



ARIANNA SANTANA DE MENEZES

**ESPÉCIES DO COMPLEXO *Fusarium oxysporum*
ASSOCIADAS À MURCHA DE *FUSARIUM* DO FEIJOEIRO**

**LAVRAS - MG
2022**

ARIANNA SANTANA DE MENEZES

**ESPÉCIES DO COMPLEXO *Fusarium oxysporum* ASSOCIADAS À MURCHA DE
FUSARIUM DO FEIJOEIRO**

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

Dr. Ludwig H. Pfenning
Orientador

**LAVRAS - MG
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Menezes, Arianna Santana de.

Espécies do Complexo *Fusarium oxysporum* associadas à
murcha de *Fusarium* do feijoeiro / Arianna Santana de Menezes. -
2022.

42 p.

Orientador(a): Ludwig Heirinch Pfenning.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Ascomycetes. 2. Doença de planta. 3. Filogenia molecular. I.
Pfenning, Ludwig Heirinch. II. Título.

ARIANNA SANTANA DE MENEZES

**ESPÉCIES DO COMPLEXO *Fusarium oxysporum* ASSOCIADAS À MURCHA DE
FUSARIUM DO FEIJOEIRO
MEMBERS OF THE *Fusarium oxysporum* SPECIES COMPLEX FOSC ASSOCIATED
WITH COMMON BEAN WITH SYMPTOMS OF WILT**

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

APROVADA, Lavras MG, 07 de março de 2022.

Dr. Eduardo Alves	UFLA
Dr. Trazilbo José de Paula Júnior	EPAMIG
Dr. Fábio Aurélio Dias Martins	EPAMIG

Dr. Ludwig H. Pfenning
Orientador

**LAVRAS - MG
2022**

Esta dissertação é dedicada a todos que acreditam na ciência e contribuem para o avanço do conhecimento na sociedade.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pela oportunidade de realizar meu mestrado.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG pela concessão da bolsa, sendo fundamental para eu completar esse ciclo.

Um agradecimento a todos os professores pelo conhecimento transmitido, contribuindo com minha formação acadêmica.

Agradeço aos membros da banca por terem aceito o convite e pela colaboração nesse trabalho.

Agradeço especialmente ao meu orientador Prof. Ludwig H. Pfenning por sua confiança, atenção, conselhos e muito conhecimento transmitido.

Agradeço à minha coorientadora e amiga Janaina Sousa, por todas as contribuições, ensinamentos e por ser meu anjo científico.

Gratidão às minhas amigas Marileide Costa e Cristina Troya por todo apoio na condução deste trabalho, pela paciência e colaboração. Agradeço também aos meus colegas do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos: Carol, Ana, Bárbara, Gabriel, Mikaely, João e Edinho, sem o apoio e trabalho em equipe, eu jamais teria concluído todas as etapas desse mestrado.

Agradeço aos meus pais, Mary e Adriano, pelo apoio e incentivo por todos esses anos, foram essenciais para o meu desenvolvimento pessoal e contribuíram para que eu buscasse ser melhor a cada dia. Gratidão também a Vitório, pela parceria, apoio e motivação em todos os momentos.

Obrigada a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

A murcha de *Fusarium* é uma doença relatada em diferentes áreas de cultivo de feijoeiro, responsável por perdas na produção da cultura no Brasil e no mundo. Ao agente etiológico atribui-se o nome *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Atualmente, baseado em análises de filogenia molecular de várias regiões gênicas, membros do complexo de espécies *Fusarium oxysporum* (FOSC) foram descritos como espécies filogenéticas. Nesse estudo foi investigado quais espécies do FOSC induzem murcha de *Fusarium* em feijoeiro no Brasil e se existe alguma correlação entre *formae speciales* e as espécies filogenéticas propostas. Os 22 isolados obtidos das principais áreas de produção de feijoeiro foram caracterizados por meio de avaliação de seus marcadores morfológicos, análise de filogenia molecular de sequências da região gênica *tefl* e testes de patogenicidade em feijão comum e feijão caupi. *Fusarium gros-michelii*, *F. gossypinum*, *F. kalimantanense*, *F. nirenbergiae*, *F. triseptatum*, *F. callistephi* e duas linhagens filogenéticas, ainda não identificadas, induzem sintomas característicos de murcha de *Fusarium* em feijão comum e caupi. Não foi possível reconhecer marcadores específicos para as espécies encontradas. Estas espécies já foram relatadas como agentes causais da murcha de *Fusarium* em outras culturas. No entanto, esse é o primeiro trabalho esclarecendo a etiologia desse patossistema sob o aspecto da redefinição do complexo *F. oxysporum*. Geramos fortes indícios que a *forma specialis phaseoli* seja representada por espécies distintas. Os resultados obtidos contribuem para uma nova etapa de avaliação da etiologia da doença e podem ser aproveitados em programas de seleção de cultivares com resistência durável a essa doença.

Palavras chave: Ascomycetes; Doença de planta; Filogenia molecular.

ABSTRACT

Fusarium wilt is a disease of common bean, causing losses in production in Brazil and other countries. The causal agent is known in the literature as *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. But recently, based on the phylogenetic analyses of several barcode regions, members of the *Fusarium oxysporum* species complex – FOOSC have been described as phylogenetic species. In this study we investigated which species of the FOOSC can induce symptoms of wilt in common bean and cowpea, and if there is an correlation between the concept of *formae speciales* and the proposed phylogenetic species. Twenty two isolates with morphological characteristics of *F. oxysporum*, obtained from the main production areas in Brazil, were evaluated by means of phylogenetic analysis of sequences of the TEF barcode region and pathogenicity tests in common bean and cowpea. *Fusarium grosnichelii*, *F. gossypinum*, *F. kalimantanense*, *F. nirenbergiae*, *F. triseptatum*, *F. callistephi* and still two phylogenetic lineages, not named so far, induced typical symptoms of wilt in all inoculated plants. No specific markers for each of those species could be recognized. Those species have already been reported as causal agents of *Fusarium* wilt in other crops. Indeed, this is the first study evaluating the etiology of *Fusarium* wilt in common bean and cowpea under the aspect of redefinition of the species within the FOOSC. We bring strong evidence that the *forma specialis phaseoli* is actually represented by several phylogenetic species. Results presented here are contributing to the redefinition of the etiological agents of this disease, but will also give relevant support to breeding programs, aiming the selection of cultivars with durable resistance to this disease.

Key words: Ascomycetes; Molecular phylogeny; Plant disease.

SUMÁRIO

	PARTE 1.....	10
1	INTRODUÇÃO GERAL	10
2	ESTADO DA ARTE.....	11
2.1	A Cultura do Feijoeiro	11
2.2	Complexo de espécies <i>Fusarium oxysporum</i> (FOSC)	13
2.3	Murcha de <i>Fusarium</i> do feijoeiro.....	14
	REFERÊNCIAS	15
	PARTE 2.....	18
	RESUMO.....	18
	INTRODUÇÃO	22
	MATERIAL E MÉTODOS	22
	RESULTADOS	25
	DISCUSSÃO	27
	AGRADECIMENTOS	29
	LITERATURA CITADA.....	29

PARTE 1

1 Introdução Geral

O feijão possui um importante papel na alimentação da população brasileira e é um dos produtos agrícolas de maior importância econômico-social. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial (Faostat, 2019), utilizando principalmente duas espécies, o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) e o feijoeiro caupi (*Vigna unguiculata*) (Conab, 2021). A murcha de *Fusarium* do feijoeiro ocorre não somente no Brasil, mas também em países como Colômbia, Equador, Panamá e China (Abawi e Pastor-Corrales 1990), onde pode causar perdas consideráveis nos cultivos de feijoeiro devido ao plantio subsequente da mesma cultura (Xue et al. 2015).

Ao agente etiológico dessa doença refere-se na literatura em geral como *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* quando isolado de feijão comum e *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* para isolados obtidos de feijão caupi, em função de suas características morfológicas e de patogenicidade. O conceito agrônomo de *forma specialis* foi adotado para diferenciar populações com características fisiológicas distintas, baseado na patogenicidade a determinado hospedeiro. Atualmente, mais de 100 *formae speciales* de *F. oxysporum* encontram-se registradas na literatura (Edel-Hermann e Lecomte 2019).

Baseado em análises de filogenia molecular de sequências das regiões gênicas *tef1*, *rpb1*, *rpb2*, *cmdA*, IGS e *tub2*, isolados identificados anteriormente como *Fusarium oxysporum* e agrupados, de acordo com a sua capacidade de causar doença em *formae speciales*, foram definidos como espécies filogenéticas (O'Donnell et al. 1998, 2013, Lombard et al. 2019, Maryani et al. 2019). Recentemente, 26 espécies foram formalmente descritas como membros do Complexo de espécies *Fusarium oxysporum* (FOSC), em associação a diferentes hospedeiros, tais como algodão, banana, soja e tomate, por análise de filogenia molecular das regiões *tef1*, *rpb1*, *rpb2*, *cmdA* e *tub2* (Lombard et al. 2019, Maryani et al. 2019).

Espécies do FOSC são conhecidas por causar doenças vasculares, e induzirem murcha, podridão e tombamento em muitas culturas de importância agrícola. O fungo coloniza a planta através das raízes e inicia assim o processo de colonização do sistema vascular, causando amarelecimento das folhas, nanismo, murcha parcial e conseqüentemente morte da planta (Leitão et al. 2020).

As espécies responsáveis por causar a murcha de *Fusarium* em feijoeiro ainda não foram caracterizadas de acordo com o conceito de espécie filogenética. Até o presente momento, duas espécies que ocorrem em associação com leguminosa foram descritas como *F. fabacearum* e *F. glycines*, encontradas em soja na África do Sul (Lombard et al. 2019).

A maioria dos trabalhos sobre a murcha de *Fusarium* do feijoeiro consiste em propostas de métodos para o manejo da doença, como a obtenção de variedades de feijoeiro resistentes (Pereira et al. 2011; Henrique et al. 2015; Carvalho et al. 2011). Contudo, esses estudos identificam o agente etiológico baseado apenas no conceito de *forma specialis* e raça. Nesse estudo, testamos a hipótese que mais que uma espécie filogenética do complexo FOSC cause doença no feijoeiro (O'Donnell et al. 1998, 2009; Baayen et al. 2000). Pretendemos esclarecer as seguintes questões: (i.) Quais espécies do FOSC estão associadas a plantas de feijoeiro com sintomas de murcha de *Fusarium*? (ii.) Quais espécies do FOSC causam a murcha de *Fusarium* em feijoeiro no Brasil? (iii.) As espécies patogênicas ao feijoeiro comum causam murcha também em feijão caupi?

