



SARAH DA SILVA COSTA GUIMARÃES

***Fusarium solani* ASSOCIADO À SOJA NO
BRASIL: MORFOLOGIA, FILOGENIA
MOLECULAR E PATOGENICIDADE**

**LAVRAS – MG
2011**

SARAH DA SILVA COSTA GUIMARÃES

***Fusarium solani* ASSOCIADO À SOJA NO BRASIL: MORFOLOGIA,
FILOGENIA MOLECULAR E PATOGENICIDADE**

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

Orientador
Dr. Ludwig H. Pfenning

LAVRAS – MG

2010

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

Guimarães, Sarah da Silva Costa.

Fusarium solani associado à soja no Brasil : morfologia,
filogenia molecular e patogenicidade / Sarah da Silva Costa
Guimarães. – Lavras : UFLA, 2010.

65 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning.

Bibliografia.

1. *Glycine max*. 2. Podridão vermelha da raiz. 3. Complexo de
espécie. 4. Doença fúngica. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 632.43

SARAH DA SILVA COSTA GUIMARÃES

***Fusarium solani* ASSOCIADO À SOJA NO BRASIL: MORFOLOGIA,
FILOGENIA MOLECULAR E PATOGENICIDADE**

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

APROVADA em 22 de dezembro de 2010

Dr. Dauri José Tessmann	UEM
Dra. Elaine Aparecida de Souza	UFLA
Dra. Antônia dos Reis Figueira	UFLA
Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende	UFLA

Orientador
Dr. Ludwig H. Pfenning

LAVRAS – MG
2010

Aos meus filhos, Dieguinho e Helena,
que são a razão da minha vida, a minha luz e o meu
incentivo para que eu conseguisse cumprir mais esta etapa,

DEDICO

Ao Diego, aos meus pais e as minhas irmãs,
pelo carinho e apoio

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), por meio do Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do doutorado.

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

Ao Prof. Ludwig H. Pfenning, pela orientação, confiança e pelo constante apoio e amizade.

Aos professores Dauri José Tessmann, Mário Lúcio Vilela de Resende, Profa. Elaine Aparecida de Souza e Profa. Antônia dos Reis Figueira, por comporem a banca avaliadora.

Ao Dr. Lucas Abreu, pelos ensinamentos, incentivo, paciência e pelas valiosas sugestões na execução deste trabalho.

A Virgínia Guerra Elizei, Kedma Matos, Paula Vale, Rodrigo Valeriano e Edson Luis Rezende, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Sistemática e Ecologia dos Fungos, pelo companheirismo e boa convivência.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia.

A Deus, por mais esta graça concedida, pelo sustento e fidelidade em todos os momentos.

Aos meus filhos, Dieguinho e Helena, por compreenderem minha ausência e por me incentivarem a nunca desistir.

Aos meus pais, minhas irmãs, meu esposo e meus sogros, por todo amor, carinho e confiança.

A minha mãe. Suas orações me ajudaram a permanecer forte e a persistir nos meus sonhos, mesmo em meio às dificuldades.

RESUMO

O complexo *Fusarium solani* (FSSC) compreende mais de 40 espécies biológicas e filogenéticas, incluindo patógenos de várias plantas cultivadas, como a soja. Este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar isolados de *Fusarium solani* obtidos de plantas de soja com sintomas de podridão vermelha da raiz e solo sob cultivo, coletados em diversas regiões produtoras de soja no país, por meio de morfologia em condições padronizadas, análise filogenética e teste de patogenicidade. Ainda foi verificado se espécies do FSSC, descritas recentemente como agentes etiológicos da PVR, ocorrem no Brasil. A análise filogenética foi realizada com sequências parciais do gene Fator de alongação 1 α e segunda maior subunidade da RNA polimerase, incluindo sequências de isolados de referência de diversas espécies pertencentes ao FSSC. Os testes de patogenicidade foram conduzidos em casa de vegetação, utilizando dois métodos, fermento de raiz e infestação do substrato com sementes de sorgo inoculadas com o patógeno. Foram avaliados 65 isolados, diferenciados em quatro morfotipos, de acordo com a taxa de crescimento das colônias e a diferenciação do conidióforo e célula conidiogênica. Na análise filogenética bayesiana, todos os isolados provenientes da soja no Brasil formaram um clado único, com 100% de probabilidade posterior, distinto das demais espécies filogenéticas pertencentes ao clado 3 do FSSC. Os isolados estudados induziram sintomas de podridão radicular da mesma forma que os isolados de referência de *Fusarium tucumaniae*, *Fusarium brasiliense* e *Fusarium cuneirostrum*. Na ampla coleta realizada, não foram encontradas espécies do clado 2, mas uma população distinta pertencente ao clado 3 do complexo *Fusarium solani* patogênica à cultura da soja no Brasil. Os resultados evidenciam que isolados do FSSC associados à soja, pertencentes tanto ao clado 2 como ao clado 3, podem causar podridão radicular em soja. A população estudada representa uma espécie filogenética distinta no complexo *Fusarium solani*.

Palavras-chave: *Glycine max*. Complexo de espécies de *Fusarium solani*. Podridão vermelha da raiz. Filogenia molecular. Patogenicidade.

ABSTRACT

The *Fusarium solani* species complex (FSSC) contains more than 40 phylogenetic and biological species, including pathogens of crops such as soybean. The main objective of this work was to characterize isolates of *Fusarium solani* obtained from soybean plants showing symptoms soybean sudden death syndrome (SDS) and soil under soybean fields collected in different geographical regions of Brazil, using morphology, phylogenetic analyses and pathogenicity tests. The presence of other species of the FSSC recently described as etiological agents of SDS was also assessed. The phylogenetic analysis was done using fragments of the genes encoding the elongation factor 1 α and the second largest subunit of RNA polymerase, and included sequences from other species of the FSSC as references. Pathogenicity tests were conducted in a greenhouse using two methods of inoculation, wound-inoculation of roots and substrate infestation with sorghum seeds colonized with the pathogen. Sixty-five isolates investigated were divided in four morphotypes based on differences of colony growth rate, and morphology of conidiophores and conidiogenous cells. In the Bayesian phylogenetic analysis, all isolates from soybean collected in Brazil grouped together in a well supported clade, with 100% posterior probability, apart from other species in the clade 3 of the FSSC. The isolates also induced symptoms of SDS similar to those of other SDS pathogens, *Fusarium tucumaniae*, *Fusarium brasiliense* and *Fusarium cuneirostrum*. In this large sampling of SDS pathogens in Brazil, a distinct phylogenetic species belonging to the clade 3 of the FSSC was identified, but no member of the clade 2 in the FSSC was found, indicating that both clades in the FSSC contain species pathogenic to soybean.

Keywords: *Glycine max.* *Fusarium solani* species complex. Red root rot. Molecular phylogeny. Pathogenicity.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Populações de <i>Fusarium solani</i> patogênicas à soja	09
1	INTRODUÇÃO	09
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Importância da Podridão vermelha da raiz da soja	12
2.2	Diversidade de populações de <i>Fusarium solani</i> em soja	13
2.3	Sintomatologia	15
2.4	Epidemiologia	16
2.5	Controle da doença	16
2.6	Conceitos de espécie no complexo <i>Fusarium solani</i>	17
	REFERÊNCIAS	19
	CAPÍTULO 2 <i>Fusarium solani</i> associado à Soja no Brasil: Morfologia, Filogenia molecular e Patogenicidade	23
1	INTRODUÇÃO	25
2	MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1	Obtenção dos isolados	29
2.2	Caracterização morfológica	29
2.3	Análise filogenética	30
2.3.1	Extração de DNA	30
2.3.2	Sequenciamento e análise das sequências de nucleotídeos	31
2.4	Verificação da patogenicidade dos isolados	32
2.4.1	Método de inoculação com fermento de raízes	33
2.4.2	Método de inoculação utilizando grãos de sorgo infectados	34
3	RESULTADOS	35
3.1	Caracterização morfológica	35
3.2	Análise filogenética	36
3.3	Verificação da patogenicidade dos isolados	37
4	DISCUSSÃO	39
5	CONCLUSÕES	44
	REFERÊNCIAS	45
	APÊNDICES	49

CAPÍTULO 1

Populações de *Fusarium solani* patogênicas à soja

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) do mundo, ocupando lugar de destaque no cenário do agronegócio mundial. A podridão vermelha da raiz (PVR), também conhecida como síndrome da morte súbita (SDS), é uma das mais importantes doenças que ocorrem em associação à soja e pode causar perdas consideráveis, atingindo até 70% da produção (FREITAS et al., 2004).

A PVR foi relatada, pela primeira vez, em 1972, nos Estados Unidos, no estado de Arkansas e *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (RUPE, 1989; RUPE; WEIDEMANN, 1986) ou *Fusarium solani* f.sp. *glycines* K.W. Roy (ROY et al., 1997) foi considerado o agente etiológico. No Brasil, essa doença foi observada, pela primeira vez, na safra 1981/82, em São Gotardo, MG. Atualmente, está presente nas principais regiões produtoras (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2001; EMBRAPA, 1998, 1998; NAKAJIMA et al., 1996).

O uso de cultivares resistentes é a melhor expectativa de controle da PVR, uma vez que não há opção de controle químico para esses patógenos e métodos como rotação de culturas não têm sido eficazes (YORINORI, 2000). Porém, um dos pré-requisitos principais para a condução de um programa de melhoramento bem sucedido é o conhecimento da variabilidade genética e patogênica existente na população do patógeno (EMBRAPA, 2002).

Estudos realizados durante os últimos 10 anos com patógenos da soja, inclusive com alguns isolados do Brasil, apontam como causadores da PVR as

espécies *F. virguliforme*, *F. tucumaniae*, *F. brasiliense* e *F. cuneirostrum*. Com exceção de *F. virguliforme*, essas espécies ocorrem supostamente no Brasil (AOKI et al., 2003, 2005), entretanto, foram utilizados apenas de 14 isolados nestes estudos.

No Brasil, estudos sobre identidade e diversidade genética da população de *Fusarium solani* associada à soja, causando doença, são limitados, apesar de essa cultura gerar dividendos para o país por meio das exportações. Em 2005, Arruda et al. utilizaram 26 isolados obtidos de soja, oriundos apenas do Brasil, e a presença de *Fusarium tucumaniae* no Brasil foi novamente sugerida com base em estudos morfológicos, filogenéticos, RFLP e patogenicidade, além de ter sido evidenciada a presença de *Fusarium solani* forma B (FSB) (ARRUDA et al., 2005). Porém, a nomenclatura mais utilizada até os dias de hoje, para nomear o patógeno, é de *Fusarium solani* f.sp. *glycines*, a qual pode obscurecer a verdadeira variabilidade genética do patógeno. A possibilidade de encontrar espécies e populações novas de patógenos num país com extensões do Brasil existe e deve ser explorada (LIMA et al., 2009 a, b).

Este trabalho se propôs a esclarecer a situação do patossistema soja-*Fusarium solani* no Brasil, pois, além de garantir alta produtividade e qualidade do produto, o país poderá dispor do conhecimento gerado para prevenir barreiras não tarifárias, como as provenientes da vigilância fitossanitária, poderá subsidiar futuros projetos relacionados com melhoramento, manejo da doença e proteção fitossanitária no âmbito internacional, visando tornar a produção brasileira cada vez mais competitiva. Neste sentido, o objetivo geral do presente estudo foi caracterizar isolados associados à podridão vermelha da raiz da soja no Brasil por meio de morfologia, análise filogenética e patogenicidade. Os objetivos específicos foram: i. obter uma ampla coleção de isolados das várias regiões produtoras de soja; ii. analisar e comparar marcadores morfológicos de isolados de *Fusarium solani* obtidos da soja; iii. realizar análise de filogenia molecular

das espécies, com base em sequências parciais dos genes fator de alongação 1- α e segunda maior subunidade da RNA polimerase; iv. verificar a patogenicidade dos isolados e v. confirmar a presença das espécies descritas por Aoki et al. (2005) que causam PVR no Brasil.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância da podridão vermelha da raiz da soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é planta originária da China e foi introduzida no Brasil, em 1908, por imigrantes japoneses nos estados da região sul, mas, apenas a partir da década de 1970, observou-se o crescimento da sua produção no país. Em 1980, o cultivo da soja expandiu-se para o estado de Goiás, o oeste de Minas Gerais, a Bahia, o sul do Mato Grosso e do Mato Grosso do Sul, avançando, posteriormente, para as áreas do Mato Grosso e oeste do Maranhão (BARBOSA; ASSUMPÇÃO, 2001).

