



ESTUDOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DE
Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum

Fabiana Pires da Silva

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Vegetal,
Segurança Alimentar e o Ambiente
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Harakava

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

ESTUDOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DE

Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum

Fabiana Pires da Silva

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Vegetal, Segurança Alimentar e o Ambiente
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Harakava

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Silva, Fabiana Pires da.

Estudos morfológicos e moleculares de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. / Fabiana Pires da Silva. -- São Paulo, 2013.
70 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: **Sanidade Animal, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio**

Linha de pesquisa: Sanidade Vegetal, Segurança Alimentar e o Ambiente.

Orientador: Ricardo Harakava.

Versão do título para o inglês: Morphological and molecular studies of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*.

1. *Gossypium* spp. 2. Detecção 3. Fusariose I. Silva, Fabiana Pires da
II. Harakava, Ricardo III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título

IB/Bibl./2013/007



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação

Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo - SP
secretariapg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato:

Título:

Orientador(a):

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração:

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a):

*Instituição:

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a):

*Instituição:

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a):

*Instituição:

Aos meus amados pais, Celso e Sonia, pelo amor, orgulho e principalmente pela educação, valores e momentos de superação que sempre estiveram ao meu lado.

E ao meu adorado irmão, Rafael, pela força e companheirismo.

Dedico-lhes este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Biológico que, através do Programa de Pós-Graduação em Sanidade Vegetal, Segurança Alimentar e o Ambiente, possibilitou a realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro através da concessão da bolsa de mestrado.

Ao Prof. Dr. Ricardo Harakava pela orientação, amizade, respeito, total confiança para a realização desse trabalho e principalmente pelo exemplo profissional.

A Dra. Marta Helena Vechiato que esteve o tempo todo ao meu lado e como uma mãe confiou e me ensinou desde os primeiros passos da fitopatologia até a realização total desse trabalho. Agradeço de coração pelo carinho, amizade, simplicidade, dedicação e confiança.

A Dra. Margarida F. Ito, Dra. Christiane Ceriani Aparecido e Dr. José Ivanildo de Souza pelos isolados cedidos para a realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Programa de Pós Graduação pelo convívio e boas risadas, as quais descontraíam os momentos de tensão, além das histórias, piadas e lembranças que ficarão gravadas para sempre em minha memória.

Aos pesquisadores, professores e funcionários do Instituto Biológico, pela amizade, dedicação, princípios e conhecimentos adquiridos.

A Samantha pela ajuda nos estudos moleculares, disponibilidades durante a execução desde trabalho e por toda compreensão.

A Alyne pelo auxílio, colaboração e pensamentos positivos.

Ao Wilson pela ajuda nos momentos corridos.

A Leilane por toda ajuda, ensinamentos, dedicação, amizade e por todas as consultorias prestadas, você já estaria rica se me cobrasse por cada uma delas!

E mais uma vez, a toda equipe do Laboratório de Patologia de Sementes que me auxiliaram na realização desse trabalho, pelos momentos de risadas, por toda amizade e ensinamentos durante todos esses anos de convivência.

Muito Obrigada!

*“Não podemos ter medo dos confrontos...
até os planetas se chocam e do caos nascem às estrelas”.*

(Charles Chaplin)

SILVA, F.P. ESTUDOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. São Paulo-SP. 2013. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

RESUMO

A identificação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov) em sementes de algodão é dificultada visto que a diferenciação das formaes speciales de fungos não é possível quando se utiliza métodos rotineiros recomendados para a detecção. Diante disso, este trabalho teve como objetivo estudar as características de crescimento e coloração micelial de isolados de Fov, comprovar a especificidade de iniciadores descritos na literatura e desenvolver iniciadores específicos, visando estabelecer um método de detecção e identificação deste patógeno em sementes de algodão e também prospectar a opinião de produtores de algodoeiros sobre a importância da doença. Quinze isolados de Fov, obtidos junto a diferentes coleções, tiveram sua patogenicidade confirmada através da inoculação de plantas de algodão, entretanto grande variabilidade na agressividade foi constatada. Os experimentos para a caracterização do crescimento e coloração micelial foram realizados utilizando-se os meios de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e Czapek (CZP), e temperaturas de incubação de 25 e 27°C. Os isolados formaram quatro grupos para o meio BDA e sete grupos para o CZP, mostrando que as características miceliais não permitem a identificação de Fov. Para os estudos moleculares, as regiões ITS (internal transcribed spacer) e IGS (intergenic spacer region) e parte do gene codificador do fator de alongação (EF) foram amplificados empregando-se iniciadores universais. O sequenciamento destas regiões não permitiu o desenho de iniciadores específicos ao Fov devido à baixa variabilidade da região ITS entre formaes speciales de *F. oxysporum*, apesar da maior variabilidade do gene EF e da região IGS, várias formaes speciales distintas compartilhavam a mesma sequência. Iniciadores específicos para Fov não permitiram a detecção de todos os isolados de Fov utilizados no presente trabalho. O emprego da técnica de “random

amplified polymorphic DNA” (RAPD) resultou na amplificação de padrões de bandas distintos entre Fov e outras f. sp de *F. oxysporum*. Entretanto, iniciadores desenvolvidos a partir do sequenciamento de bandas distintas de Fov não mostraram especificidade ao mesmo.

Palavras-chave: *Gossypium* spp., detecção e fusariose.

SILVA, F.P. MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR STUDIES OF *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. São Paulo-SP. 2013. Dissertation (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

ABSTRACT

The identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov) in cotton seeds is a difficult task given that distinction of formae speciales of fungi that grow on seeds is not possible when routine methods recommended for detection of fungi are employed. The objectives of this work were: to study the growth characteristics and mycelial color of Fov isolates, to confirm the specificity of primers described in the literature and/or to develop new specific primers aiming the establishment of a method for detection and identification of this pathogen in cotton, and to survey the opinion of cotton grower about the importance of the disease. Fifteen Fov isolates obtained from different collections had their pathogenicity confirmed through inoculation in cotton plants but high variability in the aggressiveness was observed. The experiments for growth characterization and mycelia color were conducted using two media, potato-dextrose-agar (PDA) and Czapek (CZP), and two incubation temperatures, 25 and 27°C. The isolates formed four groups for the BDA medium and seven groups for the CZP medium, showing that the colony features do not allow identification of Fov. For the molecular studies, PCR products were amplified using universal primers for the elongation factor gene for the ITS (internal transcribed spacer) and IGS (ribosomal intergenic spacer) regions. The sequencing of these products did not allow the development of specific primers for Fov because the ITS region showed low variability between f. sp of *F. oxysporum* or, on the other hand because even though there was higher variability among sequences of the EF gene and IGS region, several f. sp. of *F. oxysporum* shared the same sequences. Fov-specific primers did not allow the detection of all Fov isolates in the present study. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was employed in order to detect fragments

specific to Fov but the primers developed from these fragments sequences did not show specificity to Fov.

Keywords: *Gossypium* spp., detection and fusariose.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Isolados obtidos para os estudos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> (Fov), <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> (Fop), <i>Fusarium oxysporum</i> (Fo), <i>Fusarium solani</i> (Fsf, Fsa, Fs) e outras espécies do gênero <i>Fusarium</i> (F).....	11
Tabela 2-	Relação dos sintomas e dos dias de sua aparição em plantas de algodão após inoculação com isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> (Fov).....	21
Tabela 3-	Relação dos sintomas e dos dias de sua aparição em plantas de feijão após inoculação com isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> (Fop).....	24
Tabela 4a-	Agrupamento de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i> , incubados a 25° e 27°C, em meio de cultura batata ágar dextrose, de acordo com as características miceliais e coloração.....	26
Tabela 4b-	Agrupamento de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i> , incubados a 25° e 27°C, em meio de cultura Czapeck, de acordo com as características miceliais e coloração.....	26
Tabela 5-	Crescimento micelial (cm) de diferentes isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> (Fov) em meio batata-agar-dextrose (BDA) e Czapek (Czp), incubados durante 5 e 10 dias a 25 e 27°C.....	31
Tabela 6-	Médias do crescimento micelial (cm) da interação Temperaturas X Meio de Cultura de diferentes isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> (Fov) em meio batata-agar-dextrose (BDA) e Czapek (Czp), incubados durante 5 e 10 dias a 25 e 27°C.....	32
Tabela 7-	Reação a doenças de acordo com as variedades comerciais da Bayer, descritas por Vilela, Belot e Morello (2012).....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Questionário aplicado com produtores de algodão na região de Paranapanema, Estado de São Paulo.....	20
Figura 2-	Planta de algodão, inoculada com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> apresentando sintoma severo de murcha, seguida de morte (A); Planta apresentando redução de crescimento, seguida de morte (B); Planta apresentando amarelecimento, murcha e morte (C), Detalhe do amarelecimento visto na figura C (D).....	22
Figura 3-	Planta de algodoeiro, inoculada com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> , apresentando escurecimento nos feixes vasculares em secção longitudinal do caule.....	23
Figura 4-	Sintomas em plantas de feijão inoculadas com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> . Sintoma severo de murcha seguida de morte (A) e amarelecimento e redução no crescimento (B).....	23
Figura 5a-	Grupos de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> , em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), incubados a 25 e 27°C.....	27
Figura 5b-	Grupos de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> , em meio de cultura Czapek (CZP), incubados a 25 e 27°C.....	28
Figura 6-	Quadro de análise fatorial do crescimento micelial de isolados de Fov aos 5 dias de incubação (A) e aos 10 dias de incubação (B). Fator 1 = Isolados, Fator 2 = Temperaturas, Fator 3 = Meios de Cultura, F.V. = Fonte de variação, G.L. = Graus de liberdade, S.Q. = Soma de quadrado, Q.M. = Quadrado médio, F= Estatística do teste F.....	30
Figura 7-	Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor Joining com sequências do gene EF de isolados de Fov e Fop do presente estudo e “sequence types” do complexo de espécies <i>F. oxysporum</i> (FOSC). Os números junto aos nós indicam o valor de “bootstrap” para 500 réplicas.....	33
Figura 8-	Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor Joining com sequências da região IGS de isolados de Fov e Fop do presente estudo e “sequence types” do complexo de espécies <i>F. oxysporum</i> (FOSC). Os números junto aos nós indicam o valor de “bootstrap” para 500 réplicas.....	35
Figura 9-	Gel de agarose 2%, de PCR com os iniciadores específicos desenvolvidos por Moricca <i>et. al.</i> (1998), para <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> . Iniciadores FOV1 e FOV2 e DNAs	

- de Fov, Fop e Fs. 1ªFileira: Fov 1-11; 2ªFileira: Fov 12-15, Fsa, Fop 1-4 e Fsf 1-2. Pd = Padrão 1 Kb, Br = Branco, Fop = *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, Fov = *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e Fs = *Fusarium solani*..... 36
- Figura 10- Alinhamento das sequências obtidas por Moricca et al. (1998) para a região ITS de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, com as obtidas para outros isolados de *F. oxysporum* depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information) e sequências obtidas para Fov no presente estudo. Apenas as duas primeiras sequências superiores oriundas do trabalho de Moricca et al. (1998) são 100 % idênticas ao iniciador Fov1 desenvolvido por estes autores..... 37
- Figura 11- Géis de agarose 2%, de PCRs com os iniciadores específicos para *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, desenvolvidos por Zambounis, Paplomatas e Tsiftaris (2007). A - iniciadores FOV1 e FOV2 e DNAs de Fov 1-15 e Fsa. B - Iniciadores FOV3 e FOV4 e DNAs de Fov 1-15, Fsa, Fop 1-8 e Fsf 1 e 2 Pd = Padrão 1 Kb, Br = Branco, Fop = *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, Fov = *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e Fs = *Fusarium solani*..... 38
- Figura 12- Gel de agarose 2%, de PCR com os iniciadores específicos desenvolvidos por Alves-Santos et al. (2002), para *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Iniciadores A280/B310 e DNAs de Fop, Fov e Fs. 1ªFileira: Fop 1-15; 2ª Fileira: Fov 1-15, Fsf 1-2 e Fsa 1. Pd = Padrão 1 Kb, Br = Branco, Fop = *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, Fov = *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e Fs = *Fusarium solani*..... 39
- Figura 13- Análise de RAPD com iniciador OPF15 para isolados de Fov e Fop. Br = Branco. Pd (Padrão) = 1kb DNA ladder. Fop = *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e Fov: *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Gel agarose 2%. Fragmento evidenciado pelo retângulo branco foi clonado e sequenciado..... 40
- Figura 14- Análise de RAPD com iniciador OPC18 para isolados de Fov, Fop, Fsa e Fsf. Br = Branco; Pd (Padrão) = 1kb DNA ladder. Fop = *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, Fov: *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, Fsa = *Fusarium solani* de algodão, Fsf = *Fusarium solani* de feijão. Gel agarose 2%. Fragmento evidenciado pelo retângulo branco foi clonado e sequenciado..... 41
- Figura 15- PCR com os iniciadores FOV-F e FOV-R, desenhados para *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* a partir de fragmento específico obtido por RAPD. Pd= Padrão 100 pb DNA ladder, Br= Branco, Fop= *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, Fov= *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e Fs= *Fusarium solani*. Gel de agarose 2%..... 42
- Figura 16- PCR com os iniciadores Fov-R7-F e Fov-R7-R, desenhados para

	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> a partir de fragmento específico obtido por RAPD. Pd= Padrão 100 pb DNA ladder, Br= Branco, Fov= <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> , Fop= <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> , Fsa= <i>Fusarium solani</i> de algodão, Fsf= <i>Fusarium solani</i> de feijão, Fs= <i>Fusarium solani</i> , Fo= <i>Fusarium oxysporum</i> e F= <i>Fusarium</i> sp. Gel de agarose 2%.....	42
Figura 17-	Tempo de atuação no mercado pelos produtores de algodão da região de Paranapanema, SP.....	43
Figura 18-	Cultivares mais utilizadas pelos produtores de algodão da região de Paranapanema, SP.....	44
Figura 19-	Conhecimento da Murcha de <i>Fusarium</i> , por produtores de algodão da região de Paranapanema, SP (n = 14).....	45
Figura 20-	Presença da Murcha de <i>Fusarium</i> em propriedades na região de Paranapanema, SP (n = 14).....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
a.C.	Antes de Cristo
BDA	Batata Dextrose Agar
Br	Branco
CCIBt	Coleção de Culturas do Instituto de Botânica
CIA	Clorofórmio Álcool Isoamílico
cm	centímetro
CNPAF	Centro Nacional de Pesquisa Arroz e Feijão
CPDSV	Centro de Pesquisa e Desenvolvimento Sanidade Vegetal
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
CV%	Coefficiente de variação em %
cv.	Cultivar
Czp	Czapek
DMS	Diferença mínima significativa
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EF	Fator de Elongação
EUA	Estados Unidos da América
F	<i>Fusarium</i>
f. sp.	<i>forma specialis</i>
Fo	<i>Fusarium oxysporum</i>
Fop	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>
Fov	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>
Fs	<i>Fusarium solani</i>
Fsa	<i>Fusarium solani</i> de algodão
Fsf	<i>Fusarium solani</i> de feijão
G.L.	Grau de liberdade
GenBank	National Center for Biotechnology Information
HCl	Ácido clorídrico
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
IB	Instituto Biológico
IGS	ribosomal intergenic spacer
ITS	Internal Transcribed Spacer

Kb	Quilobyte
LBF	Laboratório de Bioquímica Fitopatológica
LPS	Laboratório de Patologia de Sementes
M	Molar
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
Pd	Padrão
pH	Potencial hidrogeniônico
Q.M.	Quadrado médio
RAPD	Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso
rDNA	DNA ribossomal
RFLP	Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
rpm	Rotações por minuto
S.Q.	Soma de quadrado
sp.	Espécie
UV	Ultra violeta
var.	variedade
µL	Microlitro

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Histórico e aspectos econômicos da cultura do algodoeiro.....	2
2.2 Doenças que ocorrem no algodoeiro.....	3
2.2.1 Murcha de <i>Fusarium</i> (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>).....	3
2.3 Métodos morfológicos e moleculares de detecção e identificação de formaes speciales de <i>F. oxysporum</i>	7
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Locais e período de realização dos experimentos.....	11
3.2 Obtenção dos isolados.....	11
3.3 Preservação dos Isolados.....	13
3.4 Teste de Patogenicidade dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	13
3.5 Caracterização Morfológica dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	14
3.6 Técnicas moleculares.....	15
3.6.1 Extração de DNA dos isolados.....	15

3.6.2 Amplificação e sequenciamento do gene EF e das regiões ITS e IGS.....	15
3.6.3 Análises filogenéticas.....	16
3.6.4 Comprovação da especificidade de iniciadores específicos citados na literatura para detecção de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> (Fov) e <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> (Fop).....	17
3.6.5 Detecção de regiões genômicas específicas a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> (Fov) através de RAPD e desenvolvimento e avaliação de iniciadores específicos.....	17
3.7 Avaliação da visão dos produtores de algodão sobre a importância da murcha do algodoeiro e da sanidade das sementes.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1 Teste de Patogenicidade dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	20
4.2 Caracterização Morfológica.....	24
4.2.1 Tipo e Coloração de Micélio dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	24
4.2.2 Crescimento Micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	29
4.3 Análises filogenéticas das sequências obtidas para o gene EF e para as regiões ITS e IGS.....	32
4.4 Avaliação da especificidade de iniciadores específicos citados na literatura para detecção de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> (Fov) e <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> (Fop).....	36
4.5 Detecção de regiões específicas a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> (Fov) através de RAPD e avaliação da especificidade de iniciadores.....	40
4.6 Avaliação da visão dos produtores de algodão sobre a importância da murcha do algodoeiro e da sanidade das sementes.....	43
5. CONCLUSÕES.....	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

O algodão (*Gossypium* spp.), pertencente à família Malvaceae é uma cultura de grande importância no Brasil (BELTRÃO; AZEVEDO, 2008). Atualmente, a indústria têxtil consome mais de um milhão de toneladas da sua produção anual, isto significa cerca de 70% da produção interna total de 1,5 milhões de toneladas em 2009/10. A produção de algodão aumenta paralelamente ao avanço da tecnologia, sendo que em 1996 o índice de importação era cerca de 472 mil toneladas de algodão e hoje a importação não passa de 15 mil toneladas por ano. Como resultado, o Brasil passou de maior importador mundial de algodão para o terceiro maior exportador do produto, no período de 12 anos, segundo dados do MAPA (2012).

Em todas as regiões produtoras de algodão no mundo as doenças bióticas causam perdas na cultura e limitam a obtenção de altos rendimentos, causando prejuízos econômicos, como é o caso da murcha do algodoeiro ou murcha de *Fusarium*, doença causada pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (BLASINGAME; PATEL, 2001; CIA; SALGADO, 2005).

As sementes infectadas pode introduzir o patógeno em áreas isentas, bem como aumentar a fonte de inóculo em áreas onde a doença já existe pelo plantio consecutivo, inviabilizando a cultura. A utilização de sementes livres do patógeno é considerada uma das medidas mais eficientes de controle desta doença.

Estudos sobre as características morfológicas de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* são importantes para subsidiar metodologias para detecção deste fungo em sementes. Entretanto, métodos rotineiros de patologia de sementes, como papel de filtro, plaqueamento em ágar e outros não permitem a distinção de *F. oxysporum* em níveis infraespecíficos, como por exemplo, entre as formaes especiais *vasinfectum* e *phaseoli*.