2 Estado da Arte

2.1 A Cultura do Feijoeiro

O feijão está presente na alimentação da população brasileira e é um dos produtos agrícolas de maior importância econômico-social. (Souza e Wander 2014). Os principais produtores são a Índia, Myanmar e o Brasil. A produção brasileira atingiu um total de 2.906.508 toneladas em 2019 (Faostat 2019) e duas espécies detiveram a maior produção nacional, feijão

comum (*Phaseolus vulgaris*) com 1.747,5 mil toneladas e feijão caupi (*Vigna unguiculata*) com 625,2 mil toneladas (Conab 2021). Os estados brasileiros que detêm a maior produção nacional de feijão são Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso, Goiás e São Paulo (Conab 2021).

O Brasil possui três períodos distintos de plantio dentro do ano-safra, o que garante a oferta constante do feijão comum. Dessa forma, tem-se o feijão de primeira safra (feijão das águas), semeado entre agosto e dezembro, o de segunda safra (feijão da seca), entre janeiro e abril e o de terceira safra (feijão de inverno), de maio a julho (Posse et al. 2010, Silva 2015).

O feijoeiro comum é originário de duas populações selvagens das regiões Mesoamérica e Andina, que divergiram de um ancestral comum há mais de 100.000 anos (Mamidi et al., 2012), dando origem ao cultivado atualmente. (Bitocchi et al. 2013, Schmutz et al. 2014, Vlasova et al. 2016). É uma cultura de grande importância social e uma importante fonte de proteínas e nutrientes essenciais. Em todo o mundo, o feijão comum é uma leguminosa muito rica nutricionalmente, fornecendo até 15% do total de calorias diárias e 36% do total de proteína diária em partes da África e das Américas (Faostat 2019).

O feijão caupi tem sua origem no continente africano e foi introduzido no Brasil em meados do século XVI. Há relatos de que o feijão caupi foi inicialmente introduzido na Bahia e disseminado por todo país (Freire Filho 2011). Essa espécie é cultivada predominantemente nas regiões Norte e Nordeste, onde o cultivo se dá através das práticas tradicionais, com baixo uso de tecnologias e baixas produtividades de grãos. Porém, na região Centro-Oeste a área de cultivo de feijão caupi está em expansão, aumentando a produção e produtividade, principalmente devido ao cultivo mecanizado e com a participação de médios e grandes produtores (Rocha et al. 2017).

2.2 Complexo de Espécies *Fusarium oxysporum* - FOSC

Fusarium oxysporum é um complexo de espécies, que consiste em numerosas espécies crípticas (Gordon e Martyn 1997, Laurence et al. 2014). Esse complexo inclui espécies de fungos habitantes de solo, patogênicos (planta, animal e humano) e não patogênicos, ocorrendo também como endófitos e saprófitas (Leslie e Summerell 2006, Laurence et al. 2012). Em 2012, *F. oxysporum* foi classificado em quinto lugar no ranking dos 10 principais fungos patógenos de plantas com base na importância científica e econômica (Dean et al. 2012).

De acordo com Leslie e Summerell (2006), as características morfológicas das colônias de *F. oxysporum* em meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (BDA) podem variar de forma considerável. Geralmente a coloração oscila entre branco e violeta claro. A maioria dos isolados produz esporodóquio laranja claro abundante. Os macroconídios possuem comprimento de curto a médio (37,5-50 x 6,25 µm), são ligeiramente curvados, relativamente finos e com paredes finas. A célula apical é afilada e curva, às vezes com um ligeiro gancho. Os microconídios podem ser ovais, elípticos ou reniformes e asseptados. No micélio aéreo são observadas falsas cabeças e fiálides curtas. A maioria dos isolados formam abundantemente clamidósporos entre 2-4 semanas em meio de ágar adicionado folha de cravo. Normalmente são solitários ou em pares e podem ser encontrados aglomerados ou em cadeias curtas, formados em posição intercalar ou terminal ao longo das hifas e sua parede pode ser lisa ou rugosa.

O Complexo de Espécies *Fusarium oxysporum* inclui atualmente em torno de 26 espécies, que foram identificadas por análise de filogenia molecular das regiões *tef1*, *rpb1*, *rpb2*, *cmda* e *tub2* e representam patógenos de diferentes hospedeiros, tais como algodão, banana, soja, e tomate (Lombard et al. 2019, Maryani et al. 2019).

2.3 Murcha de *Fusarium* do feijoeiro

A murcha de *Fusarium*, também conhecida por fusariose, é uma importante doença que afeta a cultura do feijoeiro. Essa doença é causada por membros do complexo de espécies *Fusarium oxysporum* (Schwartz et al. 2005). A sintomatologia geralmente é observada a partir do florescimento e do enchimento de vagens, quando ocorre clorose/amarelecimento, murcha parcial e/ou necrose das folhas. Os sintomas iniciam-se nas folhas inferiores e progridem para cima, podendo evoluir para senescência precoce e ocasionar a morte das plantas. O caule quando seccionado, permite a observação do escurecimento vascular, devido à obstrução e colonização do patógeno. Quando a infecção ocorre em plantas jovens, a doença ocasiona redução no crescimento. Fatores abióticos como temperaturas amenas (20 - 25°C), solos compactados, alta umidade do solo e presença de nematoides contribuem para o progresso da doença. Em campo, sob condições de alta umidade, observa-se uma produção mucilaginosa sobre o caule, oriunda da produção de esporos do patógeno (Abawi e Corrales 1990, France e Abawi 1994, Wendland et al. 2018).

Na literatura, o agente etiológico é identificado como *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em função de suas características morfológicas e de patogenicidade. O conceito agrônômico de *forma specialis* é empregado para agrupar isolados que apresentam morfo-tipo de *F. oxysporum* e que são patogênicas a plantas específicas (Edel-Hermann e Lecomte 2019). Até o presente momento, espécies pertencentes ao FOOSC que são patogênicas ao feijoeiro, não foram identificadas com base no conceito de espécie filogenética.

Referências

- Abawi GS, Pastor-Corrales MA (1990) Root rots of beans in Latin America and Africa: diagnosis, research and methodologies and management strategies. Cali, Colombia: CIAT
- Baayen RP, O'Donnell K, Bonants PJ, Cigelnik E, Kroon LP, Roebroek EJ, Waalwijk C (2000) Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic *formae speciales* causing wilt and rot disease. *Phytopathology* 90:891-900
- Bitocchi E, Bellucci E, Giardini A, Rau D, Rodriguez M, Biagetti E, Santilocchi R, Zeuli PS, Gioia T, Logozzo G, Attene G, Nanni L, Papa R (2012) Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. *New Phytologist* 197:300-313
- Carvalho DDC, Mello SCM, Lobo Júnior M, Silva MC (2011) Controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. *Tropical Plant Pathology* 36:28-34
- CONAB. Feijão, safra 2020 - 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em 22 setembro 2021
- Dean R, Kan JALV, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Pietro AD, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster GD (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13:414-430
- Edel-Hermann V, Lecomte C (2019) Current status of *Fusarium oxysporum formae speciales* and races. *Phytopathology* 109:512-530
- FAOSTAT. Crops and livestock products. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Acesso em 22 setembro 2021
- France RA, Abawi GS (1994) Interaction between *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* on selected bean genotypes. *The Journal of Nematology* 26:467-474
- Freire Filho FR (2011) Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. Embrapa Meio-Norte-Livro científico (ALICE)
- Freire Filho FR (1988) Origem, evolução e domesticação do caupi. In: Araújo JPP, Watt EE (Org.). O caupi no Brasil. Brasília, DF: IITA: Embrapa, pp. 26-46
- Gordon TR, Martyn RD (1997) The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology* 35:111-128
- Henrique FH, Carbonell SAM, Ito MF, Gonçalves JGR, Sasserón GR, Chiorato AF (2015) Classification of physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common bean. *Bragantia* 74:84-92
- Laurence MH, Summerell BA, Burgess LW, Liew ECY (2014) Genealogical concordance phylogenetic species recognition in the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Biology* 118:374-384

- Laurence MH, Burgess LW, Summerell BA, Liew ECY (2012) High levels of diversity in *Fusarium oxysporum* from non-cultivated ecosystems in Australia. *Fungal Biology* 116:289-297
- Leitão ST, Malosetti M, Song Q, Eeuwijk FV, Rubiales D, Patto MCV (2020) Natural variation in portuguese common bean germplasm reveals new sources of resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* and resistance-associated candidate genes. *Phytopathology* 110:633-647
- Leslie JF, Summerell BA (2006) The *Fusarium* laboratory manual. Malden: Blackwell Publishers
- Lombard L, Sandoval-Denis M, Lamprecht SC, Crous PW (2019) Epitypification of *Fusarium oxysporum* – clearing the taxonomic chaos. *Persoonia* 43:1-47
- Mamidi S, Rossi M, Moghaddam SM, Annam D, Lee R, Papa R, McClean PE (2012) Demographic factors shaped diversity in the two gene pools of wild common bean *Phaseolus vulgaris* L. *Heredity* 110:267-276
- Maryani N, Lombard L, Poerba YS, Subandiyah S, Crous PW, Kema GHJ (2019) Phylogeny and genetic diversity of the banana *Fusarium* wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. *Studies in Mycology* 92:155-194
- O'Donnell K, Rooney AP, Proctor RH, Brown DW, McCormick SP, Ward TJ, Frandsen RJN, Lysoe E, Rehner SA, Aoki T, Robert VARG, Crous PW, Groenewald JZ, Kang S, Geiser DM (2013) Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genetics and Biology* 52:20-31
- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC (1998) Multiple evolutionary origins of the fungus causing panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings National Academy Science* 95:2044-2049
- Pereira MJZ, Ramalho MAP, Abreu AFB (2011) Reação de linhagens de feijoeiro ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em condições controladas. *Ciência e Agrotecnologia* 35:940-947
- Posse SCP, Riva-Souza EM, Silva GM, Fasolo LM, Silva MB, Rocha MAM (2010) Informações Técnicas para o cultivo do feijoeiro comum na região central-brasileira: 2009-2011. Vitória, ES, Incaper, 245p
- Rocha MM, Silva KJD, Menezes Junior JAN (2017) Cultivo de Feijão-Caupi. Embrapa Meio-Norte. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1071700/1/SistemaProducaoCaupiCapituloImportanciaEconomica.pdf>. Acesso em 04 outubro 2021
- Schmutz J, McClean PE, Mamidi S, Wu GA, Cannon SB, Grimwood J, ... Jackson SA (2014) A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics* 46:707-713
- Schwartz HF, Steadman JR, Hall R, Forster RL (2005) Compendium of bean diseases (2nd. Ed.). American Phytopathological Society APS Press

Silva MG (2015) Implantação da cultura. In: ARF O. (Ed.) Aspectos gerais da cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) 1 ed., FEPAF, Botucatu/SP, Cap. 9, p. 163-180.