A soja foi uma das culturas que apresentaram crescimento mais expressivo no cultivo e no segmento agroindustrial, na segunda metade do século XX, no Brasil, o que explica sua importância econômica para o país (AGRIANUAL, 2010). Dados atuais mostram que os maiores produtores de soja do mundo são Estados Unidos, Brasil e Argentina, responsáveis por 90% da comercialização mundial da oleaginosa. O Brasil, o segundo maior exportador, produziu 60 milhões de toneladas em 2009/10, ficando atrás apenas dos Estados Unidos.

A produtividade média da soja brasileira é de 2.800 kg/ha, chegando a alcançar cerca de 3000 kg/ha no estado de Mato Grosso, o maior produtor brasileiro de soja. Porém, devido a ocorrência de pragas e doenças nos campos, ocorrem grandes perdas na produção, acarretando prejuízos econômicos.

Na última década, a podridão vermelha das raízes da soja (PVR), conhecida também como síndrome da morte súbita (SDS), tornou-se uma das mais importantes doenças da soja, devido aos prejuízos provocados e à sua dificuldade de controle (YORINORI, 2000).

A doença pode causar diminuição de tamanho e de número de grãos, e a intensidade de danos depende do estágio no qual a planta é infectada e do número de plantas afetadas, com redução de 72% a 98% no peso médio de grãos, além de redução de 55% a 96% no número de grãos por planta afetada em cultivares de soja com sintomas da PVR (GASPARI et al., 2003), além de os danos serem maiores em áreas também infestadas por *Heterodera glycines* (EMBRAPA, 2002; XING; WESTPHAL, 2006).

2.2 Diversidade de populações de *Fusarium solani* em soja

A podridão vermelha da raiz da soja (PVR) ou síndrome da morte súbita da soja (*Sudden death syndrome of soybean* - SDS) foi relatada, pela primeira vez, nos Estados Unidos, em 1973 e no Brasil, na década de 1980, e passou a chamar a atenção em diversas lavouras do sul do Paraná, do Mato Grosso (Chapadão do Sul) e de Goiás (Chapadão do Céu) (NAKAJIMA et al., 1996; YORINORI, 2000). *Fusarium solani* foi considerado agente etiológico, com base nas características morfológicas, que são crescimento lento em meio de batata (BDA), produção de uma massa azulada com grande quantidade de macroconídios (30-65 x 6-8 µm) com 3 a 5 septos e pouca ou nenhuma presença de microconídios (RUPE, 1989; RUPE; WEIDEMANN, 1986).

O'Donnell e Gray (1995) relataram, com base na sequências de rDNA, que *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* (Burkholder) W.C. Snyder & H.N. Hansen era o agente etiológico de PVR, porém, nesse estudo não foi realizado teste de patogenicidade. Posteriormente, Achenbach et al. (1996) distinguiram o patógeno da PVR de *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*, com base nos testes de patogenicidade e análise de RAPD. Novos testes de patogenicidade foram conduzidos por Roy (1997) e estabeleceu-se, então, que os isolados de *F. solani* f.sp. *phaseoli* não induziam sintomas foliares em soja, embora tenham causado

podridão radicular. Foi possível distinguir o patógeno da PVR de *F. solani* f.sp. *phaseoli* com base na patogenicidade à soja. Então, os isolados de *F. solani* capazes de induzir sintomas PVR em soja foram reconhecidos como *F. solani* f.sp. *glycines* (ROY et al., 1997). No mesmo ano, Roy e colaboradores realizaram outro trabalho, no qual foi possível separar *F. solani* f.sp. *glycines* de outros isolados de *Fusarium solani* obtidos com alta frequência de plantas de soja. Estes isolados foram denominados *F. solani* forma B (FSB).

Segundo os autores, o que distingue *F. solani* f.sp. *glycines* de FSB é que o primeiro induz sintomas nas raízes e folhas e tem crescimento lento em BDA, enquanto o outro induz apenas sintoma de podridão radicular e crescimento lento. Após o estabelecimento da *formae speciales*, *Fusarium solani* f.sp. *glycines* (ROY et al., 1997), em estudos com isolados patogênicos à soja nos Estados Unidos e Argentina, utilizando morfologia comparativa e filogenia molecular, evidenciaram-se duas espécies filogeneticamente distintas associadas à podridão vermelha da raiz da soja, que foram denominadas *Fusarium tucumaniae*, presente na Argentina e *Fusarium virguliforme*, nos Estados Unidos, além de *F. solani* f.sp. *phaseoli* patógeno de *Phaseolus vulgaris* L. nos Estados Unidos, patogênicos também à soja (AOKI et al., 2003). Posteriormente, em estudos morfológicos, filogenéticos e patogênicos realizados com isolados associados à PVR na América do Sul foi revelada a existência de mais duas novas espécies, *Fusarium brasiliense* e *Fusarium cuneirostrum*. Com exceção de *F. virguliforme*, as outras espécies ocorrem no Brasil (AOKI et al., 2005).

Em 2005, a presença de *Fusarium tucumaniae* no Brasil foi novamente sugerida com base em estudos morfológicos, filogenéticos, RFLP e patogenicidade, além de ter sido evidenciada a presença de *Fusarium solani* forma B (FSB) (ARRUDA et al., 2005).

Apesar da importância desse patossistema, pouco se sabe sobre a estrutura populacional do FSSC associado à soja no Brasil. A maioria dos estudos publicados está relacionada com a avaliação da resistência de variedades de soja a *Fusarium solani* f.sp. *glycines* (YORINORI, 2000; EMBRAPA, 2002; GASPARI et al., 2003; KLINGELFUSS et al., 2007).

2.3 Sintomatologia

O sintoma na raiz inicia-se com uma mancha avermelhada, mais visível na raiz principal e, geralmente, localizada de um a dois centímetros abaixo do nível do solo. Com a evolução da infecção, pode-se observar uma expansão da lesão, que passa a circundar a raiz, assumindo coloração castanho-avermelhada escura. A necrose situa-se no tecido cortical, enquanto o lenho da raiz adquire uma coloração castanho-clara, estendendo-se pelo tecido lenhoso da haste a vários centímetros acima do nível do solo (RUPE, 1989; WRATHER et al., 1995). Também ocorre o apodrecimento das raízes secundárias em solo úmido e necrose da base da planta (EMBRAPA, 2006).

O sintoma foliar apresenta manchas cloróticas e necróticas internervais. Os sintomas foliares iniciam-se de duas a três semanas antes da floração, estendendo-se até o período de enchimento de grãos, quando normalmente é observada a morte da planta (RUPE; GBUR, 1995). A região das nervuras permanece com coloração verde normal e pode progredir, causando completa desfolha das plantas. Em plantas severamente afetadas, a desfolha ocorre prematuramente, causando abortamento de vagens (RUPE, 1989; WRATHER et al., 1995).

2.4 Epidemiologia

Os conídios são disseminados pela água no solo e são convertidos em estrutura de resistência, denominados clamidósporos, em poucos dias. Estes ficam no solo ou em restos culturais, constituindo o inóculo primário da doença (ROY et al., 1997). A distribuição do número de unidades formadoras de colônias por grama de solo (ufc/g) é fator correlacionado com a severidade da PVR, sendo a densidade populacional mais elevada próximo ao período de colheita (SCHERM; YANG, 1996).

O modo de penetração do fungo nas raízes ainda não foi bem esclarecido. Provavelmente, é de forma direta, isto é, a penetração ocorreria durante a germinação de clamidósporos ou de macroconídios que entram em contato com o sistema radicular das plantas (XING; WESTPHAL, 2006).

A doença é mais severa em condições de alta umidade do solo e temperaturas amenas. Temperaturas em torno de 15°C favorecem o desenvolvimento dos sintomas nas raízes, enquanto temperaturas entre 22°C a 24°C favorecem, além de sintomas na raiz, o desenvolvimento de sintomas na parte aérea (SCHERM; YANG, 1996).

2.5 Controle da doença

Informações, até o momento, indicam que práticas culturais e controle químico disponíveis não têm sido eficientes no controle desta doença. Seleção de cultivares resistentes e o uso de material propagativo de ótima qualidade são considerados os métodos mais eficazes de controle da PVR (EMBRAPA, 2006). No entanto, nos trabalhos já realizados, foi somente possível conseguir resistência moderada à doença (YORINORI, 2000; EMBRAPA, 2002; FARIAS NETO et al., 2000), fato que evidencia a dificuldade na seleção de variedades

resistentes, devido à falta de informação sobre a variabilidade genética das populações existentes em território brasileiro.

2.6 Conceitos de espécie no complexo *Fusarium solani*

O complexo de espécies de *Fusarium solani* - FSSC (teleomorfo *Haematonectria*, Hypocreales, Ascomycota) compreende diversas espécies de patógenos associados a várias plantas cultivadas, além de patógenos de humanos e animais. Existem ainda espécies produtoras de toxinas, endófitas e saprófitas (ZHANG et al., 2006). A diversidade das populações é evidenciada pela quantidade de *formae speciales*, patogenicidade específica a determinada planta (O'DONNELL., 2000).

O conceito de espécie baseado em caracteres morfológicos e patogenicidade de hospedeiro, *formae speciales*, pode não refletir a real diversidade de espécies e populações do FSSC, em que os marcadores morfológicos são escassos, tanto para o anamorfo como para o teleomorfo (O'DONNELL; GRAY, 1995). O agrupamento em *formae speciales* pode omitir a variabilidade genética das populações, as verdadeiras relações filogenéticas, distribuição geográfica, espécies biológicas e variedade de hospedeiro desses patógenos (BAAYEN et al., 2000; O'DONNELL, 2000).

O conceito biológico permitiu uma definição mais acurada no sistema de classificação de espécies que causam doenças em plantas cultivadas (NIRENBERG; O'DONNELL, 1998; LESLIE; SUMMERELL, 2006). Dentro do complexo *Fusarium solani* já foram descritas sete espécies biológicas, ou *mating populations* (MPs). *F. solani* f. sp. *cucurbitae* raça 1, MP-I e raça 2, MP-V causam podridão de frutos em *Cucurbita* spp.; *F. solani* f. sp. *batatas*, MP-II patógeno de batata; *F. solani* f. sp. *mori*, MP-III patógeno de *Moris Alba*; *F. solani* f. sp. *xanthoxyli*, MP-IV patógeno de *Xanthoxylum piperitum*; *F. solani* f.

sp. *pisi*, MP-VI causador da fusariose em ervilha; *F. solani* f. sp. *robiniae*, MP-VII patógeno de *Robinea* SP. (MATUO; SNYDER, 1973). Recentemente, a ocorrência do teleomorfo de *Fusarium tucumaniae*, um dos agentes etiológicos da PVR, foi relatada, acrescentando outra *mating population* ao FSSC (COVERT et al., 2007).

Estudos baseados em sequências de um número elevado de locos revelaram que o FSSC é composto por, pelo menos, 40 espécies filogeneticamente distintas, que antes eram desconhecidas por causa da semelhança morfológica (O'DONNELL et al., 2008, 2010; O'DONNELL, 2000; O'DONNELL; GRAY, 1995). Espécies deste complexo foram distribuídas em três clados. No clado 1 estão *F. illudens*, encontrado em associação com a planta *Beilschmiedia tawa* e *F. plagianthi*, associado à planta *Hoheria glabrata*. O clado 2 é composto por isolados associados à podridão vermelha de raiz na soja e a podridão radicular seca de feijoeiro. No clado 3 agrupam-se patógenos de outras plantas e espécies de importância clínica dentro do FSSC (O'DONNELL 2000; O'DONNELL et al., 2008). As sete espécies biológicas descritas por Matuo e Snyder (1973), ou *mating populations* (MPs), foram confirmadas como espécies filogenéticas distintas (O'DONNELL, 2000).

REFERÊNCIAS

- ACHENBANCH, L. A. et al. Use of RAPD Markers as a diagnostic tool for the identification of *Fusarium solani* isolates that cause soybean sudden death syndrome. **Plant Disease**, [S.l.], v. 80, n. 11, p. 1228-1232, July 1996.
- AGRIANUAL. Soja. São Paulo. FNP Consultoria & Comércio, 2010.
- AOKI, T. et al. Sudden death syndrome of soybean in south America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. **Mycoscience**, Lawrence, v. 46, p. 162-183, Dec. 2005.
- AOKI, T. et al. Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex - *F-virguliforme* in North America and *F-tucumaniae* in South America. **Mycologia**, Tokyo, v. 95, n. 4, p. 660-684, July/Aug. 2003.
- ARRUDA, G. M. T. et al. Morphological and molecular characterization of the sudden-death syndrome pathogen of soybean in Brazil. **Plant Pathology**, [S.l.], v. 54, n. 1, p. 53-65, Sept. 2005.
- BAAYEN, R. P. et al. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic *formae speciales* causing wilt and rot disease. **Phytopathology**, [S.l.], v. 90, n. 8, p. 891-900, May 2000.
- BARBOSA, M. Z.; ASSUMPÇÃO, R. Ocupação territorial da produção e da agroindústria da soja no Brasil, nas décadas de 80 e 90. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 31, n. 11, p. 7-16, Nov. 2001.
- COVERT, S.F. et al. Sexual reproduction in the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium tucumaniae*. **Fungal Genetics and Biology**, Amsterdam, v. 44, p. 799-807, Dec. 2007.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologia de produção de soja - região Central do Brasil**. Londrina, 2006.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologia de produção de soja na região Central do Brasil**. Londrina, 2002.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologia de produção de soja na região Central do Brasil**. Londrina, 2001.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologia de produção de soja na região Central do Brasil**. Londrina, 1998.

