128, 1997.

JIMÉNEZ-GASCO, M. M.; PÉREZ-ARTÉS, E.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5, and 6 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 2, p. 237-248, Feb. 2001.

JIMÉNEZ-GASCO, M. M.; MILGROOM, M. G.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. Gene genealogies support *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* as a monophyletic group. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 1, p. 72-77, Jan. 2002.

JIMÉNEZ-GASCO, M. M.; MILGROOM, M. G.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. Stepwise evolution of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* inferred from fingerprinting with repetitive DNA sequences. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, n. 3, p. 228-235, Mar. 2003.

JIMÉNEZ-GASCO, M. M.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. Development of a specific polymerase chain reaction-based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5, and 6. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 2, p. 200-209, Feb. 2003.

KATAN, T.; KATAN, J. Vegetative-compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* from tissue and the rhizosphere of cotton plants. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 6, p. 852-855, June 1988.

KIM, D. H.; MARTYN, R. D.; MAGILL, C. W. Mitochondrial DNA (mtDNA) – Relatedness among *Formae speciales* of *Fusarium oxysporum* in the cucurbitaceae. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 1, p. 91-97, Jan. 1993.

KIM, Y.; HUTMACHER, R. B.; DAVIS, R. M. Characterization of California isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, n. 4, p. 366-372, Abr. 2005.

KOENNING, S. R.; KIRKPATRICK, T. L.; STARR J. L.; WRATHER, J. A.; WALKER, N. R.; MUELLER, J. D. Plant-parasitic nematodes attacking cotton in the united states: old and emerging production challenges. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, n. 2, p. 100-113, Feb. 2004.

KRISTENSEN, R.; TORP, M.; KOSIAK, B.; HOLST-JENSEN, A. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. **Mycological research**, v. 109, n. 2, p. 173-186, Feb. 2005.

KULKARNI, G. S. Studies in the wilt disease of cotton in the Bombay Presidency. **Indian Journal of Agricultural Science**, v. 4, p.976-1045, 1934.

LEE, H. K.; TEWARI, J. P.; TURKINGTON, T. K. A PCR-based assay to detect *Rhynchosporium secalis* in barley seed. **Plant Disease**, St Paul, v. 85, n. 2, p. 220-225, Feb. 2001.

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

LORI, G.; EDEL-HERMANN, V.; GAUTHERON, N.; ALABOUVETTE, C. Genetic diversity of pathogenic and nonpathogenic populations of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation fields in Argentina. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, n. 6, p. 661-668, June 2004.

MACHADO, A. Q.; CASSETARI NETO, D.; GUERRA, W. D. Primeiro relato de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) no estado Mato do Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. S215, 2003. Suplemento.

MAJER, D.; MITHEN, R.; LEWIS, B. G.; VOS, P.; OLIVER, R. P. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. **Mycological Research**, Oxford, v. 100, n. 9, p. 1107-1111, Sept. 1996.

MATHUR, S. B.; KONGSDAL, O. (Ed.). **Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi**. International Seed Testing Association, Copenhagen, Denmark, 2003. 425 p.

MENEZES, M.; BEZERRA, J. L.; RAMOS, R. L. B. Microflora fúngica de sementes de quatro cultivares de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4, p. 129, 1979.

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

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 7, n. 1, p. 103-116, Feb. 1997.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York, v. 90, n. 3, p. 465-493, May/June 1998a.

O'DONNELL, K.; KISTLER, H. C.; CIGELNIK, E.; PLOTZ, R. C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Applied Biological Sciences**, Washington, v. 95, n. 5, p. 2044-2049, Mar. 1998b.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; CASPER, H. H. Molecular phylogenetic, morphological, and mycotoxin data support re-identification of the Quorn mycoprotein fungus as *Fusarium veneratum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 23, p. 57-67, 1998c.

O'DONNELL, K.; WARD, T. J.; GEISER, D. M.; KISTLER, H. C.; AOKI, T. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, p. 600-623, 2004.

PERRY, D. A. Fusarium wilt of cotton in the lake province of Tanganyika. **Empire Cotton Growing Review**, v. 39, p. 22-26, 1962.

ROBBERTSE, B.; REEVES, J. B.; SCHOCH, C. L.; SPATAFORA, J. W. A phylogenomic analysis of the ascomycota. **Fungal Genetics and Biology**, v. 43, p. 715-725, 2006.

SHI, J.; MUELLER, W. C.; BECKMAN, C. H. Vessel occlusion and secretory activities of vessel contact cells in resistant or susceptible cotton plants infected with *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 40, n. 2, p. 133-147, 1992.

SILVA-HANLIN, D. M. W.; MENEZES, M.; HANLIN, R. T.; RAMALHONETO, C. E. Ribosomal DNA sequencing data reveals low genetic variability among *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolates. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 534-539, dez. 1999.

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

SMITH, S. N.; EBBELS, R. H.; GARBER, H.; KAPPELMAN-JR, J. Fusarium wilt of cotton. In: NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; COOK, R. F. (Ed.). **Fusarium: disease, biology and taxonomy**. Pennsylvania: The Pennsylvania State University/University Park and London, 1981. p. 29-38.

SMITH, S. N.; SNYDER, W. C. Persistence of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* in fields in the absence of cotton. **Phytopathology**, St. Paul, v.65. n. 2. p. 191-196, Feb. 1975.

STARR, J. L.; JEGER, M. J.; MARTYN, R. D.; SCHILLING, K. Effects of *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* on plant mortality and yield of cotton. **Ecology and Epidemiology**, v. 79, n. 6, p. 640-646, 1989.

VEIGAS, A. P. A murcha do algodoeiro. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 10, v. 1/2, p. 49-51, 1935.

WANG, B.; BRUBAKER, C. L.; TATE, W.; WOODS, M. J.; MATHESON, B. A.; BURDON, J. J. Genetic variation and population structure of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* in Australia. **Plant Pathology**, Oxford, v. 55, n. 6, p. 746-755, Dec. 2006.

## CAPÍTULO 2

### **PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* EM PLÂNTULAS DE ALGODOEIRO**

## 1 RESUMO

ARAÚJO, Dejânia Vieira. Patogenicidade de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em plântulas de algodoeiro. In:\_\_\_\_. **Caracterização molecular, patogenicidade e transmissão pela semente de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em algodoeiro.** 2008. Cap. 2 p. 18-35. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.\*

*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov), agente etiológico da murcha-de-fusarium-do-algodoeiro, é considerado um organismo colonizador do sistema vascular, que pode se estabelecer no solo e ser transmitido por sementes. Com este estudo, objetivou-se avaliar a patogenicidade de isolados provenientes de várias regiões do Brasil. Foram testados 49 isolados de Fov, coletados do algodoeiro e do quiabeiro, na cv. Delta Opal com perfil de qualidade de acordo com o padrão de certificação vigente. As sementes foram semeadas em caixas plásticas contendo substrato artificial e mantidas em condições controladas de temperatura e umidade por 10 dias. A inoculação foi realizada utilizando-se o método de imersão das plântulas, com um terço das raízes seccionadas, em suspensão de conídios, na concentração  $10^6$  con./mL, por 5 minutos. Em seguida, as plântulas foram transplantadas para sacos plásticos com capacidade para 3 kg de substrato solo:areia (2:1) esterilizado e mantidas em casa de vegetação. Avaliaram-se a severidade da doença na parte aérea (PA) e no sistema vascular (SV) e o peso seco da parte aérea (PPA) e da raiz (PR), quatro semanas após a inoculação. Todos os isolados foram patogênicos à cv. Delta Opal, havendo variação no grau de virulência entre os isolados do algodoeiro. O isolado Fov 102 proporcionou a maior severidade da doença, tanto na parte aérea (80%) quanto no sistema vascular (75%). Por outro lado, o isolado MT 22 foi o menos virulento, com 11,8% de severidade na parte aérea e nenhum sintoma no sistema vascular. O aumento da severidade resultou em menor PPA e PR, devido à infecção e à morte de plântulas pelo patógeno.

---

\*Comitê orientador: José da Cruz Machado – UFLA (Professor orientador); Ludwig H. Pfenning – UFLA; Antonia dos Reis Figueira – UFLA.

## 2 ABSTRACT

ARAÚJO, Dejánia Vieira. Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* strains in cotton seedlings. In:\_\_\_\_\_. **Molecular characterization, pathogenicity and transmission by seeds of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in cotton**. 2008. Cap. 2 p. 18-35. Thesis (Doctorate in Phytopatology). Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.\*

*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (*Fov*) is considered a soil-borne pathogen that colonizes the vascular system and may be transmitted by seeds. This study was conducted to evaluate the pathogenicity of strains obtained of several regions in Brazil. Forty-nine strains, isolated from cotton and okra, were inoculated in seeds of cv. Delta Opal with high quality profile according to current certification standards. Seeds were sown in plastic boxes containing artificial substrate and kept under controlled conditions of moisture and temperature for 10 days. After that, seedlings were carefully removed from substrate and washed in water and then inoculated through the immersion of the root system of seedlings in conidial suspension ( $10^6$  conidial/mL) for 5 min. This procedure was followed with all strains in separate. Then, seedlings were transplanted to plastic bags containing 3 kg soil:sand sterile substrate (2:1) and kept in greenhouse. Disease severity in the shoot and vascular system and weights of shoot and roots were measured four weeks after inoculation. All strains were pathogenic to cv. Delta Opal with variation in virulence degree among cotton strains. Fov 102 strain presented higher disease severity in both shoot (80%) and vascular system (75%). On the other hand, MT 22 strain was the less virulent strain with 11.8% of shoot severity and no symptom in vascular system. The increase in severity resulted in lower shoot and root weights due to infection and death of plants caused by the fungus.

---

\*Advising Committee: José da Cruz Machado – UFLA (Adviser); Ludwig Heinrich Pfenning – UFLA; Antonia dos Reis Figueira – UFLA.

### 3 INTRODUÇÃO

Por intermédio das sementes, um grande número de patógenos, considerados de alto risco, pode ser disseminado entre regiões produtoras dentro de um mesmo país e entre países, gerando perdas e danos de dimensões incalculáveis que, em algumas situações, podem ser irreversíveis (Machado, 1994). Em razão do acentuado número destes patógenos, o aspecto de sanidade de sementes vem se tornando uma crescente preocupação em todo o mundo.

Dentre as principais culturas que requerem uma demanda consistente e acentuada de sementes, encontra-se o algodoeiro. Apesar das adversidades climáticas e dos baixos preços no mercado internacional, trata-se de uma cultura com boas perspectivas de mercado para o Brasil, que é um de seus maiores produtores mundiais (Agrianual, 2007). Dentre as doenças fúngicas que causam perdas às lavouras de algodão, encontra-se a murcha de fusarium, cujo agente etiológico é *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Esse patógeno vem se tornando importante, justamente por ser um organismo de solo e colonizador do sistema vascular, podendo ser veiculado por sementes, restos culturais e movimento de solo de diversas naturezas (Hillocks & Kibani, 2002).

A escolha de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* como alvo neste estudo se dá em razão da importância econômica atual desse organismo e da cultura do algodoeiro no Brasil. Sobre este patógeno, existe uma carência de estudos relacionados à sua variabilidade no Brasil, bem como de métodos de detecção que sejam mais precisos e acessíveis para análise de rotina. Por ser um patógeno com alta variabilidade genética, dentro da espécie e que possui isolados patogênicos e não patogênicos (Gordon & Martyn, 1997), o objetivo deste estudo foi avaliar o grau de virulência de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* provenientes de várias regiões do Brasil.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido no Laboratório de Patologia de Sementes e em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia (DFP), na Universidade Federal de Lavras (UFLA).

### 4.1 Obtenção e manutenção dos isolados

Quarenta e nove isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* foram obtidos de diversas regiões do Brasil, sendo isolados do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) e do quiabeiro (*Abelmoschus esculentus* L. [Moench.]) (Tabela 1). Todos os isolados provenientes do estado de Mato Grosso, com exceção do MT 01 e do Fov 101, foram obtidos de plantas com sintomas da doença, coletadas em campos de produção de algodão. Os isolados BA 02 e BA 06 foram encontrados em sementes provenientes do estado da Bahia. Os demais foram fornecidos pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC), pelo Centro Nacional de Pesquisa em Algodão (CNPQ), pela Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) e pelo Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, no DFP/UFLA.

TABELA 1. Procedência e hospedeiros dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov) utilizados neste estudo. Lavras, MG, 2008.

Isolados (Fov) <sup>1</sup>	Nº de acesso CML <sup>2</sup>	Local de procedência	Hospedeiro
CNPA 0001	1089	Bahia	<i>G. hirsutum</i>
CNPA 0002	1090	Paraíba	<i>G. hirsutum</i>
CNPA 0003	1091	Paraíba	<i>G. hirsutum</i>
CNPA 0004	1092	Paraíba	<i>G. hirsutum</i>
CNPA 0005	1093	Paraíba	<i>G. hirsutum</i>
CNPA 0006	1094	Goiás	<i>G. hirsutum</i>
CNPA 0007	1095	Paraíba	<i>G. hirsutum</i>
Fov 100	1096	Pernambuco	<i>G. hirsutum</i>
Fov 101	1097	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
Fov 102	1098	São Paulo	<i>G. hirsutum</i>
Fov 103	1099	Goiás	<i>G. hirsutum</i>
Fov 03	1101	Maranhão	<i>A. esculentus</i>
Fov 04	1102	Maranhão	<i>A. esculentus</i>
Fov 07	1103	Maranhão	<i>A. esculentus</i>
Fov 08	1104	Maranhão	<i>A. esculentus</i>
Fov 14	1105	Maranhão	<i>A. esculentus</i>
Fov 15	1106	Maranhão	<i>A. esculentus</i>
Fov 27	1107	Maranhão	<i>A. esculentus</i>
Fov 29	1108	Maranhão	<i>A. esculentus</i>
Fov 33	1109	Maranhão	<i>A. esculentus</i>
Fov 36	1110	Maranhão	<i>A. esculentus</i>
MT 01	1100	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
MT 02	1112	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
MT 04	1113	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
MT 05	1114	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
MT 06	1115	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
MT 09	1118	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
MT 11	1119	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
MT 15	1120	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
MT 16	1121	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
MT 20	1116	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
MT 21	1122	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
MT 22	1123	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
MT 23	1124	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
MT 24	1125	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
MT 25	1126	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
MT 26	1127	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
MT 27	1128	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
MT 28	1129	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
MT 29	1130	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
MT 30	1131	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
MT 31	1132	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
IAC 3463	1134	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
IAC 3039-8	1133	São Paulo	<i>G. hirsutum</i>
IAC 21-4	1111	São Paulo	<i>G. hirsutum</i>
CML 0288	0288	Minas Gerais	<i>G. hirsutum</i>
Fov-L	1117	Minas Gerais	<i>G. hirsutum</i>
BA 02	1135	Bahia	<i>G. hirsutum</i>
BA 06	1136	Bahia	<i>G. hirsutum</i>

<sup>1</sup>CNPA = Centro Nacional de Pesquisa em Algodão; MT = Mato Grosso; IAC = Instituto Agrônomico de Campinas; Fov-L = *F.o. vasinfectum*/Lavras; BA = Bahia; <sup>2</sup>CML = Coleção Micológica de Lavras.

Todos os isolados foram purificados por meio de cultivos monospóricos, partindo de macroconídios individuais. O método utilizado foi baseado em coleta destes, a partir de fragmentos de meio de cultura SNA contendo conídios, previamente dispersos na superfície do meio. Blocos de meio SNA (ágar pobre em nutrientes) com macroconídios individuais foram transferidos para placas de 6 cm de diâmetro contendo meio OA (aveia-ágar). As placas de Petri foram incubadas em BOD a  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. Após a germinação e o crescimento micelial da colônia, apenas uma cultura pura foi transferida para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meios OA e SNA para posterior caracterização morfológica.

A caracterização morfológica foi baseada em critérios sugeridos por Nelson et al. (1983), considerando a presença de macro e microconídios, clamidósporos, fiálides, falsas cabeças e coloração da colônia. Após a caracterização, os isolados foram preservados em areia, papel de filtro, água destilada e esterilizada e congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  (criopreservação) e depositados na micoteca do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos.

#### **4.2 Teste de patogenicidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum***

O teste de patogenicidade dos isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* foi conduzido conforme metodologia adaptada de Kim et al. (2005). Plântulas de algodoeiro, cv. Delta Opal, cultivadas por 10 dias em substrato comercial (Vermiculita), foram cuidadosamente retiradas do substrato e lavadas em água corrente. Em seguida, foi seccionada a terça parte das raízes e imersas em suspensão de conídios ( $10^6$  conídios/mL) provenientes de colônias cultivadas em meio de cultura OA e mantidas em BOD, a  $21^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. Após 5 minutos de imersão, as plântulas foram transplantadas para sacos plásticos contendo 3 kg de substrato solo-areia, na proporção 2:1 e

mantidas em casa de vegetação por 30 dias. Esse procedimento foi realizado com cada isolado, separadamente.

O experimento foi disposto em blocos casualizados, com 49 isolados e uma testemunha em quatro repetições. A parcela experimental foi composta por um saco plástico contendo três plântulas.

A severidade da doença foi avaliada com base em sintomas na parte aérea (folhas e pecíolo) e no sistema vascular, aos 30 dias após a inoculação. Para avaliar a parte aérea, utilizou-se a escala de notas variando de 0 a 4, adaptada de Ibrahim & Nirenberg (1993) citados por Kim et al. (2005), em que 0 = ausência de sintomas; 1 = clorose e ou murcha restrita aos cotilédones ou primeira folha; 2 = clorose e ou necrose ao longo da primeira folha; 3 = sintomas severos afetando a planta inteira e 4 = planta morta. Após esta avaliação, as plantas foram removidas e cortadas, longitudinalmente, a partir da raiz, para verificar a coloração vascular. Este procedimento foi realizado mediante a assepsia, em álcool e posterior flambagem, da lâmina do bisturi, após cortes em cada tratamento.