Métodos moleculares, como o desenvolvimento de iniciadores específicos, têm sido empregados para a distinção e detecção de formaes especiais de *F. oxysporum* de diversas plantas hospedeiras como *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em algodoeiro (MORICCA et al., 1998; ZAMBOUNIS; PAPLOMATAS; TSAFTARIS, 2007) e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em feijoeiro (ALVES-SANTOS et al., 2002). Porém esses iniciadores específicos ainda não foram testados com isolados brasileiros. Esses testes poderão auxiliar na aplicação de métodos mais confiáveis e eficientes e consequentemente beneficiar o comércio de sementes com uma boa qualidade sanitária (VECHIATO, 2002).

Dessa forma o trabalho foi conduzido com os objetivos de estudar: i) características morfológicas, de diversos isolados do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, utilizando duas temperaturas e dois diferentes meios de cultura; ii) validar a especificidade

de iniciadores específicos descritos na literatura, para isolados brasileiros deste fungo em cultura pura; iii) desenhar iniciadores específicos, visando desenvolver um método de detecção e identificação deste patógeno; iv) prospectar a opinião de produtores sobre a importância da murcha do algodoeiro e da sanidade das sementes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico e aspectos econômicos da cultura do algodoeiro

O algodão vem sendo utilizado pela humanidade há muito tempo. Os primeiros relatos do emprego do algodão, como fibra, datam de oito séculos antes de Cristo e mostram o cultivo do algodoeiro em diversos países, principalmente nos europeus e asiáticos (NEVES, 1965). Há registros de que a cultura já era conhecida na China 3 mil a.C., cultivado na Índia 1.500 a.C. e introduzida na Grécia no período de 356 a.C. a 323 a.C.. Já na Espanha e na Sicília há registros de que o algodão chegou, através dos árabes, no século 10 (COSTA; BUENO, 2004).

Atualmente cerca de 50 diferentes espécies de algodão, pertencentes à família Malvaceae, do gênero *Gossypium*, foram identificadas e podem ser encontradas em cinco continentes: Ásia, África, América, Europa e Oceania (GRUERE, 2007).

Com o descobrimento da América veio também o descobrimento do algodão existente nesse continente, distribuído principalmente no Brasil, México, América Central e no Peru, onde posteriormente se transformou em um produto comercial tanto para o mercado interno como externo (NEVES, 1965).

O algodão é a principal cultura utilizada como fonte de fibra vegetal no mundo, consistindo em um produto com grande diversidade e aplicação (EMBRAPA ALGODÃO, 2003).

Atualmente dados revelam que no mundo, em média 35 milhões de hectares de algodão são cultivados por ano, mostrando um crescimento anual médio de 2% e um aumento gradativo desde a década de 1950 (ABRAPA, 2012).

O comércio mundial de algodão movimentava cerca de US\$ 12 bilhões por ano, sendo produzido por mais de 60 países nos cinco continentes, além de contribuir para o envolvimento de mais de 350 milhões de pessoas em sua produção (ABRAPA, 2012).

Os países que se mostraram com a maior produção mundial de algodão, na safra de 2011/2012, foram a China, Índia, Estados Unidos, Paquistão e Brasil (ABRAPA, 2012).

O algodão, no Brasil, é de extrema importância para o agronegócio. Na safra de 2006-2007 houve uma contribuição de mais de 4 bilhões de dólares e geração de empregos para milhares de pessoas, sendo que no Centro-Oeste quatro pessoas são empregadas por hectare, região com maior parte da produção nacional (COSTA; BUENO, 2004). O país se destaca atualmente como grande produtor e exportador de algodão, ocupando as posições, na safra de 2011/2012, de quinto e terceiro lugares no mundo respectivamente, ocupando a Austrália a mesma posição que o Brasil em relação à exportação (ABRAPA, 2012).

O algodão no Brasil, até o início da década de 90, era produzido principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste e, posteriormente, a produção passou a ocupar áreas de cerrado da região Centro-Oeste (EMBRAPA ALGODÃO, 2006).

A espécie mais cultivada e explorada economicamente no mundo é o *Gossypium hirsutum* L., que corresponde a cerca de 90% da produção mundial (EMBRAPA ALGODÃO, 2003).

O algodoeiro oferece uma ampla variedade de produtos com diversas aplicações, que são utilizados em todo o mundo, sendo considerado “o boi vegetal” (EMBRAPA ALGODÃO, 2003). Essa cultura é totalmente aproveitada pelo homem, contendo em média 60% de caroço e 40% de fibra. Após a separação da fibra, seu principal produto é o óleo comestível, sendo possível utilizá-lo como fonte de proteína, podendo ser um suplemento proteico na alimentação animal e humana, desde que se tenham os cuidados necessários com o gossipol, metabólito tóxico do algodoeiro. Outros subprodutos são obtidos a partir da extração do óleo, sendo separados em primários como o línter, a casca e a amêndoa; secundários como farinha integral, óleo bruto, torta e farelo e como terciários, o óleo refinado, borra e farinha desengordurada (EMBRAPA ALGODÃO, 2006).

O plantio de algodão é realizado a partir de sementes, sendo necessário que estas sejam de boa qualidade genética, proporcionando características desejáveis de fibra, uniformidade do comprimento, finura, resistência, maturidade, brilho, cor, elasticidade, aderência e que favoreçam a germinação e o desenvolvimento inicial das plantas. Para obtenção de uma boa produtividade da cultura, a qualidade fitossanitária é de extrema importância, sendo um dos pontos cruciais a utilização de sementes livres de patógenos (EMBRAPA ALGODÃO, 2006).

2.2 Doenças que ocorrem no algodoeiro

O crescimento e investimento na tecnologia e nas pesquisas científicas ajudam a garantir a qualidade fitossanitária das plantas e conseqüentemente dos produtos gerados a

partir do algodoeiro. A produção de sementes sadias, com variedades comerciais resistentes e adaptáveis às condições das diferentes regiões de plantio são exemplos da garantia de qualidade (EMBRAPA ALGODÃO, 2003).

Embora seja uma cultura altamente tecnicizada, o algodoeiro pode ser acometido por diversas doenças, sendo esse um dos fatores limitantes para o alto rendimento do algodão. Essas doenças podem ser favorecidas por condições climáticas de uma determinada região, contribuindo para o aumento de custos na produção (EMBRAPA ALGODÃO, 2003). Dentre elas estão as de origem viral, bacteriana, as causadas por nematoides e principalmente àquelas causadas por fungos. Dentre as doenças de origem fúngica destacam-se a antracnose (*Colletotrichum gossypii*), ramulose (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*), mancha-branca (*Ramularia areola*), mancha de alternária (*Alternaria* spp.), ferrugem tropical (*Phakopsora gossypii*), mancha de estenfílio (*Stemphylium solani*), murcha de *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*), murcha de *Verticillium* (*Verticillium albo-atrum* e *Verticillium dahliae*) e o tombamento (*Colletotrichum gossypii*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp., entres outros) (HOFFMANN et al., 2003; CIA; SALGADO, 2005).

2.2.1 Murcha de *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)

A murcha de *Fusarium*, também conhecida como fusariose, é uma doença de origem fúngica que tem como agente causal o *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, relatado em 1940 por W.C. Snyder & H.N. Hansen. Esse fungo pertence ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, subclasse Hypocreomycetidae, ordem Hypocreales, família Nectriaceae e gênero *Fusarium* (INDEX FUGORUM, 2008).

A doença atinge algodoeiros e é considerada de grande importância, podendo reduzir significativamente a produtividade da cultura (CIA; SALGADO, 2005).

Estudos realizados por Cia et al. (2005), em diferentes genótipos, estimou que o *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* foi responsável por 81% de perda da cultura do algodão na região de Adamantina e Caiabu, no Estado de São Paulo, no ano agrícola de 2001/02.

Em 2004, nos Estados Unidos, a perda estimada de algodão, causada por murcha de *Fusarium* foi de 109.000 fardos, referente a 227 Kg (BLASINGAME; PATEL, 2001).

Atkinson, no Alabama, EUA, foi quem descreveu a doença pela primeira vez em 1892. Nesse período, o autor já tinha conhecimentos das infecções por *Fusarium* e sabia dos possíveis riscos que o patógeno podia oferecer a agricultura (ATKINSON, 1892;

JULIATTI; RUANO, 1997; RUANO, 1984). No Brasil, a doença só foi constatada em 1935, em material da variedade "Texas" proveniente da Estação Experimental da Alagoinha, Paraíba (KRUG, 1936).

Após a primeira constatação da doença no país, foram registrados novos focos de contaminação como, por exemplo, em Pernambuco em 1938 (DESLANDES, 1938), em São Paulo a partir de 1957/58 e, em seguida, para outros Estados, tendo importância nos Estados de Goiás, Minas Gerais e, posteriormente em Mato Grosso (CIA; SALGADO, 2005).

Na segunda metade da década de 1950, essa doença foi responsável por uma fase de decadência da cotonicultura paulista, tendo sido necessária a obtenção de cultivares melhoradas com resistência à doença (BELTRÃO; AZEVEDO, 2008).

Diferente da maioria das outras formas especiais de *F. oxysporum* que possuem especificidade por um determinado hospedeiro, o *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* pode ocorrer em hospedeiros alternativos, também conhecidos como hospedeiros secundários, como nas espécies margarida mexicana (*Tithonia rotundifolia*), fedegoso (*Cassia tora*), alfafa (*Medicago sativa*), erva-noiva (*Physalis alkekengi*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), soja (*Glycine Max*) e tremoço (*Lupinus* sp.) (CIA; SALGADO, 2005).

Relatos revelam que no Brasil, as espécies de quiabeiro (*Abelmoschus sculentum*), quiabeiro-de-cheiro (*A. moscatus*) e papoula-do-são-francisco (*Hibiscus cannabinus*) exibiram sintomas de murcha-de-fusário por meio de inoculação de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Isso mostra que isolados de *F. oxysporum* podem possuir uma ampla variedade de hospedeiros, devendo haver cautela na classificação de *F. oxysporum* dentro de uma forma *specialis* (CIA; SALGADO, 2005). Dessa forma podem existir outras espécies nas quais o patógeno se multiplica com pouca severidade ou sem produzir sintomas (MACHADO, 2008).

O algodoeiro é o hospedeiro primário do *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, no entanto, pode ser hospedeiro secundário para *F. oxysporum* das formas especiais "apii" e "cassiae" (CIA; SALGADO, 2005).

Isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* diferem em relação a patogenicidade quando inoculados em diferentes hospedeiros. O primeiro relato da variabilidade da espécie foi em 1927 com estudos realizados através de isolados provenientes dos EUA (*G. hirsutum*), Egito (*G. barbadense*) e Índia (*G. herbaceum* e *G. arboreum*) em suas respectivas espécies de origem (MACHADO, 2008).

O patógeno é um habitante do solo, capaz de sobreviver por vários anos no ambiente por possuir atividade saprofítica em matéria orgânica e por desenvolver estruturas de resistência chamadas clamidosporos (MENEZES et al., 2010).

Os sintomas da doença são caracterizados por amarelecimento, crestamento do limbo, diminuição de crescimento da planta, folhas e caules com enegrecimento, podendo

ocorrer a morte da planta. As plantas doentes podem apresentar sintomas com um quadro variável, dependendo do grau de resistência da variedade da planta (a murcha das folhas e morte prematura das plantas normalmente ocorre em até 25 dias de idade em variedades suscetíveis) e de condições ambientais, onde as plantas que não sofreram um ataque com alta agressividade e sobrevivem, têm seu crescimento reduzido (CIA; SALGADO, 2005).

Durante a infecção, ocorre a obstrução do lume dos vasos pela formação de tiloses, presença intensa de micélio e esporos do fungo, entre outros fatores, formando um bloqueio e impedindo o livre fluxo de água e seiva bruta para a parte aérea, principal causa da ocorrência da murcha das folhas e dos ramos do algodoeiro (CIA; SALGADO, 2005).

Pode-se ter um reconhecimento prévio da murcha de *Fusarium* ao observar a descoloração ou escurecimento dos feixes vasculares ao realizar secção longitudinal do caule (HOFFMANN et al., 2003).

A doença pode ocorrer em todo ciclo de vida da planta, porém é mais comum no início do florescimento, cerca de dois meses após o plantio, devido às mudanças fisiológicas do algodoeiro. Em condições favoráveis ao patógeno a doença pode causar a morte de plântulas (CIA; SALGADO, 2005).

Após a aparição dos primeiros sintomas externos muitas plantas jovens, com aproximadamente seis semanas de idade, podem morrer em poucos dias. As sobreviventes, porém afetadas, podem gerar novas brotações com ramos não produtivos (EMBRAPA ALGODÃO, 2003).

A presença de nematoides, especialmente dos gêneros *Meloidogyne* e *Rotylenchulus* (por terem a capacidade de formar na planta uma célula nutridora que produz compostos carbônicos e nitrogenados, utilizados também pelo fungo) e *Pratylenchus*, associada à murcha do *Fusarium* (complexo fusarium-nematoide), prejudica ainda mais a cultura de modo a agravar a doença, tornando-a mais severa (HOFFMANN et al., 2003). Os nematoides provocam ferimentos nas raízes e debilitação da planta, facilitando a penetração do patógeno no sistema radicular e o desenvolvimento da doença (EMBRAPA ALGODÃO, 2003).

O favorecimento da doença também pode ocorrer devido às condições do solo com alto teor de areia, baixo pH, fertilidade desequilibrada, temperaturas entre 25°C e 32°C e alta umidade (EMBRAPA ALGODÃO, 2006).

A dispersão do *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, pode ocorrer a curtas distâncias, pelo movimento de partículas de solo contaminado, máquinas agrícolas, pelo vento e pela água, contribuindo para a disseminação no campo e ocasionando as chamadas “reboleiras”. Por longas distâncias, a transmissão ocorre principalmente por sementes contaminadas tanto externamente como internamente, sendo importantes portadoras do patógeno permitindo sua sobrevivência no ambiente (EMBRAPA ALGODÃO, 2006).

O plantio de variedades resistentes, uso de sementes livres do patógeno e a rotação de cultura são as principais medidas utilizadas para o controle da murcha de *Fusarium* na cultura do algodão, evitando assim prejuízos aos produtores (ARAÚJO; SUASSUNA, 2003; MACHADO; et al, 2005).

A forma *specialis vasinfectum* possui diferentes raças. Essa descoberta foi realizada a partir da inoculação de uma série de plantas diferenciadoras composta de espécies do gênero *Gossypium* e as cultivares 'Gold Dolar' de *Nicotiana tabacum* e 'Yelredo' de *Glycine max*, mostrando grande variabilidade na agressividade e origem geográfica do isolado. As raças foram nomeadas como raças 1 e 2 para as originárias dos Estados Unidos, raça 3 no Egito, raça 4 na Índia, raça 5 no Sudão, raça 6 no Brasil e raças 7 e 8 na China. Atualmente há relatos de que as raças 3, 4 e 8 também ocorrem nos Estados Unidos (MACHADO, 2008).

2.3 Métodos morfológicos e moleculares de detecção e identificação de formas especiais de *F. oxysporum*

Para garantir que não ocorra a introdução de sementes infectadas em áreas isentas ou que aumente a fonte de inóculo em áreas onde a doença já exista, a medida mais efetiva de controle é o emprego do princípio de exclusão, realizando-se a detecção de fitopatógenos em sementes (NEEGAARD, 1977).

Os fungos são classificados e identificados, normalmente, com base na observação das características morfológicas de suas estruturas vegetativas e reprodutivas. Conhecimentos taxonômicos também podem ser obtidos através de estudos do comportamento biológico do patógeno em relação ao hospedeiro (STAKMAN; HARRAR, 1957).

Fusarium oxysporum em sementes de algodão possui micélio aéreo com pigmentação bege pálido a rosa, roxo, vináceo a azul. Sob aumento de 80X, podem ser observadas falsas cabeças de microconídios formadas no extremo de conidióforos curtos produzidos ao longo da hifa, agrupamentos de macroconídios em diferentes locais do micélio, podendo ocorrer também a presença de clamidósporos (BRASIL, 2009).

A identificação de fungos que infectam sementes pode ser dificultada pela ocorrência de muitas espécies proximamente relacionadas, que apresentam similaridade de características morfológicas, como é o caso de espécies de *Phomopsis* em sementes de soja, *Drechslera* em sementes de arroz e trigo, *Fusarium* sp. em sementes de feijão e algodão (BARROCAS, 2008).

A utilização de características como tipo, coloração e crescimento micelial em diferentes meios de cultura, como o Batata-dextrose-ágar (BDA) e Czapek, para a diferenciação de espécies a nível infraespecífico não é confiável. Diversos estudos mostram que um mesmo organismo pode ter diferentes características de acordo com as condições nos quais ele cresce (VECHIATO, 2002; ROSA; MENEZES, 2001; PERES et al., 2003).

Podemos encontrar formas saprofíticas e patogênicas para a espécie *F. oxysporum*, que possuem características morfológicas muito semelhantes. Com base na capacidade patogênica em diferentes hospedeiros, as formas patogênicas foram agrupadas em *formae speciales*, não podendo ser diferenciadas quando comparadas em relação à morfologia (MACHADO, 2008).

Os métodos rotineiros de patologia de sementes, como o do papel de filtro, plaqueamento em ágar e outros, são baseados na morfologia dos fungos que colonizam as sementes (VECHIATO, 2002). Devido às semelhanças morfológicas, a diferenciação da forma *specialis vasinfectum* de outras *formae speciales*, em sementes de algodão, não é confiável quando se utiliza os métodos tradicionais. A diferenciação só é possível ao realizar inoculação em plantas de algodão em casa de vegetação, processo que exige um longo período e pode ser afetado por uma série de fatores, não sendo viável quando utilizado para a obtenção de emissão de laudos fitossanitários oficiais (MORICCA et al., 1998).

Dentre as técnicas moleculares mais utilizadas para a detecção e/ou diferenciação de fitopatógenos encontram-se a reação em cadeia pela polimerase (PCR), amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD) e polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) (BATISTA, 1993).

Estudos de taxonomia, variabilidade genética e detecção de fungos fitopatogênicos vêm sofrendo avanços com o emprego de técnicas de biologia molecular, possibilitando estudos de filogenias e podendo distinguir *formae speciales* em espécies de fungos (MENEZES et al., 2010).

A técnica de PCR é comumente utilizada para o diagnóstico de fungos, por sua especificidade e sensibilidade, podendo distinguir grupos de linhagens, patótipos, espécies ou taxa superiores. Essa técnica foi descrita na década de 80, sendo possível a obtenção *in vitro* de várias cópias de um determinado segmento de DNA (FUNGARO, 2000).

A PCR amplifica fragmentos de DNA através de um processo cíclico constituído de desnaturação da fita dupla de DNA, anelamento dos iniciadores à sequência complementar de cada fita simples do DNA desnaturado e extensão dos iniciadores pela enzima Taq polimerase ao longo das fitas em oposição, com consequente duplicação da sequência de DNA, ocorrendo reações sucessivas através das fitas moldes (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). Esta técnica tem como vantagens ser um método rápido que requer quantidades mínimas de DNA, o qual não necessita apresentar alto grau de pureza e

pode ser extraído de diversos materiais tais como solos, alimentos e amostras clínicas (FUNGARO, 2000).

Iniciadores específicos foram projetados para a diagnose de alguns fungos em sementes, como: *Tilletia indica*, *Alternaria radicina* e *Phomopsis longicolla* são alguns exemplos (SMITH et al., 1996; PRYOR; GILBERTSON, 2001; ZHANG et al., 1997).

Iniciadores específicos foram desenvolvidos e descritos para diversas espécies do gênero *Fusarium* em diferentes hospedeiros, como: *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* de feijão (ALVES-SANTOS et al., 2002), *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* em sementes e raízes de manjeriço (PASQUALI et al., 2006); *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. avenaceum* em trigo e centeio (SCHILLING; MÖLLER; GEIGER, 1996), *Fusarium poae* no trigo e em suas sementes (PARRY; NICHOLSON, 1996).