Souza RS, Wander AE (2014) Aspectos econômicos da produção de feijão no Brasil. Revista de Política Agrícola 3:43-54

Vlasova A, Capella-Gutiérrez S, Rendón-Anaya M, Hernández-Oñate M, Minoche AE, Erb I, ... Guigó R (2016) Genome and transcriptome analysis of the Mesoamerican common bean and the role of gene duplications in establishing tissue and temporal specialization of genes. Genome Biology 17:1-18

Wendland A, Lobo Junior M, Faria JC (2018) Manual de Identificação das Principais Doenças do Feijoeiro-Comum. Embrapa Arroz e Feijão. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1102266/manual-de-identificacao-das-principais-doencas-do-feijoeiro-comum>. Acesso em 06 outubro 2021

Xue R, Wu J, Zhu Z, Wang L, Wang X, Wnag S, Blair MW (2015) Differentially expressed genes in resistant and susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. PloS ONE 10:1-20

Zanotti MGS, Queiroz MV, Santos JK, Rocha RB, Barros EG, Araújo EF (2006) Analysis of genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates, pathogenic and non-pathogenic to common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of Phytopathology 154:545-549

PARTE 2

Espécies do complexo *Fusarium oxysporum* associadas à murcha de *Fusarium* do feijoeiro

Arianna S. Menezes, Janaina M. Sousa, Marileide M. Costa, Ludwig H. Pfenning
Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-900, Lavras - MG,
Brazil

*Autor para correspondência: Ludwig H. Pfenning, e-mail: ludwig@ufla.br

Manuscrito preparado de acordo com as normas da revista *Tropical Plant Pathology*

Resumo

A murcha de *Fusarium* é uma doença relatada em diferentes áreas de cultivo de feijoeiro, responsável por perdas na produção da cultura no Brasil e no mundo. Ao agente etiológico atribui-se o nome *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Atualmente, baseado em análises de filogenia molecular de várias regiões gênicas, membros do complexo de espécies *Fusarium oxysporum* (FOSC) foram descritos como espécies filogenéticas. Nesse estudo, foi investigado quais espécies do FOSC induzem murcha de *Fusarium* em feijoeiro no Brasil e se existe alguma correlação entre *formae speciales* e as espécies filogenéticas propostas. Os 22 isolados obtidos das principais áreas de produção de feijoeiro foram caracterizados por meio de avaliação de seus marcadores morfológicos, análise de filogenia molecular de sequências da região gênica *tefl* e testes de patogenicidade em feijão comum e feijão caupi. É possível afirmar que as espécies *Fusarium grosnichelii*, *F. gossypinum*, *F. kalimantanense*, *F. nirenbergiae*, *F. triseptatum*, *F. callistephi* e duas linhagens filogenéticas, ainda não identificadas, induzem sintomas característicos da murcha de *Fusarium* em feijão comum e caupi. Estas espécies já foram relatadas como agentes causais da murcha de *Fusarium* em outras culturas, no entanto, esse é o primeiro trabalho esclarecendo a etiologia desse patossistema no mundo, o que contribui e dar suporte à programas de seleção de cultivares resistentes.

Palavras chave: Ascomycetes; Doença de planta; Filogenia molecular.

Abstract

Fusarium wilt is a disease of common bean, causing losses in production in Brazil and other countries. The causal agent is known in the literature as *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. But recently, based on the phylogenetic analyses of several barcode regions, members

of the *Fusarium oxysporum* species complex – FOOSC have been described as phylogenetic species. In this study we investigated which species of the FOOSC can induce symptoms of wilt in common bean and cowpea, and if there is an correlation between the concept of *formae speciales* and the proposed phylogenetic species. Twenty two isolates with morphological characteristics of *F. oxysporum*, obtained from the main production areas in Brazil, were evaluated by means of phylogenetic analysis of sequences of the TEF barcode region and pathogenicity tests in common bean and cowpea. *Fusarium grosnichelii*, *F. gossypinum*, *F. kalimantanense*, *F. nirenbergiae*, *F. triseptatum*, *F. callistephi* and still two phylogenetic lineages, not named so far, induced typical symptoms of wilt in all inoculated plants. No specific markers for each of those species could be recognized. Those species have already been reported as causal agents of *Fusarium* wilt in other crops. Indeed, this is the first study evaluating the etiology of *Fusarium* wilt in common bean and cowpea under the aspect of redefinition of the species within the FOOSC. We bring strong evidence that the *forma specialis phaseoli* is actually represented by several phylogenetic species. Results presented here are contributing to the redefinition of the etiological agents of this disease, but will also give relevant support to breeding programs, aiming the selection of cultivars with durable resistance to this disease.

Key words: Ascomycetes; Molecular phylogeny; Plant disease.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Isolados do morfo-tipo *Fusarium oxysporum* obtidos de *Phaseolus vulgaris* cultivado em diferentes estados produtores de feijão do Brasil.

Tabela 2. Escala de notas para avaliação da patogenicidade de isolados do FOOSC com base nos sintomas visualizados na parte aérea.

Tabela 3. Sequências dos isolados de referência incluídos nas análises filogenéticas.

Figura 1. Árvore filogenética de máxima parcimônia (MP) inferida a partir de fragmentos do gene *EF-1a* mostrando a relação de *Fusarium* associada à murcha de *Fusarium* do feijoeiro com outras espécies dentro do complexo de espécies de *Fusarium oxysporum*. Os valores de bootstrap (1000 réplicas) de $MP \geq 70\%$ são mostrados nos entrenós. Isolados ex-tipo e ex-epítipo são indicados com T e ET, respectivamente.

Figura 2. *Fusarium* linhagem 1. **a-b.** Colônias em BDA; **a.** superfície da colônia; **b.** verso da colônia; **c-h.** Fotomicrografias de estruturas de *Fusarium* linhagem 1: **c.** conídios e clamidósporo; **d-e.** monofiálides no micélio aéreo; **f-h.** macroconídios e microconídios.

Figura 3. *Fusarium* linhagem 2. **a-b.** Colônias em BDA; **a.** superfície da colônia; **b.** verso da colônia; **c-e.** Fotomicrografia de características morfológicas de *Fusarium* linhagem 2: **c.** clamidósporos; **d.** monofiálides no micélio aéreo; **e.** macroconídios e microconídios.

Figura 4. Feijoeiro da cultivar BRS Estilo (*Phaseolus vulgaris*) inoculado com espécie de *Fusarium* linhagem 1 apresentando sintomas de murcha de *Fusarium*. **A.** testemunha à esquerda, plantas inoculadas à direita; **B.** folhas apresentando clorose e necrose; **C-D.** testemunha à esquerda e planta inoculada à direita. **E.** testemunha. **F.** raiz apresentando lesão provocada pelo patógeno (apontada pela seta).

Figura 5. Feijoeiro da cultivar BRS Estilo (*Phaseolus vulgaris*) inoculado com espécie de *Fusarium nirenbergiae* apresentando sintomas de murcha de *Fusarium*. **A.** testemunha à esquerda, plantas inoculadas à direita; **B.** folhas apresentando clorose e necrose; **C-D.** testemunha à esquerda e planta inoculada à direita. **E.** testemunha à esquerda, planta apresentando necrose no sistema vascular e na raiz.

Figura 6. Feijoeiro da cultivar BRS Estilo (*Phaseolus vulgaris*) inoculado com espécie de *Fusarium* linhagem 2 apresentando sintomas de murcha de *Fusarium*. **A.** testemunha à esquerda, plantas inoculadas à direita; **B.** planta tombando devido à necrose na raiz; **C.** testemunha à esquerda e planta inoculada à direita. **D.** testemunha. **E-F.** testemunha à esquerda, planta apresentando necrose no sistema vascular e na raiz.

Figura 7. Feijoeiro da cultivar BRS Estilo (*Phaseolus vulgaris*) inoculado com espécie de *Fusarium callistephi* apresentando sintomas de murcha de *Fusarium*. **A-B** testemunha à esquerda, plantas inoculadas à direita; **C.** testemunha; **D** planta inoculada com necrose na raiz; **E.** caule apresentando necrose na parte externa; **F.** necrose no sistema vascular.

Figura 8. Feijoeiro da cultivar BRS Estilo (*Phaseolus vulgaris*) inoculado com espécies de FOOSC. Plantas inoculadas com: **a.** *Fusarium callistephi*; **b.** *F. triseptatum*; **c.** *F. nirenbergiae*;

d. *F. gossypinum*; **e.** *F. kalimantanense*; **f.** *F. gros-michelii*; **g.** *F. oxysporum* linhagem 1; **h.** *F. oxysporum* linhagem 2.

Figura 9. Feijoeiro da cultivar Pingo de ouro (*Vigna unguiculata*) inoculado com espécies de FOSC. Plantas inoculadas com: **a.** *Fusarium callistephi*; **b.** *F. triseptatum*; **c.** *F. nirenbergiae*; **d.** *F. gossypinum*; **e.** *F. kalimantanense*; **f.** *F. gros-michelii*; **g.** *F. oxysporum* linhagem 1; **h.** *F. oxysporum* linhagem 2.

Figura 10. Feijoeiro da cultivar Pingo de ouro (*Vigna unguiculata*) inoculado com espécie de *Fusarium gros-michelii* apresentando sintomas de murcha de *Fusarium*. **A.** testemunha à esquerda, plantas inoculadas à direita com clorose nas folhas; **B.** controle; **C-D.** plantas inoculadas com necrose vascular.

Figura 11. Feijoeiro da cultivar Pingo de ouro (*Vigna unguiculata*) inoculado com espécie de *Fusarium nirenbergiae* apresentando sintomas de murcha de *Fusarium*. **A.** testemunha à esquerda, plantas inoculadas à direita com clorose nas folhas; **B.** controle; **C-D.** plantas inoculadas com necrose vascular

NOTAS DE RODAPÉ DAS TABELAS

Tabela 1. ¹ = AM - Coleção de isolados: Arianna Santana de Menezes

Tabela 2. ^aCBS = Westerdijk Fungal Biodiversity Center, Utrecht, The Netherlands; CPC = Collection of P.W. Crous; InaCC = Indonesian Culture Collection, Research Center for Biology, Indonesian Institute of Sciences (LIPI) Cibinong, Indonesia; Indo = Collection of N. Maryani at Wageningen Plant Research, Wageningen University, The Netherlands; NRRL = Agricultural Research Service Culture Collection, USA; Isolados ex-tipo e ex-epítipo são indicados com T e ET, respectivamente.

Tabela 3. Fonte: adaptado de Van Schoonhoven e Pastor-Corrales, 1987.

Introdução

A murcha de *Fusarium* do feijoeiro ocorre em diversas áreas de cultivo de feijão em países como Colômbia, Equador, Panamá, China e Brasil, onde pode causar perdas consideráveis nos cultivos de feijoeiro devido ao plantio sequente da mesma cultura (Abawi e Pastor-Corrales 1990; Xue et al. 2015). O fungo coloniza a planta através das raízes e inicia assim o processo de colonização no sistema vascular, causando amarelecimento das folhas, nanismo, murcha parcial e conseqüentemente morte da planta (Leitão et al. 2020).