Na avaliação dos sintomas vasculares, adotou-se a escala de notas variando de 0 a 3, adaptada de Kim et al. (2005), em que 0 = ausência de sintomas; 1 = traços de coloração marrom-claro; 2 = traços de coloração marrom-escuro e 3 = planta morta. Para confirmar a presença do patógeno, fragmentos da haste de cada plântula foram incisados e desinfestados em hipoclorito de sódio 2% por 30 segundos e enxaguados, três vezes, em água destilada e esterilizada. Em seguida, os fragmentos foram transferidos para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio SNA e mantidos em incubação em BOD, a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. Para obter os dados em porcentagem, a severidade da doença, na parte aérea e no sistema vascular, foi ponderada pelo índice de McKinney (1923).

$$ID (\%) = [\Sigma(f.v)/n.x]*100$$

em que:

ID = índice de doença; f = número de plântulas com determinada nota; v = nota observada; n = número total de plântulas avaliadas; x = grau máximo de severidade da escala.

### **4.3 Peso seco de parte aérea e de raiz**

O peso seco foi obtido após secagem da parte aérea e da raiz, de todos os tratamentos, separadamente. O processo de secagem ocorreu em estufa de ventilação forçada, com temperatura de 50°C. Após três dias nessas condições, efetuou-se a pesagem, em gramas, utilizando-se balança semi-analítica com precisão de três casas decimais.

### **4.4 Análise dos dados**

As análises de variância foram realizadas no programa Sisvar (Ferreira, 2000). As médias entre tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott Knott ( $P \leq 0,05$ ). Os dados de severidade foram transformados para  $\sqrt{x} + 0,5$  e os de peso seco (parte aérea e raiz), para  $\sqrt{x}$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise de variância, houve diferença significativa entre os isolados quanto à severidade da doença, da parte aérea e do sistema vascular, e ao peso seco da parte aérea e da raiz (Figuras 1 e 2).

A severidade da doença foi maior na parte aérea do que no sistema vascular, variando de 11,8% a 80%, na parte aérea e de 2% a 75%, no sistema vascular. A testemunha não apresentou sintomas da doença. O isolado Fov 102, procedente de São Paulo, comportou-se como o mais virulento quando comparado com os demais, com severidade de 80% na parte aérea e 75% no sistema vascular. Já o isolado MT 22, do Mato Grosso, comportou-se como o menos virulento, apresentando severidade, na parte aérea, de 11,8% e nenhum sintoma no sistema vascular, não diferindo da testemunha (Figura 1).

Notou-se que a virulência não foi relacionada com a origem geográfica dos isolados, visto que isolados obtidos no estado do Mato Grosso (MT 01 a MT 31) apresentaram variação na severidade da doença, assim como os isolados obtidos de sementes produzidas no estado da Bahia (BA 02 e BA 06). Os isolados dessas localidades causaram sintomas leves a moderados nas plântulas de algodoeiro, alcançando o máximo de 43,3% e 33,3% de severidade na parte aérea e no sistema vascular, com exceção do isolado MT 02, que apresentou a maior severidade quando comparado com os outros isolados das mesmas regiões (MT e BA). Os isolados obtidos do quiabeiro, juntamente com outros isolados do algodoeiro, concentraram-se no grupo com maior virulência, tanto da parte aérea quanto do sistema vascular. O relato da ocorrência de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em quiabeiro foi feito pela primeira vez em 1972, como a fusariose-do-quiabeiro (Robbs et al. 1972). Entretanto, Armstrong & Armstrong (1978) constataram que, além da espécie *G. hirsutum* do algodoeiro, *F. oxysporum* f. sp.

*vasinfectum* é patogênico ao quiabeiro, sendo caracterizado como raça 6, oriunda do Brasil.

De acordo com as avaliações, todos os isolados foram patogênicos ao cv. Delta Opal, utilizado como hospedeiro referencial para este estudo, em razão de ser uma das mais suscetíveis ao patógeno em foco (Dr. Edivaldo Cia, comunicação pessoal). Em geral, os resultados deste estudo confirmam os sintomas descritos em literatura para esta fase de desenvolvimento do algodoeiro (Wang, 1999).

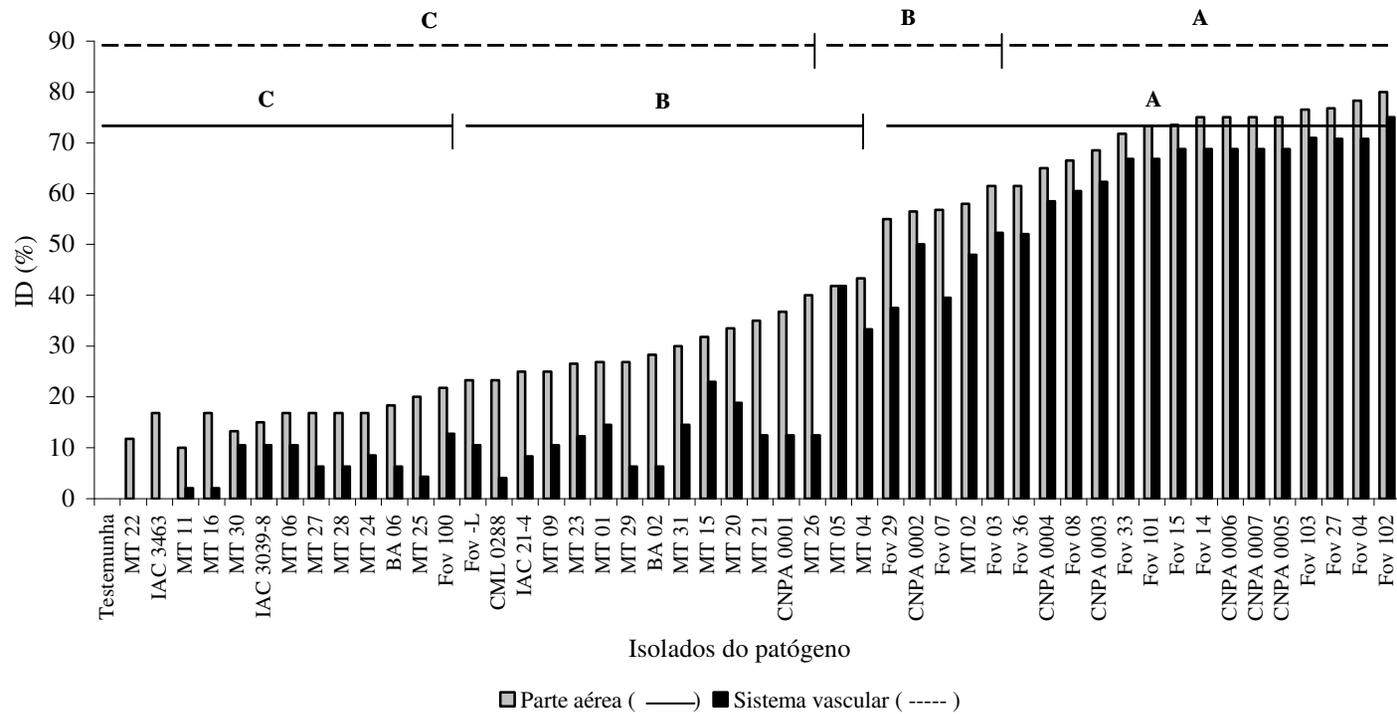


FIGURA 1. Severidade (ID) da parte aérea e do sistema vascular de plântulas de algodoeiro inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ( $P \leq 0,05$ ). Dados transformados para  $\sqrt{x + 0,5}$ . Lavras, MG, 2008.

A virulência dos isolados refletiu, diretamente, no peso seco da parte aérea e da raiz das plantas de algodoeiro. À medida que aumentou a severidade da doença, o peso da parte aérea e da raiz foi menor, devido à redução no porte e na morte de plantas inoculadas com os isolados mais virulentos. O peso seco da parte aérea (PPA) e da raiz (PR) variou de 0,10 g a 1,0g e de 0,02g a 0,17g, respectivamente, entre os 49 isolados. A testemunha apresentou os maiores valores, sendo 1,13g e 0,22g para PPA e PR, respectivamente (Figura 2). Os isolados que apresentaram os maiores índices de doença (ID) obtiveram os menores PPA e PR. O isolado Fov 04 do quiabeiro, um dos mais virulentos, foi o que apresentou menores PPA e PR. Por outro lado, o isolado MT 06 apresentou maiores PPA e PR, sendo este caracterizado como um dos menos virulentos, não diferindo estatisticamente da testemunha (Figura 2). Com estes resultados foram confirmadas diferenças significativas em virulência dos isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* coletados em várias localidades do Brasil. Além disso, observou-se que a metodologia de inoculação foi eficiente na obtenção de plântulas com sintomas externos de murcha, de clorose e mortas, e internamente apresentando escurecimento vascular, devido à presença do patógeno (Kim et al., 2005).

Estudos de patogenicidade e levantamento de germoplasma de algodoeiro para uso em melhoramento buscando a resistência a *Fov* foram realizados com isolados da Austrália. Os sintomas da doença foram significativamente maiores em plântulas jovens (uma semana de idade), quando comparadas com plântulas mais velhas. Além disso, houve aumento da doença em concentrações de inóculo mais altas (suspensão com concentração >10<sup>6</sup> conídios/mL), pH ácido (4,0-5,5) e períodos de inoculação mais longos (5-25 minutos) (Wang et al., 1999). No presente trabalho, utilizaram-se plântulas de 10 dias inoculadas por 5 minutos, em concentração de inóculo de 10<sup>6</sup> conídios/mL.

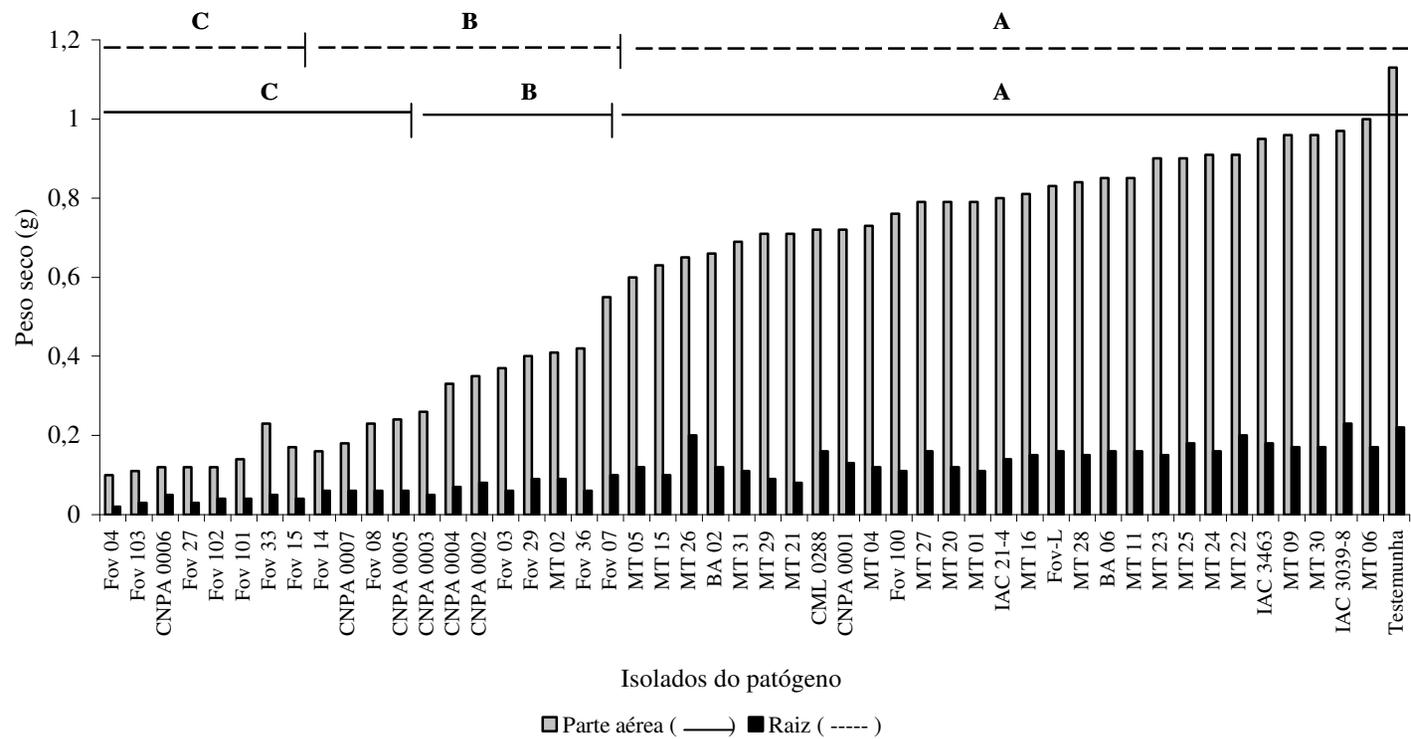


FIGURA 3. Peso seco de parte aérea e de raiz de plântulas de algodoeiro inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ( $P \leq 0,05$ ). Dados transformados para  $\sqrt{x}$ . Lavras, MG, 2008.

## 6 CONCLUSÕES

1. Todos os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* do Brasil, obtidos tanto do algodoeiro como do quiabeiro, foram caracterizados como patogênicos ao algodoeiro, cv. Delta Opal.
2. Entre os isolados do patógeno, foram observados graus variados de virulência, independente da origem geográfica, exceto para os isolados do quiabeiro que foram agrupados entre os mais virulentos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira. 2007. p. 163-175.

ARMSTRONG, G. M.; ARMSTRONG, J. K. A new race (race 6) of the cotton-wilt *Fusarium* from Brazil. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 62, n. 5, p. 421-423, May. 1978.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos, SP. **Programa e Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.

GORDON, T. R.; MARTYN, R. D. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. **Annual Review Phytopathology**, v. 35, p. 111-128, 1997.

HILLOCKS, R.J.; KIBANI, T.H.M. Factors affecting the distribution, incidence and spread of *Fusarium* wilt of cotton in Tanzania. **Experimental Agriculture**, v. 38, n. 1, p. 13-27, Jan. 2002.

KIM, Y.; HUTMACHER, R. B.; DAVIS, R. M. Characterization of California isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, n. 4, p. 366-372, Abr. 2005.

MACHADO, J.C. Padrões de tolerância de patógenos associados a sementes. In: LUZ, W.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 2, p. 229-264, 1994.

McKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal Agricultural Research**, Washington, v. 26, n. 5, p. 195-219, nov. 1923.

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

ROBBS, C.F.; RIBEIRO, R.L.D.; AKIBA, F.; SUDO, S. Nota sobre a ocorrência da 'fusariose' do quiabeiro (*Hibiscus esculentus* L.) na Baixada Carioca-Fluminense. **Agronomia**, Rio de Janeiro, v. 30, p. 23-26, 1972.

WANG, B.; DALE, M.L.; KOCHMAN, J.K. Studies on a pathogenicity assay for screening cotton germplasm for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp.

*vasinfectum* in the glasshouse. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 39, n. 8, p. 967-974. 1999.

## CAPÍTULO 3

### CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Fusarium* *oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

## 1 RESUMO

ARAÚJO, Dejânia Vieira. Caracterização molecular de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. In:\_\_\_\_. **Caracterização molecular, patogenicidade e transmissão pela semente de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em algodoeiro.** 2008. Cap. 3 p. 35-64. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.\*

O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade genética de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* provenientes de diversas regiões do Brasil, com base na análise de seqüências de DNA dos genes que codificam para o fator de alongação da transcrição 1- $\alpha$  (*tef1*) e a  $\beta$ -tubulina (*tub2*). Foram utilizados 49 isolados provenientes das regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. O DNA dos isolados foi extraído a partir de culturas puras e amplificado utilizando-se os pares de *primers* Ef1 e Ef2, para o gene *tef1* e T1 e T2, para o gene *tub2*. Foram construídas árvores com as seqüências de todos os isolados do Brasil, considerando cada gene individual e a combinada dos dois genes (*tef1* + *tub2*). Para a construção da árvore combinada foram selecionadas seqüências de 14 isolados de *Fov* do Brasil, juntamente com seqüências de outras formas especiais do GenBank. As amplificações dos produtos de PCR geraram fragmentos de, aproximadamente, 600 pb para o gene *tub2* e de 690 pb para o gene *tef1*. Com a caracterização molecular dos isolados, foi possível verificar alta variabilidade genética dentro da população de *Fov* do Brasil, formando um grupo heterogêneo com várias origens evolucionárias que, provavelmente, evoluiu independente do hospedeiro e do local de origem. O agrupamento, em dois clados, de apenas isolados do Brasil, evidencia a possível ocorrência de populações distintas do patógeno que podem estar relacionadas com o hospedeiro ou com a existência de novas raças do patógeno.

---

\*Comitê orientador: José da Cruz Machado – UFLA (Professor orientador); Ludwig H. Pfenning – UFLA; Antonia dos Reis Figueira – UFLA.

## 2 ABSTRACT

ARAÚJO, Dejânia Vieira. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* strains from Brazil. In:\_\_\_\_\_. **Molecular characterization, pathogenicity and transmission of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in cotton.** 2008. Cap. 3 p. 35-64. Thesis (Doctorate in Phytopatology). Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.\*

The objective in this study was to evaluate the genetic variability of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* isolates obtained from several regions in Brazil based on DNA sequence analyses of the Translation Elongation Factor 1- $\alpha$  (*tef1*) and  $\beta$ -Tubulin (*tub2*) genes. Forty-nine isolates of the North East, Central West and South East from Brazil were used. DNA of the strains was extracted and amplified using the pairs of primers Ef1 e Ef2 to *tef1* and the T1 e T2 to *tub2* genes. Trees containing all sequences of Brazil strains considering each individual gene and the combined tree of the two genes (*tef1* + *tub2*) were constructed. The construction of the combined tree was made selecting sequences of 14 strains from Brazil and other formae speciales sequences from GenBank data base. PCR product amplifications generated fragments of, approximately, 600 bp to *tub2* gene and of 690 bp to *tef1* gene. Based on the molecular characterization it was verified a high genetic variation into *Fov* population from Brazil, forming a heterogeneous group with several evolutionary origins that, probably, evolved independent of the geographic origin or host. Brazilian isolate grouping into two clades is an evidence about possible different pathogen populations that, may be related to the host or to new pathogen races.

---

\*Advising Committee: José da Cruz Machado – UFLA (Adviser); Ludwig Heinrich Pfenning – UFLA; Antonia dos Reis Figueira – UFLA.