Moricca et al. (1998) descreveram os iniciadores específicos para *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* com base em pequenas diferenças nucleotídicas na região ITS. Zambounis, Paplomatas e Tsiftaris (2007) descreveram para o mesmo fungo, dois pares de iniciadores específicos baseados na região ribossomal intergenic spacer (IGS). Os iniciadores desenvolvidos por Moricca et al. (1998) mostraram-se eficazes para a detecção de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em caules, folhas e raízes de plantas com ou sem sintomas, sendo um método específico e sensível para a detecção do patógeno. Zambounis, Paplomatas e Tsiftaris (2007) conseguiram detectar a presença do patógeno em amostras de solo e plantas inoculadas com o fungo.

O conhecimento de sequências de nucleotídeos de, pelo menos, uma parte da região alvo é necessário para se desenhar iniciadores específicos, que posteriormente poderão ser utilizados para a detecção de fungos, proporcionando a amplificação de um gene ou segmento específico da espécie que se deseja identificar (FUNGARO, 2000).

O DNA ribossomal (DNAr) é muito utilizado como marcador molecular na identificação e diferenciação de espécies. Nos seres eucariotos estão presentes repetidas vezes e cada unidade consiste de genes codificadores dos RNAs ribossomais 18S, 5.8S e 28S e dois espaços internos (ITS 1 e ITS 2) que separam esses genes. O espaço intergênico (IGS) é uma região que separa cada unidade do DNAr (MENEZES et al., 2010; PENNA, 2012).

A amplificação da região ITS por PCR é bastante utilizada para taxonomia de fungos. Essa região apresenta variabilidade moderada e pode ser utilizada para a diferenciação em nível de gênero e espécie (MENEZES et al., 2010; PENNA, 2012). A variabilidade da região IGS costuma ser maior que a da região ITS e pode ser utilizada na diferenciação infra-específica (PENNA, 2012).

O gene codificador do fator de alongação (EF) também é comumente utilizado como marcador filogenético para a diferenciação de espécies do gênero *Fusarium*, como mostra o

trabalho desenvolvido por O'Donnell, et al. em 1998, no qual foi possível resolver relações dentro do complexo de espécies *Fusarium oxysporum*. A presença de exons (codificadores) e introns (não-codificadores) confere uma mistura de regiões conservadas e variáveis úteis para estudos filogenéticos.

Outra maneira de identificar características similares e definir a relação histórica ou evolucionária, baseando-se em características, como genes ou fragmentos de DNA é a sistemática filogenética. Árvores filogenéticas podem ser desenvolvidas para mostrar as ações evolucionárias ou agrupamentos de organismos (BUSO, 2005).

Atualmente, árvores filogenéticas estão sendo utilizadas para estudos de filogenia molecular de diferentes espécies do gênero *Fusarium* (MACIAL, 2012; MARTINS, 2005; MENEZES et al., 2010; O'DONNELL et al., 1998).

Um extenso estudo sobre a variabilidade genética do complexo de espécies *F. oxysporum* (*Fusarium oxysporum* species complex ou FOOSC) foi realizado por O'Donnell et al. (2009), no qual 850 isolados tiveram parte do gene EF (680 pb) e toda a região IGS (2,4 – 2,6 kb) sequenciados. A análise das sequências resultou em 101 “sequence types” (STs) para o gene EF, 203 para a região IGS e, combinando-se ambos foram obtidos 256 STs. Os dados deste estudo estão disponíveis on-line pela Internet de forma que comparações de sequências podem ser realizadas através do programa Blast nas páginas da web www.fusariumdb.org ou www.cbs.knaw.nl/fusarium.

Dados do sequenciamento total de 13 genomas de *Fusarium* spp. também estão disponíveis on-line na página http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/MultiHome.html. As espécies sequenciadas incluem *F. verticillioides*, *F. graminearum* e mais onze linhagens distintas do complexo de espécies *F. oxysporum*, incluindo a forma *specialis vasinfectum*. A comparação dos três primeiros genomas concluídos (*F. verticillioides*, *F. graminearum* e *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) mostrou que em *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* há regiões genômicas específicas desta linhagem que incluem quatro cromossomos inteiros (MA et al., 2010). Essas regiões linhagem-específicas são ricas em transposons e de genes envolvidos em patogenicidade, indicativas de aquisição horizontal. Foi demonstrado também que a transferência artificial de dois destes cromossomos linhagem-específicos converteu uma linhagem não-patogênica em patogênica. Esse fenômeno explica a origem polifilética da especificidade de hospedeiro, onde isolados distintos da mesma forma *specialis* podem ter arcabouços genéticos de origens diferentes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Locais e período de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia de Sementes (LPS) e no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica (LBF) do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento Sanidade Vegetal (CPDSV), do Instituto Biológico (IB), com início em abril de 2011, e término em fevereiro de 2013.

3.2 Obtenção dos isolados

Isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov), *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop), *Fusarium oxysporum* (Fo), *Fusarium solani* de algodão (Fsa), *Fusarium solani* de feijão (Fsf), *Fusarium solani* (Fs) e outras espécies do gênero *Fusarium* (F) de diversas regiões, foram fornecidos por pesquisadores de diferentes Instituições, conforme a Tabela 1. Estes isolados foram utilizados, no presente estudo, com objetivo de encontrar diferenças significativas nos testes moleculares para diferenciar o *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* de outras formae speciales e outras espécies de *Fusarium*.

Tabela 1. Isolados obtidos para os estudos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov), *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop), *Fusarium oxysporum* (Fo), *Fusarium solani* (Fsf, Fsa, Fs) e outras espécies do gênero *Fusarium* (F).

NÚMERO	ISOLADOS	PROCEDÊNCIA
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>		
Fov 1	IB 230	Campinas/SP
Fov 2	IB 492	Castelar/ Argentina
Fov 3	IB 3/96	Campinas/SP
Fov 4	IAC 12803	Acreuna/GO
Fov 5	IAC 12976	Ituverava/SP
Fov 6	IAC 12911	Ituverava/SP
Fov 7	IAC 12047	Ituverava/SP

Fov 8	IAC 12344	Tocantins
Fov 9	IAC 13824	Adamantina/SP
Fov 10	IAC 12401	Miguelópolis/SP
Fov 11	IAC 12345	Tocantins
Fov 12	IAC 12325	Leme/SP
Fov 13	IAC 696	Colina/SP
Fov 14	IAC 3463	Guaíra/SP
Fov 15	IAC 21-4	Capão Bonito/SP

***Fusarium solani* de algodão**

Fsa 1	IAC 8450	Guaíra/SP
-------	----------	-----------

Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli

Fop 1	IB 595	São Paulo
Fop 2	IB 4/96	Capão Bonito/SP
Fop 3	IAC 12872	Pindorama/SP
Fop 4	IAC 12802	Pindorama/SP
Fop 5	IAC 11747	Pariquera Açu/SP
Fop 6	IAC 11749	Pariquera Açu/SP
Fop 7	IAC 11750	Pariquera Açu/SP
Fop 8	IAC 11848	Votuporanga/SP
Fop 9	IAC 11849	Pindorama/SP
Fop 10	IAC 13029	Vargem Grande do Sul/SP
Fop 11	IAC 9760/1	Pindorama/SP
Fop 12	IAC 13349	Casa Branca/SP
Fop 13	IAC 13368	Vargem Grande do Sul/SP
Fop 14	IAC 2556	Silva Jardins/RJ
Fop 15	IAC 8278	Senador Firmino/MG

***Fusarium solani* de feijão**

Fsf 1	IAC 13030	Vargem Grande do Sul/SP
Fsf 2	IAC 10241	São Gotardo/MG

Fusarium oxysporum

Fo 5	CCIBt 2194	---
Fo 6	CCIBt 2226	---

Fusarium solani

Fs 5	CCIBt 2175	---
Fs 6	CCIBt 2190	---

Outras espécies do gênero *Fusarium*

F 9 (<i>F. graminearum</i>)	IB 496	---
F 10 (<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>)	IB 01/96	---
F 12 (<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>)	IB 29/06	---
F 14 (<i>F. moniliforme</i>)	IB 63/08	---

- Fops 3 ao 15, Fovs 4 ao 15, Fsa 1 e Fsf 1 e Fsf 2 - enviados pela Dra. Margarida F. Ito do Instituto Agrônômico de Campinas, IAC-SP;
- Fops 1 e 2, Fovs 1, 2 e 3 e F 9, F 10, F 12 e F 14 - enviados pela Dra. Christiane Ceriani Aparecido do Instituto Biológico, Micoteca "Mario Barreto Figueiredo";
- Fo 5, Fo 6, Fs 5 e Fs 6 – enviados pelo Dr. José Ivanildo de Souza, do Instituto de Botânica de São Paulo.

3.3 Preservação dos Isolados

Os isolados foram preservados a 10°C, em tubos de ensaio contendo meio de cultura de batata-dextrose-ágar (BDA) e pelo método de Castellani, visando manter suas características (APARECIDO; EGYDIO; FIGUEIREDO, 2001; FIQUEIREDO, 1967).

3.4 Teste de Patogenicidade dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

O experimento foi instalado em casa de vegetação do Centro de P&D de Sanidade Vegetal, do Instituto Biológico, para confirmação da patogenicidade dos 15 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e os 15 de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, listados na Tabela 1, baseando-se nos sintomas característicos da doença nos hospedeiros originais.

Os 30 isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA, por 10 dias a 25°C, para a posterior obtenção do inóculo após o crescimento micelial dos fungos. A suspensão de conídios foi preparada acrescentando-se 25 mL de água destilada nas placas contendo os isolados. Em seguida, friccionou-se o micélio, com o auxílio de alça de vidro, para liberação das estruturas infectivas de forma asséptica. As suspensões foram ajustadas à concentração de 10⁶ conídios/mL, contando-se os esporos com o auxílio de um

microscópio óptico e câmara de Neubauer (hematocitômetro), conforme metodologia citada por Ito (1997).

Para as inoculações de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em plantas de algodão (cultivar Fibermax 966) e feijão (cultivar IPA6) respectivamente, foram preparados vasos contendo terra autoclavada realizando-se, posteriormente, a semeadura. O sistema radicular das plantas, quando apresentavam as primeiras folhas verdadeiras, com cerca de duas semanas de idade, foi previamente cortado mantendo-se cerca de 2/3 de seu comprimento, e submergido por 10 min na suspensão de conídios, utilizando-se 3 plantas/vaso. As testemunhas foram inoculadas com água destilada e conduzidas da mesma forma que as plantas inoculadas.

O experimento permaneceu em casa de vegetação, com duas regas diárias por aspersão durante um minuto, conforme descrito por Tanaka (1987). Foram feitas quatro avaliações aos 15, 20, 25 e 30 dias após inoculação, observando-se os sintomas da doença.

Após visualização e registro dos sintomas, os isolados foram submetidos ao isolamento em placas contendo meio de cultura BDA, para confirmar se os sintomas observados haviam sido causados pelo patógeno inoculado.

3.5 Caracterização Morfológica dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

Os experimentos para a caracterização do crescimento e coloração micelial foram realizados com os isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov) descritos na Tabela 1. Para tanto discos de micélio com nove mm de diâmetro foram transferidos para meios de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e Czapek (CZP), contidos em placas de Petri de nove cm de diâmetro. Um disco de cada isolado foi posicionado no centro da placa e foi realizada a incubação às temperaturas de 25 e 27°C. Estas temperaturas foram utilizadas, para verificar se ocorrem diferenças morfológicas entre temperaturas próximas, dentro da faixa ótima de crescimento para este fungo.

As características miceliais dos isolados (tipo e coloração de micélio) foram avaliadas e agrupados seguindo o trabalho de Nelson, Toussoun e Marasas (1983).

O crescimento linear foi avaliado aferindo-se o diâmetro médio de cada colônia, com auxílio de uma régua milimetrada, aos cinco e dez dias de incubação. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições de cada isolado e os dados foram analisados adotando o esquema fatorial (3x2x2), aplicando-se o teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados foram analisados utilizando-se programa Assisat, versão 7.5 beta.

3.6 Técnicas moleculares

3.6.1 Extração de DNA dos isolados

Discos de micélio de nove mm de diâmetro de todos os isolados listados na Tabela 1 foram transferidos para tubos esterilizados contendo meio líquido de batata-dextrose e mantidos a 25°C por sete dias. A massa micelial foi coletada para realizar a extração de DNA total seguindo o método descrito por Dellaporta et al. (1983) com modificações.

Primeiramente o material foi triturado em nitrogênio líquido, com a adição de 600µL de solução de extração CTAB (2% CTAB; 100 mM Tris HCl – pH 8,0; 20 mM EDTA – pH 8,0; 1,4 M NaCl) e realizada a homogeneização. Em seguida, realizada a incubação por 45 min a 65°C com agitação moderada. Posteriormente, foram adicionados 600 µL de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico - 24:1) e realizada a agitação por inversão e centrifugação (12.000 g, a 4°C durante 10 min). Após este procedimento o sobrenadante foi transferido para um novo tubo (repetir essa etapa). A seguir foram Adicionados 400 µL de isopropanol e manteve-se de um dia para o outro a -20°C. Após centrifugação (12.000 g, a 4°C durante 10 min) o sobrenadante foi descartado, lavou-se o *pellet* com etanol 70% (300 µL) e realizou-se a centrifugação, e em seguida, o sobrenadante foi descartado, o mesmo, foi realizado com etanol absoluto (300 µL). Secou-se o pellet a 37°C por 20 min e o DNA foi suspenso em 30 µL de água de osmose reversa estéril.

As bandas de fragmentos de DNA resultantes da extração dos isolados foram visualizadas sob luz UV em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo.

3.6.2 Amplificação e sequenciamento do gene EF e das regiões ITS e IGS

Para a amplificação de fragmentos de DNAs, em reações de PCR, foram utilizadas as regiões universais: Internal Transcribed Spacer (ITS), Ribosomal Intergenic Spacer (IGS) e Fator de Elongação.

Para a região ITS, reações de PCR foram preparadas utilizando os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATTGC-3'), segundo White et al. (1990). Nessas reações foram utilizados isolados de *Fusarium*

oxysporum f. sp. *vasinfectum* (Fov), *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop) e *Fusarium solani* (Fsa 1, Fsf1 e Fsf2), listados na Tabela 1.

As reações de PCR para região Fator de Elongação foram preparadas utilizando-se dois pares de iniciadores: EF11 (5'-GTGGGGCATTACCCCGCC-3') e EF22 (5'-AGGAACCCTTACCGAGCTC-3'), e EF1 (5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3') e EF2 (5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3'), segundo O'Donnell et al. (1998).

As reações de PCR para região IGS foram preparadas utilizando-se os iniciadores NL11 (5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAG-3') e CNS1 (5'-GAGACAAGCATATGACTAC-3'), segundo Aoki et al. (2003).

Os produtos das PCR foram purificados seguindo protocolo descrito por Schmitz e Riesner (2006), conforme descrito a seguir: em microtubo de 1,5 mL foi misturado 1,6 µL de EDTA 0,5 M, 21,0 µL PEG a 50% e 8,1 µL de NaCl 5 M. Adicionou-se o produto da PCR (± 20 µL) à mistura, sendo este incubado em temperatura ambiente por 10 min. Realizou-se a centrifugação durante 10 min a 14.000 g e descartou-se o sobrenadante. Foram adicionados 125µL de etanol 70%, e realizada nova centrifugação (5 min a 14.000 g). Em seguida, o sobrenadante foi descartado. Secou-se o pellet a 37 °C por 20 min. O DNA foi resuspenso em 20 µL de água de osmose reversa estéril.

As bandas de fragmentos de DNA resultantes da amplificação por PCR foram visualizadas sob luz UV em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo.

Os produtos purificados foram sequenciados pelo método de terminação de cadeia, descrito por Sanger, Nicklen e Coulson (1977). As reações para o sequenciamento foram efetuadas com o kit Big Dye (Applied Biosystems), sendo utilizado o sequenciador (ABI 377 – ABI Prism / Applied Biosystems), conforme instruções do fabricante.

As sequências obtidas foram alinhadas e analisadas utilizando o programa BioEdit, versão 7.1.11.

3.6.3 Análises filogenéticas

As árvores filogenéticas foram construídas a partir das sequências obtidas para o gene EF e para a região IGS. O fragmento do gene EF utilizado nas análises consistiu de 603 nt. A região IGS não foi completamente sequenciada, tendo sido utilizados somente 634 nt da região 5' obtidos no sequenciamento com o iniciador NL11. Foram incluídas nas análises, sequências obtidas a partir do Fusarium MLST Database (<http://www.cbs.knaw.nl/fusarium/>), correspondendo a “sequence types” (STs) do complexo de espécies *F. oxysporum* (FOSC) mais semelhantes às sequências do presente estudo. As

árvores filogenéticas foram geradas através do programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011) empregando-se o método de Neighbor-Joining e avaliação da reprodutibilidade da topologia das árvores através de bootstrap com 500 repetições.

3.6.4 Comprovação da especificidade de iniciadores específicos citados na literatura para detecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop)

Para Fov foram avaliados três pares de iniciadores específicos, um desenhado por Moricca et al. (1998), [Fov1 (5'-CCCCTGTGAACATACCTTACT-3') e Fov2 (5'-ACCAGTAACGAGGGTTTTACT- 3')] e os outros dois por Zambounis, Paplomatas e Tsaftaris (2007), [Fov1 (5'- TGTAGGGGTTGTGGGTTTTTTTC-3') e Fov2 (5'-CCAACACACAACCGCACACGA-3'); e Fov3 (5'-AGCAGTAGAGTAGCCTTGTTG-3') e Fov4 (5'-TTCCACCAAGTCTAACTCGC-3')].

Para confirmar a especificidade para os isolados de Fop foram utilizados os iniciadores específicos A280 (5'-TATACCGGACGGGCGTAGTGACGATGG-3') e B310 (5'-CAGCCATTCATGGATGACATAACGAATTTC-3') projetados por Alves-Santos et al. (2002). Os mesmos também foram utilizados para verificar se os isolados de Fov, Fsf e Fsa não amplificariam.

As reações foram preparadas seguindo protocolo das referências, nas quais os iniciadores foram descritos, e a análise eletroforética em gel de agarose a 2%.

3.6.5 Detecção de regiões genômicas específicas a *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov) através de RAPD e desenvolvimento e avaliação de iniciadores específicos

Com a finalidade de determinar uma região do DNA diferenciadora entre os isolados de Fov, Fop e Fs, foram realizadas ampliações ao acaso do DNA, por meio da técnica de RAPD.

Os DNAs dos isolados foram amplificados com os seguintes iniciadores randômicos: OPC18 - 5'-TGAGTGGGTG-3' (ALVES-SANTOS et al., 2002), OPF5 - 5'-CCGAATTCCC-3' e OPF6 - 5'-GGGAATTCGG-3'- (ASSIGBETSE et al., 1994), Primer 9 - 5'-CAAACGGGTG-3' (ABD-ELSALAM et al., 2004) e OPF15 - 5'-CCAGTACTCC-3' (SILVA-MANN et al., 2002).

A análise eletroforética dos fragmentos de DNA amplificados foi feita em gel de agarose a 2%.

Os fragmentos de DNA amplificados específicos para Fov foram eluídos a partir do gel de agarose utilizando-se o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN), seguindo instruções do fabricante.

Para clonagem dos fragmentos, o produto de DNA amplificado e purificado (inserto) foi inserido no vetor pGEM®-T Easy (PROMEGA), conforme protocolo do fabricante: foram misturados 5 µL de 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase, 1 µL pGEM®-T Easy (50ng), 3 µL produto da PCR, 1 µL T4 DNA Ligase e a reação foi incubada por 24 h a 0°C.