FREITAS, T.M.Q. Dano devido à podridão vermelha da raiz na cultura da soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 991-996, Aug. 2004.

GÁSPERI, A. C. et al. Reação de cultivares de soja à podridão vermelha da raiz causada por *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, [S.l.], v. 28, n. 5, p. 544-547, Sept/Oct. 2003.

KLINGELFUSS, L. H. et al. Métodos de inoculação para quantificação de resistência em soja à *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, em casa-de-vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, [S.l.], v. 32, n. 1, p. 50-55, Jan/Feb. 2007.

LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Malden: Blackwell Publishers, 2006.

LIMA, C. S.; et al. A new *Fusarium* lineage within the *Gibberella fujikuroi* species complex is the main causal agent of mango malformation disease in Brazil. **Plant Pathology**, [S.l.], v. 58, p. 33-42, Feb. 2009a.

LIMA C.S. et al. Vegetative compatibility and amplified fragment length polymorphism analyses identify the same groups in the causal agents of mango malformation in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Manhattan, v. 123, p. 17-26, 2009b.

MATUO, T.; SNYDER, W. C. Use of morphology and mating populations in the identification of formae speciales in *Fusarium solani*. **Phytopathology**, [S.l.], v. 63, p. 562–565, Nov. 1973.

NAKAJIMA, T. et al. First occurrence of sudden death syndrome of soybean in Brazil. **Japanese Agricultural Research Quarterly**, [S.l.], v. 30, n. 1, p. 31-34, Jan. 1996.

NIRENBERG, H.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, [S.l.], v. 90, n. 3, p. 434-458, Nov. 1998.

O'DONNELL, K. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, [S.l.], v. 92, n. 5, p. 919-938, Mar. 2000.

O'DONNELL, K. et al. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. **Journal Clinical Microbiology**, [S.l.], v. 46, n. 8, p. 2477-2490, Aug. 2008.

O'DONNELL, K. et al. Soybean Sudden Death Syndrome Species Diversity Within North and South America Revealed by Multilocus Genotyping. **Phytopathology**, [S.l.], v. 100, n. 1, p. 58-71, Jan. 2010.

O'DONNELL, K.; GRAY, L.E. Phylogenetic relationships of the Soybean Sudden Death Syndrome pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* inferred from rDNA sequence data and PCR primers for its identification. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [S.l.], v. 8, n. 5, p. 709-716, Sept./Oct. 1995.

ROY, K.W. *Fusarium solani* on soybean roots: nomenclature of the causal agent of Sudden death syndrome and identity and relevance of *F. solani* form B. **Plant Disease**, [S.l.], v. 81, n. 3, p. 259-266, Mar. 1997.

ROY, K.W. et al. Sudden Death Syndrome of Soybean. **Plant Disease**, [S.l.], v. 81, n. 10, p. 1100-1111, Oct. 1997.

RUPE, J.C.; GBUR J. R. E. E. Effect of plant age, maturity group and environmental on disease progress of Sudden Death Syndrome of Soybean. **Plant Disease**, [S.l.], v. 79, p. 139-143, Oct. 1995.

RUPE, J.C. Frequency and pathogenicity of *Fusarium solani* recovered from soybeans with sudden death syndrome. **Plant Disease**, [S.l.], v. 73, n. 7, p. 581-584, July 1989.

RUPE, J.C.; WEIDEMANN, G.J. Pathogenicity of a *Fusarium* sp. isolated from soybean plants with Sudden death syndrome. **Phytopathology**, [S.l.], v. 76, p. 1080, 1986.

SCHERM, H.; YANG X. B. Development of sudden death syndrome of soybean in relation to soil temperature and soil water matric potential. **Phytopathology**, [S.l.], v. 86, n. 6, p. 642-649, Feb. 1996.

WRATHER, J. A. et al. Effects of tillage, cultivar, and planting date on percentage of soybean leaves with symptoms of sudden death syndrome. **Plant Disease**, [S.l.], v. 79, n. 6, p. 560-562, Mar. 1995.

XING, L. J.; WESTPHAL, A. Interaction of *Fusarium solani* f. sp *glycines* and *Heterodera glycines* in sudden death syndrome of soybean. **Phytopathology**, West Lafayette, v. 96, n. 7, p. 763-770, July 2006.

YORINORI, J. T. . Evolução da ocorrência e da severidade da podridão vermelha da raiz da soja (PVR/SDS) e reação das cultivares comerciais à doenças. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 22. 2000, Cuiabá. **Resumos**. Londrina, PR : Embrapa Soja, 2000. 94 p.

ZHANG, N. et al. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.l.], v. 44, n. 6, p. 2186-2190, June 2006.

CAPÍTULO 2

***Fusarium solani* associado à soja no Brasil: morfologia, filogenia molecular e patogenicidade**

RESUMO

O complexo *Fusarium solani* (FSSC) compreende mais de 40 espécies biológicas e filogenéticas, incluindo patógenos de várias plantas cultivadas, como a soja. Este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar isolados de *Fusarium solani* obtidos de plantas de soja com sintomas de podridão vermelha da raiz e solo sob cultivo, coletados em diversas regiões produtoras de soja no país, por meio de morfologia em condições padronizadas, análise filogenética e teste de patogenicidade. Ainda foi verificado se espécies do FSSC, descritas recentemente como agentes etiológicos da PVR, ocorrem no Brasil. A análise filogenética foi realizada com sequências parciais do gene Fator de alongação 1 α e segunda maior subunidade da RNA polimerase, incluindo sequências de isolados de referência de diversas espécies pertencentes ao FSSC. Os testes de patogenicidade foram conduzidos em casa de vegetação, utilizando dois métodos, ferimento de raiz e infestação do substrato com sementes de sorgo inoculadas com o patógeno. Foram avaliados 65 isolados, diferenciados em quatro morfotipos, de acordo com a taxa de crescimento das colônias e a diferenciação do conidióforo e célula conidiogênica. Na análise filogenética bayesiana, todos os isolados provenientes da soja no Brasil formaram um clado único, com 100% de probabilidade posterior, distinto das demais espécies filogenéticas pertencentes ao clado 3 do FSSC. Os isolados estudados induziram sintomas de podridão radicular da mesma forma que os isolados de referência de *Fusarium tucumaniae*, *Fusarium brasiliense* e *Fusarium cuneirostrum*. Na ampla coleta realizada, não foram encontradas espécies do clado 2, mas uma população distinta pertencente ao clado 3 do complexo *Fusarium solani* patogênica à cultura da soja no Brasil. Os resultados evidenciam que isolados do FSSC associados à soja, pertencentes tanto ao clado 2 como ao clado 3, podem causar podridão radicular em soja. A população estudada representa uma espécie filogenética distinta no complexo *Fusarium solani*.

Palavras-chave: *Glycine max*. Complexo de espécies de *Fusarium solani*. Podridão vermelha da raiz. Filogenia molecular. Patogenicidade.

ABSTRACT

The *Fusarium solani* species complex (FSSC) contains more than 40 phylogenetic and biological species, including pathogens of crops such as soybean. The main objective of this work was to characterize isolates of *Fusarium solani* obtained from soybean plants showing symptoms soybean sudden death syndrome (SDS) and soil under soybean fields collected in different geographical regions of Brazil, using morphology, phylogenetic analyses and pathogenicity tests. The presence of other species of the FSSC recently described as etiological agents of SDS was also assessed. The phylogenetic analysis was done using fragments of the genes encoding the elongation factor 1 α and the second largest subunit of RNA polymerase, and included sequences from other species of the FSSC as references. Pathogenicity tests were conducted in a greenhouse using two methods of inoculation, wound-inoculation of roots and substrate infestation with sorghum seeds colonized with the pathogen. Sixty-five isolates investigated were divided in four morphotypes based on differences of colony growth rate, and morphology of conidiophores and conidogenous cells. In the Bayesian phylogenetic analysis, all isolates from soybean collected in Brazil grouped together in a well supported clade, with 100% posterior probability, apart from other species in the clade 3 of the FSSC. The isolates also induced symptoms of SDS similar to those of other SDS pathogens, *Fusarium tucumaniae*, *Fusarium brasiliense* and *Fusarium cuneirostrum*. In this large sampling of SDS pathogens in Brazil, a distinct phylogenetic species belonging to the clade 3 of the FSSC was identified, but no member of the clade 2 in the FSSC was found, indicating that both clades in the FSSC contain species pathogenic to soybean.

Keywords: *Glycine max.* *Fusarium solani* species complex. Red root rot. Molecular phylogeny. Pathogenicity.

1 INTRODUÇÃO

O complexo de espécies *Fusarium solani* - FSSC (teleomorfo *Haematonectria*, Hypocreales, Ascomycota) compreende pelo menos 40 espécies filogeneticamente distintas, incluindo espécies não descritas formalmente de patógenos associados a várias plantas cultivadas de importância agrícola, além de patógenos de humanos e animais. Existem ainda espécies produtoras de toxinas, endofíticas e saprófitas (O'DONNELL 2000; O'DONNELL et al., 2008 e 2010; ZHANG et al., 2006). Em estudos filogenéticos, com espécies deste complexo, baseados em sequências de 28S rDNA, ITS, fator de alongação (EF-1 α) e segunda maior subunidade da RNA polimerase (RPB2), foi demonstrado que essas estão distribuídas em três clados. No clado 1 estão *F. illudens*, encontrado em associação com a planta *Beilschmiedia tawa*, e *F. plagianthi*, associado à planta *Hoheria glabrata*. O clado 2 é composto por isolados patogênicos ao feijoeiro e à soja e, no clado 3, se agrupam patógenos de outras plantas e espécies de importância clínica dentro do FSSC (O'DONNELL, 2000; O'DONNELL et al., 2008). A diversidade de populações de *Fusarium solani* patogênicos às plantas também é evidenciada pela quantidade de *formae speciales* descritas, principalmente nas regiões tropical e subtropical (O'DONNELL, 2000).

O Brasil ocupa lugar de destaque no cenário do agronegócio mundial como grande produtor e exportador de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) (AGRIANUAL, 2010). Porém, por causa de pragas e doenças nos campos, ocorrem grandes perdas na produção, acarretando prejuízos econômicos. Na última década, a podridão vermelha das raízes da soja (PVR), conhecida também como síndrome da morte súbita (SDS), tornou-se uma das mais importantes doenças da soja, devido aos prejuízos provocados e à sua dificuldade de controle (YORINORI, 2000). A sintomatologia inclui clorose e necrose foliar

internervais, podridão de raiz e morte da planta (ROY, 1997). Esta doença ocorre nas principais áreas produtoras de soja: Estados Unidos, Canadá, Argentina e Brasil (ROY, 1997; ROY et al., 1997; EMBRAPA, 1998 1998, YORINORI, 2000). No Brasil, a PVR foi relatada, pela primeira vez, na safra 1981/82, em São Gotardo, MG e, atualmente, é encontrada nas principais regiões produtoras (NAKAJIMA et al., 1996; FREITAS et al., 2004).

O agente etiológico da PVR foi identificado, inicialmente, como *Fusarium solani*, com base nas características morfológicas que são crescimento lento em meio de batata (BDA), produção de uma massa de conídios azulada, presença de macroconídios no micélio aéreo (RUPE, 1989; RUPE & WEIDEMANN, 1986). O'Donnell e Gray (1995), com base na filogenia utilizando o rDNA, identificaram o agente etiológico da PVR como *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* (Burkholder) W.C. Snyder & H.N. Hans., porém, nesse estudo, não foi realizado teste de patogenicidade. Posteriormente, Achenbach et al. (1996) distinguiram o patógeno da PVR de *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* com base em testes de patogenicidade e análise de RAPD. Novos testes de patogenicidade foram conduzidos por Roy (1997) e estabeleceu-se, então, que os isolados de *F. solani* f.sp. *phaseoli* não induziam sintomas foliares em soja, embora tivessem causado alguma podridão radicular. Então, foi proposto que isolados de *F. solani* capazes de induzir sintomas em raízes e folhas de soja deveriam ser reconhecidos como *F. solani* f.sp. *glycines* (ROY, 1997). No mesmo ano, Roy et al. (1997) realizaram outro trabalho, em que foi possível separar *F. solani* f.sp. *glycines* de outros isolados de *Fusarium solani* obtidos com alta frequência de plantas de soja. Estes isolados foram denominados *F. solani* forma B (FSB). Segundo os autores, o que distingue *F. solani* f.sp. *glycines* de FSB é que o primeiro induz sintomas nas raízes e folhas e tem crescimento lento em BDA, enquanto o outro induz apenas sintoma de podridão

radicular e tem crescimento rápido. FSB não foi considerado como agente etiológico da PVR, ainda que fosse patogênico ao sistema radicular.