### 3 INTRODUÇÃO

*Fusarium oxysporum* Schldl. é encontrado em solos cultivados em todas as áreas agricultáveis do mundo, sendo considerado como agente etiológico de murchas em diversas culturas. Até o momento, não se tem conhecimento da fase teleomórfica deste fungo, sendo a espécie constituída de inúmeras formae speciales e raças (Gordon & Martyn, 1997; O'Donnell et al., 1998b; Davis et al., 2006). Na cultura do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), a doença conhecida como murcha vascular é causada por *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* W.C. Snyder & H.N. Hansen e encontra-se disseminada em todas as regiões agricultáveis do mundo, podendo causar perdas consideráveis na produção (Assigbetse et al., 1994).

A caracterização molecular de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* com base na genealogia dos genes que codificam o fator de alongação 1- $\alpha$  (*tef1*), a  $\beta$ -tubulina (*tub2*) e a fosfato permease, além da região IGS do rDNA, foi utilizada com sucesso na determinação da variabilidade genética em isolados do estado da Califórnia, EUA, sugerindo que estas informações podem ser utilizadas para o estabelecimento de novas técnicas de controle da doença, bem como o melhoramento genético, visando à introdução de novas cultivares (Kim et al., 2005). No estudo da evolução das raças de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, com base na seqüência nucleotídica de quatro genes, Skovgaard et al. (2001) observaram quatro grupos de isolados, os quais foram classificados como linhagens. Essas linhagens apresentaram diferenças quanto à virulência e à origem geográfica e formaram agrupamentos evidenciando origens evolucionárias independentes.

No Brasil, apesar da cultura do algodoeiro encontrar-se amplamente distribuída em várias regiões, ainda não foram realizados estudos concretos quanto à diversidade genética da população de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*.

Com o propósito de se determinar um marcador molecular para a detecção do patógeno em sementes, este estudo focou-se na avaliação da caracterização molecular de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* provenientes de diversas regiões do Brasil, com base na análise de seqüências de DNA dos genes que codificam o fator de alongação 1- $\alpha$  (*tef1*) e a  $\beta$ -tubulina (*tub2*).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas de extração, amplificação e purificação do DNA de 49 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, utilizados neste estudo, foram realizadas no Laboratório de Fitovirologia Molecular, no Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e a etapa de seqüenciamento foi realizada no Laboratório de Biotecnologia do Centro Nacional de Pesquisa em Milho e Sorgo (CNPMS), em Sete Lagoas, MG.

### 4.1 Obtenção e manutenção dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

A procedência, bem como as etapas de isolamento, a caracterização, a purificação e a manutenção dos isolados, está descrita no capítulo 2. Os isolados, devidamente preservados, foram depositados na Coleção Micológica de Lavras do DFP/UFLA.

### 4.2 Extração de DNA

Na etapa de extração do DNA foram utilizados os 49 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* descritos no capítulo 2. Os isolados foram cultivados em meio OA (aveia-ágar) por sete dias, de onde foram transferidos para frascos Erlenmeyer com capacidade para 250 mL, contendo 100 mL de extrato de malte líquido (2%) e mantidos sob agitação constante, a 150 rpm, em temperatura ambiente (25°-30°C), por três dias. O micélio foi filtrado utilizando-se bomba a vácuo e armazenado a -80°C.

A extração de DNA foi realizada utilizando-se protocolo adaptado de Murray & Thompson (1980). Foram adicionados 500 µL do tampão de extração

CTAB 2% (CTAB 2%; 100 mM de Tris-HCl [pH8,0]; 1,4 M de NaCl; 20 mM de EDTA; 2% PVP; 1 µL de β-mercaptoetanol [0,2%]). O DNA total foi obtido mediante maceração com nitrogênio líquido de, aproximadamente, 100 mg de micélio acrescido de 1 mg de polivinilpirrolidona (PVP). Em seguida, foi adicionado tampão de extração à biomassa pulverizada. A mistura foi transferida para tubos com capacidade para 1,5 mL e agitada em vortex por, aproximadamente, 10 segundos e incubada em banho-maria, a 65°C, por 30 minutos. Nessa etapa, o material foi agitado, por inversão, em períodos de 10 minutos. Posteriormente, adicionaram-se 700 µL da mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1).

Após nova agitação em vortex, realizou-se a primeira etapa de centrifugação, por 10 minutos, a 10.000 rpm. Com o propósito de obter DNA mais puro, o sobrenadante (500 µL) foi transferido para novo tubo, sendo realizada uma segunda adição de 700 µL de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), seguindo-se centrifugação. O sobrenadante (400 µL) foi recuperado em novo tubo, ao qual foi adicionada igual quantidade (400 µL) de isopropanol gelado. Após agitação por inversão, o material foi acondicionado a -80°C por 10 minutos. Esta etapa é importante para aglutinar o DNA que está em suspensão, formando um precipitado (*pellet*), após centrifugação.

Em seguida, o material passou por processo de lavagem em etanol 70% (500 µL) e foi ressuscitado em 40 µL de TE 1x + RNase A (10 µg.mL<sup>-1</sup>) e, posteriormente, incubado em estufa, a 37°C, por 30 minutos. A RNase A auxilia na limpeza final do DNA, fazendo a digestão de fragmentos de RNA presentes na amostra. A etapa seguinte consistiu da adição de 8 µL de acetato de sódio 3 M [pH = 5,2] e 220 µL de etanol absoluto gelado, agitação por inversão e refrigeração (-80°C, por 15 minutos). Dessa forma, pôde-se obter uma maior quantidade de DNA precipitado. A seguir, foi realizada nova centrifugação e o precipitado foi lavado com etanol 70% e seco a vácuo. É importante eliminar

todo o resíduo de etanol para se obter DNA de alta qualidade. Finalmente, o precipitado foi ressuspenso em 40 µL de TE 1x. A presença do DNA foi confirmada por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,7%.

### 4.3 Amplificação e purificação de DNA

A amplificação dos fragmentos dos genes *tef1* e *tub2* foi realizada utilizando-se conjunto de *primers* universais. Os *primers* Ef-1 (senso: 5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') e Ef-2 (antisenso: 5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') foram utilizados para amplificar um fragmento de aproximadamente 640 pb do gene *tef1*, enquanto os *primers* T1 (senso: 5'-AACATGGGTGAGATTGTAAGT-3') e T2 (antisenso: 5'-TAGTGACCCCTGGCCCAGTTG-3') amplificaram fragmento de, aproximadamente, 540 pb do gene *tub2* (Figura 1).

As reações de PCR foram realizadas conforme protocolo sugerido por O'Donnell et al. (1998a) e Geiser et al. (2004), para *tef1* e O'Donnell & Cigelnik (1997), para *tub2*. A amplificação foi conduzida em 50 µL de reação contendo 1 µL de DNA, 5 µL de tampão 1x, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,25 pM de cada *primer*, 0,025 U/µL de *Taq* polimerase e 38,35 µL de água ultrapura com DEPC. A mistura foi levada ao termociclador com a seguinte programação: 94°C, por 1 minuto; 94°C, por 30 segundos; 62°C, por 45 segundos; 72°C, por 1 minuto; 94°C, por 30 segundos (34 vezes) e uma extensão final a 72°C por 5 minutos para *tef1*. Para o gene *tub2*, variou-se apenas a temperatura de anelamento, 61°C, por 45 segundos.

O produto de PCR foi observado por meio de eletroforese de gel de agarose 0,7%. O produto restante foi purificado utilizando-se o kit de purificação de banda e de produto de PCR GFX de acordo com as especificações do fabricante (Amersham Biosciences/GE Health Care). O produto purificado

foi, então, quantificado por comparação utilizando-se DNA- $\gamma$  (lambda) de peso conhecido (50, 100 e 200 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup>).

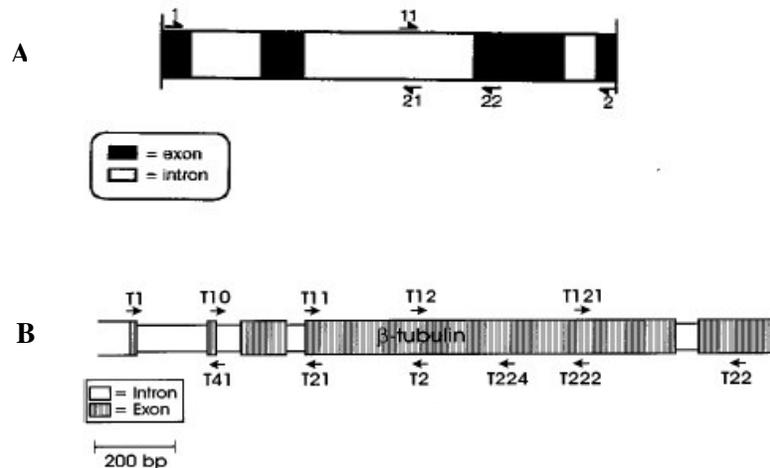


FIGURA 1. Representação das regiões de anelamento dos *primers* utilizados para a amplificação de fragmentos dos genes *tef1* (A) e *tub2* (B) (O'Donnell & Cigelnik, 1997; O'Donnell et al., 1998b).

#### 4.4 Seqüenciamentos de DNA e caracterização molecular

As amostras foram seqüenciadas nas duas direções, senso e antisenso, em seqüenciador automático ABI<sup>®</sup> 3100 (Applied Biosystems). Os eletroferogramas gerados, a partir dos seqüenciamentos, foram analisados no programa BioEdit<sup>®</sup> (Hall, 1999), no qual foi obtida a seqüência consenso no sentido 5'-3'. As seqüências consensos foram comparadas por meio do programa BLAST (Altschul et al., 1997), existente na base de dados do NCBI

(National Center for Biotechnology Information)  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>).

O programa CLUSTALW (Thompson et al., 1994) foi utilizado para gerar alinhamentos múltiplos das seqüências nucleotídicas de todos os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* do Brasil, sendo, em seguida, selecionados 14 representantes da população para os alinhamentos com seqüências de outras formae speciales depositadas no GenBank, NCBI (Tabelas 1 e 2). Os alinhamentos foram corrigidos manualmente e analisados no programa PAUP 4.0 versão beta 10 para a construção das árvores filogenéticas usando os comandos da análise de máxima parcimônia (busca heurística, *tree-bisection-reconnection*, *branch swapping* e MULTREES) (Swofford, 2000).

Todos os caracteres de cada gene foram analisados com o mesmo peso, os *gaps* foram considerados como quinto caractere (*newstate*) e os valores de *bootstrap*, com 1.000 repetições, foram considerados apenas quando superiores a 50%. *Fusarium* sp. NRRL 25184 foi utilizado como *outgroup* em todas as análises. Este isolado tem sido utilizado como *outgroup* em estudos filogenéticos do complexo *F. oxysporum* (O'Donnell et al., 1998b; Baayen et al., 2000).

As árvores filogenéticas foram geradas considerando cada gene, separadamente, e a combinação dos dois (*tef1* + *tub2*). As seqüências dos isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* do Brasil estão depositadas no GenBank, NCBI e os alinhamentos estão disponíveis mediante solicitação junto aos autores.

TABELA 1. Isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (*Fov*) selecionados para a análise filogenética da população. UFLA, Lavras, MG, 2008.

<b>Isolados <i>Fov</i>*</b>	<b>Local de procedência</b>	<b>Hospedeiro</b>
CNPA 0002 (CML 1090)	Paraíba	<i>G. hirsutum</i>
103 (CML 1099)	Goiás	<i>G. hirsutum</i>
MT 02 (CML 1112)	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
MT 09 (CML 1118)	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
MT 16 (CML 1121)	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
IAC 3463 (CML 1134)	Mato Grosso	<i>G. hirsutum</i>
IAC 21-4 (CML 1111)	São Paulo	<i>G. hirsutum</i>
BA 02 (CML 1135)	Bahia	<i>G. hirsutum</i>
BA 06 (CML 1136)	Bahia	<i>G. hirsutum</i>
04(CML 1102)	Maranhão	<i>H. esculentus</i>
07 (CML 1103)	Maranhão	<i>H. esculentus</i>
14 (CML 1105)	Maranhão	<i>H. esculentus</i>
15 (CML 1106)	Maranhão	<i>H. esculentus</i>
29 (CML 1108)	Maranhão	<i>H. esculentus</i>

\*Seqüências selecionadas com base na análise de MP dos genes *tef1* e *tub2*.

TABELA 2. Seqüências obtidas do GenBank de *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* utilizadas na caracterização de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* do Brasil. UFLA, Lavras, MG, 2008.

<b>formae speciales</b>	<b>N° de acesso<sup>b</sup></b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Origem</b>	<b>Referência</b>
<i>F. oxysporum</i>	NRRL 25356	Solo	-	O'Donnell et al. (1998b)
batatas	NRRL 26409	<i>Ipomoea batatas</i>	-	O'Donnell et al. (1998b)
<i>canariensis</i>	NRRL 26035	<i>Phoenix canariensis</i>	-	O'Donnell et al. (1998b)
<i>cubense</i> (C5) <sup>a</sup>	NRRL 25367	<i>Musa acuminata</i> x <i>M. balbisiana</i>	-	O'Donnell et al. (1998b)
<i>cubense</i> (C2) <sup>a</sup>	NRRL 25605	<i>Musa acuminata</i>	-	O'Donnell et al. (1998b)
<i>erythroxyli</i>	NRRL 26574	<i>Erythroxylum coca</i>	-	O'Donnell et al. (1998b)
<i>glycines</i>	NRRL 25598	<i>Glycine</i> sp.	-	O'Donnell et al. (1998b)
<i>lycopersici</i>	NRRL 26200	<i>Solanum esculentum</i>	-	O'Donnell et al. (1998b)
<i>lycopersici</i>	NRRL 26203	<i>Solanum esculentum</i>	-	O'Donnell et al. (1998b)
<i>melonis</i>	NRRL 26178	<i>Cucumis melo</i>	-	O'Donnell et al. (1998b)
<i>melonis</i>	NRRL 26406	<i>Cucumis melo</i>	-	O'Donnell et al. (1998b)
<i>passiflorae</i>	NRRL 22549	<i>Passiflora edulis</i>	-	O'Donnell et al. (1998b)
<i>perniciosum</i>	NRRL 22550	<i>Albizia julibrissin</i>	-	O'Donnell et al. (1998b)
<i>radicis-lycopersici</i>	NRRL 26380	<i>Solanum esculentum</i>	-	O'Donnell et al. (1998b)
<i>tuberosi</i>	NRRL 22555	<i>Solanum tuberosum</i>	-	O'Donnell et al. (1998b)
<i>vasinfectum</i>	NRRL 25420	<i>G. hirsutum</i>	-	O'Donnell et al. (1998b)
<i>vasinfectum</i> raça 5	BBA 65654	<i>G. barbadense</i>	Sudão	Skovgaard et al. (2001)
<i>vasinfectum</i> raça 7	BBA 69716	<i>Gossypium</i> sp.	China	Skovgaard et al. (2001)
<i>vasinfectum</i> raça 8	BBA 69711	<i>Gossypium</i> sp.	China	Skovgaard et al. (2001)
<i>dianthi</i>	NRRL 28906	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Austrália	Skovgaard et al. (2001)
<i>spinaciae</i>	NRRL 26876	<i>Spinacea oleracea</i>	USA	Skovgaard et al. (2001)

...continua...

TABELA 2, Cont.

<b>formae speciales</b>	<b>Nº de acesso<sup>b</sup></b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Origem</b>	<b>Referência</b>
<i>lilli</i>	NRRL 28395	<i>Lilium</i> sp.	Itália	Skovgaard et al. (2001)
<i>albedinis</i>	NRRL 26622	<i>Phoenix dactylifera</i>	Marrocos	Skovgaard et al. (2001)
<i>tulipae</i>	NRRL 26954	<i>Tulipa x gesneriana</i>	Holanda	Skovgaard et al. (2001)
<i>vasinfectum</i> raça 3	CC-612-3 (ATCC 16612)	<i>Gossypium</i> sp.	Egito	Kim et al. (2005)
<i>vasinfectum</i> raça 1	CC-421-1 (ATCC 16421)	<i>Gossypium</i> sp.	EUA	Kim et al. (2005)
<i>vasinfectum</i> raça 2	CC-611-2 (ATCC 16611)	<i>Gossypium</i> sp.	EUA	Kim et al. (2005)
<i>vasinfectum</i> raça 6	CC-198-6 (ATCC 36198)	<i>Gossypium</i> sp.	Brasil	Kim et al. (2005)
<i>vasinfectum</i> raça 4	CC-613-4 (ATCC 16613)	<i>Gossypium</i> sp.	Índia	Kim et al. (2005)
<i>vasinfectum</i>	AUST16	<i>Gossypium</i> sp.	Austrália	Kim et al. (2005)

<sup>a</sup> Número entre parênteses indica linhagem clonal; <sup>b</sup> ATCC = *American Type Culture Collection*, Manassas, Virginia, EUA; NRRL = *National Center for Agricultural Utilization Research*, Peoria, Illinois, EUA; BBA = *Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft*, Berlim, Alemanha.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As ampliações dos produtos de PCR geraram fragmentos de, aproximadamente, 600 pb para o gene *tub2* e de 690 pb para *tef1*. Para *tub2*, foram analisados 563 nucleotídeos contendo nove caracteres filogeneticamente informativos, com apenas uma árvore gerada na análise de máxima parcimônia, que apresentou cinco grupos distintos (Figura 2). Para *tef1*, foram analisados 651 nucleotídeos, nos quais foi possível encontrar 30 caracteres informativos quanto à filogenia. Na análise de máxima parcimônia, foi gerado um total de seis árvores filogenéticas com os mesmos cinco grupos distintos observados para *tub2*, sendo selecionada a que melhor representou os agrupamentos (Figura 3).

Com base nas árvores filogenéticas dos dois genes, observou-se que os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* apresentaram alta variabilidade genética, sendo o gene *tef1* o que apresentou mais subgrupos dentro da população do Brasil (Figuras 2 e 3). Este resultado reforça a informação de que o gene *tef1* é um marcador eficiente para estudos filogenéticos do complexo *F. oxysporum* (O'Donnell et al., 1998b; Baayen et al., 2000, Skovgaard et al., 2001; Kim et al., 2005; Kristensen et al., 2005).