O vetor contendo o inserto foi, então, inserido em células competentes de *Escherichia coli* DH10B por meio de transformação via choque térmico, onde as células foram misturadas ao vetor permanecendo por 1 min a 42°C, seguido de 2 min em gelo. Foi adicionado 1 mL de meio de cultura Luria Broth (LB) e as bactérias foram incubadas sob agitação por 1 h a 37 °C.

O meio LB contendo as bactérias foi centrifugado a 10.000 g e aproximadamente 850 µL do sobrenadante foi descartado. As bactérias foram suspendidas e plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (100 µg/mL) e Xgal (4 µL de solução 20 mg/mL) e incubadas a 37 °C por 16hs. Após o crescimento, as colônias recombinantes com o fragmento de DNA inserido no sítio de clonagem exibiram a cor branca, enquanto as colônias não recombinantes mostraram-se azuis (produzindo β-galactosidase funcional). As colônias brancas foram cultivadas em meio LB na presença de ampicilina. As extrações dos plasmídeos para posterior sequenciamento foi feita com o uso de um sistema de purificação da Invitrogen: "PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit", seguindo protocolo do fabricante.

Os produtos purificados foram sequenciados pelo método de terminação de cadeia, descrito por Sanger, Nicklen e Coulson (1977). As reações para sequenciamento foram efetuadas com o kit Big Dye (Applied Biosystems) e processadas em um sequenciador (ABI 377 – ABI Prism / Applied Biosystems), conforme instruções do fabricante.

As sequências obtidas foram comparadas com os genomas completos de *F. verticillioides*, *F. graminearum* e onze linhagens de *F. oxysporum* (incluindo Fov) disponíveis no Fusarium Comparative Database (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/MultiHome.html).

Segmentos dos genomas foram comparados com as sequências obtidas para os fragmentos de RAPD com auxílio do programa BioEdit. Dois pares de iniciadores (FOV-F/FOV-R e FOV-R7-F/FOV-R7-R) foram desenvolvidos com base nas diferenças encontradas nestas comparações.

Na reação de PCR utilizando os iniciadores específicos de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, FOV-F (5' – GCTCAGGATGTTGAACTTTC – 3') e FOV-R (5' –

GGTAAGGTAGAGTTGAGTGAGTAAA – 3'), foram utilizados DNAs genômicos de 15 isolados de Fov, 6 de Fop, 1 Fsa e 1 Fsf, seguindo o protocolo: 94°C por 5 min; 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 56°C e 45 s a 72°C; 4 min por 72°C.

Já para os iniciadores específicos Fov-R7-F – (5'-GGTGATACTATATTTTCGCAATC–3') e Fov-R7-R – (5'-GGCTTCTAGTATCTATGGGATC–3'), também, desenvolvidos para *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, foram utilizados DNAs genômicos de 15 isolados de Fov, 5 de Fop, 1 Fsa, 2 Fsf, 2 Fo, 2 Fs e 4 isolados de outras espécies de *Fusarium*, seguindo o protocolo: 94°C por 5 min; 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C e 30 s a 72°C; 4 min por 72°C.

3.7 Avaliação da visão dos produtores de algodão sobre a importância da murcha do algodoeiro e da sanidade das sementes

Um questionário foi desenvolvido e posteriormente aplicado na região de Paranapanema, no Estado de São Paulo, com a finalidade de avaliar junto aos produtores os impactos econômicos e sociais da murcha do algodoeiro (Figura 1).

O questionário prospectou a visão de 14 produtores sobre aspectos como: importância da doença em questão, sanidade das sementes, cultivares utilizadas para plantio, frequência com que problemas resultantes de sementes contaminadas ocorrem, impactos econômicos e sociais, formas de controle aplicadas e outros.

INFORMAÇÕES BÁSICAS	
Nome:	_____
Profissão/Cargo:	_____
Nome da Empresa:	_____
Cidade:	_____ Estado: _____
QUESTIONÁRIO	
1 - Há quanto tempo está no mercado do algodão?	_____ _____
2 - Quais seus principais produtos fornecidos (sementes, fibras, etc)?	_____ _____
3 - Qual(s) cultivar(s) de algodão é utilizado em seu plantio?	_____ _____
4 - Conhece ou já ouviu falar sobre a murcha do fusário (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>) e os danos que essa doença pode causar?	
	Sim (___) Não (___)
5 - Já teve problemas em seu plantio devido a essa doença? Se sim, quais foram seus prejuízos econômicos?	_____ _____
6 - Qual procedimento é utilizado para a prevenção de aparecimento de doenças em seu plantio? (uso de sementes saudáveis, biocontrole, agroquímicos, entre outros)	_____ _____

Figura 1: Questionário aplicado com produtores de algodão na região de Paranapanema, Estado de São Paulo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste de Patogenicidade dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Sintomas como o amarelecimento foliar, crestamento do limbo, inibição de crescimento, murcha e posterior morte das plântulas foram observados nos algodoeiros

inoculados com *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov), bem como nos feijoeiros inoculados com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop). Cia e Salgado (2005) e Kimati (1980) descreveram os mesmos sintomas para a ocorrência da murcha do *Fusarium* no algodoeiro e no feijoeiro.

Os isolados Fov 1, 3, 4, 5, 8, 11 e 12, inoculados em algodão, apresentaram sintomas após 15 dias de inoculação, enquanto que os Fov 6, 7, 9, 10, 14 e 15, após 20 dias de inoculação. Aos 25 dias após a inoculação, o Fov 2 apresentou sintomas, e o Fov 13, apenas apresentou leve inibição de crescimento observada aos 30 dias após a inoculação, conforme mostra a Tabela 2. Esse resultado está de acordo com o descrito por Cia e Salgado (2005), onde é relatado que a murcha das folhas e morte prematura das plantas normalmente ocorre em até 25 dias de idade em variedades suscetíveis.

Tabela 2. Relação dos sintomas e dos dias de sua aparição em plantas de algodão após inoculação com isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov).

Isolados	Dias				Sintomas
	15	20	25	30	
Fov 1	X				Diminuição de crescimento
Fov 2			X		Diminuição de crescimento, amarelecimento e leve murcha
Fov 3	X				Morte
Fov 4	X				Morte
Fov 5	X				Diminuição de crescimento e leve murcha
Fov 6		X			Morte
Fov 7		X			Diminuição de crescimento
Fov 8	X				Morte
Fov 9		X			Diminuição de crescimento, amarelecimento e leve murcha
Fov 10		X			Murcha
Fov 11	X				Morte
Fov 12	X				Leve murcha
Fov 13				X	Leve diminuição de crescimento
Fov 14		X			Diminuição de crescimento
Fov 15		X			Morte

Pôde-se observar que as plantas de algodão inoculadas com Fov apresentaram variação na intensidade dos sintomas de acordo com o isolado inoculado (Figura 2). Os

isolados de Fov 3, 4, 6, 8, 11 e 15 causaram sintomas mais severos em relação aos demais isolados, chegando à morte das plantas (Tabela 2).

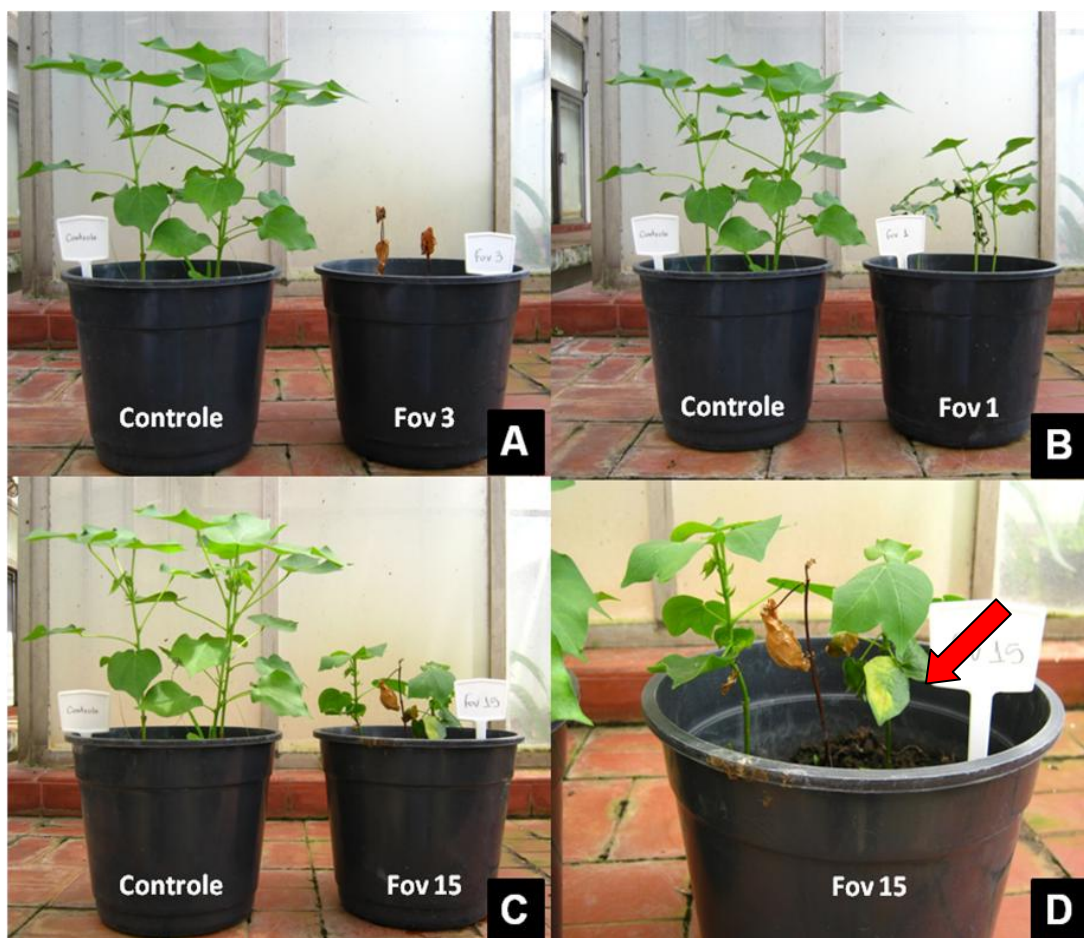


Figura 2: Planta de algodão, cultivar Fibermax 966, inoculada com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* apresentando sintoma severo de murcha, seguida de morte (A); Planta apresentando redução de crescimento, seguida de morte (B); Planta apresentando amarelecimento, murcha e morte (C), Detalhe do amarelecimento visto na figura C (D).

Essas diferenças na agressividade podem ter ocorrido por diferentes fatores, como a descrita por Machado (2008), onde a forma *specialis vasinfectum* possui diferentes raças, mostrando grande variabilidade na agressividade.

Ao realizar o reisolamento de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* na secção longitudinal do caule, foi observada descoloração ou escurecimento dos feixes vasculares (Figura 3), conforme descrição do reconhecimento prévio da murcha de *Fusarium* por Hoffmann et al. (2003).



Figura 3: Planta de algodoeiro, inoculada com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, apresentando escurecimento nos feixes vasculares em secção longitudinal do caule.

Em relação ao *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* inoculado em feijão, os isolados Fop 2, 5, 7, 8, 9, 14 e 15, apresentaram sintomas após 15 dias de inoculação e os isolados Fop 1, 3, 4, 6, 10, 11, 12, 13 após 20 dias de inoculação. Houve variação em relação à severidade dos sintomas, tendo os isolados Fop 3, 11, 12 e 13 apresentado sintomas menos severos com leve diminuição do crescimento e amarelecimento foliar em relação aos outros isolados de Fop (Figura 4 e Tabela 3).

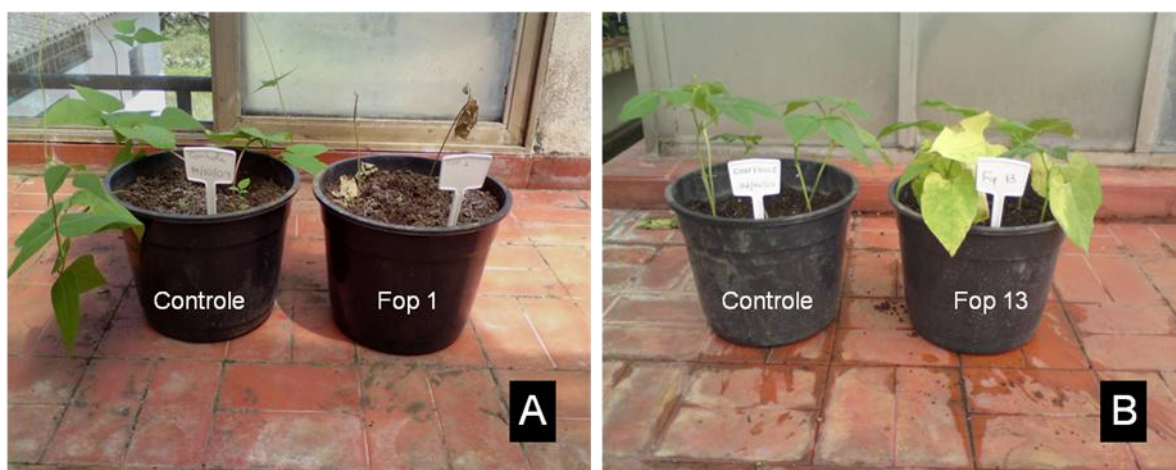


Figura 4: Sintomas em plantas de feijão, cultivar IPA6, inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Sintoma severo de murcha seguida de morte (A) e amarelecimento e redução no crescimento (B).

Tabela 3. Relação dos sintomas e dos dias de sua aparição em plantas de feijão após inoculação com isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop).

Isolados	Dias				Sintomas
	15	20	25	30	
Fop 1		X			Morte
Fop 2	X				Murcha
Fop 3		X			Diminuição de crescimento e amarelecimento
Fop 4		X			Diminuição de crescimento e murcha
Fop 5	X				Murcha
Fop 6		X			Morte
Fop 7	X				Murcha
Fop 8	X				Murcha
Fop 9	X				Murcha
Fop 10		X			Leve murcha
Fop 11		X			Amarelecimento
Fop 12		X			Diminuição de crescimento e amarelecimento
Fop 13		X			Diminuição de crescimento e amarelecimento
Fop 14	X				Murcha
Fop 15	X				Murcha

Todos os isolados de Fov e Fop foram reisolados a partir das plantas inoculadas, confirmando-se a patogenicidade dos mesmos ao se completar os postulados de Koch.

4.2 Caracterização Morfológica

4.2.1 Tipo e Coloração de Micélio dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

Os isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* foram avaliados e agrupados de acordo com o seu tipo e coloração de micélio, obtendo-se um total de quatro grupos no

meio batata-dextrose-ágar (BDA) e sete grupos no meio Czapek (CZP), com as seguintes características:

Em BDA: Grupo 1- micélio superior cotonoso branco e reverso alaranjado, Grupo 2- micélio superior cotonoso rosa avermelhado e reverso roxo avermelhado, Grupo 3- micélio cotonoso superior roxo e reverso roxo, Grupo 4- micélio superior cotonoso roxo e reverso rosa claro (Tabela 4a e Figura 5a).

Em CZP: Grupo 1- micélio cotonoso branco e reverso creme alaranjado, Grupo 2- micélio superior lanoso em mechas branco e reverso creme alaranjado, Grupo 3- micélio superior lanoso em mechas branco e reverso roxo, Grupo 4- micélio superior cotonoso roxo e reverso creme alaranjado, Grupo 5- micélio superior lanoso em mechas roxo e reverso creme com setores azul, Grupo 6- micélio superior lanoso em mechas roxo e reverso roxo e Grupo 7- micélio superior cotonoso roxo e reverso roxo (Tabela 4b e Figura 5b).

Esses resultados mostram que existe uma variabilidade expressiva na coloração e tipo de micélio entre os isolados da mesma forma *specialis* que se encontravam nas mesmas condições de incubação, meio de cultura e temperatura. A variabilidade de coloração de *Fusarium oxysporum* também foi descrita em sementes de algodão, possuindo micélio aéreo com pigmentação bege pálido a rosa, roxo, vináceo a azul (BRASIL, 2009).

Tabela 4a. Agrupamento de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, incubados a 25° e 27°C, em meio de cultura batata ágar dextrose, de acordo com as características miceliais e coloração.

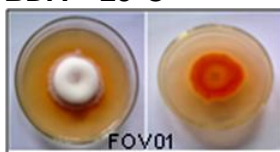
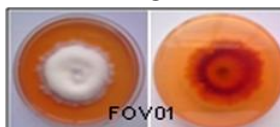
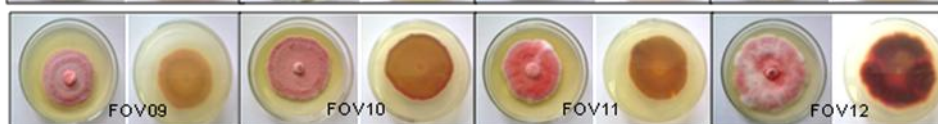
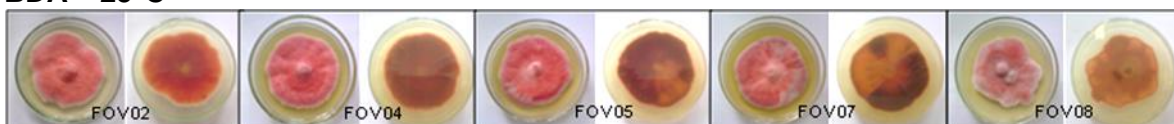
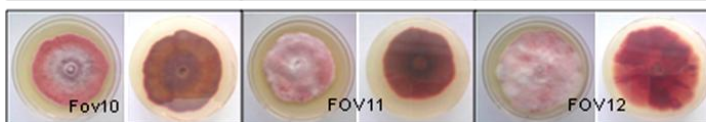
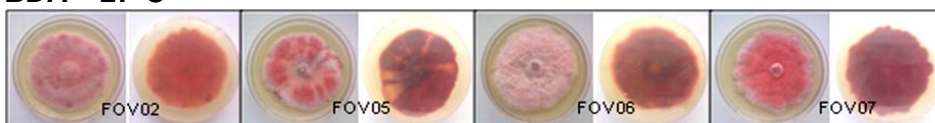
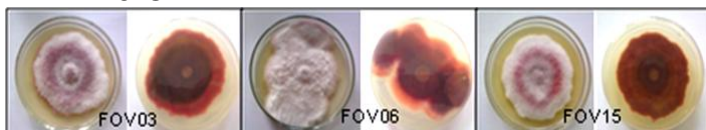
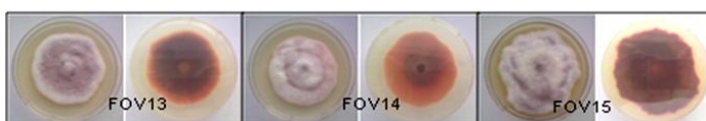
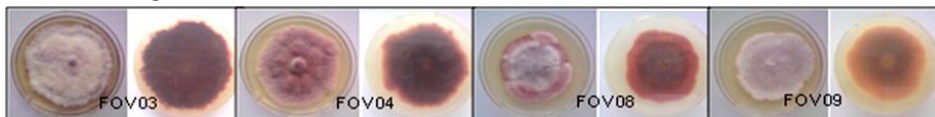
Grupos	Batata-dextrose-ágar	
	Temperatura (°C)	
	25	27
1	1	1
2	2;4,5;7;8;9;10;11;12	2;5;6;7;10;11;12
3	3;6;15	3;4;8;9;13;14;15
4	13;14	-

1-micélio superior cotonoso branco e reverso alaranjado; 2- micélio superior cotonoso rosa avermelhado e reverso roxo avermelhado; 3- micélio cotonoso superior roxo e reverso roxo; 4- micélio superior cotonoso roxo e reverso rosa claro.