Após o estabelecimento de *Fusarium solani* f. sp. *glycines* (ROY, 1997; ROY et al., 1997), em estudos com isolados obtidos de plantas de campos de cultivo de soja dos Estados Unidos e da Argentina, por meio de caracterização morfológica e filogenia, evidenciou-se a existência de duas espécies filogeneticamente distintas, identificadas como *Fusarium tucumaniae*, presente na Argentina, e *Fusarium virguliforme*, nos Estados Unidos (AOKI et al., 2003). Posteriormente, estes mesmos autores identificaram mais duas novas espécies, *Fusarium brasiliense* e *Fusarium cuneirostrum*, de ocorrência restrita à América do Sul (AOKI et al., 2005). Supostamente, três dessas novas espécies, *Fusarium tucumaniae*, *Fusarium brasiliense* e *Fusarium cuneirostrum*, estariam presentes no Brasil (AOKI et al., 2005). Em outro estudo, com 26 isolados obtidos de soja, oriundos apenas do Brasil, a presença de *Fusarium tucumaniae* no Brasil foi novamente sugerida com base em estudos morfológicos, filogenéticos, RFLP e patogenicidade, além de ter sido evidenciada a presença de *Fusarium solani* forma B (FSB) (ARRUDA et al., 2005). Estes trabalhos foram realizados com um número restrito de isolados do Brasil em relação à grande extensão territorial do país, o que, provavelmente, não representou a real variabilidade da população, além de o agente etiológico da PVR no país ainda ser conhecido como *Fusarium solani* f. sp. *glycines*.

Este trabalho foi realizado com os objetivos de: i. obter ampla coleção de isolados das várias regiões produtoras de soja; ii. analisar e comparar marcadores morfológicos de isolados de *Fusarium solani* obtidos da soja; iii. realizar análise de filogenia molecular das espécies, com base em sequências parciais dos genes fator de alongação 1- α e segunda maior subunidade da RNA polimerase; iv. verificar a patogenicidade dos isolados e v. confirmar a presença das espécies descritas por Aoki et al. (2005) que causam PVR no Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos isolados

Foram utilizados neste estudo isolados de *Fusarium solani* obtidos de plantas de soja (*Glycine max*) com sintomas de PVR e solo de campo de produção de soja de diferentes regiões do Brasil (MT, MS, GO, MG, PR e RS), além de isolados de referência das espécies *F. brasiliense*, *F. tucumaniae* e *F. cuneirostrum*, cedidos pelo Serviço de Coleção de Cultura de Pesquisa Agrícola do Estados Unidos, Agriculture Research Service Culture Collection – NRRL, (Tabela 1). O isolamento foi realizado pelo método de desinfestação superficial a partir de raízes sintomáticas (AOKI et al., 2003) e, para o isolamento a partir do solo, utilizou-se o método de diluição: 10 g de solo em 100 mL de água estéril. Culturas puras dos isolados foram preservadas em microtubos e água destilada esterilizada, ambos armazenados a 10°C, no escuro e criopreservadas, suspensão de esporos em 15% glicerol a -80°C, na Coleção Micológica de Lavras (CML), Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.2 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica dos isolados foi realizada seguindo as especificações descritas em Aoki et al (2003). Os isolados foram crescidos em placas plásticas de Petri de 6-cm de diâmetro, nos meios batata dextrose ágar (BDA) e em *synthetic low nutrient agar* (SNA) com folha de cravo e foram incubados em BOD, a 25°C, no escuro e a 20°C, com fotoperíodo de 12 horas, respectivamente. A morfologia, pigmentação, odor e taxa de crescimento das colônias foram avaliadas em BDA após quatro dias da inoculação. As

características micromorfológicas foram avaliadas em SNA com folha de cravo, entre 10 e 14 dias após a inoculação. Procedeu-se à mensuração dos conídios produzidos no micélio aéreo e esporodóquio, bem como à observação do formato e septação dos mesmos. Também foram observadas as características dos conidióforos e a produção de clamidósporos.

2.3 Análise filogenética

Foram selecionados 35 isolados, representantes dos morfotipos definidos durante a análise morfológica, para o sequenciamento do fragmento do gene fator de alongação *1- α* (TEF) (O'DONNELL et al., 1998). A análise filogenética foi realizada e, com base nos agrupamentos gerados, foram selecionados 12 isolados para se fazer o sequenciamento do fragmento do gene da segunda maior subunidade da RNA polimerase (RPB2) (O'DONNELL et al., 2008). Para estes 12 isolados selecionados, foi realizada uma análise filogenética combinada, com base nas sequências das duas regiões genômicas, TEF e RPB2.

2.3.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando-se o tampão CTAB. O fungos foram cultivados em meio líquido à base de extrato de malte 2% por três dias, em temperatura ambiente e sob agitação de 100 rpm. O micélio foi filtrado, macerado em nitrogênio líquido, transferido para microtubos contendo tampão CTAB 2% e mantido em banho-maria, a 65°C, por 20 minutos. Foram adicionados 600 μ L de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) à mistura, que foi centrifugada. A fase aquosa foi recuperada e a ela foram adicionados 400 μ L de isopropanol gelado. A mistura ficou no freezer, a -20°C, por 20 minutos e foi centrifugada. O sobrenadante foi descartado e ao resíduo (pellet) foram

adicionados 500 µL de etanol 70%. A suspensão foi centrifugada e o etanol sobrenadante descartado. O pellet foi seco em estufa a 60°C e o DNA, ressuspendido em solução tampão TE 1x (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

2.3.2 Sequenciamento e análise das sequências de nucleotídeos

Para a amplificação do fragmento do gene fator de alongação *1-α*, foram utilizados os *primers*: Ef-1 (forward; 5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') e Ef-2 (reverse; 5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') (O'DONNELL et al., 1998). Na amplificação do fragmento da segunda maior subunidade da RNA polimerase (RPB2), utilizaram-se os *primers* 5F2 (forward; 5'-GGGGWGAYCAGAAGAAGGC-3') e 7cR (reverse; 5'-CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT-3') (O'DONNELL et al., 2008).

As reações de PCR foram realizadas no termociclador My Cycler™ (BIO-RAD). As condições de ciclo para TEF-1α 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). Para Rpb2, o programa de ciclos 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). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium®) e posterior visualização realizada em um transiluminador. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o kit GenElute PCR Clean-up Kit (Sigma-Aldrich) para, posteriormente, serem sequenciados.

Os fragmentos gênicos foram sequenciados, nas direções senso e antisenso, em um sequenciador automático MEGA BACE® no Laboratório de Genômica da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente com o auxílio do programa SeqAssem

(HEPPERLE, 2004) e as sequências editadas foram comparadas com a base de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information – NCBI, por meio do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>). Sequências de referência correspondentes a segunda maior subunidade da RNA polimerase e ao fator de alongação-1 α , das espécies do FSSC, previamente depositadas no GenBank, também foram acrescentadas às análises (Tabela 3). Alinhamentos múltiplos das sequências nucleotídicas foram gerados utilizando-se o programa CLUSTALW (THOMPSON et al., 1994), implementado pelo programa MEGA 4 (KUMAR et al., 2004). Os alinhamentos foram corrigidos manualmente.

A análise filogenética bayesiana foi realizada com o programa MrBayes 3.1 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003), utilizando-se o modelo de substituição nucleotídica GTR+G (*General time reversible with Gamma distribution*) para a análise de segunda maior subunidade da RNA polimerase e a análise combinada das sequências de fator de alongação 1 α e segunda maior subunidade da RNA polimerase, e o modelo GTR+I (*General time reversible with a proportion of invariable sites*) para fator de alongação 1 α . Para cada região analisada e para a árvore combinada foram realizadas duas análises, cada qual contendo quatro cadeias de Markov "aquecidas" por incrementos durante 100.000 de gerações e amostradas a cada 100 gerações. Vinte e cinco por cento das 10.000 árvores geradas foram descartadas (*25% of burning*) e a árvore de consenso calculada foi visualizada com o auxílio do programa Mega 4 (KUMAR et al., 2004).

2.4 Verificação da patogenicidade dos isolados

Foram utilizadas duas metodologias para a verificação da patogenicidade dos isolados, a metodologia de ferimento de raiz e a de

inoculação com grãos de sorgo infectados. Os experimentos foram conduzidos utilizando-se a cultivar suscetível BRS 133. Primeiramente, foi realizada a inoculação de todos os isolados utilizando-se a metodologia de fermento de raiz e, posteriormente, para a metodologia utilizando grãos de sorgo, foram selecionados 15 isolados, dentre os quais havia representantes dos quatro morfotipos definidos durante o estudo morfológico dos isolados, *Fusarium tucumaniae* (NRRL31773), *Fusarium brasiliense* (NRRL22743) e *Fusarium cuneirostrum* (NRRL31949). Os tratamentos (isolados) foram arranjados em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Para avaliação, foi realizada análise descritiva da presença ou da ausência de sintomas. Os sintomas das plantas inoculadas com os isolados obtidos neste estudo foram comparados com os dos isolados de referência cedidos pela NRRL. O postulado de Koch foi completado por meio do reisolamento dos isolados inoculados em raízes das plantas de soja.

2.4.1 Método de inoculação com fermento de raízes

Plantas de soja com 15 dias de idade, plantadas em areia, tiveram suas raízes lavadas, cortadas e imersas, por 5 minutos, em suspensão de 1×10^6 conídios mL^{-1} . Após a imersão, fez-se o plantio individual das plantas em copos plásticos contendo solo, areia e Plantmax® (1:1:1). Inocularam-se cinco plantas por isolado. As plantas foram colocadas em câmara de crescimento com temperatura de 20°C. Foram feitas avaliações com cinco semanas após inoculação, verificando-se a presença ou a ausência de sintomas. As plantas foram retiradas do solo, suas raízes lavadas com água e procedeu-se à observação dos sintomas (PASTOR-CORRALES; ABAWI, 1987).

2.4.2 Método de inoculação utilizando grãos de sorgo infectados

O inóculo foi cultivado em placas de Petri de 9 cm contendo meio BDA por sete dias, sob temperatura de 25°C, no escuro. Um disco de micélio, com aproximadamente 6 mm, foi retirado de colônias desenvolvidas e transferido para tubos de ensaio contendo 3 g de grãos de sorgo previamente autoclavados por dois dias (60 minutos, a 121°C). Os tubos foram incubados à temperatura de 25°C, no escuro, por 15 dias. Para a inoculação, adotou-se o seguinte procedimento: foram preparados copos plásticos de 500 mL com substrato composto de solo, areia e Plantmax® (1:1:1). As covas de semeadura foram feitas com 4 cm de profundidade e ali foram colocados grãos de sorgo colonizados, sendo, em seguida, cobertos com uma camada de 2 cm de substrato. A seguir, foi semeada a soja e outra camada do substrato com aproximadamente 2 cm cobriu as duas sementes. Os copos foram mantidos em casa de vegetação, à temperatura de 25±3°C por cinco semanas. As testemunhas foram preparadas com sementes de sorgo não inoculadas (HARTMAN et al., 1997).

3 RESULTADOS

Foi composta uma coleção de 67 isolados de *Fusarium solani*, obtidos de plantas de soja e de solo de campo de produção de soja, provenientes dos estados RS, PR, MT, MS, GO e MG. Destes isolados, apenas dois não induziram sintomas de podridão radicular no teste de patogenicidade utilizando o método de fermento de raiz e foram excluídos das demais avaliações (APÊNDICE A). Na população amostrada, não foram encontradas as espécies descritas por Aoki et al. (2005) que supostamente estariam presentes em lavouras de soja no Brasil, causando PVR.