O agente etiológico é identificado como *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em função de suas características morfológicas e de patogenicidade. O conceito técnico de *formae speciales* foi empregado para diferenciar populações com características fisiológicas distintas, baseado na patogenicidade específica a determinado hospedeiro. Atualmente, mais de 100 *formae speciales* de *F. oxysporum* encontram-se registradas na literatura (Edel-Hermann e Lecomte 2019). Baseado em análises de filogenia molecular com seqüências das regiões gênicas *tef1*, *rpb1*, *rpb2*, *cmdA*, IGS e *tub2*, isolados identificados anteriormente como *Fusarium oxysporum* e agrupados em *formae speciales* de acordo com a sua capacidade de causar doença, foram definidos como espécies filogenéticas distintas. Com isso, 26 espécies foram descritas como membros do Complexo de espécies *Fusarium oxysporum* (FOSC), em associação a diferentes hospedeiros, tais como algodão, banana, soja e tomate (O'Donnell et al. 1998, 2013; Lombard et al. 2019; Maryani et al. 2019). Pretendemos esclarecer as seguintes questões: (i.) Quais espécies do FOSC estão associadas a plantas de feijoeiro com sintomas de murcha de *Fusarium*? (ii.) Quais espécies do FOSC causam a murcha de *Fusarium* em feijoeiro no Brasil? (iii.) As espécies patogênicas ao feijoeiro comum, causam murcha também em feijão caupi?

Material e Métodos

Isolamento, cultivo monospórico e preservação dos isolados

Foram obtidos isolados de raízes de plantas de feijoeiro sintomáticas e não sintomáticas (próximas de reboleiras) nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Paraná, São Paulo, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul e Ceará (Tabela 1). As plantas foram obtidas em diferentes condições de cultivo (irrigado, sequeiro, plantio direto e convencional). Para a realização dessa etapa, contamos com a ajuda de colaboradores presentes nos estados citados.

As raízes foram observadas a fim de verificar a presença de estruturas de *F. oxysporum* para isolamento direto, que consiste na transferência dessas estruturas para placas de Petri contendo meio de extrato de malte 2% (MA2%). Na ausência dessas estruturas, as raízes foram

lavadas em água corrente e secadas em papel toalha para isolamento indireto. Os fragmentos foram transferidos para placas contendo MA2%, e incubadas em câmara incubadora tipo BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) sob temperatura de 26 °C e fotoperíodo de 12 horas de luz branca fluorescente. Quando notado crescimento micelial característico do gênero *Fusarium* foi realizada a transferência de fragmentos de micélio para placas contendo meio MA2% e submetidos à incubação em temperatura de 26 °C e fotoperíodo de 12 horas de luz branca fluorescente e 12 horas de escuro, para crescimento das colônias.

Culturas puras com características morfológicas de *F. oxysporum* foram submetidos ao cultivo monospórico, sendo cultivadas em meio *synthetic low nutrient agar* (SNA) sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas de luz. Em seguida, foram preservados em água destilada esterilizada, armazenados a 10 °C, no escuro, criopreservados em suspensão de esporos em 15% glicerol a -80 °C e depositados na Coleção Micológica de Lavras (CML).

Avaliação de marcadores morfológicos

Para a caracterização morfológica dos isolados seguiu-se os protocolos de Leslie e Summerell (2006). Os isolados foram cultivados em placas de Petri de 6 cm de diâmetro, contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) e foram incubados em câmara tipo BOD, a temperatura de 25 °C no escuro por 4 dias para avaliação da taxa de crescimento das colônias, e com fotoperíodo de 12 horas por 10 dias para avaliação da pigmentação e morfologia, respectivamente.

As características micromorfológicas foram avaliadas em meio SNA com folha de cravo, os isolados foram incubados em câmara tipo BOD, a temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas, em um período de 10 e 15 dias de crescimento, nos quais as dimensões dos conídios produzidos no micélio aéreo e esporodóquio foram medidas, bem como a observação de seu formato e septação. As características dos conidióforos e a produção de clamidósporos também foram observadas.

Extração de DNA, PCR, sequenciamento e análise filogenética

Os isolados foram cultivados em meio líquido à base de extrato de malte 2% por três dias, em temperatura ambiente (25 a 28 °C) sob agitação de 100 rpm em agitador de mesa orbital. O micélio foi filtrado, macerado em nitrogênio líquido, e a extração de DNA foi realizada utilizando-se o método CTAB (O'Donnell 1992). As amostras de DNA foram quantificadas utilizando-se o aparelho NanoDrop 2000 e, visualmente, em gel de agarose 1,2%. As regiões gênicas que foram amplificadas são a segunda maior subunidade da RNA polimerase (RPB2), e fator de alongação 1- α (EF-1 α). Na amplificação do fragmento do RPB2, foram

utilizados os primers 5F2 e 7cR (Liu et al. 1999; Sung et al. 2007). Para a amplificação do fragmento do gene EF-1 α , foram utilizados os primers Ef-1 e Ef-2 (O'Donnell et al. 1998).

As reações de PCR foram realizadas no termociclador MyCyclerTM (BIO-RAD). As condições de ciclo para RPB2, foi 94°C, por 90 segundos; 40 ciclos: 94°C, por 30 segundos; 55°C, por 90 segundos e 1 ciclo 68°C, por 2 minutos; 68°C por 5 minutos (O'Donnell et al. 2008). Para EF-1 α foram: 94°C, por 1 minuto; 34 ciclos: 94°C, por 30 segundos; 62°C, por 45 segundos; 72°C, por 1 minuto e 72°C, por 5 minutos (O'Donnell et al. 1998). Procedeu-se a eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da PCR com GelRed (Biotium[®]) e visualização realizada em um fotodocumentador da marca DNR Bio Imaging Systems e modelo MiniBIS. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o PCR Products Purification Kit (Ludwig Biotecnologia) para, posteriormente, serem sequenciados.

Fragmentos dos genes foram sequenciados nas direções senso e antisenso, no laboratório da empresa Psomagen, USA. Analisamos os eletroferogramas visualmente, utilizando o programa SeqAssem[®] (Hepperle 2004) e as sequências obtidas foram comparadas com a base de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information, NCBI, por meio da ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sequências de referência de *Fusarium oxysporum* correspondentes às regiões sequenciadas, previamente depositadas no GenBank, também foram acrescentadas às análises. Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos foram gerados utilizando-se a ferramenta CLUSTALW (Thompson et al. 1994), implementada no programa MEGAX (Kumar et al. 2018). As análises filogenéticas foram realizadas pelos métodos de Máxima verossimilhança e Máxima Parcimônia, também no programa MEGAX.

Teste de patogenicidade

Para a obtenção do inóculo, os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio extrato de malte a 2% e mantidos a 25°C e fotoperíodo de 12 h por 10 dias (Leslie e Summerell 2006). O inóculo foi preparado pelo método milho triturado + Fungo, que consiste na utilização de milho triturado (canjiquinha) esterilizado como substrato. O substrato foi acondicionado em frascos Erlenmeyers de 500 mL, preenchendo o volume de 200 ml, e a umidade mantida por adição de 60 mL de água destilada esterilizada. Os frascos contendo o milho triturado foram autoclavados a 120°C por 1h, duas vezes, com intervalo de 24h. Posteriormente, 6 discos de micélio (5 mm de diâmetro) retirado de colônias de *F. oxysporum* foram transferidos para cada frasco contendo o milho autoclavado. Os frascos foram mantidos em incubadora tipo BOD durante 10 dias a 25°C e luz intermitente.

As plântulas de feijão comum e feijão caupi, cultivares BRS Estilo e Pingo de ouro respectivamente, foram previamente cultivadas durante 8 a 10 dias (folhas primárias totalmente expandidas) em bandejas contendo vermiculita esterilizada. Para o transplântio foram utilizados copos de 700 mL contendo um substrato composto por solo, areia e substrato comercial (Carolina Soil ®) na proporção 1:1:1. Para a inoculação, utilizou-se uma camada de substrato, seguida de 30g de canjiquinha contendo o fungo, posteriormente outra camada de substrato, e por fim, foi introduzida a plântula de feijão. As plantas foram mantidas em casa de vegetação a 28 °C e foram irrigadas diariamente, conforme necessidade hídrica. Para o tratamento controle, as plântulas foram transferidas para copos contendo substrato e canjiquinha não inoculada (Costa et al. 2012, Dita et al. 2010).

Cada tratamento consistiu em um isolado representante de cada espécie identificada por análise de filogenia molecular, mais um tratamento controle com plantas não inoculadas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada parcela experimental composta por uma planta. As plantas de feijão foram avaliadas quanto a patogenicidade e a severidade da doença. Os sintomas foliares foram analisados com base na escala de notas do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) as quais variam de 1 a 9, onde são considerados resistentes linhagens com nota média de 1 a 3; de 3,1 a 6, intermediárias e, de 6,1 a 9, suscetíveis. (Tabela 2) (Van Schoonhoven e Pastor-Corrales, 1987).

Também foi considerada a avaliação da porcentagem de necrose vascular, a qual foi realizada aos 30 dias após a inoculação (DAI) ou à medida que se encontravam plantas mortas. As plantas foram retiradas cuidadosamente dos vasos, e suas raízes lavadas em água corrente para remoção do substrato e avaliação da severidade. Para o cálculo desse percentual, a haste foi cortada longitudinalmente para medição da área com escurecimento vascular (Galdino et al. 2021). Os dados obtidos foram submetidos à análises não paramétricas com os testes de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn e analisados através do Software R.

Resultados

Filogenia molecular

A análise filogenética baseada no gene *tefl* mostrou que 22 isolados representam espécies do FOOSC. Isolados foram agrupados com sequências de referência de *Fusarium gros-michelii* (n=5), *F. gossypinum* (n = 1), *F. kalimantanense* (n = 1), *F. nirenbergiae* (n = 1) e *F. triseptatum* (n = 1). Quatro isolados formaram um clado separado, sendo referidos como *Fusarium* linhagem 1. O isolado AM19 não agrupou com nenhuma sequência de referência,

citado como *Fusarium* linhagem 2. Com material de referência de *F. callistephi* agruparam 8 isolados (Fig. 1).

Avaliação de marcadores morfológicos

Os isolados da linhagem 1, AM01, AM02, AM18 e AM22, apresentaram coloração de colônia variando de branca a roxa (Fig. 2). O crescimento micelial apresentou um diâmetro de aproximadamente 1,3 cm por dia de cultivo em meio BDA e incubados em BOD a 25°C no escuro. Microconídios produzidos no micélio em aéreo em mono e polifiálides, apresentaram formas cilíndrica, oval e elipsoidal, número de septos variando de 0-1, sendo 0: 5-10 x 1-3 µm e 1: 13-17 x 2-4 µm. Macroconídios formados no micélio aéreo e esporodóquio apresentaram de 3-6 septos, com 42-77 x 2,5 µm, com formato falcado, célula apical curvada e célula pé bem desenvolvida. Em meio SNA com folha de cravo, foi observada produção de esporodóquio de coloração marrom claro. Clamidósporo ausente. O AM02 diferiu dos demais isolados apenas no tamanho do macroconídio (35-92 x 2,5-4 µm), apresentando um comprimento maior.