Diferente da análise de genealogia de genes, Abo et al. (2005) também observaram alta diversidade genética entre isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* da Costa do Marfim, com base nos grupos de compatibilidade vegetativa (VCG's), análise da região IGS do rDNA e de *mating type*. Em estudos da população do patógeno da Austrália, Wang et al. (2006) utilizaram marcadores AFLP para detectar alta variabilidade genética entre os isolados, havendo a separação de haplotipos em dois grupos geneticamente distintos. Da mesma forma, Abd-Elsalam et al. (2003) verificaram alta variabilidade genética dentro e entre populações de *Fusarium* spp, derivadas de cultivares de algodão do Egito, com o uso de marcadores AFLP.

Obtido o perfil genético da população, com base nas seqüências de *tub2* e *tef1*, 14 isolados foram selecionados como representantes da variabilidade genética dentro da população de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* do Brasil, os quais estão representados em negrito nas Figuras 2 e 3.

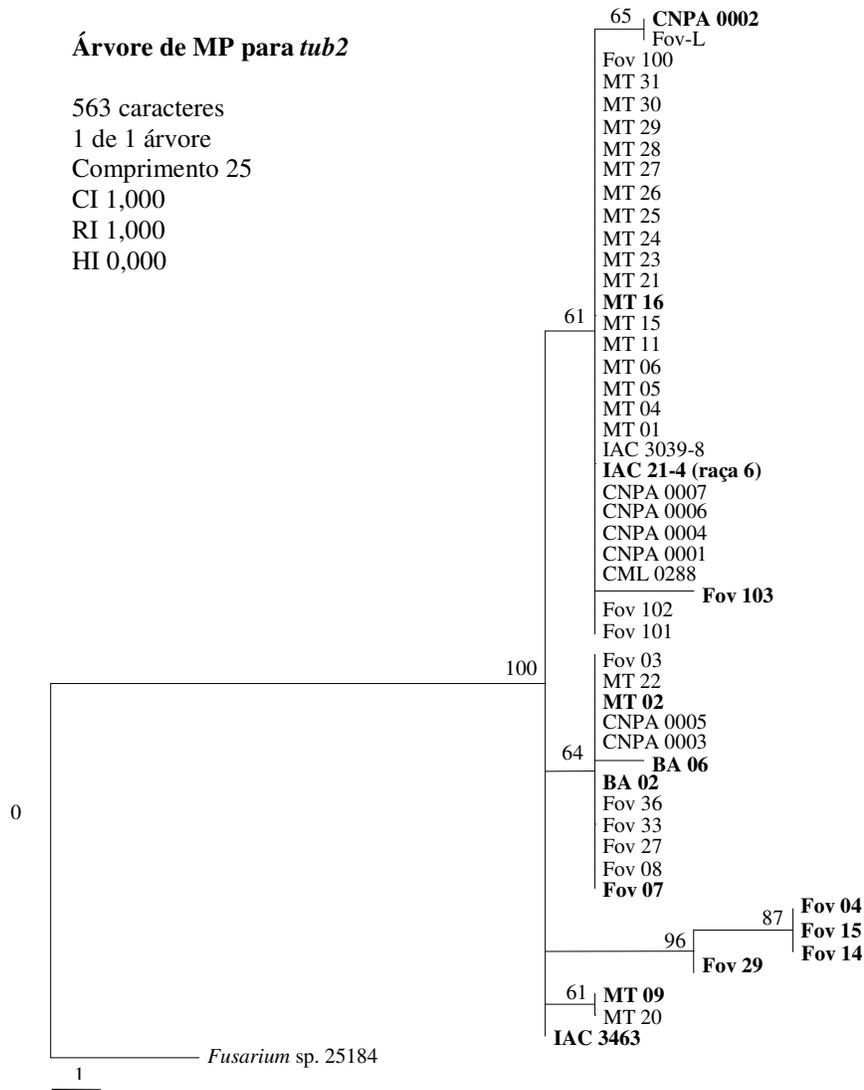


FIGURA 2. Árvore de máxima parcimônia para o gene *tub2* de isolados *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* do Brasil. Os isolados em negrito foram selecionados para a análise com seqüências de outras formae speciales depositadas no GenBank. A escala na base da árvore indica o comprimento dos ramos e os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) estão em porcentagem nos internódios. O isolado *Fusarium* sp. NRRL 25184 foi usado como *outgroup*. UFLA, Lavras, MG, 2008.

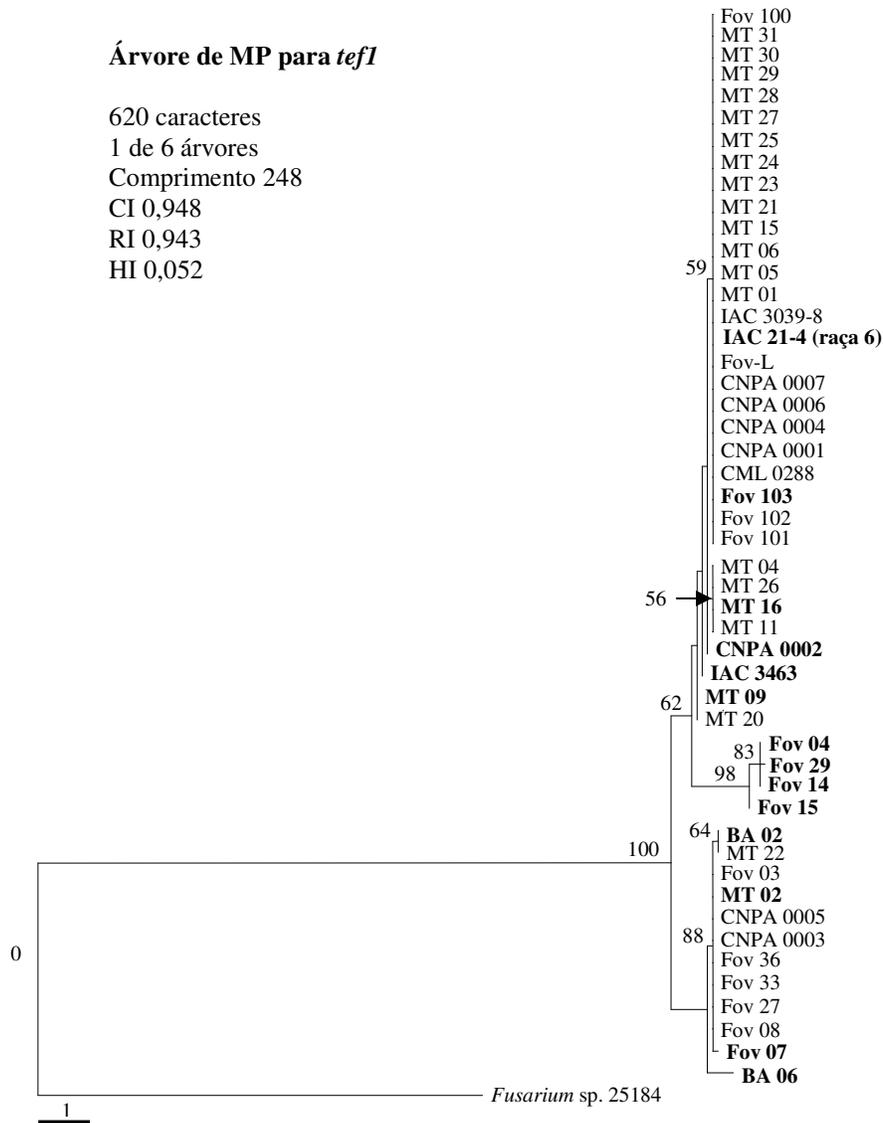


FIGURA 3. Árvore de máxima parcimônia para o gene *tefl* de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* do Brasil. Os isolados em negrito foram selecionados para a análise com seqüências de outras formaes especiais depositadas no GenBank. A escala na base da árvore indica o comprimento dos ramos e os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) estão em porcentagem nos internódios. O isolado *Fusarium* sp. NRRL 25184 foi utilizado para enraizar a árvore. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Utilizando o BLAST, as seqüências dos dois genes, para os 14 isolados do Brasil, foram comparadas com outras seqüências do GenBank. Para *tub2*, a identidade variou de 98% a 99%, quando comparada com uma seqüência FOV14 de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, depositada no GenBank. Por outro lado, para *tef1*, a identidade de nucleotídeos entre os isolados variou de 97% a 100%, comparada com a seqüência NRRL 25420 de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, depositada no GenBank. O máximo de identidade genética obtida pelas seqüências de *tub2* dos isolados do Brasil com a seqüência de FOV14 foi de 99%, exceto para os isolados Fov 04, Fov 14, Fov 15 e Fov 29 (98%). Identidade genética de 100% foi observada entre as seqüências de *tub2* dos isolados IAC 21-4 e MT 16 com as de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (NRRL 25609).

Considerando o gene *tef1*, as maiores identidades foram observadas com as seqüências dos isolados IAC 21-4, IAC 3463, CNPA 0002 e Fov 103 (100%) do algodoeiro, ao passo que as seqüências dos isolados do quiabeiro, Fov 04, Fov 07, Fov14, Fov 15 e Fov 29, juntamente com as obtidas dos isolados de sementes, BA 02 e BA 06, foram as que apresentaram a menor identidade (97%) com a de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* NRRL 25420. O isolado Fov 07 teve a maior identidade com *F. oxysporum* NRRL 25356 (99%) e os isolados MT 09, BA 02 e BA 06 tiveram maiores identidades com *F. oxysporum* f. sp. *cubense* NRRL 25609 (100%), *F. oxysporum* f. sp. *aechmeae* NRRL 22533 (99%) e *F. oxysporum* f. sp. *batatas* NRRL 26409 (99%), respectivamente.

Seqüências dos genes *tub2* e *tef1*, de várias formae speciales de *F. oxysporum*, publicadas por O'Donnell et al. (1998b), Skovgaard et al. (2001) e Kim et al. (2005), foram selecionadas no GenBank e analisadas juntamente com as seqüências dos 14 isolados representantes do Brasil. O agrupamento das seqüências, de cada gene, separadamente, pode ser observado nas Figuras 4 e 5. Para a análise combinada dos genes, foram utilizados os representantes da

variabilidade genética da população do Brasil e os representantes de formaes speciales e das raças de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* que possuíam seqüências disponíveis para os dois genes (*tub2* e *tef1*) (Figura 6).

Na árvore combinada foram identificados cinco clados, dentro do complexo *F. oxysporum*, que podem ser correlacionados com os observados por O'Donnell et al. (1998b), Skovgaard et al. (2001) e Kim et al. (2005) (Tabela 3), os quais observaram o agrupamento de isolados de complexo *F. oxysporum*, bem como isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, em cinco clados distintos.

Os isolados do Brasil foram agrupados em três clados distintos (I, III e V). No clado V, agruparam-se representantes das raças 1, 2 e 6, originários da América do Norte e do Sul e o representante da raça 4, da Índia, juntamente com os isolados IAC 21-4, 103, CNPA 0002, MT 16, IAC 3463 e MT 09, analisados neste estudo, além de outras formaes speciales observadas por O'Donnell et al. (1998b). Da mesma forma, Skovgaard et al. (2001), analisando seqüências de 28 isolados, representantes das diferentes raças do patógeno, verificaram a ocorrência de quatro linhagens diferentes, dentre as quais foi possível observar o agrupamento dos representantes das raças 1, 2 e 6, formando a linhagem II.

Observou-se, no clado V, o agrupamento do representante da raça 6 de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (IAC 21-4), obtido da coleção do Instituto Agrônômico de Campinas, juntamente com a seqüência do mesmo isolado depositada no banco de dados do NCBI (CC-198-6). Este isolado foi obtido de plantas de algodoeiro com sintomas de murcha e caracterizado como sendo a raça originária do Brasil (Armstrong & Armstrong, 1978). No entanto, há fortes evidências da existência de mais de uma raça no país, devido ao agrupamento de isolados brasileiros com outras raças, além da raça 6 (Figura 6).

Adicionalmente, foram observados dois clados (I e III) com isolados obtidos do quiabeiro e do algodoeiro, que não agruparam isolados de nenhuma

raça conhecida, podendo representar raças ainda não relatadas. No clado I foram agrupados tanto isolados coletados do algodoeiro (MT 02) quanto do quiabeiro (Fov 07), podendo ser encontrados também os isolados obtidos de sementes (BA 02 e BA 06). Já no clado III, agruparam-se apenas isolados do quiabeiro e originários do estado do Maranhão (Fov 04, Fov 14, Fov 15 e Fov 29), apresentando um padrão genético diferente dos demais isolados.

Além do hospedeiro e da origem geográfica, os isolados deste clado apresentaram virulência acima de 50%, sendo agrupados entre os isolados mais virulentos ao algodoeiro, pelo teste de patogenicidade realizado com os 49 isolados usados neste estudo (Tabela 1 Capítulo 2). É importante salientar que os isolados pertencentes a estes dois cladogramas foram os mesmos que apresentaram as menores identidades genéticas, quando comparados com seqüências de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, dos dois genes estudados (*tef1* e *tub2*), depositadas no GenBank. Diante deste padrão diferenciado, há evidências de que este grupo de isolados pode ser caracterizado como uma população específica do patógeno, podendo estar relacionada com o hospedeiro, no caso dos isolados do clado III. Contudo, quanto ao clado II, por apresentar isolados de várias localidades, torna evidente a necessidade de se estudar a possível ocorrência de novas raças do patógeno, mesmo sendo estes isolados obtidos dos hospedeiros diferenciadores da raça 6 (*G. hirsutum* e *A. sculentus*).

Com exceção do clado III, não foi possível observar correlação entre os agrupamentos genéticos, a origem geográfica e a virulência dos isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* do Brasil, havendo a distribuição de isolados de mesma procedência em cladogramas diferentes, bem como isolados com variação na virulência, agrupados no mesmo clado (Figura 6). Diferentemente do observado neste estudo, Skovgaard et al. (2001) observaram correlação entre virulência e origem geográfica entre todas as linhagens de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Vale ressaltar que os autores realizaram o estudo evolucionário das raças do

patógeno, ao passo que, no presente trabalho, estudaram-se a caracterização molecular e a filogenia de um grupo de isolados do patógeno.

Kim et al. (2005), em estudo da diversidade genética da população de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, relacionaram a variabilidade genética e a diferença em patogenicidade, observadas dentro da população, à possível introdução do patógeno de várias áreas do mundo.

Nenhum representante de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* do Brasil foi agrupado nos clados II e IV. Apenas um representante desta forma *specialis* da raça 3, originário do Egito foi agrupado no clado IV e um representante da Austrália no clado II (Figura 6).

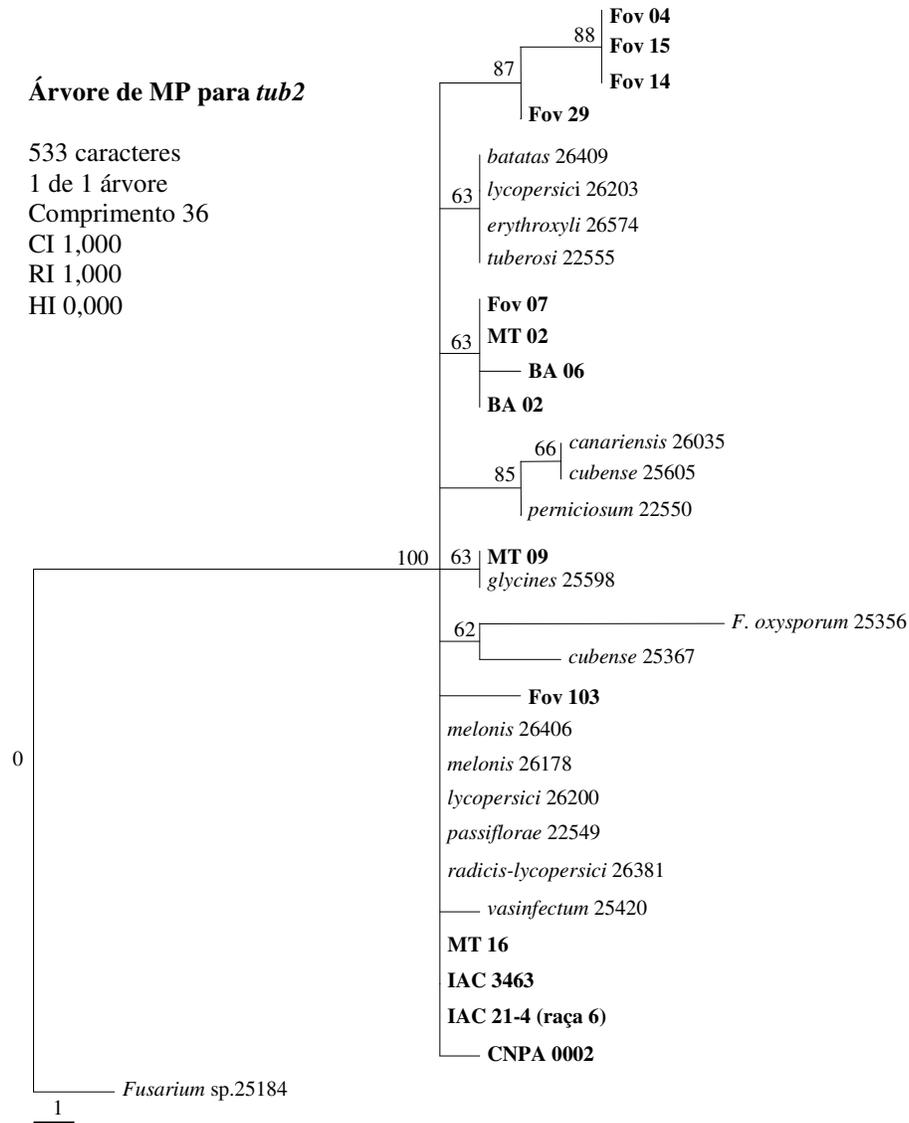


FIGURA 4. Árvore filogenética de máxima parcimônia para o gene *tub2* de formaes especiais de *Fusarium oxysporum*, incluindo isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* do Brasil (negrito). A escala na base da árvore indica o comprimento dos ramos e os valores de *bootstrap* (1000 repetições) estão em porcentagem nos internódios. O isolado *Fusarium* sp. NRRL 25184 foi usado como *outgroup*. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Árvore de MP para *tef1*

624 caracteres  
 1 de 144 árvores  
 Comprimento 112  
 CI 0,893  
 RI 0,958  
 HI 0,107