Tabela 4b. Agrupamento de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, incubados a 25° e 27°C, em meio de cultura Czapek, de acordo com as características miceliais e coloração.

Grupos	Czapek	
	Temperatura (°C)	
	25	27
1	1	1
2	3;10;14;15	-
3	2;6;8;9	-
4	5;7;11;12	-
5	13	-
6	-	2;3;6;8;9;10;11;13;14;15
7	4	4;5;7;12

1- micélio cotonoso branco e reverso creme alaranjado; 2- micélio superior lanoso em mechas branco e reverso creme alaranjado; 3- micélio superior lanoso em mechas branco e reverso roxo; 4- micélio superior cotonoso roxo e reverso creme alaranjado; 5- micélio superior lanoso em mechas roxo e reverso creme com setores azul; 6- micélio superior lanoso em mechas roxo e reverso roxo; 7- micélio superior cotonoso roxo e reverso roxo.

Grupo 1**BDA – 25°C****BDA – 27°C****Grupo 2****BDA – 25°C****BDA – 27°C****Grupo 3****BDA – 25°C****BDA – 27°C**

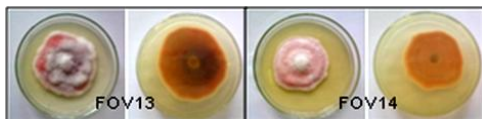
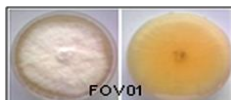
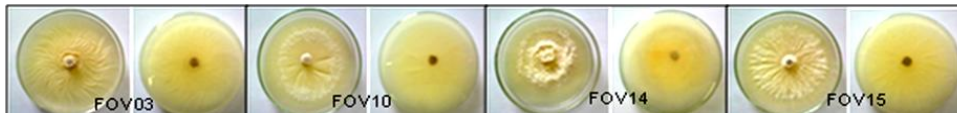
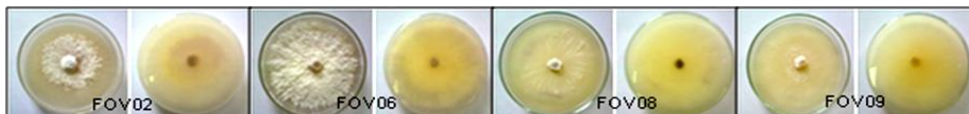
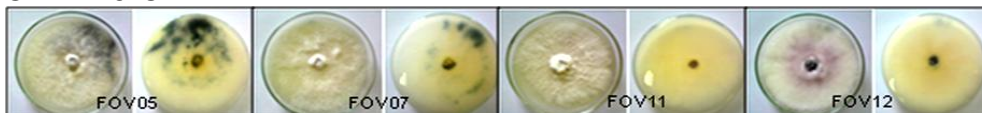
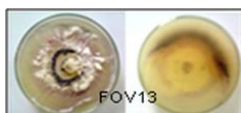
Grupo 4**BDA – 25°C**

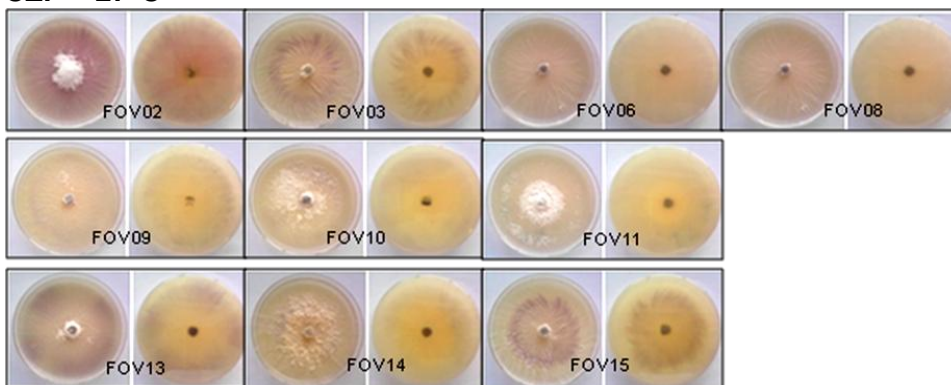
Figura 5a: Grupos de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), incubados a 25 e 27°C.

Grupo 1**CZP – 25°C****CZP – 27°C****Grupo 2****CZP – 25°C****Grupo 3****CZP – 25°C****Grupo 4****CZP – 25°C****Grupo 5****CZP – 25°C**



Grupo 6

CZP – 27°C



Grupo 7

CZP – 25°C



CZP – 27°C

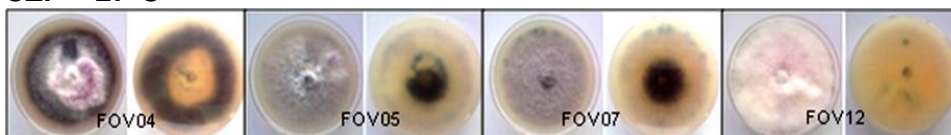


Figura 5b: Grupos de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, em meio de cultura Czapek (CZP), incubados a 25 e 27°C.

4.2.2 Crescimento Micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

No experimento fatorial, obteve-se o quadro de análise, mostrando as diferenças significativas entre os fatores e entre as suas interações (Figura 6).

Nas médias dos isolados de Fov, aos cinco dias de incubação, Fov 1 e 14 apresentaram menor ou igual crescimento a um isolado e Fov 2, 4, e 6 apresentaram maior ou igual crescimento a outros oito isolados. Aos dez dias de incubação, Fov 1 apresentou menor ou igual crescimento ao isolado Fov 14 e Fov 3 apresentou maior ou igual crescimento a outros nove isolados.

Na interação entre isolados e meio de cultura tanto para cinco como dez dias de incubação, os isolados apresentaram maior crescimento em meio CZP em relação ao BDA.

QUADRO DE ANÁLISE - 5 dias					A
F.V.	GL.	S.Q.	Q.M.	F	
Fator1(F1)	14	33.24411	2.37458	12.5234	**
Fator2(F2)	1	11.10050	11.10050	58.5435	**
Fator3(F3)	1	236.21356	236.21356	1245.7791	**
Int. F1xF2	14	7.65117	0.54651	2.8823	**
Int. F1xF3	14	19.04394	1.36028	7.1741	**
Int. F2xF3	1	21.01250	21.01250	110.8189	**
Int.F1x2x3	14	3.64167	0.26012	1.3719	ns
Tratamentos	59	331.90744	5.62555	29.6689	**
Resíduo	120	22.75333	0.18961		
Total	179	354.66078			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)
ns não significativo (p >= .05)

QUADRO DE ANÁLISE - 10 dias					B
F.V.	GL.	S.Q.	Q.M.	F	
Fator1(F1)	14	15.11536	1.07967	12.6771	**
Fator2(F2)	1	0.64201	0.64201	7.5383	**
Fator3(F3)	1	222.55568	222.55568	2613.1782	**
Int. F1xF2	14	2.05319	0.14666	1.7220	ns
Int. F1xF3	14	15.11536	1.07967	12.6771	**
Int. F2xF3	1	0.64201	0.64201	7.5383	**
Int.F1x2x3	14	2.05319	0.14666	1.7220	ns
Tratamentos	59	258.17682	4.37588	51.3802	**
Resíduo	120	10.22000	0.08517		
Total	179	268.39682			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)
ns não significativo (p >= .05)

Figura 6: Quadro de análise fatorial do crescimento micelial de isolados de Fov aos 5 dias de incubação (A) e aos 10 dias de incubação (B). Fator 1 = Isolados, Fator 2 = Temperaturas, Fator 3 = Meios de Cultura, F.V. = Fonte de variação, G.L. = Graus de liberdade, S.Q. = Soma de quadrado, Q.M. = Quadrado médio, F= Estatística do teste F.

Em relação à interação entre isolados e temperatura, aos cinco dias de incubação, os isolados comportaram-se com maior ou igual crescimento a 27°C do que a 25°C. Aos dez dias de incubação não houve diferenças significativas entre os fatores isolados e temperaturas, não se aplicando assim o teste de comparação de médias.

Esses resultados mostram que ocorrem diferenças significativas entre os isolados, entre as temperaturas e entre os meios de cultura, e também entre as interações Isolados X Temperatura, Isolados X Meio de Cultura e Temperatura X Meio de Cultura, com exceção da interação entre Isolados X Temperaturas aos dez dias de incubação. A interação Isolados X Temperatura X Meio de Cultura não apresentou diferenças significativas (Tabelas 5 e 6). Vechiato (2002) observou diferença de crescimento micelial de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* e de outras espécies de *Diaporthe* nos meios de cultura BDA, soja e Czapek. Rosa e Menezes (2001) estudaram as características de *Pseudocercospora musae* e observaram variações quanto à coloração e à pigmentação das colônias, em diferentes meios de cultura e pH utilizados. Peres et al. (2003) observaram diferenças de crescimento micelial e características das colônias em diferentes meios de cultura (BDA, MDA e Czapek) para isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phoma caricae-papayae* e *Fusarium solani*.

Tabela 5. Crescimento micelial (cm) de diferentes isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov) em meio batata-agar-dextrose (BDA) e Czacpek (Czp), incubados durante 5 e 10 dias a 25 e 27°C.

Crescimento Micelial (cm)										
Isolados	Isolados X Temperatura				Isolados X Meio de Cultura				Médias dos Isolados	
	5 dias		10 dias		5 dias		10 dias		5 dias	10 dias
	25°C	27°C	25°C	27°C	BDA	CZP	BDA	CZP		
Fov 1	4.3250 eB	5.2917 cA	69.083	73.333	3.7417 dB	5.8750 fgA	5.2417 eB	9.0000 aA	4.80833 d	7.12083 e
Fov 2	5.8333 abB	6.6500 aA	80.250	82.083	4.7750 abcB	7.7083 abA	7.2333 abB	9.0000 aA	6.24167 a	8.11667 abc
Fov 3	5.6250 abA	5.9500 abcA	81.833	83.417	5.2000 ab	6.3750 efgA	7.5250 ab	9.0000 aA	5.78750 abc	8.26250 a
Fov 4	6.1250 abA	6.2583 abA	79.500	79.917	4.2667 bcdB	8.1167 aA	6.9417 abcB	9.0000 aA	6.19167 a	7.97083 abc
Fov 5	5.9333 abA	5.8417 abcA	79.583	77.500	4.6083 abcdB	7.1667 bcdeA	6.7083 bcB	9.0000 aA	5.88750 ab	7.85417 abcd
Fov 6	6.2833 aA	6.2250 abA	84.000	81.083	5.2417 ab	7.2667 abcdA	7.5083 ab	9.0000 aA	6.25417 a	8.25417 ab
Fov 7	5.9583 abA	5.9500 abcA	79.250	79.750	4.5833 abcdB	7.3250 abcA	6.9000 bcB	9.0000 aA	5.95417 ab	7.95000 abc
Fov 8	5.4917 abcA	5.8500 abcA	77.667	79.333	4.7083 abcB	6.6333 cdefA	6.7000 bcB	9.0000 aA	5.67083 abc	7.85000 abcd
Fov 9	4.6917 cdeB	5.8500 abcA	75.667	79.167	4.1833 bcdB	6.3583 efgA	6.4833 cdB	9.0000 aA	5.27083 cd	7.74167 cd
Fov 10	5.4750 abcA	5.8083 abcA	78.917	78.250	4.8500 abB	6.4333 defgA	6.7167 bcB	9.0000 aA	5.64167 abc	7.85833 abcd
Fov 11	5.4417 abcB	5.9417 abcA	77.333	78.417	4.2750 bcdB	7.1083 bcdeA	6.5750 cB	9.0000 aA	5.69167 abc	7.78750 cd
Fov 12	5.2917 bcdB	6.5500 abA	78.583	84.000	4.8417 abB	7.0000 bcdeA	7.2583 abB	9.0000 aA	5.92083 ab	8.12917 abc
Fov 13	5.4667 abcA	5.9500 abcA	78.333	78.583	4.3000 bcdB	7.1167 bcdeA	6.6917 bcB	9.0000 aA	5.70833 abc	7.84583 bcd
Fov 14	4.4333 deB	5.2333 cA	73.333	75.833	3.9167 cdB	5.7500 gA	5.9167 dB	9.0000 aA	4.83333 d	7.45833 de
Fov 15	5.2667 bcdA	5.7417 bcA	80.917	81.500	4.6917 abcB	6.3167 efgA	7.2417 abB	9.0000 aA	5.50417 bc	8.12083 abc
DMS para colunas	0.8711				0.8711		0.5838		DMS1= 0.61594	DMS= 0.41280
DMS para linhas	0.4978				0.4978		0.3336			
CV%					5 dias= 7.65129 e 10 dias= 3.69969					

DMS = Diferença mínima significativa

CV% = Coeficiente de variação em %

Tabela 6. Médias do crescimento micelial (cm) da interação Temperaturas X Meio de Cultura de diferentes isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov) em meio batata-agar-dextrose (BDA) e Czapek (Czp), incubados durante 5 e 10 dias a 25 e 27°C.

Médias Temperaturas X Meio de Cultura - 5 dias			Médias Temperaturas X Meio de Cultura - 10 dias		
Temperaturas	Meios de Cultura		Temperaturas	Meios de Cultura	
	BDA	CZP		BDA	CZP
25°C	4.6389 aB	6.2467 bA	25°C	6.6567 bB	9.0000 aA
27°C	4.4522 bB	7.4267 aA	27°C	6.8956 aB	9.0000 aA

4.3 Análises filogenéticas das sequências obtidas para o gene EF e para as regiões ITS e IGS

O alinhamento das sequências de aproximadamente 600 pb obtidas para a região ITS de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov), *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop) e *Fusarium solani* (Fsa, Fsf 1 e Fsf 2) mostrou que não existem diferenças entre os isolados de Fov, Fop e Fsf2 (dados não apresentados). Todos estes isolados apresentaram similaridade a diversas formaes speciales de *F. oxysporum* cujas sequências estão depositadas no GenBank. Os isolados Fov 1 e Fop 3 foram exceções, apresentando similaridade com *Fusarium solani*, assim como Fsf 1 e Fsa, sendo que estes últimos estão de acordo com o esperado. Estes resultados mostram que a região ITS não permite a distinção de formaes speciales de *F. oxysporum* e que Fov 1, Fop 3 e Fsf 2 foram erroneamente identificados, tratando-se na verdade de *F. solani* (Fov 1 e Fop 3) e *F. oxysporum* (Fsf 2).

Nos resultados apresentados, nos itens 4.2.1 e 4.2.2, foi observado que o isolado Fov 1 apresentou diferenças aos demais isolados em relação ao tipo e coloração e crescimento micelial, sendo agrupado separadamente e apresentando diferenças significativas dos demais isolados de Fov, nos dois meios de cultura e nas duas temperaturas estudadas. Os mesmos resultados foram observados em relação ao isolado Fop 3 (dados não apresentados).

Para a amplificação de fragmento do gene codificador do fator de alongação (EF) foram utilizados os iniciadores EF11 e EF22 que resultaram em um fragmento de DNA com cerca de 200 pares de bases, pouco informativo devido ao seu pequeno tamanho.

Foram utilizados, então, os iniciadores EF1 e EF2 que amplificaram um fragmento de aproximadamente 700 pares de bases. As sequências obtidas para os diferentes isolados foram alinhadas com outras correspondentes aos “sequence-types” do complexo de espécies *F. oxysporum* (FOSC), descritas por O’Donnell et al. (2009) e uma árvore

filogenética foi construída pelo método de Neighbor Joining (Figura 7). Observa-se uma separação entre a maioria dos isolados de Fov e Fop, entretanto, os isolados Fop 10, 11, 12 e 13 mostraram maior proximidade com isolados de Fov. Através de análise por Blastn contra sequências depositadas no NCBI, os isolados Fov 1 e Fop 3 apresentaram similaridade com *F. solani* e não foram incluídos na árvore.

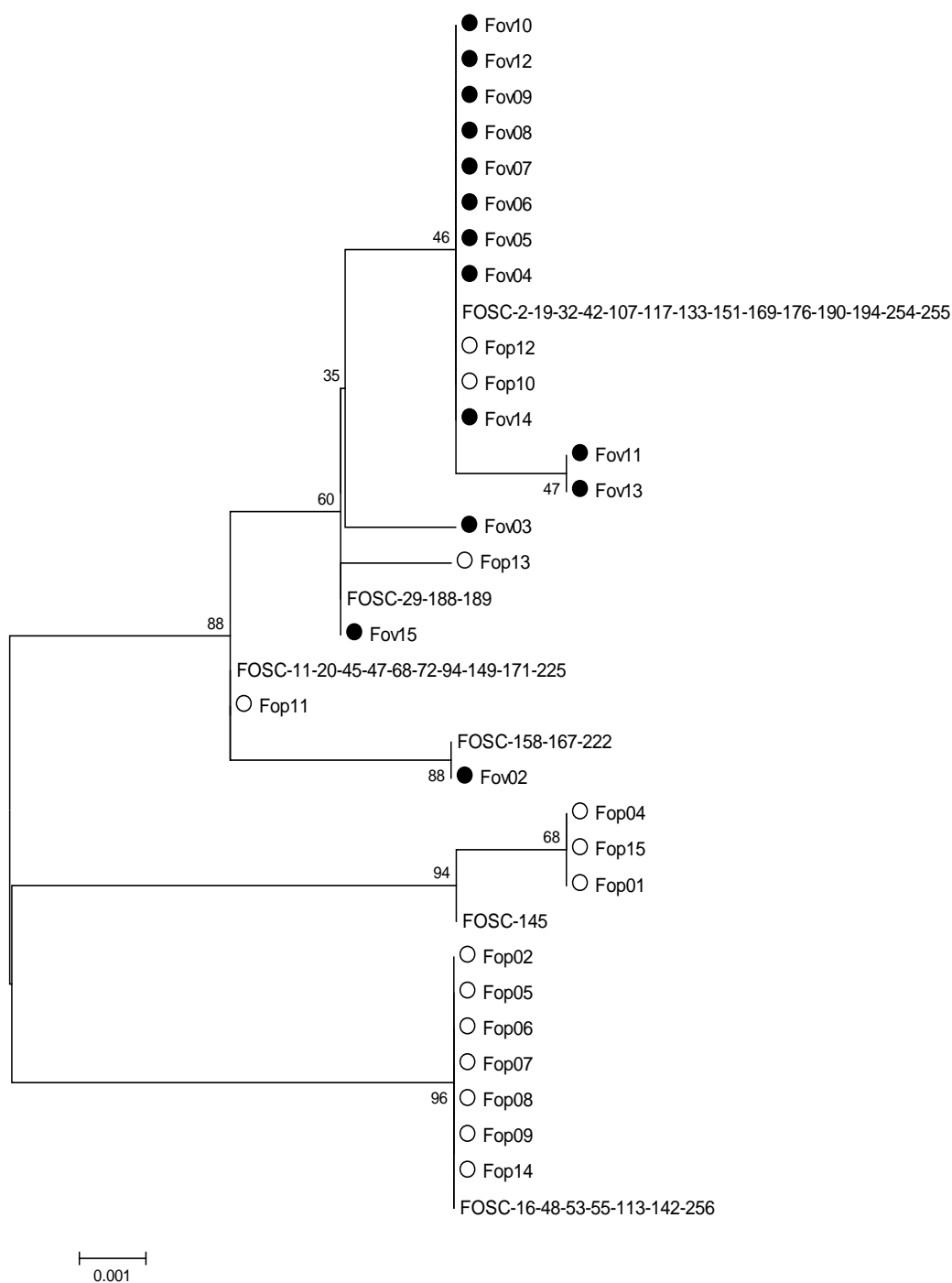


Figura 7. Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor Joining com sequências do gene EF de isolados de Fov e Fop do presente estudo e "sequence types" do complexo de espécies *F. oxysporum* (FOSC). Os números junto aos nós indicam o valor de "bootstrap" para 500 réplicas.