3.1 Características morfológicas

Os 65 isolados avaliados apresentaram características morfológicas típicas de *Fusarium solani*, como monofíalides longas, esporodóquio creme ou azulado e presença de clamidósporo. Em SNA, a 20°C, com fotoperíodo, os isolados apresentaram produção de macro e microconídios no micélio aéreo e produção de macroconídios em esporodóquio. Os microconídios apresentaram formato elipsoidal-oblongo, ocasionalmente reniforme, contendo de 0 a 2 septos. Dois tipos de macroconídios foram identificados tanto no micélio aéreo quanto em esporodóquio. O primeiro tipo foi caracterizado por esporos cilíndricos a fusiformes, possuindo laterais retas, sem distinção de célula pé e célula apical, contendo 3 a 4 septos. Os macroconídios do segundo tipo apresentaram formato falcado, possuindo célula pé e célula apical evidentes, contendo 3 a 4 septos, ocasionalmente 5 septos, quando presentes no micélio aéreo e de 3 a 5 septos quando no esporodóquio. Foi observada também a presença de clamidósporos solitários ou aos pares, lisos e rugosos. Em BDA a 25°C no escuro, foi observada variação na coloração de frente e verso das colônias de branco, creme,

azulada e cor-de-rosa-escuro. A coloração da esporulação também variou de creme e azulada (APÊNDICE D).

Com base na diferenciação do conidióforo e célula conidiogênica e nas taxas de crescimento das colônias em BDA a 25°C no escuro, quatro dias após a inoculação, foi possível diferenciar 4 subgrupos, denominados de morfotipos. O morfotipo 1 apresentou taxa de crescimento superior a 3 cm e fiálides simples; o morfotipo 2 apresentou taxa de crescimento superior a 3 cm com fiálides simples e ramificadas; o morfotipo 3 apresentou taxa de crescimento inferior a 3 cm e fiálides simples e o morfotipo 4, com taxa de crescimento inferior a 3 cm, contendo fiálides simples e ramificada (APÊNDICE D).

Os isolados de referência de *F. brasiliense* e *F. cuneirostrum* apresentaram também dois tipos de macroconídios, assim como os isolados deste estudo. O macroconídio do segundo tipo apresenta características da célula apical que pode distinguir as espécies. O macroconídio de *Fusarium tucumaniae* mostrou-se mais fino e comprido em relação aos demais isolados avaliados. O macroconídio dos isolados deste estudo é semelhante ao de *Fusarium cuneirostrum*, porém, não tem a célula apical evidentemente pontuda. Em *F. brasiliense*, a célula apical é mais arredondada.

O tamanho do macroconídio foi variável entre os morfotipos. O morfotipo 2 apresentou macroconídio do tipo 2, esporodóquio, maior que dos demais. Em comparação com as outras espécies, os isolados apresentaram macroconídio de menor comprimento que de *F. tucumaniae* e o comprimento foi mais variável, se comparado a *F. brasiliense* e a *Fusarium cuneirostrum* (APÊNDICE B).

3.2 Análise filogenética

Foram geradas árvores filogenéticas para cada região genômica, o gene fator de alongação 1- α (APÊNDICE E) e segunda maior subunidade da RNA polimerase (APÊNDICE F) em separado, e para a combinação das regiões (APÊNDICE G). As relações filogenéticas obtidas para as demais espécies filogenéticas do complexo FSSC foram congruentes com aquelas descritas anteriormente (O' DONNELL 2000; O' DONNELL et al., 2008.). Os isolados provenientes da soja no Brasil agruparam-se no clado 3, diferentemente das espécies que causam PVR, pertencentes ao clado 2, em todas as árvores filogenéticas geradas. A população estudada formou um grupo monofilético nas análises das sequências de TEF (82% de probabilidade posterior bayesiana) e das sequências combinadas TEF e RPB2 (100% de probabilidade posterior bayesiana), distinto das demais espécies filogenéticas pertencentes ao clado 3 do FSSC de O'Donnell et al. (2008). *F. falciforme* (Carrion) Summerbell et Schroers (SUMMERBELL; SCHROERS, 2002) foi a espécie mais próxima, compartilhando o mesmo ancestral mais recente. Na análise das sequências de RPB2, alguns dos isolados estudados agruparam-se com *F. falciforme* e *Fusarium* sp. obtidos de humanos. Os morfotipos identificados não foram separados pela análise filogenética, permanecendo todos juntos.

3.3 Verificação da patogenicidade dos isolados

Os isolados testados no método de ferimento de raiz reproduziram os sintomas podridão radicular igualmente aos dos isolados de referência, sob as mesmas condições de temperatura, luminosidade e irrigação. Os sintomas foliares induzidos pelos isolados foram manchas cloróticas intervenais leves, semelhante ao sintoma induzido pelos isolados de referência, e mosaico

clorótico. Nenhuma das testemunhas apresentou sintoma. No segundo método, utilizando sementes de sorgo inoculadas, os isolados induziram sintoma de podridão radicular, porém, somente os isolados de referência induziram sintomas de clorose nas folhas, aos 21 dias da inoculação. Também nenhuma das testemunhas apresentou sintoma. Após a avaliação, foram realizados isolamentos a partir da raiz e a identidade dos fungos reisolados foi confirmada por meio de análise morfológica. Os isolados recuperados apresentaram culturas típicas dos isolados inoculados, portanto, os postulados de Koch foram completados.

4 DISCUSSÃO

A população amostrada, em associação com a soja no Brasil, representa uma espécie filogenética distinta dentro do clado 3 do FSSC. Todos os isolados testados se mostraram patogênicos à cultura. As espécies descritas por Aoki et al. (2005), compondo o clado 2, que supostamente estariam presentes no país causando PVR, não foram encontradas.

Dos 65 isolados estudados, 21 apresentaram taxa de crescimento inferior a 30 mm em 4 dias, característica considerada exclusiva para isolados pertencentes ao clado 2 do FSSC (AOKI et al., 2003 e 2005). Os outros 44 isolados apresentaram crescimento superior a 30 mm em quatro dias. Portanto, a taxa de crescimento não é um bom marcador para separar isolados de *Fusarium solani* do clado 2 e clado 3.

Os isolados avaliados apresentaram alta plasticidade morfológica, sendo possível diferenciar quatro morfotipos, com base na taxa de crescimento das colônias, juntamente com a morfologia da célula conidiogênica e do conidióforo, além de apresentarem dois tipos de macroconídios tanto no micélio aéreo como no esporodóquio (APÊNDICE B). O primeiro tipo é caracterizado por macroconídios cilíndricos a fusiforme, possuindo as laterais retas com extremidades arredondadas. Esse tipo de conídio está presente também em *F. brasiliense* e *Fusarium cuneirostrum*. Os macroconídios do segundo tipo apresentaram formato falcado, com célula pé evidente diferente da célula apical. A morfologia do macroconídio do segundo tipo pode ser considerada marcador morfológico para separar a população estudada das espécies do clado 2, embora as diferenças entre *F. brasiliense*, *Fusarium cuneirostrum* e os isolados estudados sejam mínimas.

Na análise bayesiana das sequências do gene fator de alongação e das sequências combinadas dos genes fator de alongação 1 α e segunda maior

subunidade da RNA polimerase (APÊNDICE E, APÊNDICE G), os isolados analisados formaram um clado único, claramente separado dos demais grupos do clado 3 do FSSC, diferindo, portanto, das espécies descritas por Aoki et al. (2003 e 2005) como agentes causais da PVR, que pertencem ao clado 2 do FSSC. Desta forma, a população amostrada de *Fusarium solani* associada à soja no Brasil foi reconhecida como uma espécie filogenética distinta, conforme o método de concordância genealógica (*Genealogical concordance phylogenetic species recognition*, ou GCPSR) (TAYLOR et al., 2000).

Com base nestes resultados, há indícios de que a capacidade de causar doença na soja não seja uma característica de origem única, mas tenha evoluído de forma convergente em momentos distintos. A parafilia de *Fusarium* associado à PVR da soja pode ter evoluído de pelo menos quatro centros de diversidade de espécies de plantas nativas, uma vez que a soja é originária da China. Provavelmente, diferentes espécies filogenéticas de *Fusarium solani* de outros hospedeiros presentes no Brasil passaram a causar doença na soja. Slippers et al. (2005) relataram vários exemplos de “host jumps”, como a ocorrência de epidemia de cancro em *Pinus radiata*, causada por *Fusarium circinatum* após a introdução desta espécie na Califórnia. Outro exemplo é de *Cryosporthe cubensis* (sin. *Cryphonectria cubensis*), agente etiológico de cancro em várias espécies de Melostomataceae e Myrtaceae na Ásia, América do Sul e África, sendo capazes de pular “jump” entre estes hospedeiros.

O polimorfismo das sequências da segunda maior subunidade da RNA polimerase não foi suficiente para separar a população estudada de *Fusarium* sp. e *F. falciforme* associadas à micose de humanos e animais. Estas duas espécies são grupos irmãos nas análises filogenéticas (ZANG et al., 2006; O’DONNELL et al., 2008). Já na análise filogenética de fator de alongação 1 α e na análise combinada das sequências de fator de alongação 1 α e segunda maior subunidade da RNA polimerase, a população estudada formou um grupo monofilético com

suporte estatístico de 100%, evidenciando ser uma espécie filogenética distinta de *Fusarium* sp. e *Fusarium falciforme*. *Fusarium* sp. não possui sua morfologia descrita na literatura, porém, por meio de estudos filogenéticos, constatou-se que este faz parte de uma população distinta de clado 3 do FSSC assim como a população estudada de isolados da soja. *F. falciforme* também representa uma espécie filogenética de FSSC do clado 3, cujos marcadores morfológicos são: presença de conídios formados em micélio aéreo com uma a três células, curvados (7,8-10 x 2,7-3,3 μm), monofiálides com septos muito evidentes e apresenta crescimento lento, de 10 mm de diâmetro em 10 dias (SUMMERBELL; SCHROERS, 2002; HOOG, 2000; GAMS, 1971). Os isolados estudados que agruparam com *F. falciforme* apresentam crescimento rápido, com exceção de CML 1988, produção de macro e microconídio e monofiálides septadas, porém, com septos não muito evidentes.

Várias populações do FSSC, patogênicas a diferentes espécies de plantas foram descritas como espécies biológicas, com teleomorfo em *Haematonectria* ou *Neocosmospora* (Hypocreales, Ascomycota) (MATUO; SNYDER, 1973). Essas *mating populations* foram evidenciadas também como espécies filogenéticas (O'DONNELL, 2000; ZHANG et al., 2006; O'DONNELL et al., 2008). Com base na análise das sequências das espécies que causam PVR descritas até o momento, apenas *F. tucumaniae* apresentou variabilidade genética nos ramos terminais da árvore filogenética, sugerindo a ocorrência da recombinação sexual (AOKI et al., 2003 e 2005). Esta hipótese do ciclo sexual foi posteriormente confirmada nesta espécie por meio de cruzamentos em laboratório (COVERT et al., 2007).

No presente estudo, o grupo monofilético encontrado apresentou variabilidade nos ramos terminais das árvores filogenéticas, fornecendo indícios da presença da reprodução sexual. Em um trabalho paralelo, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, foi observada a reprodução sexuada entre os isolados

estudados (dados não mostrados). Os isolados deste grupo também foram cruzados com isolados de *Fusarium tucumaniae* (NRRL31773), *Fusarium brasiliense* (NRRL22743) e *Fusarium cuneirostrum* (NRRL31949), porém, não houve a produção de peritécios férteis. Tais resultados dão suporte à hipótese de que esta espécie filogeneticamente definida também corresponde a uma espécie biológica distinta do FSSC.

Nos testes de patogenicidade, os isolados estudados induziram sintomas de podridão radicular em plantas de soja, iguais aos sintomas reproduzidos pelos isolados de referência (APÊNDICE H). O sintoma foliar observado foi semelhante, na metodologia de ferimento de raiz, aos dos isolados de referência. Muito se tem discutido sobre os sintomas induzidos por isolados de *Fusarium solani* que causam PVR em soja (ROY, 1997; ROY, 1997; LI et al., 2000; RUPE et al., 2001; AOKI et al., 2003 e 2005). Nestes trabalhos, os autores relatam que o que distingue os isolados que causam PVR dos outros isolados de *Fusarium solani*, também associados à soja, é a indução do sintoma foliar provocado por toxinas produzidas pelo fungo.

Com base em avaliação da morfologia e da patogenicidade e análise de polimorfismo de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial, os isolados de *Fusarium solani* obtidos da soja, diferentes de isolados de *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, e um isolado de *Fusarium solani* obtido de cucurbitáceas, induziram sintomas iniciais da PVR como leves manchas intervenais cloróticas ou um mosaico clorótico leve (RUPE et al., 2001). Os autores relatam, ainda, que a capacidade de alguns isolados de causarem sintomas foliares iniciais em casa de vegetação deve-se à podridão radicular e que não pode ser um indicativo da sua capacidade de fazê-lo em condições de campo. Entretanto, em estudos de campo e experimentos em casa de vegetação mostrou-se a falta de correlação entre sintomas nas raízes e na parte aérea, provavelmente decorrente da variação de temperatura necessária para a ocorrência dos sintomas. Temperaturas mais

baixas favorecem a colonização da raiz, enquanto que temperaturas em torno de 25°C favorecem, além do sintoma nas raízes, o aparecimento de sintomas foliares, devido ao aumento da transpiração das folhas, fazendo com que haja maior translocação de água e da toxina produzida pelo fungo da raiz às folhas (SCHERM; YANG, 1996; HARTMAN et al., 1997).