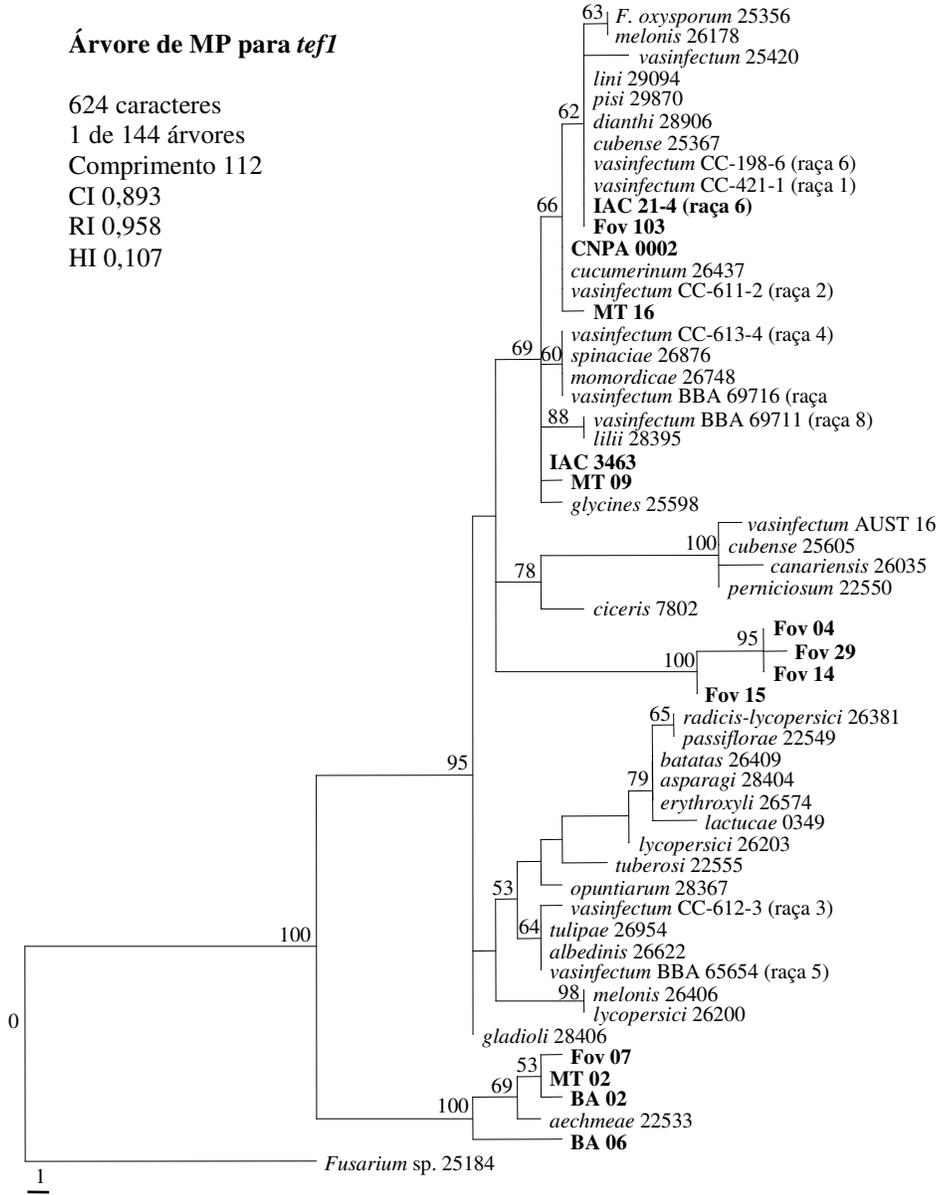


FIGURA 5. Árvore filogenética de máxima parcimônia para *tef1* de formas especiais de *Fusarium oxysporum*, incluindo isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* do Brasil (negrito). A escala na base da árvore indica o comprimento dos ramos e os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) estão em porcentagem nos internódios. O isolado *Fusarium* sp. NRRL 25184 foi usado como *outgroup*. UFLA, Lavras, MG, 2008.

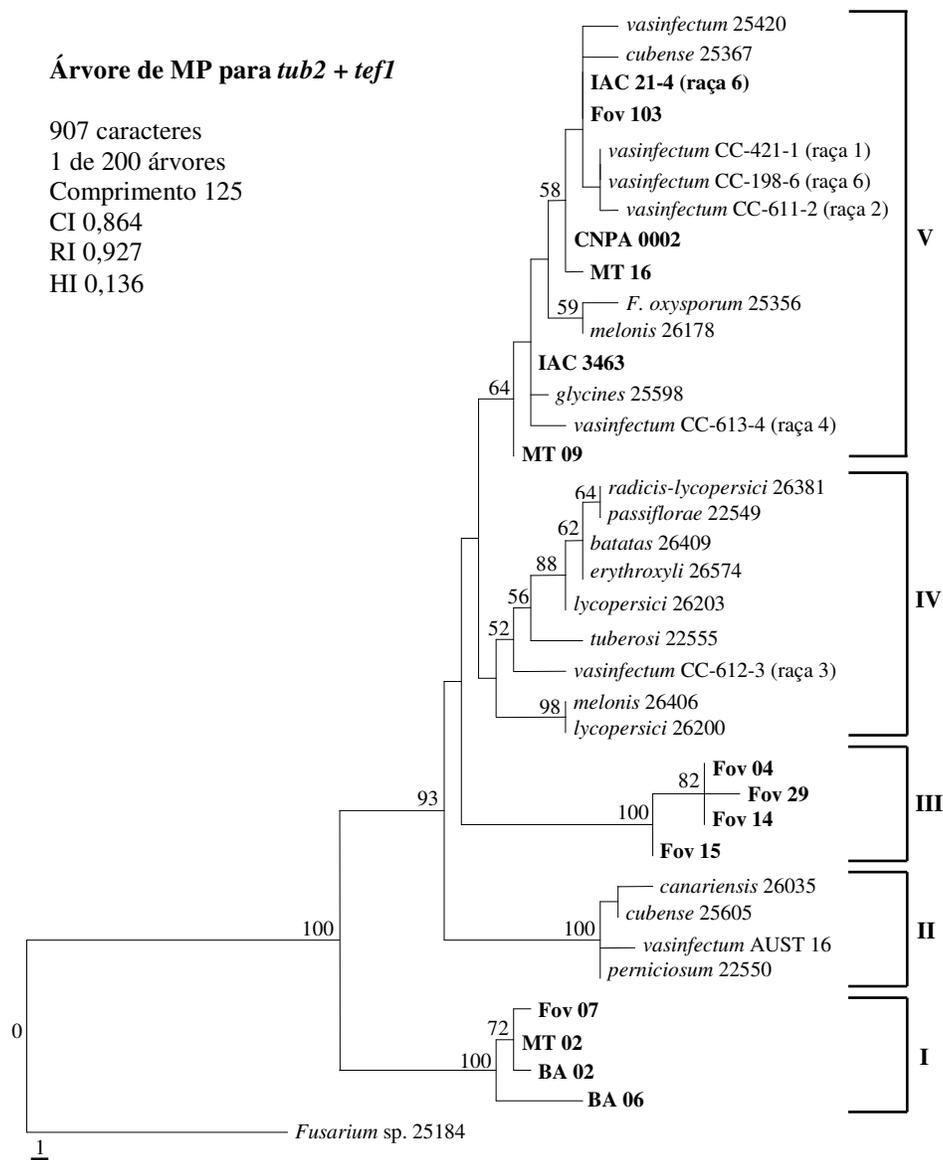


FIGURA 6. Árvore filogenética de máxima parcimônia de seqüências combinadas de *tub2* e *tef1* de formaes especiais de *Fusarium oxysporum* e de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* do Brasil (negrito). A escala na base da árvore indica o comprimento dos ramos e os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) estão em porcentagem nos internódios. O isolado *Fusarium* sp. NRRL 25184 foi utilizado para enraizar a árvore. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Devido às diferenças genéticas observadas entre os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* coletados no Brasil, foi realizada uma nova caracterização morfológica, no intuito de verificar possíveis variações com relação às características fenotípicas dos 14 isolados representantes da população. Contudo, não foi possível detectar diferenças que pudessem ser correlacionadas com os agrupamentos filogenéticos.

No presente estudo, foi possível verificar com maior clareza que a forma *specialis vasinfectum*, no Brasil, é um grupo geneticamente heterogêneo, com origem polifilética e com dois grupos monofiléticos bem definidos (clados I e III). Esses resultados reforçam os já relatados na literatura para populações do patógeno de outras localidades. Com base na patogenicidade e na análise combinada de seqüências dos genes do fator de alongação-1 $\alpha$  (*tef1*), da  $\beta$ -tubulina (*tub2*) e da fosfato permease (PHO), Kim et al. (2005) observaram ampla diversidade genética e patogênica dos isolados da Califórnia (EUA), que foram divididos em cinco linhagens, sendo relatada a ocorrência de três raças (3, 4 e 8) que ainda não existiam no estado. Em conclusão ao trabalho, os autores sugeriram que *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* tem origem polifilética, 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.

O estudo usando a genealogia de genes também foi realizado para determinar a variabilidade genética dentro de uma população de 70 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* Matuo & K. Sato. Variações na sintomatologia e na patogenicidade propiciaram classificar o patógeno em dois patótipos e oito raças. No entanto, a análise de seqüências do EF-1 $\alpha$ , BT, histona 3, actina e da calmodulina indicou origem evolucionária a partir de uma pequena população ou

de um único indivíduo, sendo a forma *specialis ciceris* considerada monofilética (Jiménez-Gasco et al., 2002). Por outro lado, para a forma *specialis cubense* Snyder & Hansen, 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).

Devido ao fato de os hospedeiros de uma determinada forma *specialis* serem, geralmente, bastante relacionados, acreditava-se que os isolados representantes da forma *specialis* tivessem o mesmo comportamento, o que resultaria em um ancestral comum (Kistler, 1997). No entanto, na medida em que os estudos avançaram, observaram-se comportamentos variados das formas *specialis* do complexo *F. oxysporum*, quanto à origem filogenética. Em algumas, a baixa diversidade genética 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., 1998a; Baayen et al., 2000).

Adicionalmente, foi mostrado que isolados do quiabeiro e do algodoeiro do Brasil podem pertencer a um mesmo grupo filogenético. Neste caso, o quiabeiro e, possivelmente, outras plantas podem servir como fonte de inóculo para a murcha do algodoeiro, caso as culturas sejam conduzidas em uma mesma localidade. Dessa forma, o patógeno pode sobreviver no solo e nos restos das culturas hospedeiras por longos períodos de tempo.

Por outro lado, os isolados que apresentaram características genéticas diferentes dos demais devem ser mais bem estudados e testados em espécies e variedades diferenciadoras para confirmar a presença de outras raças deste patógeno no Brasil, ou se estes isolados fazem parte de uma nova população ou espécie do complexo *F. oxysporum*.

## 6 CONCLUSÕES

1. Da mesma forma que o observado em outros trabalhos, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, no Brasil, forma um grupo heterogêneo com alta variabilidade genética entre os seus representantes.
2. A população do patógeno, provavelmente, evoluiu a partir de ancestrais distintos, resultando em grupos polifiléticos independentes da virulência e do local de origem, exceto para o grupo de isolados do quiabeiro.
3. Há evidências da ocorrência de outras raças do patógeno, além da raça 6, devido ao agrupamento de isolados em clados distintos daqueles que agruparam os representantes das raças já descritas.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELSALAM, K. A.; SCHNIEDER, F.; KHALIL, M. S.; ASRAN-AMAL, A.; VERREET, J-A. Use of AFLP fingerprinting to analyze genetic variation within and between populations of *Fusarium* spp. Derived from Egyptian cotton cultivars. **Journal of Plant Pathology**, Berlin, v. 85, n. 2, p. 99-103, 2003.

ABO, K.; KLEIN, K. K.; EDEL-HERMANN, V.; GAUTHERON, N.; TRAORE, D.; STEINBERG, C. High genetic diversity among strains of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* from cotton in Ivory Coast. **Phytopathology**, St. Paul, v. 95, n. 12, p. 1391-1396, Dec. 2005.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, Sept. 1997.

ARMSTRONG, G. M.; ARMSTRONG, J. K. A new race (race 6) of the cotton-wilt *Fusarium* from Brazil. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 62, n. 5, p. 421-423, May 1978.

ASSIGBETSE, K. B.; FERNANDEZ, D.; DUBOIS, M. P.; GEIGER, J. P. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, n. 6, p. 622-626, June 1994.

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

DAVIS, R.M.; COLYER, P.D.; ROTHROCK, C.S.; KOCHMAN, J.K. *Fusarium* wilt of cotton: population diversity and implications for management. **Plant Disease**, v. 90, n. 6, p. 692-708, June. 2006.

GEISER, D. M.; JIMENEZ-GASCO, M. M.; KANG, S.; MAKALOWSKA, I.; VEERARAGHAVAN, N.; WARD, T. J.; ZHANG, N.; KULDAU, G. A.; O'DONNELL, K. FUSARIUM-ID v. 1.0: DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 5/6, p. 473-479, June 2004.

- GORDON, T. R.; MARTYN, R. D. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. **Annual Review Phytopathology**, v. 35, p. 111-128, 1997.
- HALL, T. A BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/Me/XP/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, p. 95-98, 1999.
- JIMÉNEZ-GASCO, M. M.; MILGROOM, M. G.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. Gene genealogies support *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* as a monophyletic group. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 1, p. 72-77, Jan. 2002.
- KIM, Y.; HUTMACHER, R. B.; DAVIS, R. M. Characterization of California isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, n. 4, p. 366-372, Abr. 2005.
- KISTLER, H. C. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 4, p. 474-479, Apr. 1997.
- KRISTENSEN, R.; TORP, M.; KOSIAK, B.; HOLST-JENSEN, A. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. **Mycological research**, v. 109, n. 2, p. 173-186, Feb. 2005.
- MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 8, n. 19, p. 4321-4325, Oct. 1980.
- O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 7, n. 1, p. 103-116, Feb. 1997.
- O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York, v. 90, n. 3, p. 465-493, May/June 1998a.
- 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. **Applied Biological Sciences**, Washington, v. 95, p. 2044-2049, Mar. 1998b.

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

SWOFFORD, D.L. **PAUP\***: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods). Version 4.0b10, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2000.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, Nov. 1994.

WANG, B.; BRUBAKER, C. L.; TATE, W.; WOODS, M. J.; MATHESON, B. A.; BURDON, J. J. Genetic variation and population structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in Australia. **Plant Pathology**, Oxford, v. 55, n. 6, p. 746-755, Dec. 2006.

## CAPÍTULO 4

### TRANSMISSIBILIDADE E EFEITOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* EM SEMENTES DE ALGODOEIRO

## 1 RESUMO

ARAÚJO, Dejânia Vieira. Transmissibilidade e efeitos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro. In:\_\_\_\_\_. **Caracterização molecular, patogenicidade e transmissão pela semente de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em algodoeiro.** 2008. Cap. 4 p. 65-99 Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.\*

O objetivo neste trabalho foi avaliar a transmissão de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov) e os efeitos do patógeno a partir de sementes de algodoeiro, inoculadas pela técnica de condicionamento fisiológico. Foram usadas sementes de duas cultivares de algodoeiro, IAC 20-233 (resistente) e FM 966 (suscetível), e dois isolados, Fov 102 e BA 06, selecionados, previamente, com base na patogenicidade. Os tratamentos foram compostos por sementes das duas cultivares inoculadas com os dois isolados em diferentes tempos de exposição ao patógeno (0, 48, 72 e 108 horas). Após a inoculação, as sementes com diferentes potenciais de inóculo foram submetidas a testes de sanidade, germinação e de vigor, aos 25 d.a.s. As variáveis analisadas foram: percentual de ocorrência do fungo nas sementes, percentual de germinação, índice de velocidade de emergência (IVE), estandes inicial e final, além de altura e peso seco de plantas. A transmissibilidade do patógeno, da semente para a planta, foi determinada com base na severidade da doença (ID) em plantas com 45 dias de idade, cultivadas em vasos com substrato solo e areia, e as taxas de infecção e de transmissão determinadas com base na presença do patógeno em fragmentos de tecidos de hastes das plantas. O efeito do patógeno foi maior com o aumento do potencial de inóculo, em todas as variáveis avaliadas. A porcentagem de germinação foi inversamente proporcional à incidência e ao potencial de inóculo nas sementes. O mesmo ocorreu com o IVE, estandes inicial e final, altura de plantas e peso seco, em que foram observadas diferenças entre as cultivares, sendo a cv. IAC 20-233, considerada mais resistente e a que apresentou desempenho superior quando comparada com a cv. FM 966. Não foi observada diferença entre os isolados, exceto para o IVE avaliado na cv. IAC 20-233, na qual o isolado BA 06 causou um menor valor deste índice. As taxas de infecção e de transmissão foram crescentes com os potenciais de inóculo, sendo a taxa máxima de transmissão do patógeno da semente para a planta em torno de 50 %.

---

\*Comitê orientador: José da Cruz Machado – UFLA (orientador); Ludwig Heinrich Pfenning – UFLA; Antonia dos Reis Figueira – UFLA.

## 2 ABSTRACT

ARAÚJO, Dejânia Vieira. Transmissibility and effects of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in cotton seeds. In:\_\_\_\_\_. **Molecular characterization, pathogenicity and transmission by seeds of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in cotton.** 2008. Cap. 4 p. 65-99. Thesis (Doctorate in Phytopatology). Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.\*

The objective in this work was to evaluate the transmission of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (*Fov*) and the effects of this pathogen in cotton seeds inoculated by the physiologic conditioning technique. Seeds of the cv. IAC 20-233 (resistant) and FM 966 (susceptible) and the strains, Fov 102 and BA 06 were used following selection based on pathogenicity assay. Treatments were composed by seeds of the two cultivars inoculated with two strains in different exposition times to the pathogen (0, 48, 72 and 108 h). After inoculation, seeds with different inoculum potentials were submitted to health, germination and vigour tests, 25 days after sowing. The following variables: percentage of fungus on the seeds, percentage of seed germination, emergence index, initial and final stands, size and dry weight of plants were analyzed. Pathogen transmissibility, from seed to plant, was determined based on disease severity on plants with 45-day-old grown in pots containing a mixture of the soil and sand. Transmission and infection rates were measured based on presence of the pathogen in tissue fragments of plant stems. Effects of the pathogen were higher when inoculum potential was increased, for all variables analyzed. Percentage of seed germination was inversely proportional to incidence and to inoculum potential. The same occurred to emergence index, initial and final stand, size and dry weight of plants, in which it was verified difference between cultivars, being the cv. IAC 20-233, considered resistant, presenting higher performance compared to FM 966 cultivar. Strains did not present difference in behaviour, except for emergence index on cv. IAC 20-233 to which the BA 06 strain caused lower index value. Transmission and infection rates were increased with the inoculum potentials and the maximum pathogen transmission, from seed to plant, was around 50 %.