A amplificação da região IGS com os iniciadores NL11 e CNS1 resultou em produtos com cerca de 2,6 Kb. As sequências obtidas somente com o iniciador NL11, correspondendo a cerca de 600 pb da extremidade 5' da região IGS, foram alinhadas com outras semelhantes do complexo de espécies *F. oxysporum* e utilizadas para a construção de árvore filogenética pelo método de Neighbor Joining (Figura 8). Assim como o observado na árvore EF, a maioria dos isolados de Fov e Fop agruparam-se em ramos distintos mas os isolados Fop 10, 12 e 13 apresentaram maior afinidade com Fov. O isolado Fop 11, que na árvore EF agrupou-se com Fov, na árvore IGS localizou-se em ramo separado dos demais isolados de Fop e Fov. Análise das sequências IGS de Fov 1 e Fop 3 através de Blastn confirmaram a similaridade destes com *F. solani* (dados não apresentados).

As sequências EF e IGS dos isolados de Fov do presente trabalho apresentaram similaridade com diversos "sequence types" do FOOSC (Figuras 7 e 8). Isto também foi observado no trabalho de O'Donnell et al. (2009) no qual as linhagens de Fov sequenciadas foram classificadas em 22 "sequence types" diferentes. Os isolados Fov 4, 5, 6, 8, 9, 10 e 12 apresentaram em comum nas árvores EF e IGS, 100% de similaridade com FOOSC32. Este resultado coincide com o de O'Donnell et al. (2009) que classificaram um isolado da raça 6 de Fov do Brasil como pertencente a este mesmo "sequence type".

Os isolados Fop 10, 12 e 13 apresentaram proximidade com isolados de Fov, tanto na árvore EF como na IGS. Estes resultados, associados com a observação de que estes isolados apresentaram menor severidade de sintomas em plantas de feijão (Tabela 3), sugerem que estes isolados sejam Fop atípicos ou mesmo que possam ser Fov. Experimentos de inoculação de plantas de algodão poderão verificar esta hipótese.

As observações de que diferentes isolados de Fov pertencem a diferentes "sequence types" e de que um "sequence type" pode comportar diferentes formas especiais, conforme observado no presente estudo e no de O'Donnell et al. (2009), dificultam o desenvolvimento de iniciadores para PCR que permitam a distinção de formas especiais de *F. oxysporum*, com base no gene EF e região IGS. Diferentes linhagens de uma mesma forma specialis podem ter origem polifilética devido à transferência horizontal de genes ou até mesmo cromossomos inteiros que conferem a capacidade de causar doença em uma determinada espécie de planta hospedeira (VAN DER DOES et al., 2008; MA et al., 2010). Em vista disto, a identificação dos genes que determinam virulência hospedeiro-específica configura estratégia mais promissora para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico com alta especificidade para formas especiais de *F. oxysporum*. De fato, van der Does et al. (2008) estabeleceram método para a detecção específica de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* baseado na amplificação por PCR de cinco genes envolvidos na patogenicidade deste fungo ao tomateiro. A aplicação desta estratégia para Fov ainda depende da descoberta dos genes envolvidos na patogenicidade deste fungo ao algodoeiro.

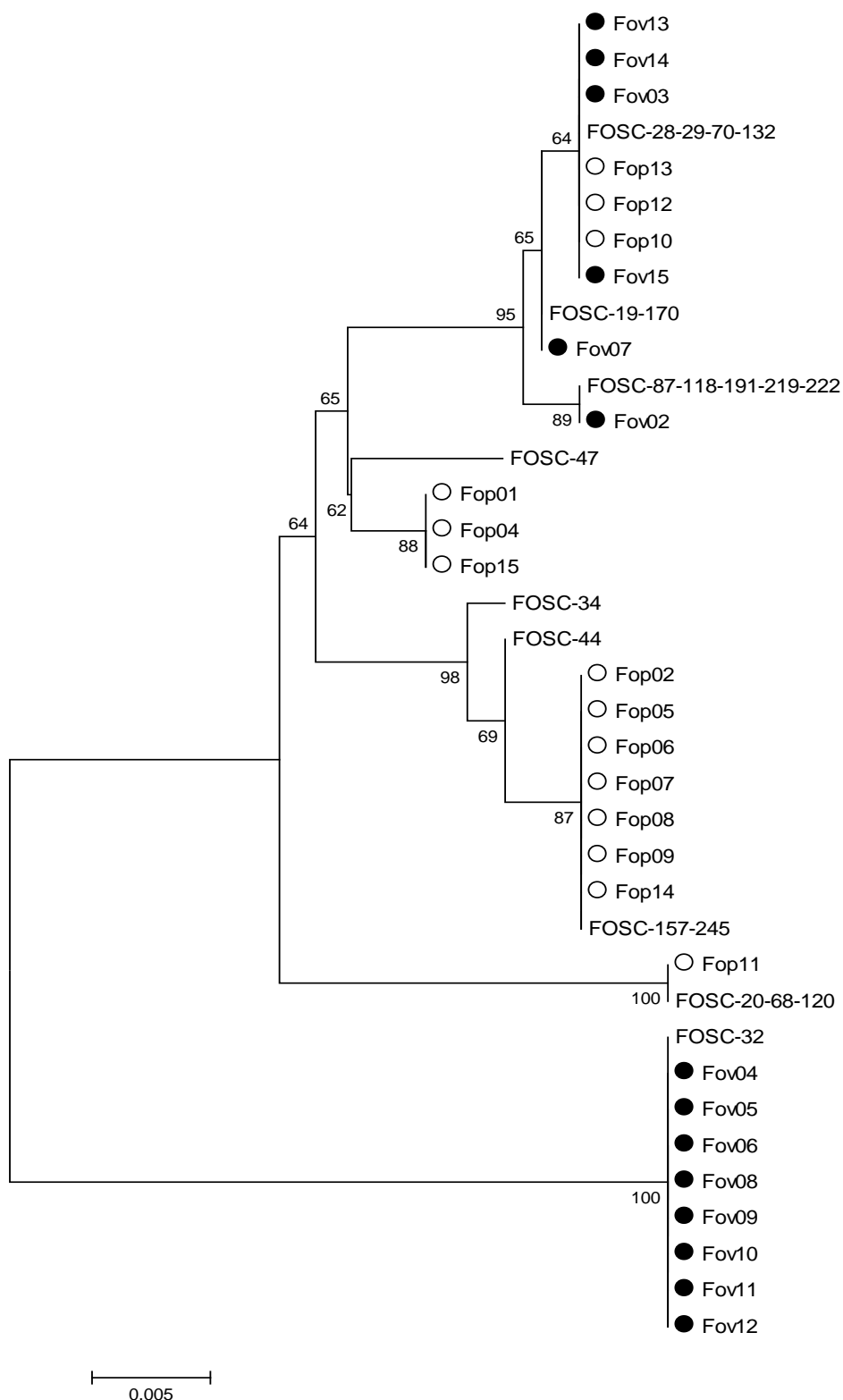


Figura 8. Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor Joining com sequências da região IGS de isolados de Fov e Fop do presente estudo e “sequence types” do complexo de espécies *F. oxysporum* (FO SC). Os números junto aos nós indicam o valor de “bootstrap” para 500 réplicas.

Apesar das dificuldades em se desenvolver iniciadores específicos baseados em genes ou regiões que não estão envolvidas na patogenicidade, Moricca et al. (1998) e Zambonis, Paplomatas e Tsaftaris (2007) relataram o desenvolvimento de iniciadores capazes de distinguir Fov de outras formas especiais de *F. oxysporum* baseados na região ITS e IGS, respectivamente. Os resultados da avaliação destes iniciadores para isolados brasileiros de Fov serão discutidos no item a seguir.

4.4 Avaliação da especificidade de iniciadores específicos citados na literatura para detecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop)

A PCR com os iniciadores específicos para *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov), desenhados por Moricca et al. (1998) com base na região ITS, não amplificou fragmentos de DNA para os 15 isolados de Fov, 4 de Fop, 1 de Fsa e 2 de Fsf (Figura 9).



Figura 9. Gel de agarose 2%, de PCR com os iniciadores específicos desenvolvidos por Moricca et al. (1998), para *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Iniciadores FOV1 e FOV2 e DNAs de Fov, Fop e Fs. 1ª Fileira: Fov 1-11; 2ª Fileira: Fov 12-15, Fsa, Fop 1-4 e Fsf 1-2. Pd = Padrão 1 Kb, Br = Branco, Fop = *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, Fov = *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e Fs = *Fusarium solani*.

Foi realizada uma análise com as sequências depositadas no NCBI utilizadas por Moricca et al. (1998) para o desenvolvimento dos iniciadores específicos a partir da região ITS, bem como sequências de outras espécies de *Fusarium* (incluindo f. sp. *vasinfectum*), também obtidas no site da NCBI, e de algumas sequências obtidas de isolados de Fov deste

estudo. Os resultados mostraram que apenas as sequências depositadas por Moricca et al. (1998) no NCBI, se alinham aos iniciadores específicos desenvolvidos por estes autores (Figura 10).

```

F oxysporum fsp vasinfectum X78258 : ACAACTCCCAACCCTGTGAACATACCTTACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAAACGGGACGG
F oxysporum fsp vasinfectum X78259 : ACAACTCCCAACCCTGTGAACATACCTTACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAAACGGGACGG
Primer Fov1 : -----CCCTGTGAACATACCTTACT-----
F oxysporum fsp dianthi DQ452452 : ACAACTCCCAACCCTGTGAACATACC--ACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAAACGGGACGG
F oxysporum fsp lillii AY684920 : ACAACTCCCAACCCTGTGAACATACC--ACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAAACGGGACGG
F oxysporum fsp cucumerinum DQ452450 : ACAACTCCCAACCCTGTGAACATACC--ACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAAACGGGACGG
F oxysporum fsp lycopersici DQ452454 : ACAACTCCCAACCCTGTGAACATACC--ACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAAACGGGACGG
F oxysporum fsp cubense EF590328 : ACAACTCCCAACCCTGTGAACATACC--ACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAAACGGGACGG
F oxysporum fsp vasinfectum AF322074 : ACAACTCCCAACCCTGTGAACATACC--ACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAAACGGGACGG
F oxysporum fsp vasinfectum AF322075 : ACAACTCCCAACCCTGTGAACATACC--ACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAAACGGGACGG
F oxysporum fsp vasinfectum AF322076 : ACAACTCCCAACCCTGTGAACATACC--ACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAAACGGGACGG
F oxysporum fsp vasinfectum EU849584 : ACAACTCCCAACCCTGTGAACATACC--ACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAAACGGGACGG
Fov2 : ACAACTCCCAACCCTGTGAACATACC--ACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAAACGGGACGG
Fov3 : ACAACTCCCAACCCTGTGAACATACC--ACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAAACGGGACGG
Fov4 : ACAACTCCCAACCCTGTGAACATACC--ACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAAACGGGACGG
Fov5 : ACAACTCCCAACCCTGTGAACATACC--ACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAAACGGGACGG
Fov6 : ACAACTCCCAACCCTGTGAACATACC--ACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAAACGGGACGG
Fov7 : ACAACTCCCAACCCTGTGAACATACC--ACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAAACGGGACGG
Fov8 : ACAACTCCCAACCCTGTGAACATACC--ACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAAACGGGACGG
Fov9 : ACAACTCCCAACCCTGTGAACATACC--ACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAAACGGGACGG
Fov10 : ACAACTCCCAACCCTGTGAACATACC--ACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCTCCCGGTAAAAACGGGACGG

```

Figura 10: Alinhamento das sequências obtidas por Moricca et al. (1998) para a região ITS de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, com as obtidas para outros isolados de *F. oxysporum* depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information) e sequências obtidas para Fov no presente estudo. Apenas as duas primeiras sequências superiores oriundas do trabalho de Moricca et al. (1998) são 100 % idênticas ao iniciador Fov1 desenvolvido por estes autores.

Moricca et al. (1998) desenvolveram os iniciadores específicos para Fov com base em sequências de isolados angolanos que não representam a grande maioria de Fov encontrados em outros países. Embora tenham confirmado que seus iniciadores também amplificavam para isolados de Fov dos EUA, China e Brasil, é possível que a temperatura de anelamento utilizada, 50°C, tenha favorecido um pareamento não-específico com estas amostras. A temperatura de fusão (melting) calculada através do DNA Calculator (<http://www.sigma-genosys.com/calc/DNACalc.asp>) para estes iniciadores foi entre 58 e 59°C.

A PCR utilizando os iniciadores específicos para Fov, desenhados por Zambounis, Paplomatas e Tsiftaris (2007) com base na região IGS, resultou na amplificação de todos os isolados (incluindo o Fsa), quando utilizados os iniciadores Fov1/Fov2, evidenciando a não especificidade dos mesmos. Quando se utilizou o segundo par de iniciadores, Fov3/Fov4, nenhum dos isolados resultou em amplificação (Figura 11).

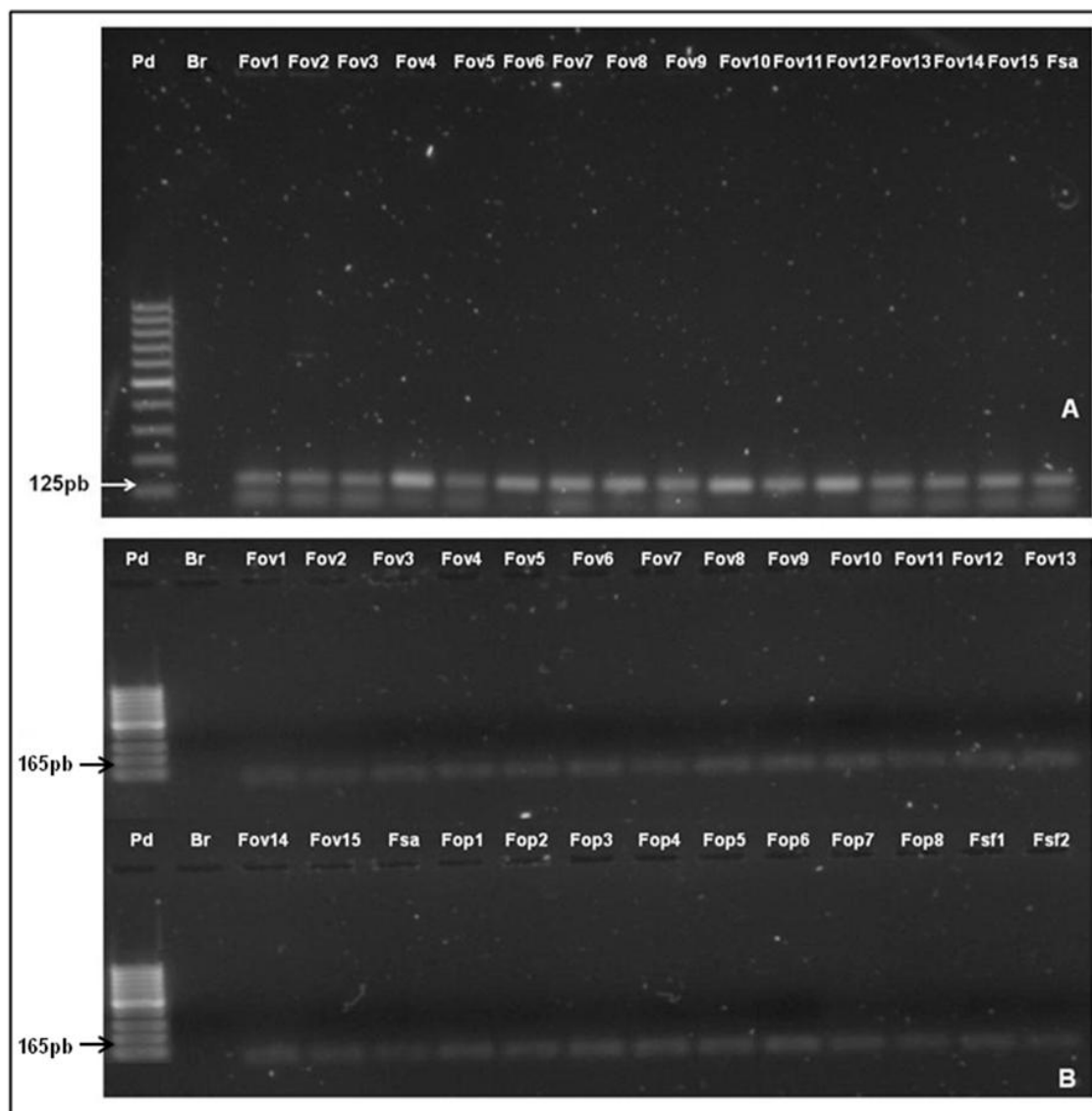


Figura 11. Géis de agarose 2%, de PCRs com os iniciadores específicos para *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, desenvolvidos por Zambounis, Paplomatas e Tsaftaris (2007). A - iniciadores FOV1 e FOV2 e DNAs de Fov 1-15 e Fsa. B - Iniciadores FOV3 e FOV4 e DNAs de Fov 1-15, Fsa, Fop 1-8 e Fsf 1 e 2 Pd = Padrão 1 Kb, Br = Branco, Fop = *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, Fov = *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e Fs = *Fusarium solani*.

A falta de especificidade observada para os iniciadores Fov1/Fov2 e a falta de amplificação para os iniciadores Fov3/Fov 4 pode ser explicada pela polifilia de linhagens de uma mesma forma *specialis*, conforme já discutido no item 4.3. Zambounis, Paplomatas e Tsaftaris (2007) desenvolveram estes iniciadores com base em sequências IGS obtidas para isolados australianos de Fov, os quais representam uma amostra limitada da diversidade de Fov no mundo.

A PCR com os iniciadores A280/B310 específicos para *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop), resultou na amplificação de um fragmento com aproximadamente 600 pares

de bases, em 11 dos 15 isolados de Fop avaliados. Os demais isolados de Fov e os isolados de *Fusarium solani* de feijão e de algodão não amplificaram (Figura 12).

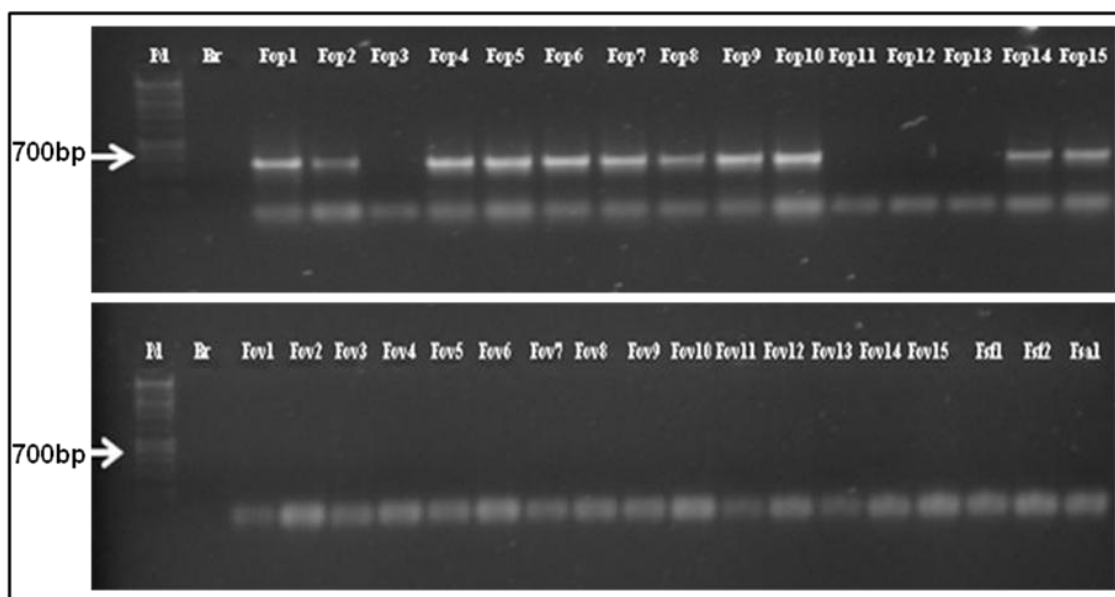


Figura 12. Gel de agarose 2%, de PCR com os iniciadores específicos desenvolvidos por Alves-Santos et al. (2002), para *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Iniciadores A280/B310 e DNAs de Fop, Fov e Fs. 1ª Fileira: Fop 1-15; 2ª Fileira: Fov 1-15, Fsf 1-2 e Fsa 1. Pd = Padrão 1 Kb, Br = Branco, Fop = *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, Fov = *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e Fs = *Fusarium solani*.