O isolado da linhagem 2 apresentou colônia de coloração roxa (Fig. 3). O crescimento micelial apresentou um diâmetro de aproximadamente 1,3 cm por dia de cultivo em meio BDA a 25°C no escuro. Microconídios produzidos em monofiálides no micélio aéreo, apresentaram formas cilíndrica, oval e elipsoidal, número de septos variando de 0-1, sendo 0: 6-9 x 1-3 µm e 1: 14-17 x 2-4 µm. Macroconídios formados no esporodóquio apresentaram de 3-5 septos, com 32-55 x 5 µm, com formato falcado, célula apical curvada e célula pé bem desenvolvida. Em meio SNA com folha de cravo, foi observada produção de esporodóquio de coloração laranja. Clamidósporo ausente.

Teste de patogenicidade

Todas as espécies e linhagens identificadas induziram sintomas de murcha de *Fusarium* no feijoeiro. Em feijão comum, os sintomas iniciaram-se aos 13 DAI, observando-se clorose e necrose nas folhas mais velhas (Fig. 4 e 5). Nas horas mais quentes do dia todas as plantas inoculadas apresentaram sintoma de murcha. Também foi observado crescimento reduzido e escurecimento vascular nas plantas inoculadas com *Fusarium gros-michelii*, *F. nirenbergiae*, *F. gossypinum*, *F. triseptatum*, *F. kalimantanense*, *F. callistephi* e com as linhagens 1 e 2. Os sintomas em feijão caupi foram tardios e caracterizados por clorose iniciando nas folhas mais velhas, progredindo para as mais novas. Foi observado sintoma de murcha em todas as plantas inoculadas durante as horas mais quentes do dia.

Todas as espécies identificadas como *Fusarium gros-michelii*, *F. nirenbergiae*, *F. gossypinum*, *F. triseptatum*, *F. kalimantanense* e *F. callistephi* e linhagens filogenéticas 1 e 2,

induziram sintomas na parte aérea em feijão comum, com índice de severidade variando entre 3 (resistente) a 6 (intermediária) (Fig. 6 e 7). Em relação ao percentual de necrose vascular, as dimensões das lesões variaram entre 11,9% a 75% da área do hipocótilo (Fig. 8). Realizamos análises não paramétricas com os testes Kruskal-Wallis e Dunn e observamos que apenas duas espécies *F. callistephi* e *F. triseptatum* diferiram estatisticamente do controle, e as demais, apesar de apresentarem nota e lesão, não diferiram do controle a 5% de significância.

Em feijão caupi, somente as espécies *F. grosnichelii* (Fig. 10) e *F. nirenbergiae* (Fig. 11) induziram sintomas na parte aérea com índice de severidade 3 (resistente) e 4 (intermediária), respectivamente. No entanto, todas as espécies induziram necrose no sistema vascular com valores de 3% a 54% da área do hipocótilo (Fig. 9).

Discussão

No presente estudo, baseado na análise filogenética do gene *EF-1 α* , isolados do morfotipo *Fusarium oxysporum* obtidos do feijoeiro com sintoma de murcha foram identificados como *F. grosnichelii*, *F. nirenbergiae*, *F. gossypinum*, *F. triseptatum*, *F. kalimantanense* e *F. callistephi*, espécies filogenéticas pertencentes ao FOOSC. No teste de patogenicidade com feijão comum e feijão caupi, os isolados representantes das espécies identificadas induziram sintomas de murcha de *Fusarium*. Esse é o primeiro trabalho esclarecendo a etiologia desse patossistema identificando os agentes causais baseado no conceito da espécie filogenética. Estas espécies foram obtidas de plantas com sintomas de murcha de *Fusarium* também em outras culturas. De acordo com a literatura, *Fusarium grosnichelii* foi relatado como patógeno da bananeira, *F. nirenbergiae* induz murcha em cravo, maracujá, tomate, batata, centeio e banana, enquanto *F. kalimantanense* causa doença na bananeira e induz sintomas de murcha em melão (Lombard et al. 2019, Maryani et al. 2019, Araújo et al. 2020). Em algodoeiro, as espécies *Fusarium triseptatum* e *F. gossypinum* foram relatadas como os agentes causais de murcha. *Fusarium triseptatum* também é patógeno da batata-doce. A espécie *F. callistephi* foi descrita a partir de isolado obtido da planta ornamental *Callistephus chinensis* (Lombard et al. 2019). Não há informação sobre outras plantas hospedeiras.

Estudos recentes demonstram que os genes *barcode* empregados para inferências filogenéticas de espécies do FOOSC, não possuem relação com a patogenicidade específica do hospedeiro deste patógeno, enquanto uma única espécie pode se tratar de diferentes *formae speciales* (O'Donnell et al., 1998; Fourie et al., 2009, Lombard et al., 2019).

As espécies identificadas neste estudo apresentaram morfologia de acordo com o descrito na literatura, com exceção das espécies *F. callistephi*, *F. gossypinum* e *F. kalimantanense*, características que foram consideradas como marcadores morfológicos destas espécies em sua descrição original não foram observadas neste estudo. Para *F. callistephi*, a descrição original relata a produção de microconídios apenas em monofiálides, e a ausência da produção de macroconídios no micélio aéreo, enquanto nos isolados trabalhados por nós pertencentes a essa espécie, esses marcadores não foram observados. Já para *F. gossypinum* e *F. kalimantanense* apresentaram polifiálides no micélio aéreo, diferente do registrado na literatura (Lombard et al. 2019, Maryani et al. 2019).

Para confirmar que todas as espécies induziram sintomas de murcha de *Fusarium* no feijoeiro, foi realizado o reisolamento do patógeno, a fim de fechar o Postulado de Koch. Os sintomas observados foram murcha, nanismo, clorose e necrose em folhas e sistema vascular, sintomas característicos da murcha de *Fusarium* (Vieira 1983, Abawi 1989). Nas horas mais quentes do dia todas as plantas inoculadas apresentaram sintoma de murcha.

Dentre as espécies inoculadas em feijão comum, apenas *F. callistephi* e *F. triseptatum* apresentaram nível de virulência maior em comparação ao controle e as demais espécies de acordo com a análise estatística. As demais espécies e linhagens não apresentaram diferenças no nível de virulência. Em feijão caupi, aos 30 DAI, *Fusarium grosnichelii*, *F. nirenbergiae*, *F. triseptatum*, *F. gossypinum*, *F. callistephi* e as duas linhagens apenas induziram pequenas lesões no sistema radicular e coroa das plantas inoculadas e não foram observados sintomas foliares, como clorose e necrose. Segundo Assunção et al. (2003), em plantas mais desenvolvidas, a infecção por *F. oxysporum* causa nanismo e a clorose precede a queda das folhas, também é observada uma murcha gradual de toda a planta e escurecimento vascular. Isso sugere que há uma possibilidade de se realizar a avaliação da severidade com um tempo superior de inoculação para que os sintomas da parte aérea sejam visualizados.

Nesse estudo, a hipótese de que mais de uma espécie filogenética do complexo FOOSC causa doença no feijoeiro foi confirmada, uma vez que todas as espécies e linhagens filogenéticas encontradas nesse estudo, *Fusarium grosnichelii*, *F. nirenbergiae*, *F. gossypinum*, *F. triseptatum*, *F. kalimantanense*, *F. callistephi* induziram sintomas de murcha de *Fusarium* em feijão comum e feijão caupi. *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* representa uma população de grande diversidade. Mesmo com amostragem reduzida de isolados, foi possível detectar a presença de seis espécies distintas e duas linhagens filogenéticas. Como perspectivas futuras, pretendemos identificar as linhagens filogenéticas a nível de espécie a partir da amplificação de mais duas regiões gênicas *barcode* e realizar ensaios de

patogenicidade para avaliar como as espécies identificadas se encaixam no conceito de raças em feijoeiro.

Agradecimentos

Parte desta pesquisa foi financiada pela FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais. Agradecimentos a Edson Luis Rezende pela habilidosa assistência técnica.

Literatura citada

Abawi GS, Pastor-Corrales MA (1990) Root Rots of Beans in Latin America and Africa: Diagnosis, Research and Methodologies and Management Strategies. Cali, Colombia: CIAT

Abawi GS (1989) Root Rots. In: Schwartz HF, Pastor-Corrales MA. (Eds.) Bean production problems in the tropics. 2nd. Ed. CIAT, Cali. p. 105-157

Araújo MBM, Moreira GM, Nascimento LV, Nogueira GA, Nascimento SRC, Pfenning LH, Ambrósio MMQ (2020) *Fusarium* rot of melon is caused by several *Fusarium* species. Plant Pathology 70:712–721

Assunção IP, Michereff SJ, Mizubuti ESG, Brommonschenkel SH (2003) Influência da intensidade da murcha-de-fusário no rendimento do caupi. Fitopatologia Brasileira 2:615-619

Costa RV, Silva DD, Cota LV, Lanza FE (2012) Metodologia para avaliação da reação de genótipos de milho a *Fusarium verticillioides* em casa de vegetação. Circular Técnica, EMBRAPA, Sete Lagoas - MG.

Dita MA, Waalwijk C, Buddenhagen IW, Souza Jr MT, Kema GHJ (2010) A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana *Fusarium* wilt pathogen. Plant Pathology 59:348-357

Edel-Hermann V, Lecomte C (2019) Current status of *Fusarium oxysporum formae speciales* and races. Phytopathology 109:512-530

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

Galdino ACS, de Freitas MB, de Borba MC, Stadnik MJ (2021) Phenolic and flavonoid content in roots and hypocotyls of resistant and susceptible bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) during early stage of colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Tropical Plant Pathology 46:553-558

Garcés-Fiallos FR, Borba MC, Schmidt EC, Bouzon ZL, Stadnik MJ (2017) Delayed upward colonization of xylem vessels is associated with resistance of common bean to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. European Journal of Plant Pathology 149:477-489

Hepperle D (2004) SeqAssem^a. Win32-Version. A Sequence Analysis Tool Contig Assembler and Trace Data Visualization Tool for Molecular Sequences Disponível em: <http://www.sequentix.de>

- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547–1549
- Leitão ST, Malosetti M, Song Q, Eeuwijk FV, Rubiales D, Patto MCV (2020) Natural variation in portuguese common bean germplasm reveals new sources of resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* and resistance-associated candidate genes. *Phytopathology* 110:633-647
- Leslie JF, Summerell BA (2006) The *Fusarium* laboratory manual. Malden: Blackwell Publishers
- Liu YJ, Whelen S, Hall BD (1999) Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16:1799-1808
- Lombard L, Sandoval-Denis M, Lamprecht SC, Crous PW (2019) Epitypification of *Fusarium oxysporum* – clearing the taxonomic chaos. *Persoonia* 43:1-47
- Martyn RD, McLaughlin RJ (1983) Effects of inoculum concentration on the apparent resistance of watermelons to *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Plant Disease* 67:493-495
- Maryani N, Lombard L, Poerba YS, Subandiyah S, Crous PW, Kema GHJ (2019) Phylogeny and genetic diversity of the banana *Fusarium* wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. *Studies in Mycology* 92:155-194
- O'Donnell K, Rooney AP, Proctor RH, Brown DW, McCormick SP, Ward TJ, Frandsen RJN, Lysoe E, Rehner SA, Aoki T, Robert VARG, Crous PW, Groenewald JZ, Kang S, Geiser DM (2013) Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genetics and Biology* 52:20-31
- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC (1998) Multiple evolutionary origins of the fungus causing panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings National Academy Science* 95:2044-2049
- O'Donnell K (1992) Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Current Genetics* 22:213-220
- Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematics Biology* 61:539-542
- Sung GH, Sung JM, Hywel-Jones NL, Spatafora JW (2007) A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44:1204-1223
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W (1994). Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680

Van Schoonhoven A, Pastor-Corrales MA (1987) Standard system for the evaluation of bean germplasm. CIAT, Cali, Colombia

Vieira C (1983) Doenças e pragas do feijoeiro. Viçosa UFV. 231 p.