---

\*Advising Committee: José da Cruz Machado – UFLA (Adviser); Ludwig Heinrich Pfenning – UFLA; Antonia dos Reis Figueira – UFLA

### 3 INTRODUÇÃO

A murcha de fusarium, cujo agente etiológico é *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, é uma das mais importantes doenças do algodão, podendo ser um sério limitador da produção desta cultura em países da África, Ásia, América Latina e na Austrália. (Davis et al., 1996). O processo de parasitismo, neste caso, tem início com a invasão das raízes pelo patógeno, resultando na oclusão dos tecidos vasculares, determinada pelo efeito combinado da produção de metabólitos fúngicos e a produção de substâncias de defesa do hospedeiro (Dowd et al., 2004). O patógeno é considerado de solo, caracterizando-se por uma fase parasítica, no interior de plantas e uma fase saprofítica, no solo ou em resíduos de plantas após a colheita (Wang et al., 2006).

Além do solo, o fungo pode ser disseminado por sementes, por material vegetal e por implementos agrícolas contaminados (Hillocks & Kibani, 2002). A transmissibilidade de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* por sementes ainda é um tema pouco elucidado, havendo relatos da ocorrência do patógeno, variando de 0,6% a 47% nas sementes analisadas (Kulkarni, 1934; Veigas, 1935; Perry, 1962)

O uso de cultivares resistentes tem sido a medida mais efetiva para o controle da doença. No entanto, o sucesso dos programas de melhoramento depende do entendimento da estrutura populacional de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, bem como do modo como o patógeno é transmitido (Wang et al., 2006). A transmissibilidade do patógeno da semente para a planta ainda é um desafio para os pesquisadores em fitopatologia. Isso se deve, principalmente, à dificuldade em avaliar a sua ocorrência nos momentos iniciais da infecção, visto que ele coloniza os tecidos internos da planta e os sintomas em plântulas podem ser confundidos com tombamento associado a outros patógenos (Smith et al., 1981).

Não existem trabalhos que evidenciem o efeito e a transmissibilidade de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodão, levando-se em consideração diferentes cultivares e graus de infecção diferenciados. Estes fatores, além de outros de natureza epidemiológica, são necessários, principalmente porque este patógeno tem sido considerado uma praga não quarentenária regulamentável (Machado, 1994). Nesta condição, a determinação de padrões de sanidade, como parte de programas de certificação no país, torna-se necessário. A determinação da taxa de transmissão do patógeno é, portanto, indispensável para a obtenção do referido padrão de qualidade.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a transmissão de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* por sementes de algodoeiro, bem como os efeitos desta interação em condições controladas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia e no Laboratório de Sementes do Departamento de Agricultura, ambos da Universidade Federal de Lavras.

### 4.1 Perfil fisiológico e sanitário das cultivares de algodoeiro

Foram utilizadas sementes das cultivares, IAC 20-233 e FM 966, fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC), consideradas ‘resistente’ e ‘suscetível’ à murcha de fusarium, respectivamente. Para a remoção do linter das sementes da cv. IAC 20-233, foi necessário o uso de tratamento químico com ácido sulfúrico, seguido da neutralização das sementes com carbonato de cálcio 2% (Kikuti et al., 2002). As sementes de ambas as cultivares foram selecionadas por densidade em água, para a retirada de sementes chochas e danificadas por insetos. Após esse processo, foram realizados os testes de germinação e sanidade, no intuito de avaliar o perfil inicial das sementes. O teste de germinação foi realizado em rolo de papel germitest, nos quais foram distribuídas 25 sementes por rolo, totalizando 200 sementes por cultivar e conduzido de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Para o teste de sanidade, foi utilizado o método de incubação em substrato de papel (*Blotter Test*) umedecido em água destilada e esterilizada (Neergaard, 1979), acrescida de 2,4-D, na concentração de 10 ppm (Machado & Langerak, 1993).

Os resultados, tanto de germinação quanto de sanidade, foram transformados em porcentagem de plântulas normais e incidência de fungos nas sementes, respectivamente.

#### **4.2 Seleção dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum***

Foram utilizados dois isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, Fov 102 e BA 02, os quais foram selecionados de acordo com a virulência apresentada no teste de patogenicidade realizado com 49 isolados do patógeno. Neste teste, o isolado Fov 102 apresentou a maior porcentagem de severidade dos sintomas observados, tanto na parte aérea (80%) como no sistema vascular (75%) de plântulas de algodoeiro. Da mesma forma, o isolado BA 02 foi escolhido por apresentar severidade moderada (28,3%) na parte aérea das plântulas, quando comparado com os outros isolados (Tabela 2, capítulo 2).

#### **4.3 Inoculação das sementes**

Os isolados foram transferidos para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio SNA, que foram mantidas em BOD a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. Após esse período, realizou-se a lavagem das placas, que apresentaram crescimento vigoroso, sendo a suspensão de conídios ajustada para  $10^6$  conídios/mL. Um mililitro da suspensão de conídios de cada isolado, separadamente, foi transferido para placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo meio BDA + manitol. O potencial hídrico do meio foi ajustado para -1 MPa pelo software SPPM (Michel & Radcliffe, 1995) e o inóculo foi distribuído uniformemente sobre o substrato com alça de Drigalski. Novamente, as placas foram incubadas em BOD, a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas, por três dias.

De acordo com a literatura, a adição do soluto manitol ao meio de cultura e o uso do potencial hídrico ajustado em -1 MPa proporcionam maiores índices de infecção de sementes de algodoeiro inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, sem inviabilizar as sementes (Machado et al., 2004).

A inoculação foi realizada com sementes das duas cultivares desinfestadas, em hipoclorito de sódio 2%, por um minuto e secas ao ar, por 24 horas. As sementes foram dispostas sobre o meio de cultura com o fungo, brevemente agitadas e incubadas em BOD, nas condições citadas anteriormente. Os tempos de exposição das sementes ao fungo foram de 0, 48, 72 e 108 horas, considerando as duas cultivares e os dois isolados. Os tempos de exposição das sementes ao patógeno possibilitam a obtenção de sementes com diferentes potenciais de inóculo. O tempo zero foi constituído por sementes, das duas cultivares, desinfestadas e sem inoculação. Ao completar cada tempo de exposição, as sementes foram retiradas da incubação e dispostas sobre papel, no qual permaneceram, em temperatura ambiente, por dois dias. Após a secagem, parte das sementes foi destinada aos testes e a outra parte acondicionada em sacos de papel e armazenada, em câmara a 10°C e 50% de umidade relativa.

#### **4.4 Checagem preliminar da qualidade sanitária e da germinação das sementes inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum***

##### **4.4.1 Teste de sanidade**

As sementes inoculadas foram submetidas à assepsia com hipoclorito de sódio 2%, por 30 segundos, secas em ambiente por 12 horas e submetidas ao teste de sanidade. A desinfestação das sementes, nesta fase, foi realizada com o propósito de determinar a porcentagem de sementes infectadas pelo patógeno. O teste utilizado foi o de incubação em substrato de papel, modificado pela adição de meio líquido, semi-seletivo, contendo PCNB (pentacloronitrobenzeno) acrescido de manitol (Sousa, 2006).

Após sete dias de incubação em temperatura de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas, as sementes foram analisadas no microscópio estereoscópico. A

incidência de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* foi dada em porcentagem de ocorrência do patógeno em 200 sementes por tratamento.

#### **4.4.2 Teste de germinação**

Foram utilizadas 200 sementes por cultivar, inoculadas com os isolados, de acordo com o citado anteriormente. Ao contrário do teste de sanidade, as sementes não foram, previamente, desinfestadas. O teste foi realizado conforme as Regras para Análises de Sementes (Brasil, 1992) e o resultado foi dado em porcentagem de plântulas normais.

Os testes, de sanidade e de germinação, foram conduzidos em blocos inteiramente casualizados, com oito repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri ou um rolo de papel, de acordo com o teste.

#### **4.5 Avaliação da transmissibilidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em plantas de algodoeiro a partir de sementes inoculadas**

A transmissibilidade de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* foi avaliada em plantas com 45 dias após semeadura. Foram semeadas 10 sementes, de cada tratamento, em vasos de polietileno com capacidade para 5 kg de substrato solo e areia esterilizado com brometo de metila, na proporção 1:1. O experimento foi conduzido em blocos casualizados com quatro repetições e mantido em câmara de crescimento vegetal, a  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas.

A transmissibilidade foi determinada com base na severidade da doença (ID), na taxa de infecção (TI) e na taxa de transmissão (TT).

##### **4.5.1 Severidade da doença (ID) avaliada em plantas de algodoeiro**

A avaliação dos sintomas foi realizada observando-se a parte aérea das plantas (folhas e hastes) e atribuindo-se notas de acordo com a escala descrita a seguir: nota 0 = plantas saudáveis; 1 = plantas murchas; 2 = plantas mortas e 3 = não emergidas. Os dados foram ponderados aplicando-se a fórmula descrita por McKinney (1923).

$$ID (\%) = [\Sigma(f.v)/n.x]*100$$

em que,

ID = índice de doença; f = número de plântulas com determinada nota; v = nota observada; n = número total de plântulas avaliadas; x = grau máximo de severidade da escala.

#### **4.5.2 Taxa de infecção (TI) e de transmissão (TT) de *Fusarium oxysporum* f. *sp. vasinfectum* a partir de sementes inoculadas**

As taxas de infecção (TI) e de transmissão (TT) de *F. oxysporum* f. *vasinfectum* para a parte aérea foram determinadas utilizando-se a metodologia adaptada de Teixeira & Machado (2003). Para determinar a TI, fragmentos de aproximadamente três centímetros, da haste de todas as plantas das parcelas, foram seccionados, longitudinalmente e desinfestados com hipoclorito de sódio 2%, por um minuto, enxaguados três vezes em água destilada esterilizada e colocados em placas de Petri de 15 cm de diâmetro com meio de cultura com PCNB (Sousa, 2006). Cada fragmento seccionado representou uma planta da parcela. As placas foram mantidas em incubação, a  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. Após esse período, as placas foram analisadas em microscópio estereoscópico e verificada a ocorrência de crescimento micelial sobre os fragmentos e no meio de cultura, bem como a pigmentação roxa, causada pelo crescimento do fungo.

De acordo com Sousa (2006), essa pigmentação roxa é intensificada quando o patógeno cresce em substrato contendo PCNB.

A TI, em porcentagem, foi obtida considerando-se o número de fragmentos com crescimento micelial em função do número de plantas avaliadas em cada parcela. A TT foi determinada com base na TI e na incidência de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* verificada nas sementes inoculadas.

$$T.T (\%) = [T.I (\%)/I.S (\%)] * 100$$

em que,

T.T = taxa de transmissão; T.I = taxa de infecção; I.S = incidência do patógeno em sementes inoculadas.

#### **4.6 Efeito de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* na qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro**

Para este estudo, as avaliações foram realizadas em caixas de polietileno com dimensões de 48 x 29 x 10 cm, contendo substrato composto por solo e areia na proporção de 1:1, previamente tratado com brometo de metila. Foram semeadas 200 sementes por tratamento, sendo distribuídas 50 sementes por caixa. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento vegetal com temperatura de 25±3°C e fotoperíodo de 12 horas, por 25 dias após a semeadura (d.a.s). Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições.

As variáveis avaliadas foram: índice de velocidade de emergência (IVE), estande inicial, estande final, altura de plântulas e peso seco da parte aérea.

##### **4.6.1 Índice de velocidade de emergência (IVE)**

A emergência de plântulas foi determinada pela contagem diária de plântulas emergidas. Foram consideradas emergidas as plântulas que apresentaram os cotilédones acima do nível do solo. A contagem foi feita até a estabilização do número de plântulas emergidas, por três dias consecutivos.

O índice de velocidade de emergência foi calculado de acordo com Maguire (1962).

$$\text{IVE} = \sum_{i=1}^n N_i/D_i$$

em que,

IVE = índice de velocidade de emergência;  $N_i$  = número de plântulas emergidas na 1ª contagem, 2ª contagem, ... enésima contagem, respectivamente;  $D_i$  = número de dias após semeadura na 1ª contagem, 2ª contagem, ... enésima contagem, respectivamente;

#### **4.6.2 Estandes inicial e final, altura de plântulas e peso seco da parte aérea**

Os estandes, inicial e final, foram obtidos aos 8 e aos 25 dias após a semeadura, sendo o valor absoluto transformado em porcentagem.

Os dados sobre altura de plântulas (cm) foram obtidos medindo-se, aleatoriamente, 10 plântulas, por repetição.

Por fim, foi realizado o corte, na altura do solo, de todas as plântulas de cada repetição, as quais foram submetidas ao processo de secagem em estufa com fluxo de ar forçado, à temperatura de 50°C. Após 72 horas de secagem, o material foi pesado em balança semi-analítica e os resultados apresentados em gramas.

#### **4.7 Análise dos dados**

As análises de variâncias, dos ensaios de transmissão e de efeito do patógeno, foram realizadas em esquema fatorial 4 x 2 x 2 (tempos de exposição das sementes; cultivares; isolados) no programa Sisvar (Ferreira, 2000). Os dados foram transformados para  $\sqrt{x}$  ou  $\sqrt{x + 0,5}$  quando necessário. As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) ou de regressão, de acordo com a natureza dos dados.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Perfil inicial das sementes

Sementes das cultivares IAC 20-233 (resistente) e FM 966 (suscetível) apresentaram, inicialmente, 85% e 72% de germinação e 1,5% e 0% de incidência de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, respectivamente.

### 5.2 Qualidade sanitária e germinação das sementes inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

Na avaliação da germinação de sementes, houve diferença significativa para a interação entre os fatores tempo de exposição *versus* cultivar e isolado *versus* cultivar. Observou-se que a porcentagem de germinação, nas duas cultivares, foi, proporcionalmente, menor com o aumento do potencial de inóculo nas sementes, representado pelos tempos de exposição das sementes ao patógeno (Figura 1). Comparando-se o desempenho das cultivares em cada tempo, foi possível observar a maior porcentagem de plântulas normais na cv. IAC 20-233, em todos os potenciais de inóculo (Tabela 1). A inoculação das sementes, utilizando a técnica de condicionamento fisiológico ou restrição hídrica, foi favorável à maior infecção pelo patógeno, com conseqüente efeito nas características fisiológicas das sementes. Esse efeito foi maior com o aumento do tempo de contato controlado das sementes com o patógeno. Estes resultados confirmam informações de outros trabalhos, envolvendo inoculação de sementes de algodão com a técnica de condicionamento osmótico (Machado et al., 2004; Teixeira et al., 2005; Araújo et al., 2006; Sousa, 2006).

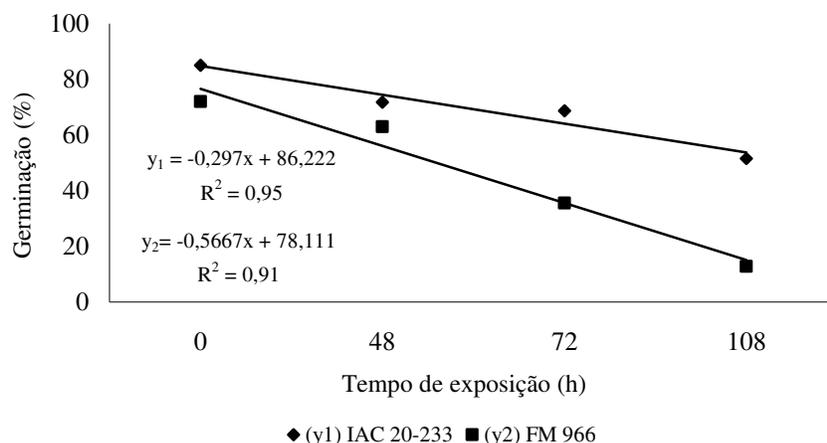


FIGURA 1. Germinação de sementes das cultivares de algodoeiro, em função do tempo de exposição das sementes ao patógeno, UFLA, Lavras, MG, 2008.

Comparando-se o efeito dos isolados na germinação das cultivares, observou-se que a cv. IAC 20-233 apresentou desempenho superior ao da cv. FM 966 na presença dos dois isolados, no entanto, não houve diferença, entre os isolados Fov 102 e BA 06, dentro da cultivar IAC 20-233 (Tabela 2). Este resultado pode estar diretamente relacionado com o genoma e com a qualidade fisiológica inicial das cultivares. Na análise do perfil inicial das sementes, a cv. IAC 20-233 apresentou melhor condição fisiológica. Este resultado foi observado em decorrência da maior porcentagem de germinação das sementes desta cultivar em relação às da cv. FM 966. Mesmo sendo considerada ‘resistente’ à fusariose, a presença de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* nas sementes da cv. IAC 20-233, na forma infectante, proporcionou a redução na porcentagem de germinação da ordem de 21% e 22%, para os isolados Fov 102 e BA 06, respectivamente.

TABELA 1. Germinação de sementes de algodoeiro inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Análise de cultivares, em função do tempo de exposição das sementes ao patógeno. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Cultivar	Germinação (%)*			
	0 h	48 h	72 h	108 h
IAC 20-233	85 a	72 a	69 a	51 a
FM 966	72 b	63 b	35 b	13 b
CV (%)	16,08			

\*Médias com mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

TABELA 2. Germinação de sementes inoculadas. Análise considerando os isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e as cultivares de algodoeiro. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Isolado	Germinação (%)*	
	IAC 20-233	FM 966
Fov 102	64 A a	33 B b
BA 06	63 A a	41 A b
CV (%)	16,08	

\*Médias com mesma letra, maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Para percentual de ocorrência de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* nas sementes, houve diferença significativa entre os tempos de exposição das sementes ao patógeno. Ao contrário da germinação, a ocorrência do patógeno foi

maior (90% a 99%) com o aumento do potencial de inóculo, sendo observada de forma mais acentuada entre os tempos de 0 e 72 horas de exposição (Figura 2).