Com base no exposto, o sintoma foliar parece ser um sintoma secundário, de modo que, mesmo que a planta apresente apenas sintoma de podridão na raiz, grandes perdas na produção podem ocorrer. A planta com podridão no sistema radicular perde a capacidade de absorver água e nutrientes, e terá seu desenvolvimento comprometido, bem como sua floração e produção (AGRIOS, 2005). Portanto, isolados associados à soja, pertencentes tanto ao clado 2 como ao clado 3 do FSSC, são capazes de causar podridão radicular em soja.

Com base nos resultados de morfologia, análise filogenética e patogenicidade, os isolados estudados de *Fusarium solani* foram reconhecidos como uma nova espécie do FSSC patogênica à cultura da soja no Brasil.

As próximas etapas serão: realizar a indução da fase sexuada desta espécie filogenética para verificar a aplicação do conceito de espécie biológica, por meio de cruzamentos com testadores de *mating populations* conhecidas (MATUO; SNYDER, 1973), além de realizar coletas mais abrangentes em áreas de produção de soja para a confirmação da presença das espécies do clado 2 no Brasil e firmar parceria com grupos de pesquisa na Argentina, Laboratório Agrícola Rio Paraná, San Pedro, Buenos Aires, e no Brasil, Embrapa Cerrados.

5 CONCLUSÕES

Os isolados estudados induzem sintomas de podridão radicular em plantas de soja.

Isolados associados à soja, pertencentes tanto ao clado 2 como ao clado 3 do FSSC, são capazes de causar podridão radicular em soja.

A população estudada representa uma espécie filogenética distinta no complexo *Fusarium solani*.

REFERÊNCIAS

- ACHENBANCH, L. A. et al. Use of RAPD Markers as a diagnostic tool for the identification of *Fusarium solani* isolates that cause soybean sudden death syndrome. **Plant Disease**, [S.l.], v. 80, n. 11, p. 1228-1232, July 1996.
- AGRIANUAL. Soja. São Paulo. FNP Consultoria & Comércio, 2010.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5th ed. California: British Library Cataloguing, 2005.
- AOKI, T. et al. Sudden death syndrome of soybean in south America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. **Mycoscience**, Lawrence, v. 46, p. 162-183, Dec. 2005.
- AOKI, T. et al. Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex - *F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. **Mycologia**, Tokyo, v. 95, n. 4, p. 660-684, July/Aug. 2003.
- ARRUDA, G. M. T. et al. Morphological and molecular characterization of the sudden-death syndrome pathogen of soybean in Brazil. **Plant Pathology**, [S.l.], v. 54, n. 1, p. 53-65, Sept. 2005.
- COVERT, S.F. et al. Sexual reproduction in the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium tucumaniae*. **Fungal Genetics and Biology**, Amsterdam, v. 44, p. 799-807, Dec. 2007.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologia de produção de soja na região Central do Brasil**. Londrina, 1998.
- FREITAS, T. M. Q. et al. Dano devido à podridão vermelha da raiz na cultura da soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 991- 996, July/Aug. 2004.
- GAMS, W. **Cephalosporium-artige Schimmelpilze**. Stuttgart:[s.n], 1971.
- HARTMAN, G. L. et al. Germplasm evaluation of *Glycine max* for resistance to *Fusarium solani*, the causal organism of sudden death syndrome. **Plant Disease**, [S.l.], v. 81, n. 5, p. 515-518, May 1997.

HEPPERLE, D. SeqAssem©. **A sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Win32-Version. 2004**
Disponível em: <http://www.sequentix.de>. Acesso em: 10 out. 2010.

HOOG, G. S. et al. **Atlas of clinical fungi**. 2nd ed. Utrecht: University Rovira i Virgili, 2000.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, [S.l.], v. 5, n. 2, p. 150–163, June 2004.

LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Malden: Blackwell Publishers, 2006.

LI, S. et al. Molecular differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* from other *F. solani* based on mitochondrial small subunit rDNA sequences. **Phytopathology**, [S.l.], v. 90, p. 491-497, May 2000.

MATUO, T.; SNYDER, W. C. Use of morphology and mating populations in the identification of formae speciales in *Fusarium solani*. **Phytopathology**, [S.l.], v. 63, p. 562–565, Nov. 1973.

NAKAJIMA, T. et al. First occurrence of sudden death syndrome of soybean in Brazil. **Japanese Agricultural Research Quarterly**, [S.l.], v. 30, n. 1, p. 31-34, Jan. 1996.

O'DONNELL, K. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, [S.l.], v. 92, n. 5, p. 919-938, Mar. 2000.

O'DONNELL, K. et al. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. **Journal Clinical Microbiology**, [S.l.], v. 46, n. 8, p. 2477-2490, Aug. 2008.

O'DONNELL, K. et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings National Academy Science**, [S.l.], V. 95, P. 2044-2049, Mar. 1998.

- O'DONNELL, K et al. Soybean Sudden Death Syndrome Species Diversity Within North and South America Revealed by Multilocus Genotyping. **Phytopathology**, [S.l.], v. 100, n. 1, p. 58-71, Jan. 2010.
- O'DONNELL, K.; GRAY, L.E. Phylogenetic relationships of the Soybean Sudden Death Syndrome pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* inferred from rDNA sequence data and PCR primers for its identification. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [S.l.], v. 8, n. 5, p. 709–716, Sept/Oct. 1995.
- PASTOR-CORRALES, M. A.; ABAWI, G. S. Reactions of selected bean germ plasms to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Plant Disease**, [S.l.], v. 71, n. 11, p. 990-993, 1987.
- ROY, K.W. *Fusarium solani* on soybean roots: nomenclature of the causal agent of Sudden death syndrome and identity and relevance of *F. solani* form B. **Plant Disease**, [S.l.], v. 81, n. 3, p. 259-266, Mar. 1997.
- ROY, K.W. et al. Sudden Death Syndrome of Soybean. **Plant Disease**, [S.l.], v. 81, n. 10, p. 1100-1111, Oct. 1997.
- RUPE, J. C. et al. Differentiation of the sudden death syndrome pathogen of soybean, *Fusarium solani* f.sp. *glycines*, from other isolates of *F. solani* based on cultural morphology, pathogenicity, and mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms. **Canadian Journal of Botany**, [S.l.], v. 79, p. 829-835, June 2001.
- RUPE, J.C. Frequency and pathogenicity of *Fusarium solani* recovered from soybeans with sudden death syndrome. **Plant Disease**, [S.l.], v. 73, n. 7, p. 581-584, July 1989.
- RUPE, J.C.; WEIDEMANN, G.J. Pathogenicity of a *Fusarium* sp. isolated from soybean plants with Sudden death syndrome. **Phytopathology**, [S.l.], v. 76, p. 1080, 1986.
- SCHERM, H.; YANG X. B. Development of sudden death syndrome of soybean in relation to soil temperature and soil water matric potential. **Phytopathology**, [S.l.], v. 86, n. 6, p. 642-649, Feb. 1996.
- SLIPPERS, B. et al. Emerging pathogens: Fungal host jumps following anthropogenic introduction. **Trends Ecology Evolution**, [S.l.], v. 20, n. 8, p. 420-421, Aug. 2005.

SUMMERBELL, R. C.; SCHROERS H.J. Analysis of phylogenetic relationship of *Cylindrocarpon lichenicola* and *Acremonium falciforme* to the *Fusarium solani* species complex and a review of similarities in the spectrum of opportunistic infections caused by these fungi. **Journal Clinical Microbiology**, Utrecht, v. 40, n. 8, p. 2866–2875, Aug. 2002.

TAYLOR, J. W. et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, [S.l.], v. 31, p. 21–32, Sept. 2000.

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

YORINORI, J. T. Evolução da ocorrência e da severidade da podridão vermelha da raiz da soja (PVR/SDS) e reação das cultivares comerciais à doenças. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 22. 2000, Cuiabá. **Resumos**. Londrina, PR : Embrapa Soja, 2000. 94 p.

ZHANG, N. et al. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.l.], v. 44, n. 6, p. 2186-2190, June 2006.

**APÊNDICE A - Tabela 1 Origem geográfica dos isolados do complexo
Fusarium solani associados à soja**

CML^a	Outro cod^a	Espécie	Substrato	Origem geográfica^b	Taxa de crescimento	Fiálide^d
1771		<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Campo N. do Parecis, MT	3,7	S/R
1987	MES730	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Chapadão do Sul, MT	2,9	S
1988	MES732	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Chapadão do Sul, MT	2,9	S
1836	S2	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Guarapuava, PR	4,2	S/R
1989	S4	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Guarapuava-PR	4,1	S/R
1990	S7	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Guarapuava, PR	4,6	S/R
1991	S8	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Lunnardelli, PR	3,3	S
1992	S9	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Lunnardelli, PR	3,6	S
1993	S10	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Marinalva, PR	3,4	S/R
1994	S11	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	S. João do Ivaí, PR	4,5	S/R
1995	S12	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Marinalva, PR	3,9	S/R
1996	S13	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	S. João do Ivaí, PR	4,5	S/R
1997	S21	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Castro, PR	3,3	S/R
1998	S22	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Castro, PR	3,4	S
1999	S23	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Castro, PR	4,3	S
1833	MES13	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Campo Mourão, PR	2,2	S/R
2000	MES34	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Carambeí, PR	3,9	S/R

Tabela 1 continuação

CML ^a	Outro cod ^a	Espécie	Substrato	Origem geográfica ^b	Taxa de crescimento	Fiálide ^d
2001	MES64	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Palmeira, PR	2,75	S
2002	MES73	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Faxinal, PR	3,4	S/R
2003	MES722	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Warta, PR	2,8	S
2004	MES723	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Campo Mourão, PR	3,1	S/R
2005	MES724	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Ubiratã, PR	2,65	S
2006	MES734	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Ponta Grossa, PR	2,15	S/R
2007	MES735	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Ivaiporã, PR	2,5	S/R
1829	MES28	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Tapera, RS	1,3	S/R
2008	MES29	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Vila Maria, RS	1,65	S/R
2009	MES728	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Passo Fundo, RS	2,85	S/R
2010	MES741	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Passo Fundo, RS	3	S
528	#1CNPT	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Passo Fundo, RS	3,2	S/R
2012	S15	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Rio Verde, GO	2,7	S
577		<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Passo Fundo, RS	3,8	S
2011	S14	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Montividiu, GO	3,2	S
2013	S16	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Montividiu, GO	4,1	S
2014	S17	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Montividiu, GO	4,2	S
1241	569 ^a	<i>F. solani</i>	Solo soja	Montividiu, GO	3,2	S

Tabela 1 continuação

CML^a	Outro cod^a	Espécie	Substrato	Origem geográfica^b	Taxa de crescimento	Fiálide^d
1243	SI7933	<i>F. solani</i>	Solo soja	Montividiu, GO	3,5	S/R
1245	S211A	<i>F. solani</i>	Solo soja	Montividiu, GO	3,6	S
1247	S54A	<i>F. solani</i>	Solo soja	Montividiu, GO	2,8	S
1830	MES24	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Cristalina, GO	3,8	S/R
2015	MES721	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Brasília, DF	3,4	S
526	MSS1624	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Planaltina, DF	3,4	S/R
575		<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Planaltina, DF	3,6	S/R
527	MSS1497	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Planaltina, DF	3,4	S/R
1837	MES1	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Brasília, DF	4,4	S/R
2016	MES2	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Brasília, DF	4,6	S/R
2017	JEM3623	<i>F. solani</i>	Solo soja	Jussara, GO	3,9	S/R
2018	JEM3599	<i>F. solani</i>	Solo soja	Luziania, GO	3,4	S/R
2019	JEM3627	<i>F. solani</i>	Solo soja	Luziania, GO	1,5	S/R
2020	S24	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Maracaj, MS	3,7	S
2021	S25	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Marapuã, MS	3,8	S
1780	test01	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Uberlândia, MG	3,4	S
1781	test02	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Uberlândia, MG	3,8	S/R
1782		<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Uberlândia, MG	3,6	S

Tabela 1 Conclusão

CML ^a	Outro cod ^a	Espécie	Substrato	Origem geográfica ^b	Taxa de crescimento	Fiálide ^d
2022	MES5	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Patos de Minas, MG	3,7	S/R
1832	MES15	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Coromandel, MG	3,55	S/R
1839	MES60	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Patrocínio, MG	3,9	S/R
2023	MES720	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	São Gotardo, MG	3,05	S/R
691	Joel11	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Araxá, MG	2,5	S/R
2024	JEM3587	<i>F. solani</i>	Solo soja	Unai, MG	1,9	S
2025	JEM3582	<i>F. solani</i>	Solo soja	UNai, MG	2	S/R
2026	JEM3614	<i>F. solani</i>	Solo soja	Uberlândia, MG	1,8	S
2027	JEM3624	<i>F. solani</i>	Solo soja	Bonfinópolis Minas, MG	3,4	S
2028	MES27	<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>	Brasília, DF	2,4	S/R
860		<i>F. solani</i>	<i>G. max</i>		4,4	S
1891	NRRL31773	<i>F. tucumaniae</i>	<i>G. max</i>	Brasil	3,2	S/R
1890	NRRL34546	<i>F. tucumaniae</i>	<i>G. max</i>	Brasil	2,6	S/R
1882	NRRL31949	<i>F. cuneirostrum</i>	<i>G. max</i>	Brasil	2,1	S/R
	NRRL22743	<i>F. brasiliense</i>	<i>G. max</i>	Brasil	2,3	S/R
1886	NRRL22678	<i>F. brasiliense</i>	<i>G. max</i>	Brasil	2,2	S/R

^aAbreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; MÊS = Micoteca Embrapa Soja, Embrapa Soja, Londrina Paraná, Brasil; JEM = JEm Análise Agrícola, Aparecida de Goiânia, Goiás, Brasil; NRRL = Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, EUA.