Xue R, Wu J, Zhu Z, Wang L, Wang X, Wnag S, Blair MW (2015) Differentially expressed genes in resistant and susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. PLoS ONE 10:1-20

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 Isolados do morfo-tipo *Fusarium oxysporum* obtidos de *Phaseolus vulgaris* cultivado em diferentes estados produtores de feijão do Brasil.

Nº de isolados	¹ Cód de trabalho	Localização
1	AM 01	Taquarivari SP
2	AM 02	Taquarivari SP
3	AM 05	Rio Verde GO
4	AM 07	Tangará da Serra MT
5	AM 09	Dourados MS
6	AM 11	Ponta Grossa PR
7	AM 12	Ponta Grossa PR
8	AM 14	Cristalina GO
9	AM 16	Tangará da Serra MT
10	AM 17	Lagoa Grande MG
11	AM 18	Lavras MG
12	AM 19	Araxá MG
13	AM 20	Araxá MG
14	AM 21	Araxá MG
15	AM 22	Taquarivari SP
16	AM 23	Rio Verde GO
17	AM 26	Dourados MS
18	AM 28	Dourados MS
19	AM 31	Tubarão SC
20	AM 32	Tubarão SC
21	AM 42	Tubarão SC
22	AM 43	Paracuru CE

¹AM - Coleção de isolados de Arianna Santana de Menezes

Tabela 2 Escala de notas para avaliação da patogenicidade de isolados do FOSC com base nos sintomas visualizados na parte aérea.

Nota	Descrição
1	Sem sintomas visíveis;
3	Não mais do que 10% das folhas apresentando murcha;
5	Aproximadamente 25% das folhas apresentando murcha e clorose;
7	Aproximadamente 50% das folhas apresentando murcha, clorose e necrose limitada;
9	Aproximadamente 75%, ou mais, das folhas apresentando murcha, clorose, necrose, desfolha, e eventual morte da planta.

Fonte: adaptado de Van Schoonhoven e Pastor-Corrales, 1987.

Tabela 3. Sequências dos isolados de referência incluídos nas análises filogenéticas

Espécie	Código^a	Hospedeiro/substrato	Forma <i>specialis</i>	Origem	GenBank <i>EF-1α</i>
<i>Fusarium callistephi</i>	CBS 187.53 ^T	<i>Callistephus chinensis</i>	<i>callistephi</i>	Holanda	MH484966
<i>F. fabacearum</i>	CBS 144743 = CPC 25802 ^T	<i>Glycine max</i>		África do Sul	
	CBS 144744 = CPC 25803	<i>G. max</i>		África do Sul	
<i>F. foetens</i>	NRRL 38302	<i>Nicotiana tabacum</i>			KU171723
	CBS 120665	<i>N. tabacum</i>		Irã	MH485009
<i>F. glycines</i>	CBS 214.49	<i>Glycine max</i>		Argentina	MH484960
	CBS 144745 = CPC 25804	<i>G. max</i>		África do Sul	MH485032
	CBS 144746 ^T	<i>G. max</i>		África do Sul	MH485033
<i>F. gossypinum</i>	CBS 116613 ^T	<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>vasinfectum</i>	Costa do Marfim	MH485000
	CBS 116611	<i>G. hirsutum</i>	<i>vasinfectum</i>	Costa do Marfim	MH484998
	CBS 116612	<i>G. hirsutum</i>	<i>vasinfectum</i>	Costa do Marfim	MH484999
<i>F. gros-michelii</i>	InaCC F849	<i>Musa acuminata</i> var. Pisang Ambon	<i>cubense</i>	Indonésia	LS479787
	Indo 19 = InaCC F833 ^T	<i>Musa</i> sp. var. Pisang Awak	<i>cubense</i>	Indonésia	LS479744
	InaCC F832	<i>Musa</i> sp. var. Pisang Awak	<i>cubense</i>	Indonésia	LS479738
	InaCC F852	<i>M. acuminata</i> var. Pisang Ambon Lumu	<i>cubense</i>	Indonésia	LS479790
<i>F. kalimantanense</i>	InaCC F917 = Indo 110 ^T	<i>M. acuminata</i> var. Pisang Ambon	<i>cubense</i>	Indonésia	LS479690
	InaCC F918	<i>M. acuminata</i> var. Pisang Ambon	<i>cubense</i>	Indonésia	LS479691
	InaCC F922	<i>M. acuminata</i> var. Pisang Ambon	<i>cubense</i>	Indonésia	LS479695

<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 758.68 = NRRL 36546	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>lycopersici</i>	Holanda	MH484968
	CBS 840.88 ^T	<i>Dianthus caryophyllus</i>	<i>dianthi</i>	Holanda	MH484978
	CBS 744.79 = BBA 62355 = NRRL 22549	<i>Passiflora edulis</i>	<i>passiflorae</i>	Brasil	MH484973
<i>F. oxysporum</i>	CBS 144134 ^{ET}	<i>S. tuberosum</i>		Alemanha	MH485044
<i>F. purpurascens</i>	Indo79 = InaCC F886E ^T	<i>Musa sp.</i> var. Pisang Kepok	<i>cubense</i>	Indonésia	LS479827
	Focu7 = ATCC76244	<i>M. acuminata</i> var. Apple	<i>cubense</i>	EUA	LS479645
<i>F. trisseptatum</i> f. sp. <i>batatas</i>	NRRL 36389 = CBS 258.50 ^T	<i>Ipomoea batatas</i>	<i>batatas</i>	EUA	MH484964
<i>F. triseptatum</i>	CBS 116619	<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>vasinfectum</i>	Costa do Marfim	MH485001

^aCBS = Westerdijk Fungal Biodiversity Center, Utrecht, The Netherlands; CPC = Collection of P.W. Crous; InaCC = Indonesian Culture Collection, Research Center for Biology, Indonesian Institute of Sciences (LIPI) Cibinong, Indonesia; Indo = Collection of N. Maryani at Wageningen Plant Research, Wageningen University, The Netherlands; NRRL= Agricultural Research Service Culture Collection, USA; Isolados ex-tipo e ex-epítipo são indicados com T e ET, respectivamente.

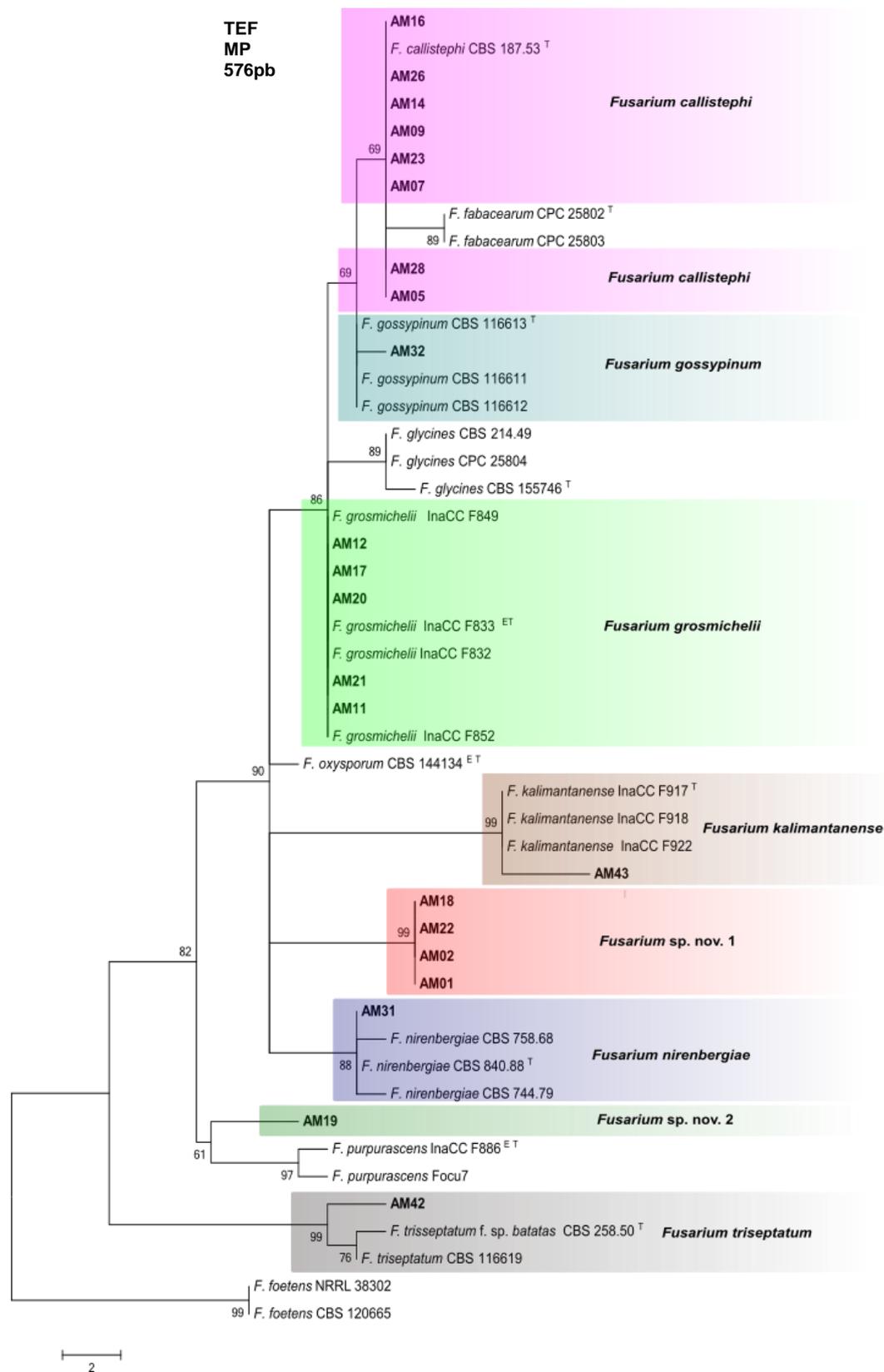


Figura 1. Árvore filogenética de máxima parcimônia (MP) inferida a partir de fragmentos do gene EF-1 α mostrando a relação de *Fusarium* associada à murcha de *Fusarium* do feijoeiro com outras espécies dentro do complexo de espécies de *Fusarium oxysporum*. Os valores de bootstrap (1000 réplicas) de MP \geq 70% são mostrados nos entrenós. Isolados ex-tipo e ex-epítipo são indicadas com T e ET, respectivamente.