A alta ocorrência do patógeno nas sementes inoculadas, por meio de exposição das sementes ao patógeno, comprovou a eficiência do método de inoculação utilizado, havendo, neste caso, a caracterização do efeito gradual crescente do inóculo nas sementes. Dessa forma, é pertinente assumir que este tipo de inoculação pode ser relacionado com potencial de inóculo. Este fato também foi observado em trabalhos relacionados

Os resultados, quanto à ocorrência do patógeno nas sementes em função do tempo de exposição, obtidos neste trabalho, estão de acordo com os disponíveis, na literatura, para outros patossistemas (Teixeira & Machado, 2003; Teixeira et al., 2005; Araújo et al., 2006).

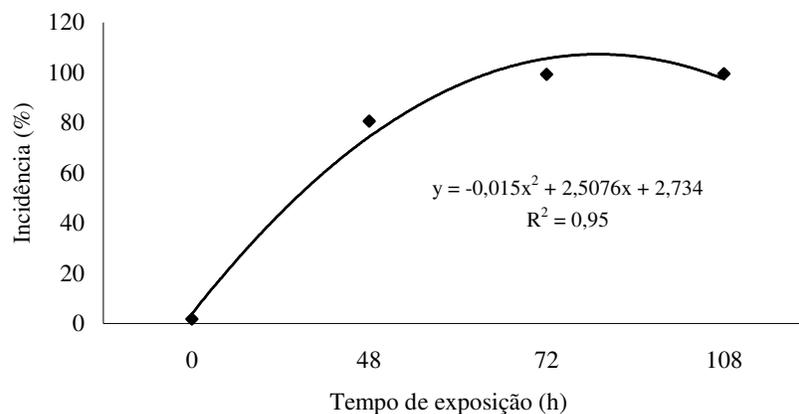


FIGURA 2. Incidência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro, em função do tempo de exposição das sementes ao patógeno. UFLA, Lavras, MG, 2008.

### 5.3 Transmissibilidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* a partir de sementes inoculadas

Na análise de variância para a severidade da doença, medida por meio do índice de doença (ID), observou-se diferença significativa entre os fatores tempo de exposição *versus* cultivar e isolado *versus* cultivar.

O efeito do potencial de inóculo nas sementes, observado no teste de sanidade, refletiu no ID avaliado em plantas de algodoeiro, com 45 dias após a semeadura. Houve aumento do ID quando o potencial de inóculo, obtido pelo tempo de inoculação, foi aumentado de 0 para 108 horas de exposição das sementes ao patógeno, nas duas cultivares avaliadas. O maior percentual de severidade da doença foi observado na cv. FM 966 (89,2%), ao passo que, na cv. IAC 20-233, a severidade foi de 47,5%, representando, aproximadamente, a metade do valor observado na cultivar FM 966, considerada suscetível (Figura 3).

De forma semelhante, Sousa (2006) observou aumento no ID quando o tempo de exposição das sementes a *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* foi aumentado de 24 para 120 horas em estudo, com três métodos de inoculação. Por sua vez, Teixeira et al. (1997) observaram que o tempo de exposição (0, 15 e 30 horas) influenciou no ID de plântulas de algodoeiro, oriundas de sementes inoculadas com *Colletotrichum gossypii* South. Os autores relatam o aumento no ID, tanto em sementes desinfestadas quanto não desinfestadas, após a inoculação de sementes de algodoeiro. Por outro lado, Araújo et al. (2006), avaliando o patossistema *C. gossypii* South. var. *cephalosporioides* A.S. Costa e algodoeiro, verificaram que o potencial de inóculo não proporcionou aumento significativo da incidência e da severidade da doença em plântulas de algodoeiro, em todos os tempo de exposição avaliados (36, 72 e 108 horas), embora estes índices tenham sido elevados já a partir do menor período de exposição da semente ao patógeno.

No presente estudo, observou-se que, entre as cultivares, a severidade da doença foi significativamente maior nos maiores potenciais de inóculo, ou seja, nos tempos de exposição de 72 e de 108 horas (Tabela 3 e Figura 4). Já o efeito dos isolados na severidade foi maior na cv. FM 966 do que na cv. IAC 20-233 (Tabela 4). Novamente, pode-se observar o fator resistência no processo de infecção e de transmissão do patógeno de semente para a planta.

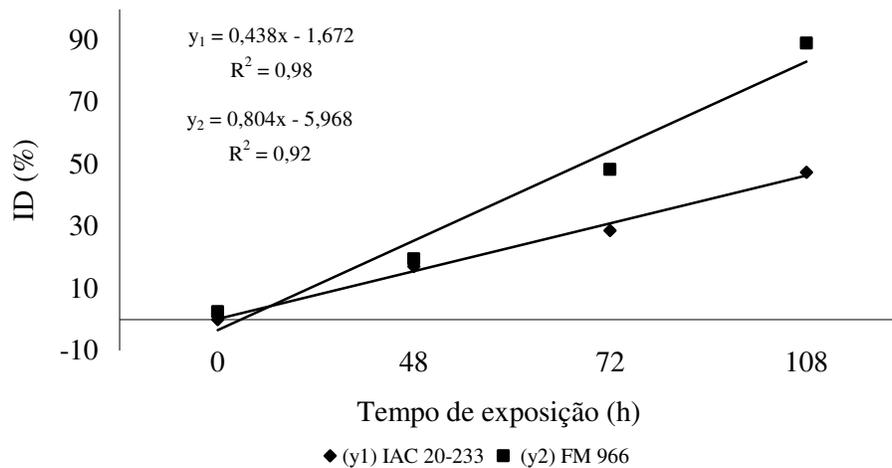


FIGURA 3. Índice de doença (ID) nas cultivares de algodoeiro, em função do tempo de exposição das sementes ao patógeno. UFLA, Lavras, MG, 2008.

TABELA 3. Índice de doença (ID) em plantas de algodoeiro (45d.a.s) provenientes de sementes inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Análise de cultivares, em função de cada tempo de exposição das sementes ao patógeno. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Cultivar	ID (%)*			
	0 h	48 h	72 h	108 h
IAC 20-233	0,0 a	17,1 a	28,7 b	47,5 b
FM 966	2,5 a	19,6 a	48,3 a	89,2 a
CV (%)	20,36			

\*Médias com mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

TABELA 4. Índice de doença (ID) em plantas de algodoeiro (45 d.a.s) provenientes de sementes inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Análise considerando isolados e cultivares. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Isolado	ID (%)*	
	IAC 20-233	FM 966
Fov 102	28,9 A b	52,2 A a
BA 06	33,3 A b	52,5 A a
CV (%)	20,36	

\*Médias com mesma letra, maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

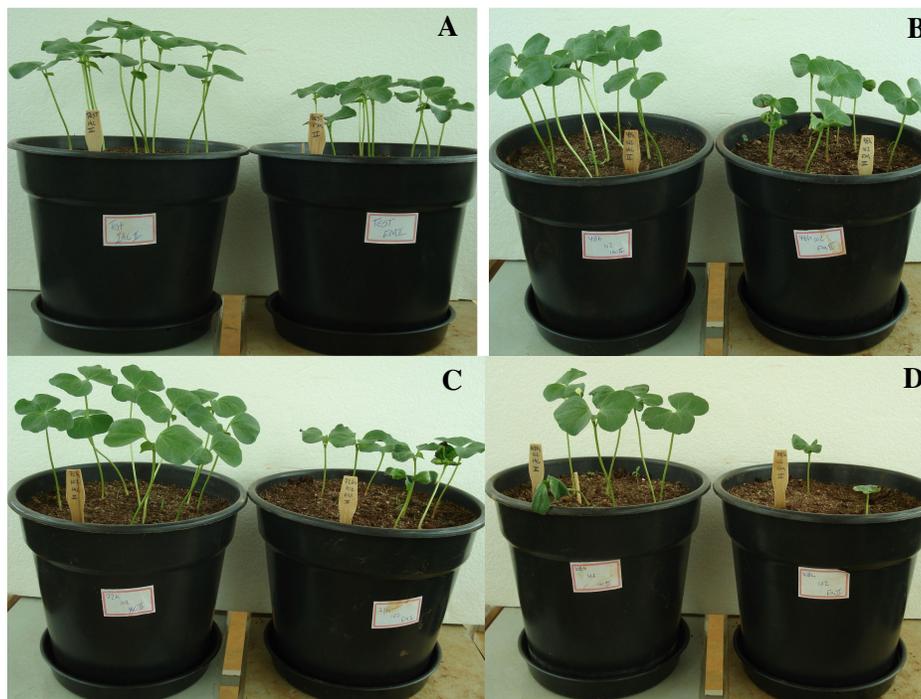


FIGURA 4. Severidade da doença aos 17 dias após a semeadura. Avaliação das cultivares IAC 20-233 (à esquerda) e FM 966 (à direita) inoculadas com o isolado Fov 102, nos tempos de exposição das sementes de (A) 0, (B) 48, (C) 72 e (D) 108 horas. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Na literatura, não existem relatos sobre a transmissibilidade de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* a partir de sementes infectadas de diferentes cultivares de algodoeiro. Neste trabalho, foram avaliadas as taxas de infecção e de transmissão do patógeno, sendo observada diferença significativa apenas para o fator tempo.

As taxas de infecção e de transmissão, avaliadas em fragmentos de hastes de plantas de algodoeiro, foram maiores na proporção do aumento do tempo de exposição, alcançando valor máximo de 51%, em ambos os casos. O ponto de máxima infecção e transmissão foi calculado no tempo de 78 horas de contato das sementes com o patógeno. A partir desse ponto, houve pequena redução nos valores de ambas as taxas (Figura 5). Como a avaliação das taxas foi feita em plantas que permaneceram vivas, até os 45 dias após a semeadura, esse resultado pode estar relacionado à baixa porcentagem de emergência observada, principalmente, no tempo de 108 horas. Este fato pode ter ocorrido devido à morte de sementes, causada por alta infecção pelo patógeno nesse tempo. Com isso, observou-se que a infecção dos tecidos das plantas pode estar diretamente relacionada com o período de contato entre o patógeno e a semente. Diante desses resultados, presume-se que a transmissibilidade de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, a partir de sementes de algodoeiro, é efetiva e pode refletir em maiores ou menores taxas de infecção e de transmissão, dependendo do nível de infecção das sementes.

Em trabalho semelhante, porém, realizado com sementes de milho inoculadas com *Acremonium strictum* Gams, Teixeira & Machado (2003) observaram que a taxa de infecção, avaliada na parte aérea de plantas com 28 dias após a semeadura, foi maior com o aumento do tempo de exposição das sementes (de 0 a 120 horas). Por outro lado, a taxa de transmissão foi estatisticamente igual nos tempos de 24, 72 e 120 horas, diferindo apenas no tempo 0 hora.

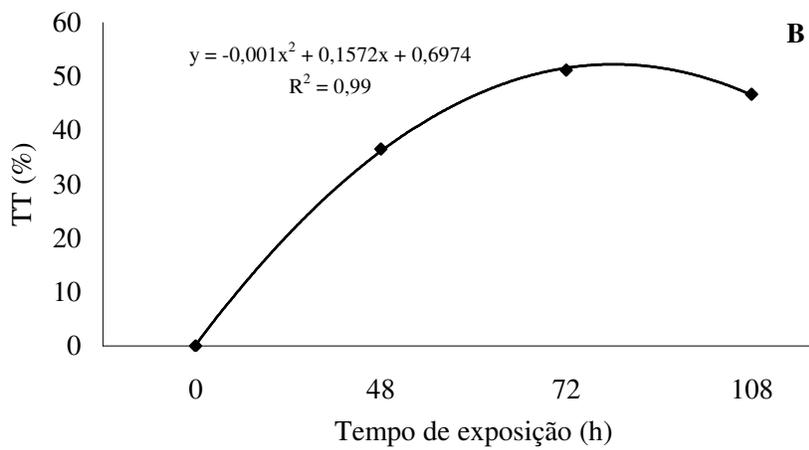
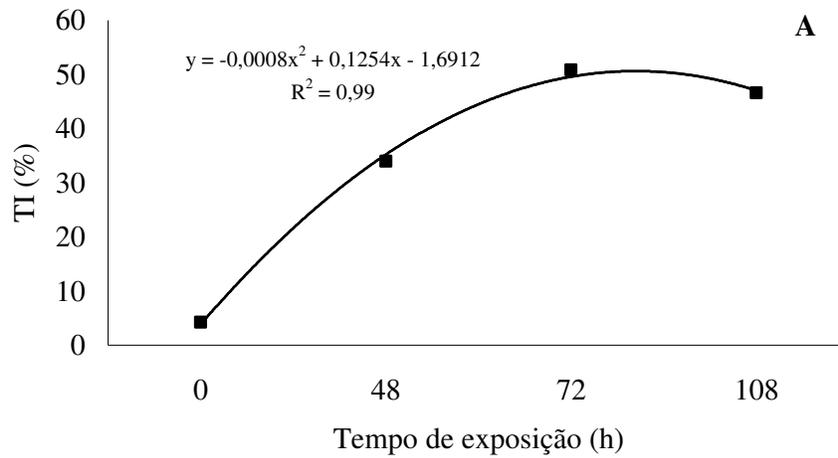


FIGURA 5. Taxas de infecção (TI) (A) e de transmissibilidade (TT) (B) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* avaliadas em plantas de algodoeiro (45d), em função do tempo de exposição das sementes ao patógeno. UFLA, Lavras, MG. 2008.

#### **5.4 Efeito de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* na qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro**

Na análise de variância para o índice de velocidade de emergência (IVE), o estande final, a altura de plântulas e o peso seco da parte aérea, foi possível observar diferenças significativas para os fatores tempo *versus* cultivar e isolado *versus* cultivar.

Observou-se redução tanto no vigor, representado pelo IVE, quanto nos estandes inicial e final, conforme o tempo de exposição foi aumentado de 0 para 108 horas, nas cultivares avaliadas. A redução foi maior na cv. FM 966, considerada suscetível à murcha de fusarium (Figuras 6 e 7). Estes resultados se correlacionam com os observados no testes de sanidade e de germinação. Na medida em que o potencial de inóculo nas sementes aumentou, a germinação e o vigor destas foram significativamente reduzidos, com influencia nos estande inicial e no estande final. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Sousa (2006), que observou redução no IVE e no estande final de plântulas de algodoeiro inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Em outro estudo, sobre a influência de vários patógenos do algodoeiro, entre os quais foi testado *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, as variáveis em questão foram afetadas negativamente pela diferença no potencial osmótico e pelo tempo de exposição das sementes aos patógenos (Machado et al., 2004).

Seguindo essa mesma observação, o tempo de exposição reduziu, significativamente, a porcentagem de plântulas de algodoeiro, quando este foi aumentado de 36 para 108 horas de contato das sementes com *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (Araújo et al., 2006). Resultados diferentes foram observados por Teixeira & Machado (2003), quando o efeito do condicionamento fisiológico, ou restrição hídrica, e do tempo de exposição proporcionou aumento no IVE de plântulas de milho provenientes de sementes inoculadas com *A.*

*strictum*, nos maiores tempos de 72 e 120 horas. Esse estímulo na velocidade de emergência de plântulas também foi observado por Carvalho (1999), onde o soluto manitol adicionado ao meio de cultura, no potencial hídrico de -1,0 MPa, por até 120 horas, causou um efeito *priming*, estimulando a emergência de plântulas de feijoeiro.

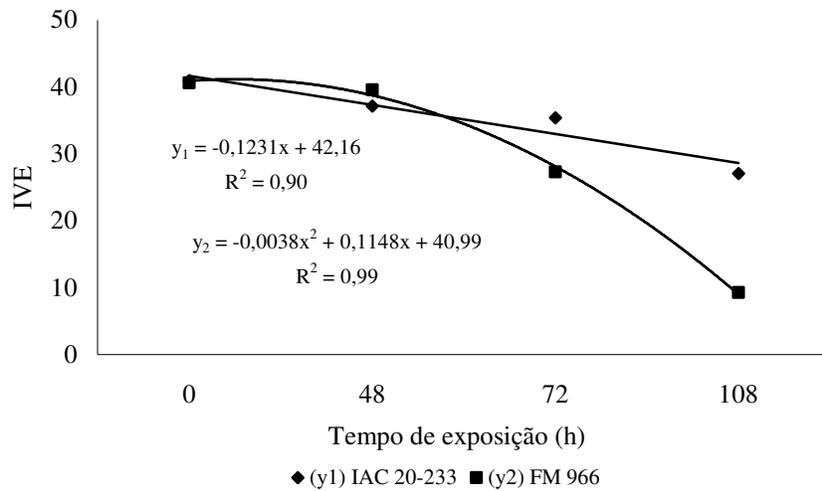


FIGURA 6. Índice de velocidade de emergência (IVE) nas cultivares de algodoeiro, em função do tempo de exposição das sementes ao patógeno, UFLA, Lavras, MG, 2008.