^bMT = isolados do estado de Mato Grosso, Brasil; PA = isolados do estado do Paraná, Brasil; RS = isolados do estado do Rio Grande Do Sul, Brasil; Go = isolados do estado de Goiás, Brasil; DF = Distrito Federal, Brasília, Brasil; MS = isolados do estado do Mato Grosso de Sul, Brasil; MG = isolados do estado de Minas Gerais, Brasil.

^cTaxa de crescimento, em centímetros, mensurada após quatro dias da transferência para BDA, 25°C, no escuro.

^dMorfologia da célula conidiogênica e do conidióforo observada pós 10 dias de inoculação em SNA, 20°C, com fotoperíodo de 12 horas. S – fiálide simples; R – Fiálide ramificada.

APÊNDICE B - Tabela 2 Marcadores morfológicos do macroconídio

Espécies ^c	Conidio micelio aéreo		Conidio esporodoquio	
	macrotipo 1 ^d	macrotipo 2 ^e	macrotipo 1 ^d	macrotipo 2 ^e
<i>morfotipo1</i> ^a	22-47,5x5-7,5	22,5-45x5-7,5	27,5-57,5x5-7,5	30-52,5x5-7,5
<i>morfotipo2</i> ^a	22,5-45x5-7,5	25-47,5x5-7,5	30-60x5-7,5	22,5-62x5-7,5
<i>morfotipo 3</i> ^a	25-52,5,5x5-7,5	22,5-50x5-7,5	32,5-50x5-7,5	27,5-52,5x5-7,5
<i>morfotipo 4</i> ^a	32,5-42,5x5-7,5	22,5-45x5-7,5	40-55x5-6,25	37-55x5-6,25
<i>F. tucumaniae</i> ^b		45-60x2,5-5		55-70x 2,5-5
<i>F. brasiliense</i> ^b	30-42,5x5	42,5-57,5x5	32,5-50,5x5	52,5-62,5x5-6,25
<i>F. cuneirostrum</i> ^b	30-45x5-7,5	30-42,5x5	30-50x5-7,5	47-62,5x5

^a Refere-se a isolados de *Fusarium solani* associada com a soja o Brasil.

^b Refere-se aos isolados de referência obtidos da NRRL = Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, EUA

^c Todos os isolados listados foram caracterizadas em SNA a 20°C, com fotoperíodo de 12 horas.

^d Macro tipo 1 caracterizado por esporos cilíndricos a fusiforme, com as laterais, dorso ventral, retas com extremidades arredondadas.

^e Macro tipo 2 caracterizado por esporos falcados, com célula pé e célula apical evidente.

Todas as medições estão em micrômetros (µm)

APÊNDICE C - Tabela 3 Sequências utilizadas na análise filogenética

Espécie	NRRL	Genbank TEF	Genbank RPB2
<i>F. plagianthi</i>	22632	AF178354	EU329519
<i>F. illudens</i>	22090	AF178326	EU329488
<i>Fusarium virguliforme</i>	34551	GU170635	GU170615
<i>Fusarium cuneirostrum</i>	31104	EF408413	EU329558
<i>Fusarium tucumaniae</i>	31096	AY220181	GU170600
<i>Fusarium phaseoli</i>	22276	AY220186	GU329500
<i>Fusarium brasiliense</i>	22743	EF408407	EU329525
<i>Fusarium striatum</i>	20101	AF178333	EU329490
<i>F.solani</i> f.sp. <i>curcubitae</i> MP-I	22098	AF178327	EU329489
<i>F.solani</i> f.sp. <i>curcubitae</i> MP-I	22153	AF178346	EU329482
<i>F.solani</i> f.sp. <i>mori</i> MP-III	22157	AF178359	EU329493
<i>F.solani</i> f.sp. <i>mori</i> MP-III	22230	AF178358	EU329499
<i>F.solani</i> f.sp. <i>xanthoxyli</i> MP-IV	22163	AF178328	EU329492
<i>F.solani</i> f.sp. <i>xanthoxyli</i> MP-IV	22277	AF178336	FJ240380
<i>F.solani</i> f.sp. <i>curcubitae</i> MP-V	32856	DQ247161	EU329629
<i>F.solani</i> f.sp. <i>curcubitae</i> MP-V	22389	AF178340	EU329506
<i>F.solani</i> f.sp. <i>pisii</i> MP-VI	22820	AF178355	EU329532
<i>F.solani</i> f.sp. <i>pisii</i> MP-VI	45880	AF178337	EU329640
<i>F.solani</i> f.sp. <i>robiniae</i> MP-VII	22161	AF178330	EU329494
<i>F.solani</i> f.sp. <i>robiniae</i> MP-VII	22586	AF178353	EU329516
<i>F.solani</i> f.sp. <i>piperis</i>	22570	AF178360	EU329513
<i>F.solani</i> f.sp. <i>batatas</i> MP-II	22402	AF178344	EU329496
<i>F.solani</i> f.sp. <i>batatas</i> MP-II	22400	AF178343	EU329509
<i>Fusarium lichenicola</i>	28030	DQ246877	EF470161
<i>Fusarium lichenicola</i>	34123	DQ246977	EF329635
<i>Fusarium ambrosium</i>	22354	AF178338	EU32504
<i>Fusarium</i> sp.	28000	DQ247542	EF470128
<i>Fusarium</i> sp.	32858	DQ247162	EU329630
<i>Fusarium falciforme</i>	43529	EF452965	EF470004
<i>Fusarium falciforme</i>	22098	DQ790489	DQ790577

^a NRRL = Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, EUA.

^b Número de acesso de sequências do gene TEF= Fator de alongação 1 α obtidas do GenBank, NCBI.

^c Número de acesso de sequências da RPB2= Segunda maior subunidade da RNA polimerase obtidas do GenBank, NCBI.

APÊNDICE D - Figura 1 Caracteres morfológicos

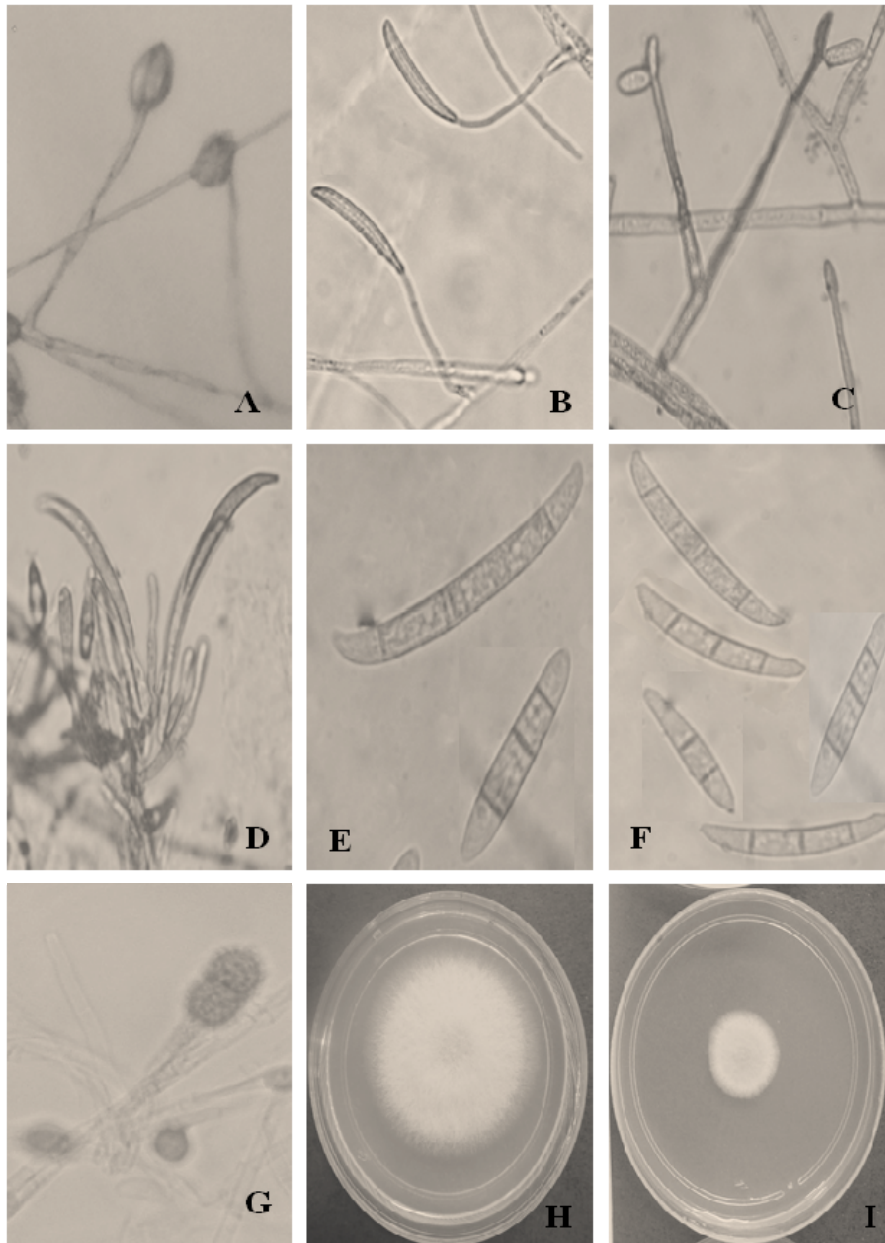


Figura 1 Caracteres morfológicos – (A) macroconídio formado no micélio aéreo; (B) macroconídio produzido em monofiálides longas; (C) microconídio produzido em monofiálide ramificada; (D) esporodóquio; (E) macroconídio tipo 1 e tipo 2; (F) macro e microconídios; (G) clamidósporo; (H) isolado com taxa de crescimento >3 cm; (I) isolado com taxa de crescimento <3 cm