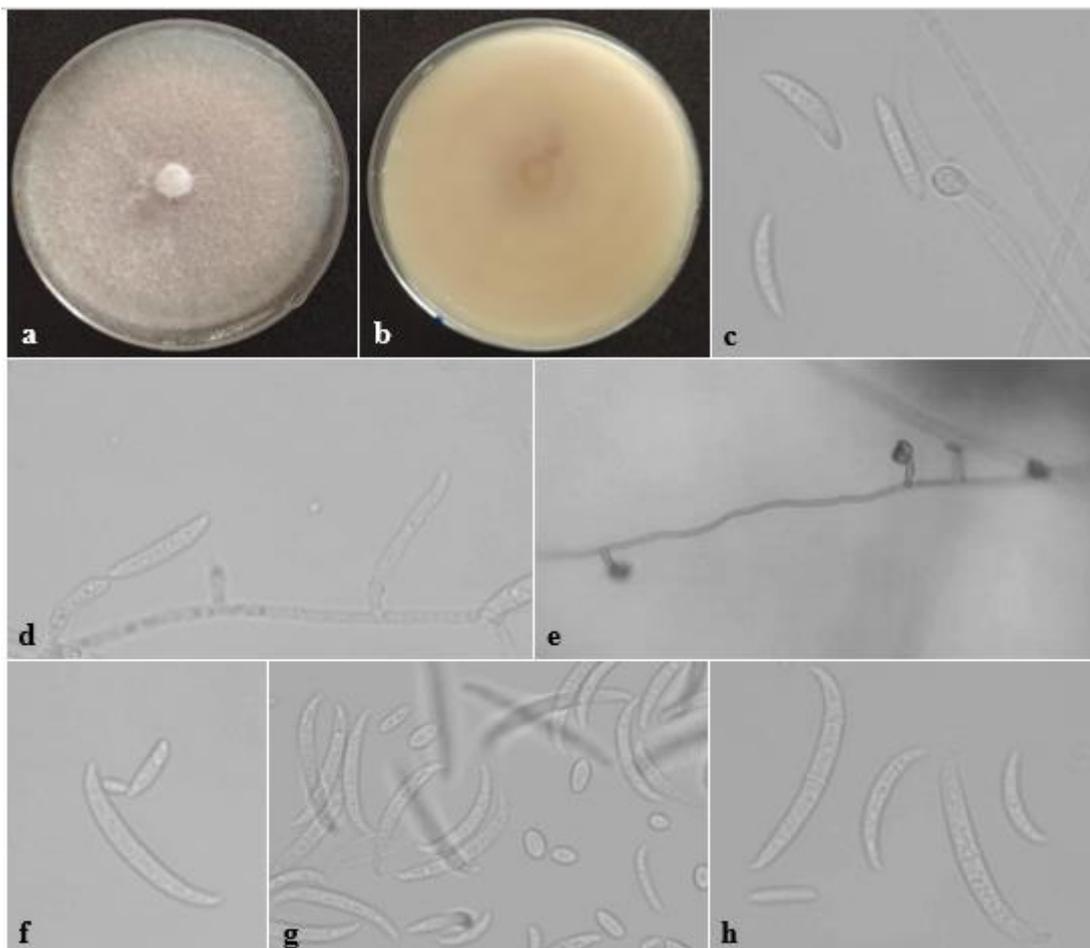


Figura 2. *Fusarium* linhagem 1. **a-b.** Colônias em BDA; **a.** superfície da colônia; **b.** verso da colônia; **c-h.** Fotomicrografias de estruturas de *Fusarium* linhagem 1: **c.** conídios e clamidósporo; **d-e.** monofíalides no micélio aéreo; **f-h.** macroconídios e microconídios.

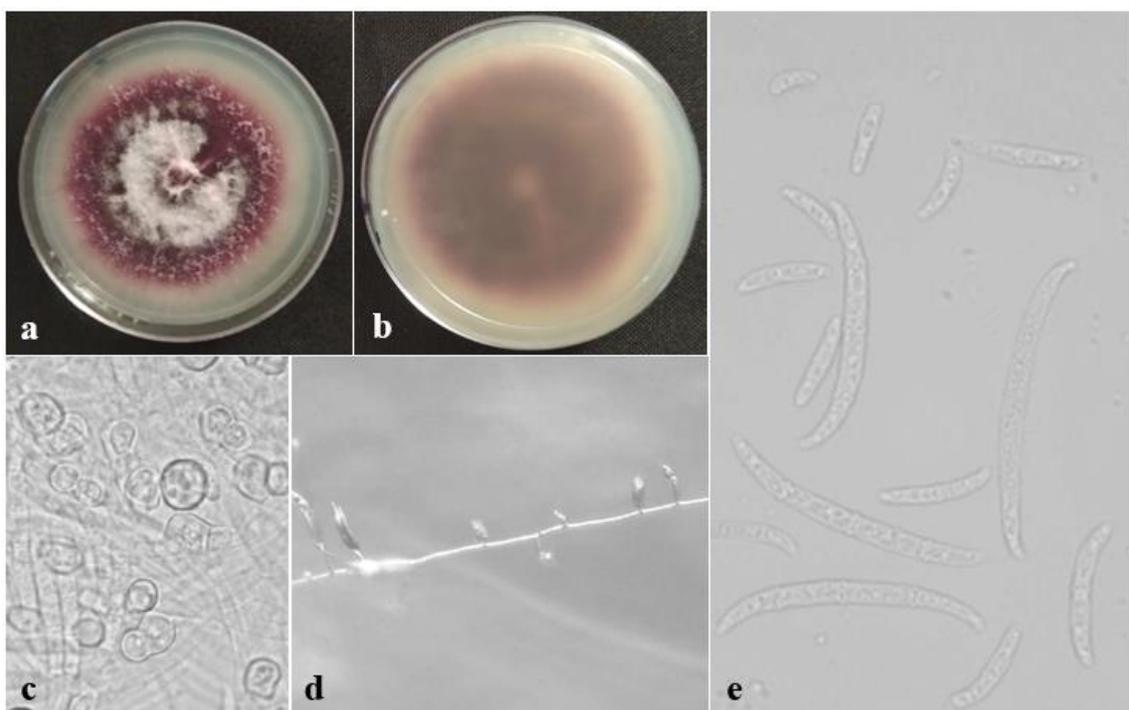


Figura 3. *Fusarium* linhagem 2. **a-b.** Colônias em BDA; **a.** superfície da colônia; **b.** verso da colônia; **c-e.** Fotomicrografia de características morfológicas de *Fusarium* linhagem 2: **c.** clamidósporos; **d.** monofialides no micélio aéreo; **e.** macroconídios e microconídios.

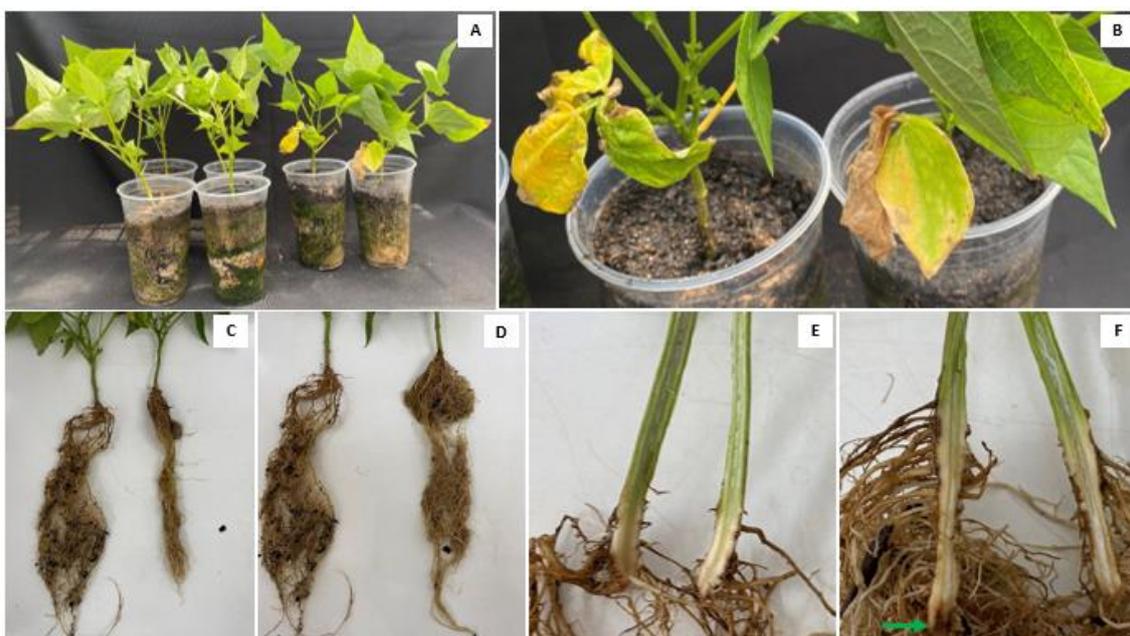


Figura 4. Feijoeiro da cultivar BRS Estilo (*Phaseolus vulgaris*) inoculado com espécie de *Fusarium* linhagem 1 apresentando sintomas de murcha de *Fusarium*. **A.** testemunha à esquerda, plantas inoculadas à direita; **B.** folhas apresentando clorose e necrose; **C-D.** testemunha à esquerda e planta inoculada à direita. **E.** testemunha. **F.** raiz apresentando lesão provocada pelo patógeno (apontada pela seta).