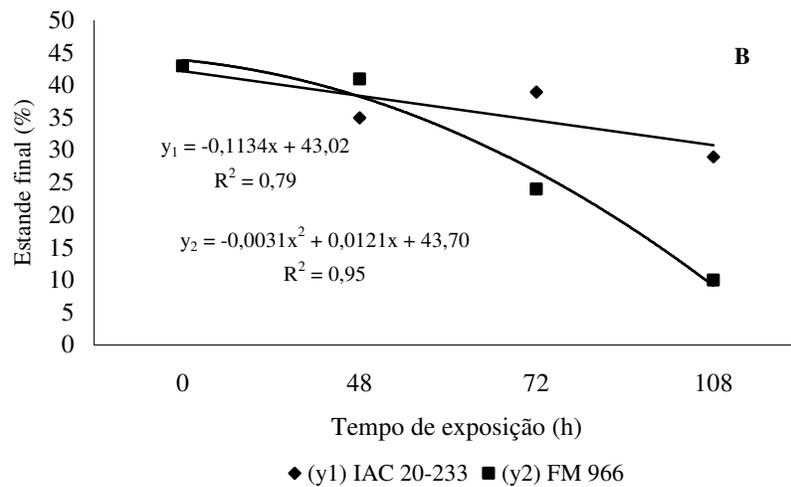
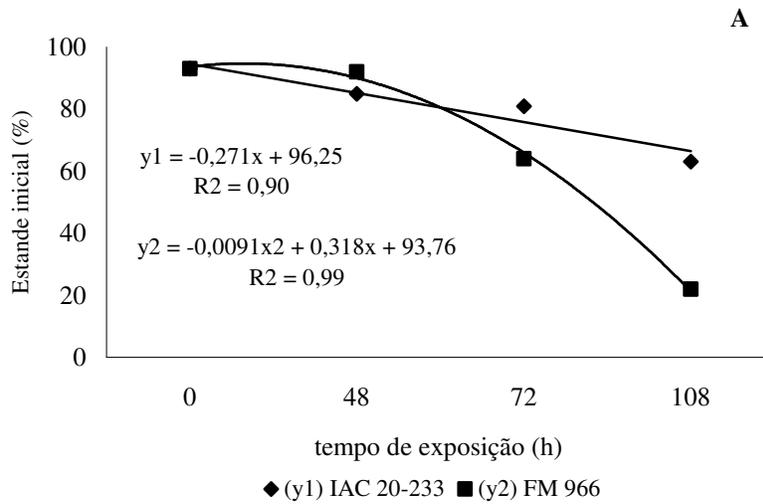


FIGURA 7. Estande inicial (**A**) e estande final (**B**) das cultivares de algodoeiro, em função do tempo de exposição das sementes ao patógeno, UFLA, Lavras, MG, 2008.

Ao analisar o IVE em cada tempo, separadamente, observou-se diferença entre as duas cultivares, nos tempos de exposição de 72 e 108 horas. Quanto ao estande inicial e estande final, essa diferença foi notada a partir de 48 horas (Tabelas 5 e 6). Novamente, a cv. IAC 20-233 apresentou melhor desempenho do que a cv. FM 966, diante do aumento no potencial de inóculo.

Na comparação entre os isolados, não foi observado o efeito destes nas cultivares, tanto no estande inicial quanto no estande final. No entanto, esse efeito foi observado no IVE da cv. IAC 20-233, em que foi verificado que o isolado BA 06 reduziu, significativamente, a velocidade de emergência quando comparado com o isolado Fov 102 (Tabelas 7 e 8).

TABELA 5. Índice de velocidade de emergência (IVE) em plântulas de algodoeiro. Análise de cultivar, em função de cada tempo de exposição das sementes ao patógeno. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Cultivar	IVE*			
	0 h	48 h	72 h	108 h
IAC 20-233	40,95 a	37,16 a	35,41 a	27,05 a
FM 966	40,65 a	39,56 a	27,31 b	9,26 b
CV (%)	8,85			

\*Médias com mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

TABELA 6. Estande inicial e estande final em plântulas de algodoeiro. Análise de cultivar, em função de cada tempo de exposição das sementes ao patógeno. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Cultivar	Estande inicial (%)*				Estande final (%)*			
	0 h	48 h	72 h	108 h	0 h	48 h	72 h	108 h
IAC 20-233	93 a	85 b	81 a	63 a	43 a	35 b	39 a	29 a
FM 966	93 a	92 a	64 b	22 b	43 a	41 a	24 b	10 b
CV (%)	8,63				15,34			

\*Médias com mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

TABELA 7. Estande inicial e estande final em plantas de algodoeiro. Análise considerando os isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e as cultivares. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Isolado	Estande inicial (%)*		Estande final (%)*	
	IAC 20-233	FM 966	IAC 20-233	FM 966
102	80 A a	59 A b	35 A a	26 A b
BA 06	73 A b	60 A a	33 A a	24 A b
CV (%)	8,63		15,34	

\*Médias com mesma letra, maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

TABELA 8. Índice velocidade de emergência (IVE) em plantas de algodoeiro. Análise considerando os isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e as cultivares. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Isolado	IVE*	
	IAC 20-233	FM 966
Fov 102	35,01 A a	25,08 A b
BA 06	31,41 B a	25,67 A b
CV (%)	8,85	

\*Médias com mesma letra, maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

O efeito do tempo de exposição na altura de plântulas e no peso seco da parte aérea foi diferente entre as duas cultivares, no entanto, ocorreu de maneira semelhante nas duas variáveis analisadas. Para a cv. FM 966, houve redução gradativa, tanto na altura de plântulas quanto no peso da parte aérea, com o aumento do tempo de exposição. Da mesma forma, a cv. IAC 20-233 apresentou redução na altura de plântulas e no peso da parte aérea, com o aumento do tempo de exposição. No entanto, essa redução foi menor do que a observada na cv. FM 966 (Figura 8). Apesar da quantidade de inóculo presente nas sementes, as plântulas emergidas, da cv. IAC 20-233, apresentaram maior resistência, resultando em maior desenvolvimento e produção de massa seca, mesmo quando o tempo aumentou de 0 para 108 horas de exposição ao patógeno. Da mesma forma, a altura e o peso seco da parte aérea de plântulas de milho inoculadas com *A. strictum* foram menores com o aumento do tempo de exposição das sementes ao patógeno (0, 24, 72 e 120 horas), evidenciando o efeito do inóculo no crescimento vegetativo das plântulas (Teixeira & Machado, 2003).

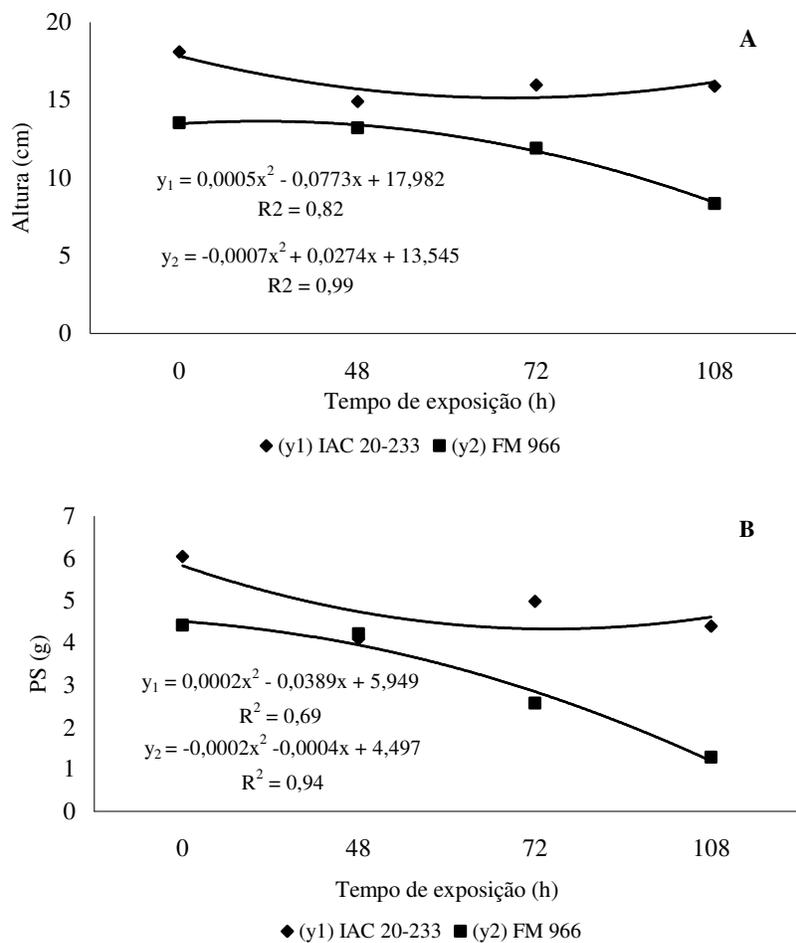


FIGURA 8. Altura (A) e peso seco da parte aérea (PS) (B) de plântulas das cultivares de algodoeiro, em função do tempo de exposição das sementes ao patógeno, UFLA, Lavras, MG, 2008.

Em média, a altura de plântulas e o peso seco da parte aérea foram significativamente maiores na cv. IAC 20-233 do que na cv. FM 966, ao se analisar cada tempo em separado, com exceção do peso seco avaliado no tempo de 48 horas de exposição (Tabela 9).

TABELA 9. Altura e peso seco da parte aérea (PS) em plântulas de algodoeiro. Análise de cultivares, em função de cada tempo de exposição das sementes ao patógeno. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Cultivar	Altura (cm)*				PS (g)*			
	0 h	48 h	72 h	108 h	0 h	48 h	72 h	108 h
IAC 20-233	18,1 a	14,9 a	15,9 a	15,9 a	6,05 a	4,09 a	4,99 a	4,40 a
FM 966	13,5 b	13,2 b	11,9 b	8,3 b	4,42 b	4,22 a	2,58 b	1,29 b
CV (%)	8,85				15,34			

\*Médias com mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

A diferença entre as cultivares, observada neste trabalho, evidenciou a resistência genética do hospedeiro em relação ao patógeno no período vegetativo da cultura. Este fato pode ser considerado de grande relevância para o melhor entendimento dos eventos relacionados à transmissão do patógeno a partir de sementes, bem como para o aprimoramento de medidas de controle da doença em campos de produção de sementes.

## 6 CONCLUSÕES

1. A transmissibilidade do patógeno, das sementes para as plantas, foi efetiva e diretamente proporcional ao potencial de inóculo nas sementes. A taxa máxima de transmissão, neste caso, foi de 51%.
2. Os efeitos de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* no desempenho das sementes de algodoeiro relacionaram-se, em geral, com o potencial de inóculo das sementes. Os danos, nos tecidos das sementes, foram maiores com o aumento do potencial de inóculo.
3. As cultivares IAC 20-233 (resistente) e FM 966 (suscetível) comportaram-se diferentemente, expressando o potencial genético, diante da presença de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* nas sementes.
4. Os dois isolados do patógeno utilizados neste trabalho apresentaram comportamento semelhante diante das cultivares testadas.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, D. V.; POZZA, E. A.; MACHADO, J. C.; ZAMBENEDETTI, E. B.; CARVALHO, E. M.; CELANO, F. A. O. Relação entre níveis de inóculo de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* nas sementes e o progresso da ramulose do algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 147-151, mar./abr. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília: LANARV/SNAD/MA, 1992. 360 p.

CARVALHO, J. C. B. de. **Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1999. 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DAVIS, R. D.; MOORE, N. Y.; KOCHMAN, J. K. Characterization of a population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* causing wilt of cotton in Australia. **Australian Journal Agricultural Research**, v. 47, n. 7, p. 1143-1156, July 1996.

DOWD, C.; WILSON, L. W.; McFADDEN, H. Gene expression profile changes in cotton root and hypocotyl tissues in response to infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 6, p. 654-667, 2004.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Programa e Resumos...** São Carlos, SP: UFSCar, 2000. p. 235.

HILLOCKS, R. J.; KIBANI, T. H. M. Factors affecting the distribution, incidence and spread of Fusarium wilt of cotton in Tanzania. **Experimental Agriculture**, v. 38, n. 1, p. 13-27, Jan. 2002.

KIKUTI, A. L. P.; OLIVEIRA, J. A.; MEDEIROS FILHO, S.; FRAGA, A. C. Armazenamento e qualidade fisiológica de sementes de algodão submetidas ao condicionamento osmótico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 2, p. 439-443, mar./abr. 2002.

KULKARNI, G. S. Studies in the wilt disease of cotton in the Bombay Presidency. **Indian Journal of Agricultural Science**, v. 4, p.976-1045, 1934.

MACHADO, J. C. Padrões de tolerância de patógenos associados a sementes. In: LUZ, W.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 2, p. 229-264, 1994.

MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J. Improvement of a blotter method to detect economically important fungi associated with seeds of cotton. In: ISTA PLANT DISEASE COMMITTEE SYMPOSIUM ON SEED HEALTH TESTING, 1., 1993, Ottawa. **Symposium...** Ottawa: ISTA, 1993. p. 48-58.

MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M. G. G. C.; ALVES, M.C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 1, p. 62-67, 2004.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p. 176-177, mar/abr. 1962.

McKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal Agricultural Research**, Washington, v. 26, n. 5, p. 195-219, nov. 1923.

MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 1, p. 131-136, jan./fev. 1995.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. 2.ed. London: McMillan. 1979. 1190 p.

PERRY, D. A. Fusarium wilt of cotton in the lake province of Tanganyika. **Empire Cotton Growing Review**, v. 39, p. 22-26, 1962.

SMITH, S. N.; EBBELS, R. H.; GARBER, H.; KAPPELMAN-JR. J. Fusarium wilt of cotton. In: NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; COOK, R.F. (Ed.). **Fusarium: disease, biology and taxonomy**. Pennsylvania: The Pennsylvania State University/University Park and London, 1981. p. 29-38.

SOUSA, M.V. **Metodologias de inoculação e detecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. 2006. 68 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

TEIXEIRA, H.; MACHADO, J. C. Transmissibilidade e efeito de *Acremonium strictum* em sementes de milho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1045-1052, set./out. 2003.

TEIXEIRA, H.; MACHADO, J.C.; ORIDE, D.; ALVES, M.C.; NODA, A. Técnica de restrição hídrica: efeito sobre *Acremonium strictum*, protrusão de sementes e obtenção de sementes de milho infectadas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 109-114, mar./abr. 2005.

TEIXEIRA, H.; MACHADO, J. C.; VIEIRA, M. G. G. C. Influência de *Colletotrichum gossypii* South. no desenvolvimento inicial do algodão (*Gossypium hirsutum* L.) em função da função da localização do inóculo e desinfestação das sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 19, n. 1, p. 9-13, 1997.

VEIGAS, A. P. A murcha do algodoeiro. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 10, v. 1/2, p. 49-51, 1935.

WANG, B.; BRUBAKER, C. L.; TATE, W.; WOODS, M. J.; MATHESON, B. A.; BURDON, J. J. Genetic variation and population structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in Australia. **Plant Pathology**, Oxford, v. 55, n. 6, p. 746-755, Dec. 2006.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre as doenças que atacam o algodoeiro, a murcha de fusarium, cujo agente etiológico é *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, é uma das mais disseminadas nas áreas de cultivo no Brasil, e as sementes, contaminadas ou infectadas, estão entre as mais importantes fontes iniciais de inóculo deste patógeno. Na medida em que as áreas de cultivo do algodoeiro vão acumulando inóculo deste patógeno, estima-se que, a médio e a longo prazo, estas áreas vão se tornando impróprias para este tipo de cultivo o que, em última análise, significa perdas expressivas não só para o agricultor como para todo o agronegócio do algodão no Brasil.

Com base nestes fatos e tendo-se em mente a necessidade de assegurar a sustentabilidade do cultivo do algodoeiro em áreas favoráveis no país, é que, atualmente, o patógeno foi enquadrado como uma das “pragas não quarentenárias regulamentadas”, sujeito, portanto, à padronização pelo Programa Brasileiro de Certificação de Qualidade de Sementes no país. Uma primeira proposição que se encontra em discussão no Ministério da Agricultura recomenda o índice zero de tolerância para este organismo, em análise sanitária de amostras representativas de lotes de sementes destinados ao plantio.

Diante dessa realidade, questiona-se, do ponto de vista operacional, a disponibilidade de métodos de detecção deste fungo, em sementes de algodão, que sejam seguros e viáveis de adoção pelos laboratórios de análises sanitárias existentes no país. No momento, os métodos disponíveis ainda apresentam dificuldades com relação à precisão e ao tempo de realização do teste, havendo necessidade de um maior aprofundamento neste campo. Por esta razão, estudos básicos que subsidiem o desenvolvimento de métodos de detecção mais precisos e menos subjetivos tornam-se essenciais neste caso.

Neste estudo, uma primeira constatação (Capítulo 2) foi a de que todos os isolados testados, identificados como *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, foram patogênicos ao algodoeiro, havendo variação no grau de virulência. Esta variabilidade, condicionada geneticamente, é de grande importância para futuros trabalhos de melhoramento genético e outras áreas que envolvem aspectos epidemiológicos e controle de doenças.

Nos resultados do Capítulo 3, tratando da variabilidade entre os isolados estudados com base nos genes fator de alongação da transcrição 1- $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina, importantes marcadores moleculares, ficou evidente a alta variabilidade genética dentro da população do patógeno estudada neste trabalho. Especificamente no âmbito da patologia de sementes, a identificação de um marcador que possa ser recomendado em testes de sanidade de sementes e outros testes diagnósticos deve ser precedido de um minucioso estudo que envolva um número representativo de isolados do fungo.

Por meio deste estudo, foi possível observar que *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* é uma espécie com forma *specialis* das mais complexas. As informações geradas neste trabalho podem servir como base em estudos de outras raças ainda não detectadas no país, ou em estudos de uma possível população nova do complexo *F. oxysporum*.

Por sua vez, os estudos de transmissibilidade do fungo, das sementes às plantas, e os efeitos iniciais desta transmissão (Capítulo 4), deixam claro que as sementes são um importante veículo para este fungo, havendo uma taxa de transmissão da ordem de 51%. Estas informações foram obtidas em condições controladas, nas quais o ambiente era favorável a este tipo de interação, sendo os diferentes potenciais de inóculo, as variáveis fixas.

É importante salientar que o cálculo desta taxa é variável em função de diversos fatores não só do ambiente de cultivo, como do próprio patógeno e do hospedeiro. Na condição de membro do complexo de tombamento do

algodoeiro, percebe-se que *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* é dos mais danosos a esta cultura, causando mortes em pré e pós-emergência.

Como etapa seguinte neste estudo, pode-se postular a fixação de um dos marcadores moleculares para estudos adicionais de detecção do fungo em amostras de sementes ou de outro material alvo de diagnose. Este tem sido um objetivo muito importante em patologia de sementes, principalmente para aqueles patógenos que ainda constituem desafios em testes de rotina, baseados em princípios culturais ou biológicos. De grande interesse também para a pesquisa é a avaliação do papel das sementes como fonte de inóculo inicial do patógeno, na presença e na ausência do hospedeiro.

Por outro lado, de suma relevância é o monitoramento do acesso do patógeno às sementes em formação, a partir de plantas infectadas no campo de cultivo. Os mecanismos e a dinâmica deste tipo de transmissão requerem estudos específicos em que fatores do ambiente exercem um papel destacado. O conhecimento dos eventos nesta rota, com base em diferentes circunstâncias, pode fornecer, com maior segurança, subsídios importantes para o estabelecimento de estratégias de manejo deste tipo de doença, em campos de produção de sementes.