APÊNDICE E – Figura 2

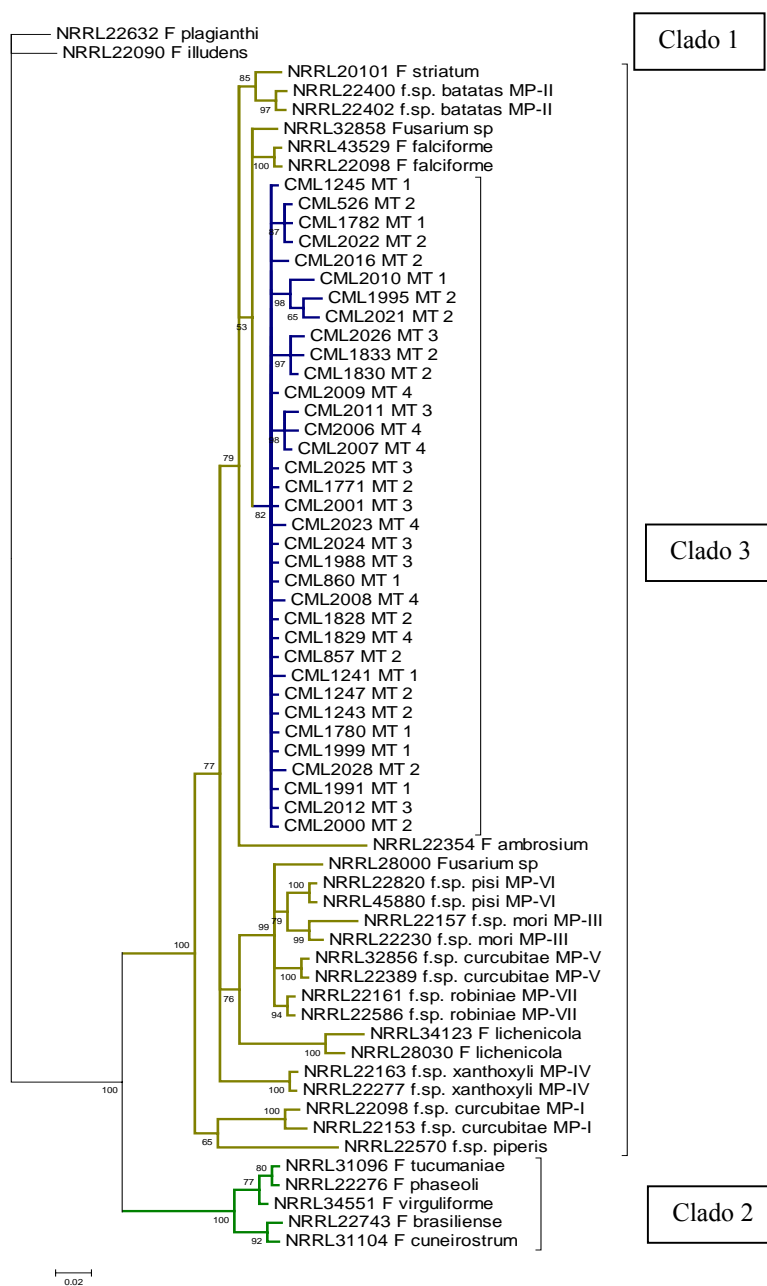


Figura 2 Análise bayesiana de sequências TEF-1 α das espécies do complexo *Fusarium solani* e isolados de *Fusarium* da soja do Brasil. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos internódios. Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras; NRRL = *Northern Regional Research Laboratory*.

APÊNDICE F - Figura 3

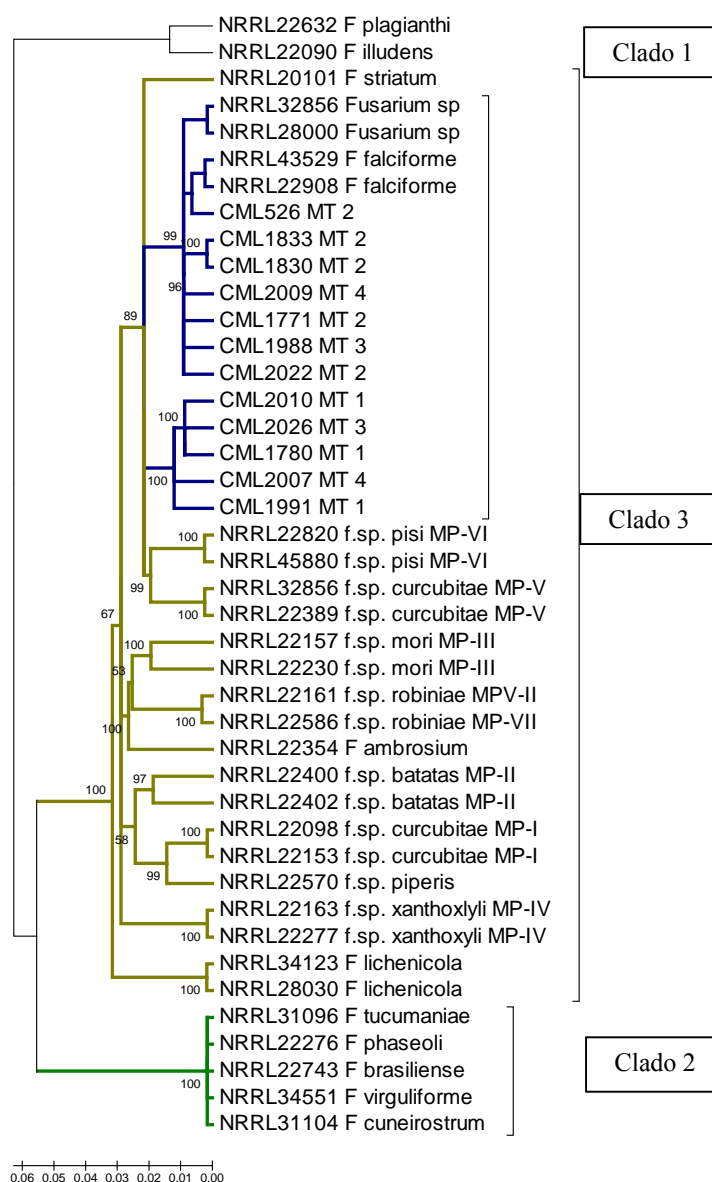


Figura 3 Análise bayesiana de sequências de RPB2 das espécies do complexo *Fusarium solani*, e isolados de *Fusarium* da soja do Brasil. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos internódios. Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras; NRRL = *Northern Regional Research Laboratory*.

APÊNDICE G - Figura 4

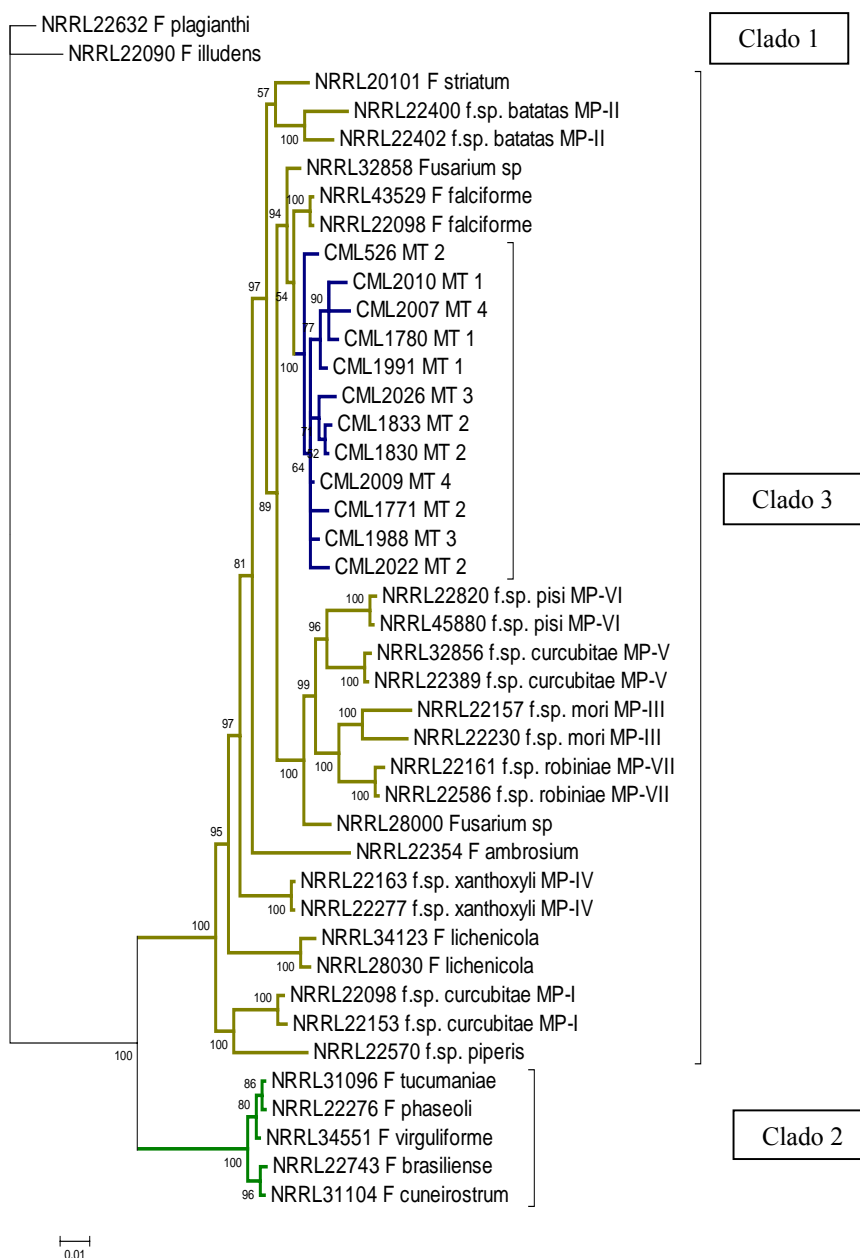


Figura 4 Análise bayesiana de sequências combinadas de RPB2 e TEF-1 α de espécies do complexo *Fusarium solani* e isolados de *Fusarium* da soja do Brasil. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos internódios. Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras; NRRL = *Northern Regional Research Laboratory*.

APÊNDICE H - Figura 5

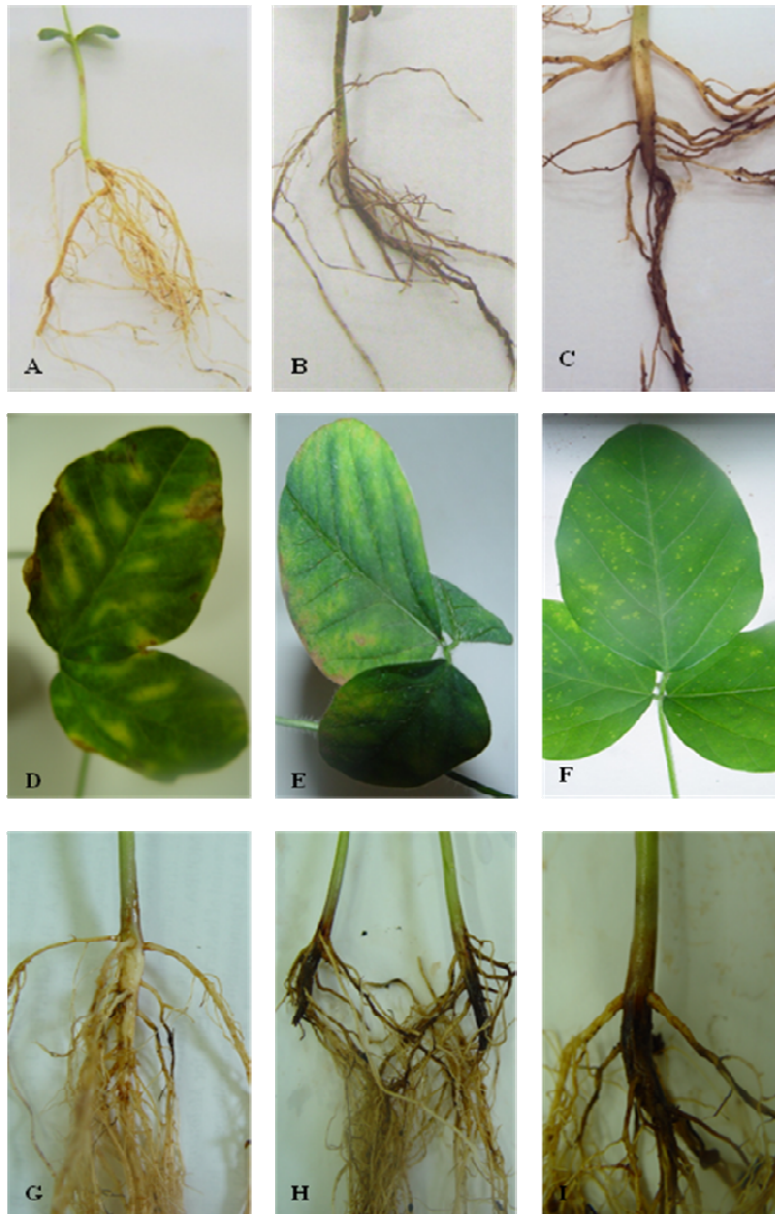


Figura 5 Teste de patogenicidade: (A-F) método de ferimento de raiz: (A) testemunha; (B) planta inoculada com isolados de referência apresentando sintoma de podridão radicular; (C) planta inoculada com isolados estudados apresentando sintoma de podridão radicular; (D) planta inoculada com isolado de referência apresentando sintoma na folha de clorose internerval; (E) planta inoculada com isolados estudados apresentando sintoma na folha de clorose internerval; (F) planta inoculada com isolados estudados apresentando sintoma na folha de mosaico leve; (G-I) método de inoculação de grãos de sorgo; (G) testemunha; (H) planta inoculada com isolados de referência apresentando sintoma de podridão radicular; (I) planta inoculada com isolados estudados apresentando sintoma de podridão radicular.