Pode-se observar que os quatro isolados de Fop que não amplificaram (Fop 3, 11, 12, 13,) apresentaram menor agressividade no teste de patogenicidade em plantas de feijão (Tabela 3). O sequenciamento do gene EF e das regiões ITS e IGS de Fop 3 mostrou que este isolado corresponde a *F. solani*. Os isolados Fop 12 e 13 mostraram-se mais próximos a Fov nas árvores filogenéticas EF e IGS (Figuras 7 e 8), podendo não ser Fop típicos. O isolado Fop 11 também mostrou posição distinta em relação à maioria dos isolados de Fop nas árvores EF e IGS (Figuras 7 e 8). Em oposição a esta linha de raciocínio, o isolado Fop 10, que mostrou-se semelhante a Fop 12 e 13 nas análises filogenéticas, amplificou com os iniciadores A280/B310. É provável que estes iniciadores não amplifiquem isolados com baixa agressividade e efetivamente diferenciem Fop de outras espécies de *Fusarium* e outras formas especiais, como a *vasinfectum*.

O fragmento amplificado pelos iniciadores A280/B310 corresponde a uma parte do gene *fff1*, que codifica um fator de transcrição presente na forma de múltiplas cópias nos genomas de linhagens altamente virulentas de Fop (RAMOS et al., 2007). Este gene é expresso somente após a infecção da planta hospedeira e está associado à patogenicidade de Fop sendo, portanto, um bom marcador para o diagnóstico específico deste fungo.

4.5 Detecção de regiões específicas a *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov) através de RAPD e avaliação da especificidade de iniciadores

Dentre os iniciadores randômicos utilizados apenas OPF 15 e OPC18 apresentaram perfis distintos quando comparados os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov), *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop) e *Fusarium solani* (Fsa 1, Fsf1 e Fsf2).

Com o iniciador OPF 15 foi observado um fragmento de aproximadamente 1.200 pb comum aos isolados de Fov que não foi amplificado para os isolados de Fop (Figura 13).

Para o iniciador OPC 18 foi selecionado um fragmento de aproximadamente 600 pb específicos para Fov (Figura 14).

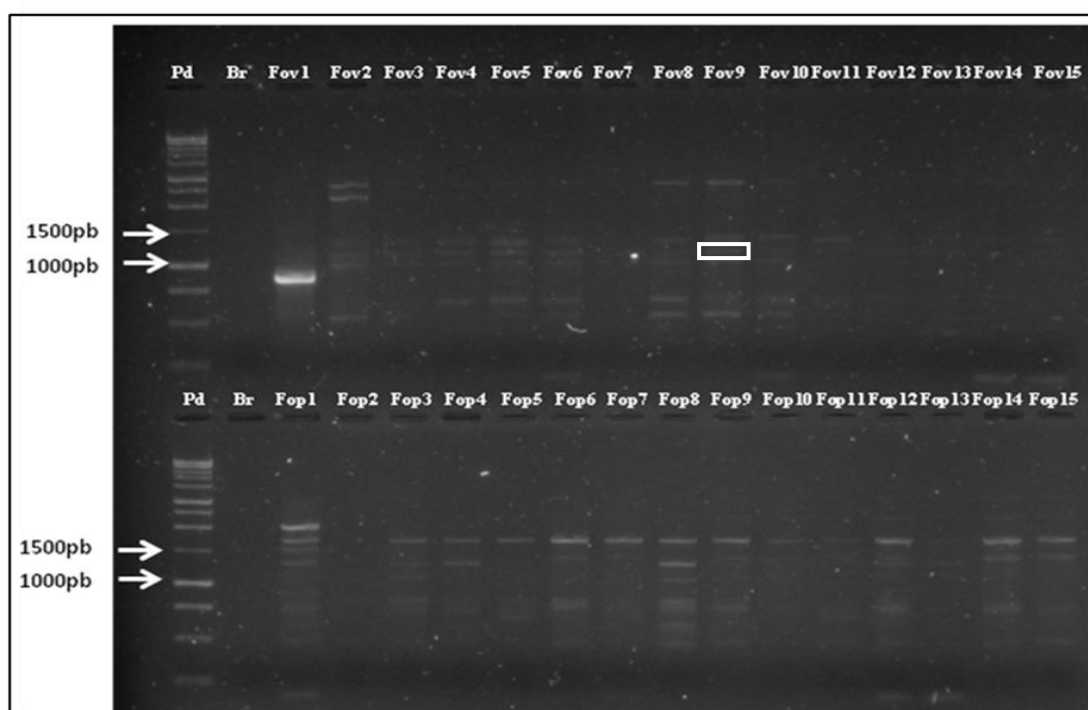


Figura 13. Análise de RAPD com iniciador OPF15 para isolados de Fov e Fop. Br = Branco. Pd (Padrão) = 1kb DNA ladder. Fop = *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e Fov: *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Gel agarose 2%. Fragmento evidenciado pelo retângulo branco foi clonado e sequenciado.

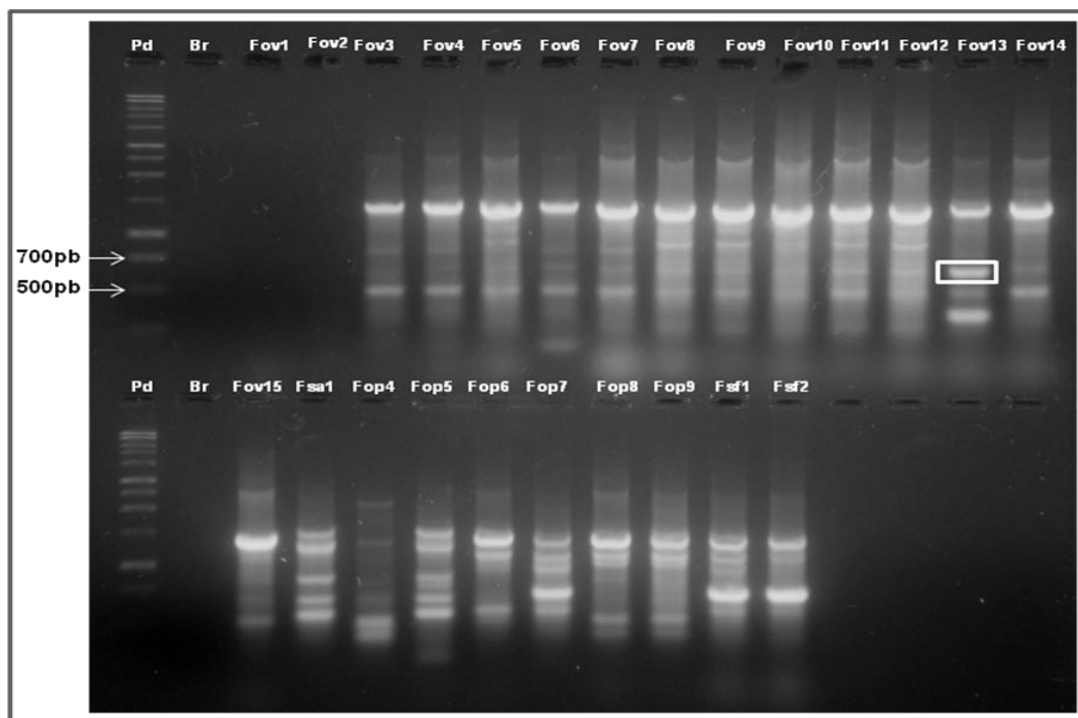


Figura 14. Análise de RAPD com iniciador OPC18 para isolados de Fov, Fop, Fsa e Fsf. Br = Branco; Pd (Padrão) = 1kb DNA ladder. Fop = *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, Fov: *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, Fsa = *Fusarium solani* de algodão, Fsf = *Fusarium solani* de feijão. Gel agarose 2%. Fragmento evidenciado pelo retângulo branco foi clonado e sequenciado.

Após comparação das sequências obtidas para os fragmentos específicos de Fov com sequências genômicas de 11 linhagens de *F. oxysporum* disponíveis no *Fusarium* Comparative Database, foram desenvolvidos dois pares de iniciadores potencialmente específicos para Fov: FOV-F (5'- GCTCAGGATGTTGAACTTTC - 3') e FOV-R (5'- GGTAAGGTAGAGTTGAGTGAGTAAA- 3') e Fov-R7-F - (5'- GGTGATACTATATTTTCGCAATC-3') e Fov-R7-R - (5'-GGCTTCTAGTATCTATGGGATC-3').

A PCR utilizando os iniciadores específicos FOV-F e FOV-R resultou na amplificação de um fragmento com aproximadamente 330 pares de bases, nos 15 isolados de Fov, entretanto, 3 isolados de Fop também apresentaram amplificação (Figura 15), mostrando que estes iniciadores não apresentam especificidade para *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*.

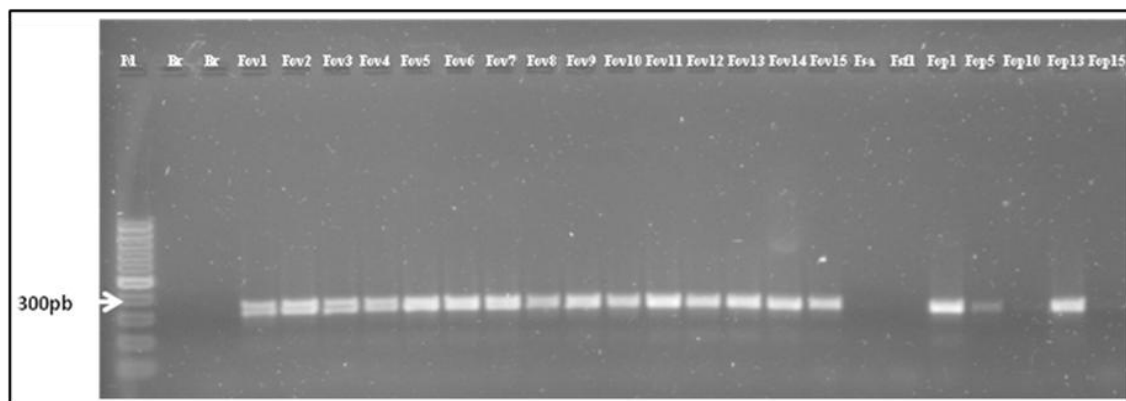


Figura 15. PCR com os iniciadores FOV-F e FOV-R, desenhados para *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* a partir de fragmento específico obtido por RAPD. Pd= Padrão 100 pb DNA ladder, Br= Branco, Fop= *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, Fov= *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e Fs= *Fusarium solani*. Gel de agarose 2%.

Com os iniciadores Fov-R7-F e Fov-R7-R, a PCR resultou na amplificação de um fragmento de 356 pb para todos os isolados de Fov, exceto Fov 3, assim como para isolados de Fop e de outras espécies de *Fusarium*, mostrando também que estes iniciadores não apresentam especificidade para *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Figura 16).

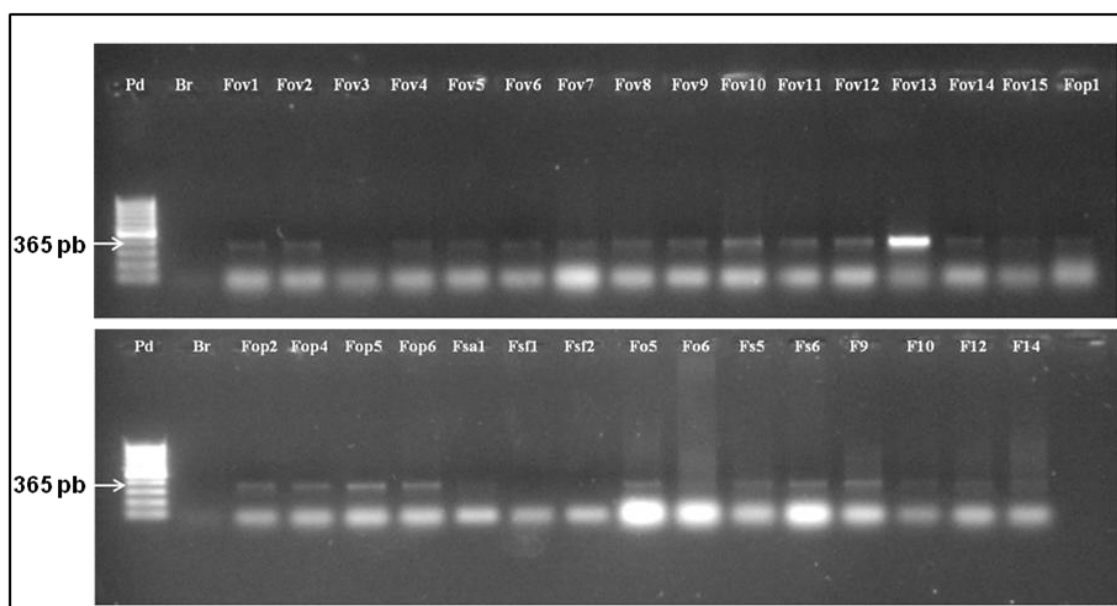


Figura 16. PCR com os iniciadores Fov-R7-F e Fov-R7-R, desenhados para *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* a partir de fragmento específico obtido por RAPD. Pd= Padrão 100 pb DNA ladder, Br= Branco, Fov= *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, Fop= *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, Fsa= *Fusarium solani* de algodão, Fsf= *Fusarium solani* de feijão, Fs= *Fusarium solani*, Fo= *Fusarium oxysporum* e F= *Fusarium* sp. Gel de agarose 2%,

Esta técnica, segundo Kohn (1992), é apropriada para estudar organismos abaixo do nível de espécie, entretanto possui baixa reprodutibilidade, o que limita sua utilização para

fins de diagnose, mas tem sido utilizada como estratégia para selecionar fragmentos de DNA, que após clonagem e sequenciamento, podem gerar iniciadores específicos.

Apesar do insucesso na obtenção de iniciadores específicos para Fov através de RAPD no presente estudo, outros autores aplicaram esta técnica com sucesso para a distinção de linhagens de fungos em nível infra-específico. Silva-Mann et al. (2002) foram capazes de distinguir os fungos patogênicos ao algodoeiro *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* a partir de RAPD empregando o iniciador randômico OPC 15. Alves-Santos et al. (2002) desenvolveram um par de iniciadores específicos para *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* capaz de distinguir esta forma *specialis* de outras da mesma espécie, a partir de RAPD empregando o iniciador randômico OPC 18.

4.6 Avaliação da visão dos produtores de algodão sobre a importância da murcha do algodoeiro e da sanidade das sementes

O questionário aplicado na região de Paranapanema, SP, foi respondido por 14 produtores de algodão.

Estes produtores estão atuando no mercado por diferentes períodos, variando de 6 a 46 anos. O período que mostrou a maior quantidade de produtores foi o de 31 a 40 anos, totalizando cinco produtores (Figura 17). Pode-se considerar que a maior parcela destes produtores possui prolongada experiência com a cultura do algodão.

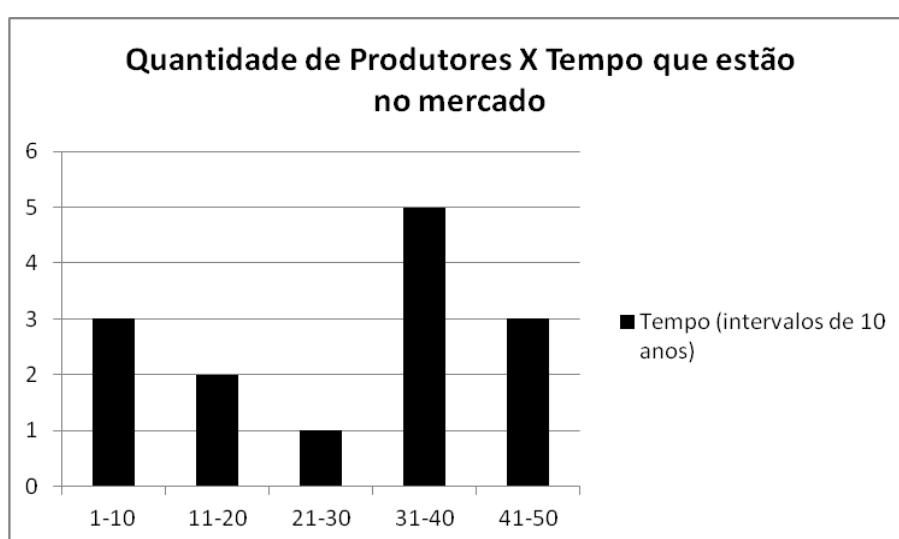


Figura 17. Tempo de atuação no mercado pelos produtores de algodão da região de Paranapanema, SP.

O caroço e a pluma de algodão são os principais produtos produzidos pelos produtores entrevistados, posteriormente, esses produtos são vendidos para cooperativas na região de Paranapanema.

As cultivares utilizadas pelos produtores para o plantio são FiberMax (FM) 966LL, 910, 951LL, 975WS e 993, variedades comerciais da Bayer (Figura 16). Essas cultivares possuem níveis de resistência ou susceptibilidade variáveis para as principais doenças da cultura (Tabela 7) (VILELA; BELOT; MORELLO, 2012).

Os dados fornecidos por Vilela, Belot e Morello (2012), não informam se as variedades FiberMax são resistentes ou suscetíveis a Murcha do *Fusarium*, porém as cultivares FM 910 e FM966LL são medianamente suscetível e suscetível, respectivamente, a nematoides. Segundo Hoffmann et al. (2003), o complexo *Fusarium*-nematóide prejudica ainda mais a cultura, tornando a doença mais severa. Os nematoides provocam ferimentos nas raízes e debilitam a planta, tornando-a mais acessível à penetração do patógeno no sistema radicular. Dessa forma, as cultivares FM 910 e FM966LL, que são as mais utilizadas pelos produtores de algodão entrevistados (Figura 18), também podem ser suscetíveis a murcha do *Fusarium*.