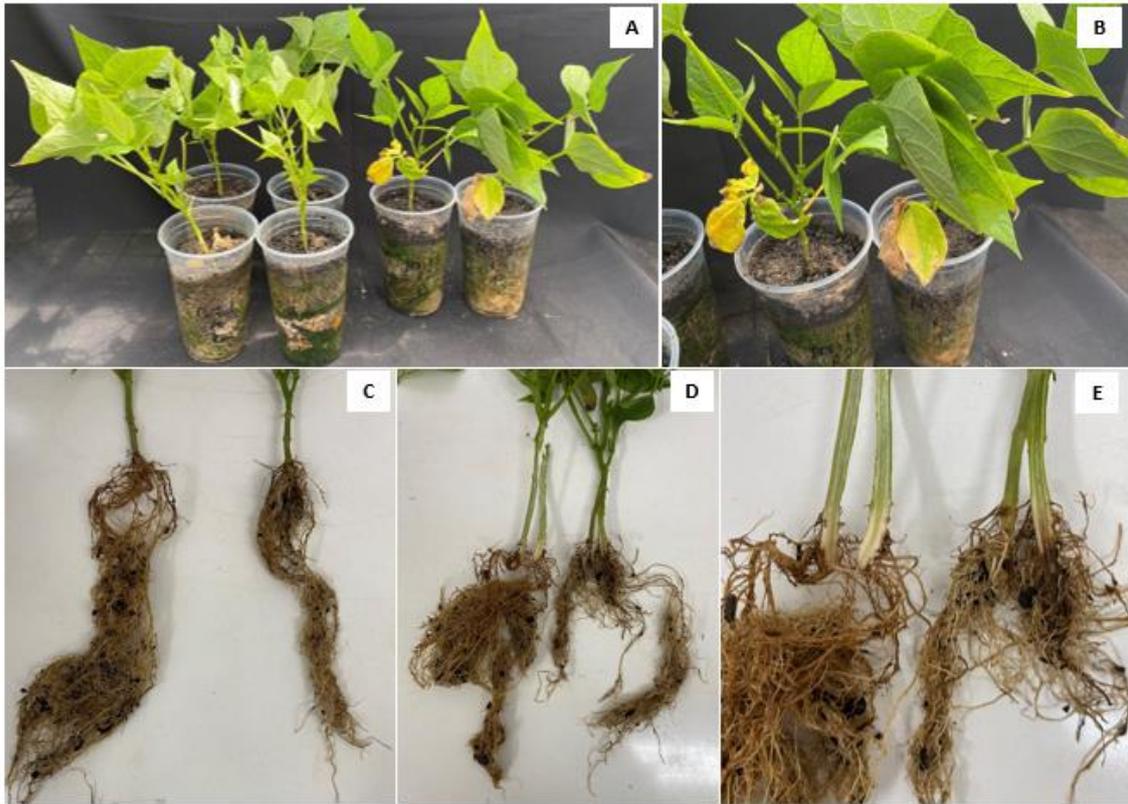


Figura 5. Feijoeiro da cultivar BRS Estilo (*Phaseolus vulgaris*) inoculado com espécie de *Fusarium nirenbergiae* apresentando sintomas de murcha de *Fusarium*. **A.** testemunha à esquerda, plantas inoculadas à direita; **B.** folhas apresentando clorose e necrose; **C-D.** testemunha à esquerda e planta inoculada à direita. **E.** testemunha à esquerda, planta apresentando necrose no sistema vascular e na raiz.

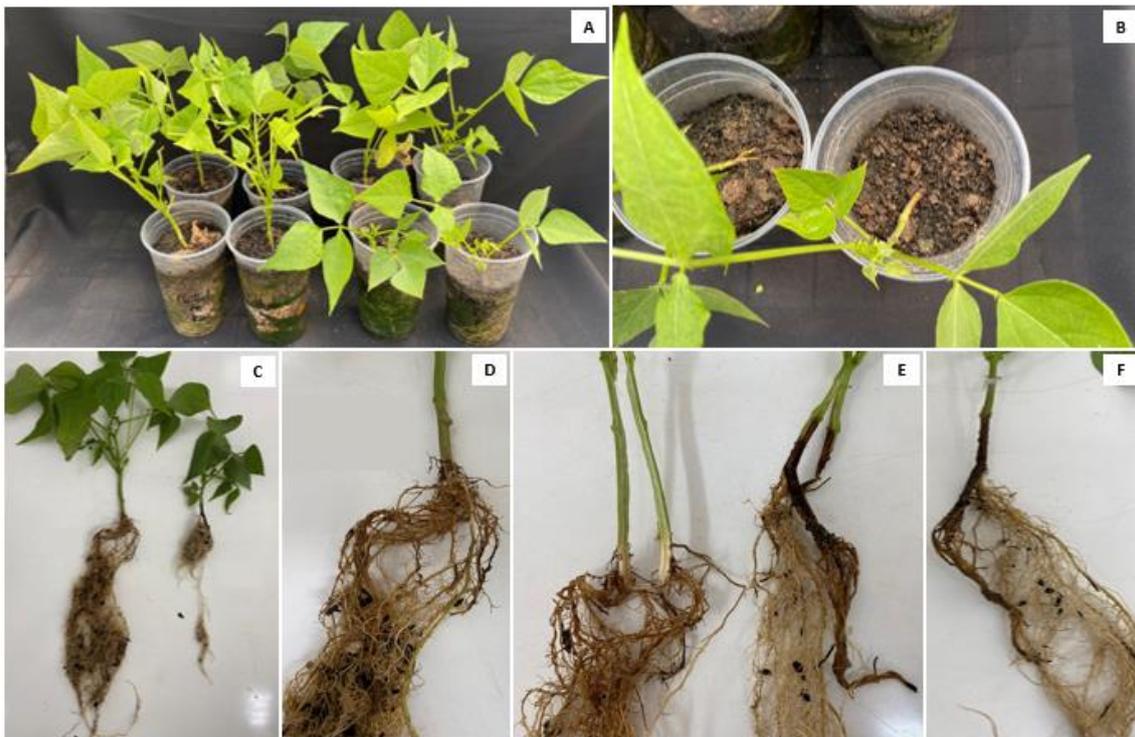


Figura 6. Feijoeiro da cultivar BRS Estilo (*Phaseolus vulgaris*) inoculado com espécie de *Fusarium* linhagem 2 apresentando sintomas de murcha de *Fusarium*. **A.** testemunha à esquerda, plantas inoculadas à direita; **B.** planta tombando devido à necrose na raiz; **C.** testemunha à esquerda e planta inoculada à direita. **D.** testemunha. **E-F.** testemunha à esquerda, planta apresentando necrose no sistema vascular e na raiz.

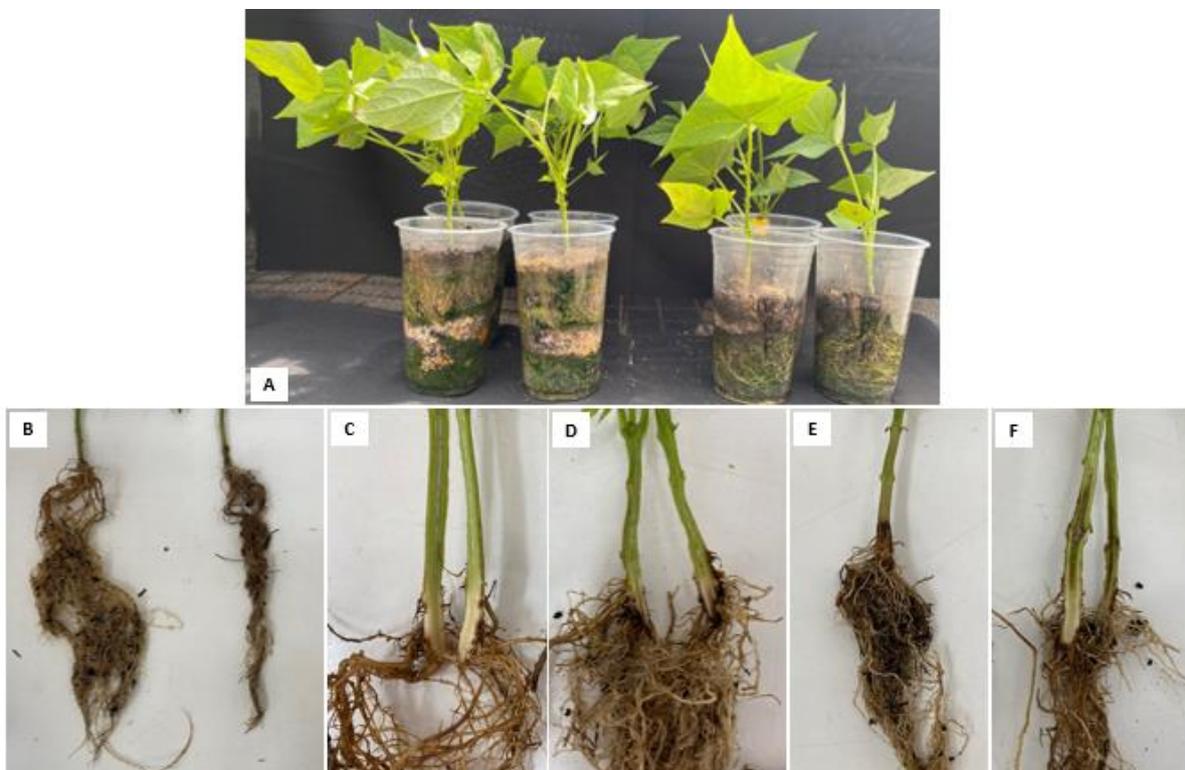


Figura 7. Feijoeiro da cultivar BRS Estilo (*Phaseolus vulgaris*) inoculado com espécie de *Fusarium callistephi* apresentando sintomas de murcha de *Fusarium*. **A-B** testemunha à esquerda, plantas inoculadas à direita; **C.** testemunha; **D** planta inoculada com necrose na raiz; **E.** caule apresentando necrose na parte externa; **F.** necrose no sistema vascular.



Figura 8. Feijoeiro da cultivar BRS Estilo (*Phaseolus vulgaris*) inoculado com espécies de FOOSC. Plantas inoculadas com: **a.** *Fusarium callistephi*; **b.** *F. triseptatum*; **c.** *F. nirenbergiae*; **d.** *F. gossypinum*; **e.** *F. kalimantanense*; **f.** *F. grosnichelii*; **g.** *F. oxysporum* linhagem 1; **h.** *F. oxysporum* linhagem 2.



Figura 9. Feijoeiro da cultivar Pingo de ouro (*Vigna unguiculata*) inoculado com espécies de FOOSC. Plantas inoculadas com: **a.** *Fusarium callistephi*; **b.** *F. triseptatum*; **c.** *F. nirenbergiae*; **d.** *F. gossypinum*; **e.** *F. kalimantanense*; **f.** *F. grosnichelii*; **g.** *F. oxysporum* linhagem 1; **h.** *F. oxysporum* linhagem 2.



Figura 10. Feijoeiro da cultivar Pingo de ouro (*Vigna unguiculata*) inoculado com espécie de *Fusarium* *grosmichelii* apresentando sintomas de murcha de *Fusarium*. **A.** testemunha à esquerda, plantas inoculadas à direita com clorose nas folhas; **B.** controle; **C-D.** plantas inoculadas com necrose vascular.



Figura 11. Feijoeiro da cultivar Pingo de ouro (*Vigna unguiculata*) inoculado com espécie de *Fusarium nirenbergiae* apresentando sintomas de murcha de *Fusarium*. **A.** testemunha à esquerda, plantas inoculadas à direita com clorose nas folhas; **B.** controle; **C-D.** plantas inoculadas com necrose vascular.