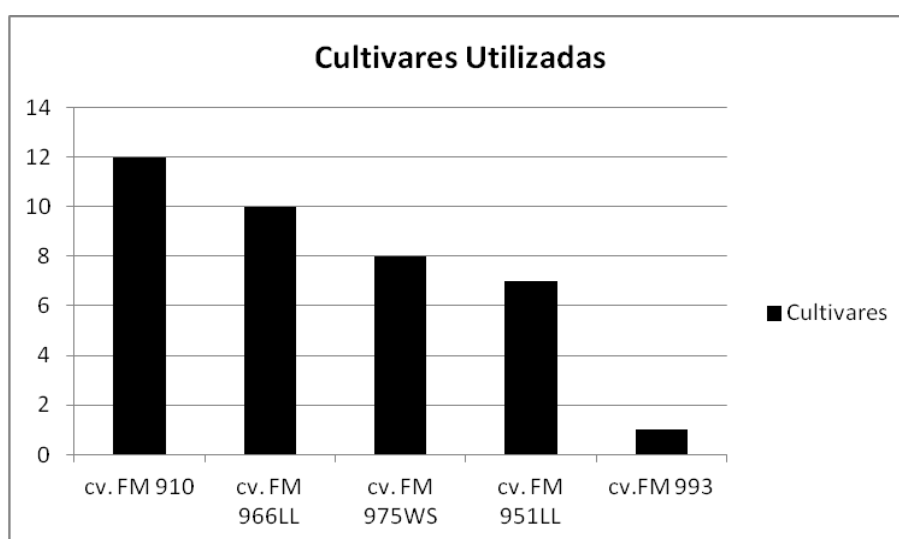


Figura 18. Cultivares mais utilizadas pelos produtores de algodão da região de Paranapanema, SP.

Tabela 7: Reação a doenças de acordo com as variedades comerciais da Bayer, descritas por Vilela, Belot e Morello (2012).

DOENÇAS	CULTIVARES				
	FM 910	FM 993	FM 951LL	FM966LL	FM 975WS
Bacteriose	R	R	R	R	R
Doença Azul	R	R	R	S	R
Ramulose	MS	MS	SI	MS	SI
Ramulária	S	S	SI	MR	SI
Nematoides	MS	MR	SI	S	SI
Podrião de Cápsulas	SI	SI	SI	SI	SI

FM= FiberMax, R= Resistente, MR= Medianamente resistente, MS= Medianamente suscetível, S= Suscetível e SI= Sem informação.

Quando foi perguntado aos entrevistados se conheciam a Murcha do *Fusarium* e os possíveis danos que a doença pode causar, 93% responderam que sim e 7% que não (Figura 19).

No que se refere à constatação da Murcha do *Fusarium*, no campo, 57% responderam que sim e 43% responderam que não (Figura 20). Embora a maioria dos produtores já tiveram problemas com a doença apenas um produtor teve prejuízos econômicos, porém foi relatado que fungo estava presente no resto de palhada de cevada que se encontrava no campo, não sendo um problema de sementes contaminadas, segundo o produtor. Os demais produtores entrevistados conseguiram controlar a doença a tempo sem terem prejuízos econômicos.

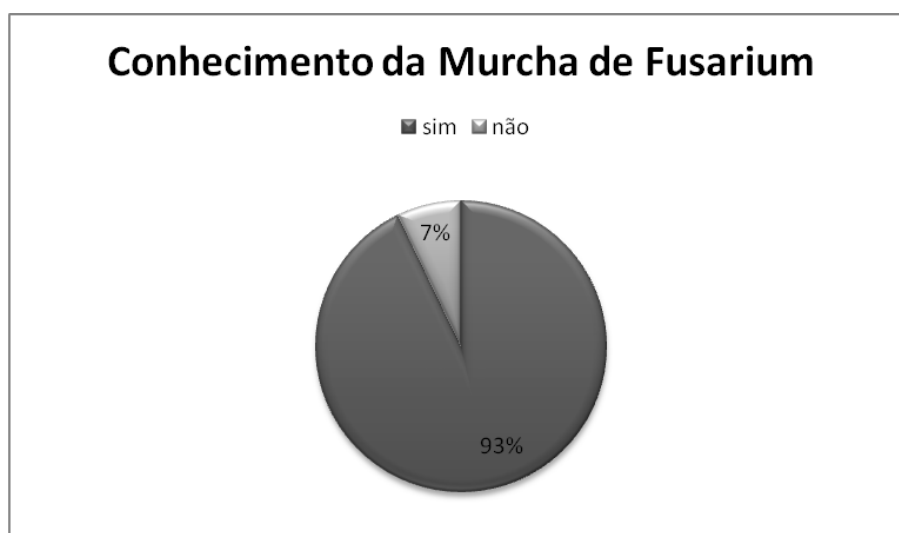


Figura 19. Conhecimento da Murcha de *Fusarium*, por produtores de algodão da região de Paranapanema, SP (n = 14).

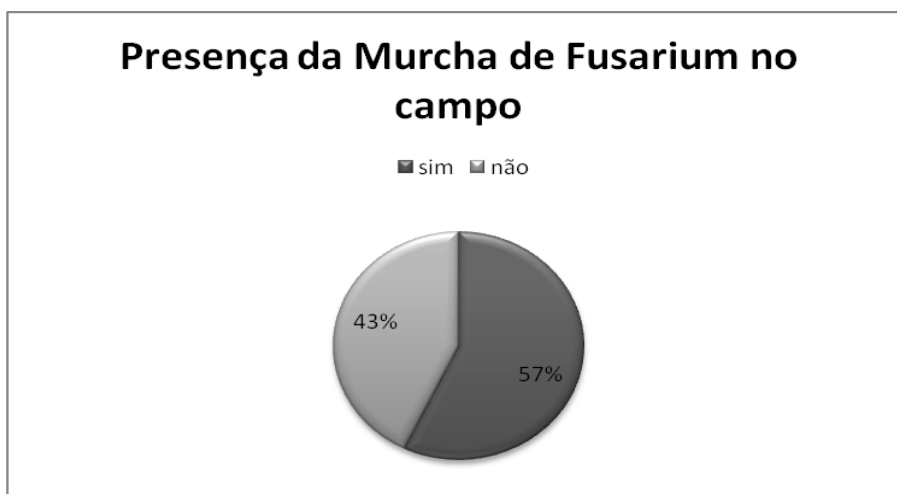


Figura 20. Presença da Murcha de *Fusarium* em propriedades na região de Paranapanema, SP (n = 14).

Quanto ao procedimento utilizado para o controle da Murcha de *Fusarium*, os produtores afirmaram utilizar principalmente a prevenção. Todos os entrevistados responderam que utilizam sementes saudáveis, tratadas, certificadas e/ou resistentes para prevenir a doença, além de realizarem a rotação de cultura e monitoramento semanal.

5. CONCLUSÕES

- A diferenciação *F. oxysporum* f. sp. *vasinfetum* de outras espécies de *Fusarium* não é confiável quando se utiliza como critérios as características de tipo, coloração e crescimento micelial em meios de cultura BDA e Czapek, havendo necessidade do uso de técnicas moleculares;
- A comparação das sequências obtidas para o gene EF e regiões ITS e IGS não permitiram o desenvolvimento de iniciadores específicos para Fov devido ao compartilhamento de sequências por formas especiais distintas;
- Análises filogenéticas com base no gene EF e na região IGS sugerem origem polifilética para isolados de Fov;
- A especificidade dos iniciadores desenvolvidos por Moricca et al. (1998) e por Zambonis, Paplomatas e Tsiftaris (2007), não foram confirmadas com os isolados de Fov utilizados no presente estudo;

- Não foi obtido sucesso no desenvolvimento de iniciadores específicos para Fov a partir da análise de RAPD;
- Os iniciadores específicos desenvolvidos por Alves-Santos et al. (2002) diferenciam *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* de outras espécies de *Fusarium* e formaes especiales, incluindo f. sp. *vasinfectum*;
- Produtores de algodão da região de Paranapanema, SP, têm conhecimento da Murcha de *Fusarium* e, apesar de utilizarem métodos preventivos para evitar a doença, esta ocorre em mais da metade das propriedades, no entanto, a maioria consegue controlar a doença.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELSALAM, K. A.; OMAR, M. R.; MIGHELLI, Q.; NIRENBERG, H. I. Genetic characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* isolates by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and amplified fragment length polymorphism (AFLP). **Journal of Plant Diseases and Protection**, (6), p. 534-344, 2004.

ALVES-SANTOS, F.M.; RAMOS B.; GARCÍA-SÁNCHEZ, M. A; ESLAVA, A.P.; DÍAZ-MÍNGUE, J.M. A DNA-Based procedure for in planta detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Epidemiology**, v.92, n.3, p.237-244,2002.

APARECIDO, C. C.; EGYDIO, A. P. M.; FIGUEIREDO, M. B. Avaliação de três métodos para preservação de fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 4, p. 421-424, 2001.

AOKI, T., O'DONNELL, K., HOMMA, Y., LATTANZI, A.R. 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**, v. 95, p.660–684, 2003.

ARAÚJO, A. E.; SUASSUNA, N. D. Guia de Identificação e Controle das Principais Doenças do Algodoeiro no Estado de Goiás. Campina Grande: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2003. 44p. (Comunicado Técnico 113). Disponível em : <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/272982/1/DOC113.PDF>>. Acesso em : 7 jun. 2012.

ASSIGBETSE, K. B.; FERNANDEZ, D.; DUBOIS, M. P.; GEIGER, J. P. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* Races on Cotton by Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) Analysis. **Molecular Plant Pathology**, v. 84, n. 6, p.622-626, 1994.

Associação Brasileira dos Produtores de Algodão (ABRAPA). O algodão no mundo. 2012. Disponível em: <http://www.abrapa.com.br/estatisticas/Paginas/Algodao-no-Mundo.aspx>. Acesso em: 12 jun. 2012.

ATKINSON, G. F. Some diseases of cotton. **Alabama Agric. Exp. Station Bull.**, 41:3-65. 1892.

BARROCAS, E. N. **Efeitos de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes e plantas de algodoeiro e detecção de *Stenocarpella* sp. em sementes de milho infectadas usando a polimerase chain reaction (PCR)**. 2008. 107p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

BATISTA, M.F. Métodos moleculares para a identificação de patógenos. *Rev. Annu. Patol. Plantas*, v.1, p.165-96, 1993.

BELTRÃO, N. E. M.; AZEVEDO, D. M. P. **O Agronegócio do Algodão no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 570 p., 2008.

BLASINGAME, D. J.; PATEL, M.V . Cotton diseases and their causal agents. In: KIRKPATRICK, T. L. e ROTHROCK, C. S. (Ed.). **Compendium of cotton diseases**. Second. St. Paul: The american Phytopathological Society, 2001. p. 7-8

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 200p. 2009.

BUSO, G.S.C. Marcadores Moleculares e Análise Filogenética. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, 22p, 2005.

CIA, E. ; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro (*Gossypium* spp.). In: BERGAMIM FILHO, A. et al. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2: Doenças das plantas cultivadas, 2005. p. 33-63.

CIA, E.; et al. Resistência Genética a Doenças e Nematóides em Genótipos de Algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 31, n.4, p.323-326, 2005.

COSTA, S.R.; BUENO, M.G. **A Saga do Algodão: Das Primeiras Lavouras à Ação na OMC**. Rio de Janeiro: Insight Engenharia, 2004, 144p.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983.

DESLANDES, J. A. A "murcha" ou "queima" do algodoeiro. **Revista de Agricultura**, 13 (10,11,12): 511-514, 1938.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Algodão. Cultivo do Algodão Herbáceo na Agricultura Familiar. 2006. Disponível em :

http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoAgriculturaFamiliar_2ed/importancia.html. Acesso em: 13 set. 2012.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Algodão. Cultura do Algodão no Cerrado. 2003. Disponível em :
<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoCerrado/index.htm>. Acesso em: 13 set. 2012.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 2.ed., 1995, 220p.

FIGUEIREDO, M.B. Estudos sobre a aplicação do método de castellani para preservação de fungos patógenos em plantas. **O Biológico**, São Paulo, v.33. p. 9-13, 1967.

FUNGARO, M.H.P. **PCR na Micologia**. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, V.14, P.12-16, 2000.

GRUERE, A. World cotton outlook. In: INTERNATIONAL COTTON CONFERENCE, 9., 2007. 2Gdansk - Polony. **Anais ...** Gdansk - Polony: ICAC - International Cotton Advisory Committee. p. 1-8.

HOFFMANN, L.V.; et.al. Metodologias para Análise de Isoenzimas e Extração de DNA de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Campina Grande: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2003. 4p. (Comunicado Técnico 175). Disponível em :
<<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/275955/1/COMTEC175.PDF>>. Acesso em : 15 ago.2012.

Index Fungorum. Search Index Fungorum. 2008. Disponível em:
<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>. Acesso em: 01 fev. 2013.

ITO, M.F.; et al. Variabilidade Fisiológica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p.270-271, 1997.

JULIATTI, F. C.; RUANO, O. **Controle de doenças. Doenças causadas por fungos e bactérias**. In : VALE, F.X.R. & ZAMBOLIM L. Controle de doenças de plantas .Grandes Culturas. Vol. 2. UFV, Departamento de Fitopatologia, Brasília, Distrito Federal : Ministério da agricultura e do abastecimento, 1997, p. 555-570.

KIMATI, H. Doenças do Feijoeiro – *Phaseolus vulgaris* L. In: GALLI, F. et al. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2: Doenças das plantas cultivadas, 1980. p. 297-318.

KOHN, L.M. Developing new characters for fungal systematics: An experimental approach for determining the rank of resolution. **Mycologia**, v.84, p.139-53, 1992.

KRUG, H.P. Fusarium como causador da murcha do algodoeiro no Brasil. **Anais. REUNIÃO DE PHYTOPATHOLOGISTAS DO BRASIL**, Rio de Janeiro. 1936. p.319-321.

MA, L.J., et al. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. **Nature**, v.464, p.367–373, 2010.

MACHADO, A.Q.; et al. Distribuição, Transmissibilidade e Controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em Algodoeiro no Estado do Mato Grosso. **Ciências Agrárias e Biológicas - UNIVAG**, Várzea Grande, 36p, 2005.

MACHADO, L.P. Seleção de Resistência para á Murcha-de-Fusário em Genótipos de Algodoeiro. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco: Recife, 2008.

MACIEL, C.G. ***Fusarium sambucinum* Associado a sementes de *Pinus elliottii*: Patogenicidade, Morfologia, Filogenia Molecular e Controle**. 2012. 94p. Tese (Mestrado em Proteção Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Santa Maria, RS, 2012.

MARTINS, M.K. **Variabilidade Genética de Isolados de *Fusarium* spp. e estudos da Interação com Planta Hospedeira**. 2005. 110p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2005.

MENEZES, J.P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z.I.; BLUME, E.; JUNGES, E.; MANZONI, C.G.; Variabilidade Genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 132-139, 2010.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Algodão. 2012. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/vegetal/culturas/algodao>. Acesso em: 13 set. 2012.

MORICCA, S.; et al. Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in cotton tissue by polimerase chain reaction. **Plant Pathology**, v.47, p.486-494, 1998.

NEEGAARD, P. **Seed Pathology**. London: The Macmillan Press, V.1, 1977. 839 p.

NELSON, P. F.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification**. University Park and London. USA: The Pennsylvania State University; 1983.

NEVES, O. S. Algodão no Mundo. In: NEVES, O. S. et al. **Cultura e Adubação do Algodoeiro**. São Paulo: Peri Ltda, 1965. p. 13-54.

O'DONNELL et al. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v.46, p. 936–948, 2009.

O'DONNELL K.; KISTLER H.C.; CIGELNIK E.; PLOETZ R.C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings National Academy of the Science, USA**, v.95, p. 2044-2049, 1998.

PARRY, D.W.; NICHOLSON, P. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. **Plant Pathology**, v. 45, p.383-391, 1996.

PASQUALI, M.; PIATTI, P.; GULLINO, M.L.; GARIBALDI, A. Development of a real-time polymerase chain for the detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* from basil seed roots. **Journal of Phytopathology**, v.154, p.632-636, 2006.

PENNA, D.S.A. Análise da Diversidade Morfológica e Genética de Isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok e Avaliação da Virulência em *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). 2012. 52p. Tese (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, São Paulo, 2012.

PERES, A.P.; SILVA-MANN, R.; VIEIRA, M.G.G.C.; MACHADO, J.C. Variabilidade Morfocultural e Genética de Fungos Associados a Podridão Peduncular do Mamão. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.5, Lavras, 2003.

PRYOR, B.M., GILBERTSON, R.L. A PCR based assay for detection of *Alternaria radicina* on carrots seed. *Plant Dis.*, v.85, p.18-23, 2001.

RAMOS, B.; ALVES-SANTOS, F. M.; GARCÍA-SÁNCHEZ, M. A.; MARTÍN-RODRIGUES, N.; ESLAVA, A. P.; DÍAZ-MÍNGUEZ, J. M. The gene coding for a new transcription factor (ftf1) of *Fusarium oxysporum* is only expressed during infection of common bean. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, p. 864–876, 2007.

ROSA, R.C.T.; MENEZES, M. Caracterização Patogênica, Fisiológica e Morfológica de *Pseudocercospora musae*. **Fitopatologia Brasileira**, vol.26, n.2, Brasília, 2001.

RUANO, O. **Resistência do algodoeiro (*Gossypium spp.*) a *Meloidogyne incognita* (kofoid & White) Chitwood, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfestum* (ATK) Snyder & Hanson e a associação desses organismos.** 1984. 19 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1984.

SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings National Academy of the Science**.v.74, p.5463-5467, 1977.

SCHILLING, A.G.; MÖLLER, E.M.; GEIGER, H.H. Polymerase Chain Reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. avenaceum*. **Phytopathology**, 86:5, p.515-522, 1996.

SCHMITZ A.; RIESNER D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Anal Biochem**, vol. 354, p.311–313, 2006.

SILVA-MANN, R., SALGADO, K.C.C., VIEIRA, M.G.G.C. & MACHADO, J.C. Variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por

meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. **Fitopatologia Brasileira**, 27, P. 027-032. 2002.

SMITH, O.P., PETERSON, G.L., BECK, R.J., SCHAAD, N.W., BONDE, M.R. Development of a PCR-based method for identification of *Tilletia indica*, causal agent of carnal bunt of wheat. **Phytopathology**, v.86, p.115-222, 1996.

STAKMAN, E.C.; HARRAR, J.G. **Principles of the Plant Pathology**. New York: The Ronald Press Company, 1957. 581p.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p.2731-2739, 2011.

TANAKA, M.A.S. Técnicas Auxiliares em Laboratório de Patologia de Sementes. In: SOAVE, J; WENTZEL, M.M.V.S. (Ed.). **Patologia de Sementes**. Campinas/SP, p. 313-330, 1987.

VAN DER DOES, H. C.; LIEVENS, B.; CLAES, L.; HOUTERMAN, P. M.; CORNELISSEN, B. J. C.; REP, M. The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1475–1485, 2008.

VECHIATO, M.H. **Detecção e Identificação de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes de soja por PCR**. 2002. 115p. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2002.

VILELA, P. M. C. A.; BELOT, J. L.; MORELLO, C. L. Escolha da Variedade: **Manual de Boas Práticas**. Instituto Mato-Grossense do Algodão, p. 3-10, 2012.

WHITE T.J.; BRUNS T.D.; LEE S.; TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ eds. **PCR protocols, a guide to methods and applications**. San Diego, California: Academic Press. p315-322, 1990.

ZAMBOUNIS, A. G.; PAPLOMATAS, E.; TSAFTARIS, A.S. Intergenic Spacer–RFLP Analysis and Direct Quantification of Australian *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* Isolates from Soil and Infected Cotton Tissues. 2007. **Plant Diseases**, v.91, n.12, p.1564-1573, 2007.

ZHANG, A. W. , HARTMAN, G.L., RICCIONI, L., CHEN, W. D., MA, R.Z., PEDERSEN, W. L. Using PCR to distinguish *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from other soybean fungal pathogens and to detect them in soybean tissues. **Plant Dis.**, v.81, p.1143-9, 1997.



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



GOVERNO DO ESTADO DE
SÃO PAULO
TRABALHANDO POR VOCÊ