

Reação de cultivares comerciais de feijoeiro comum a isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Reaction of commercial cultivars of common bean to *fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Reacción de cultivares comerciales de frijol comercial a *fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Recebido: 12/08/2020 | Revisado: 21/08/2020 | Aceito: 25/08/2020 | Publicado: 29/08/2020

Mariana Magesto de Negreiros

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3612-8247>

Universidade Estadual de Maringá, Brasil

E-mail: marianamagesto@gmail.com

Anderson Roberto Benedetti

ORCID: <https://orcid.org/00000-0001-6523-3196>

Universidade de São Paulo, Brasil

E-mail: abenedetti@usp.br

Bruna Martins Carvalho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7625-5769>

Universidade Estadual do Norte do Paraná, Brasil

E-mail: bruh_bmc@hotmail.com

Aline Garcia da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7625-5769>

Universidade Estadual do Norte do Paraná, Brasil

E-mail: aline.uenp@hotmail.com

Mayra Costa da Cruz Gallo de Carvalho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1559-3828>

Universidade Estadual do Norte do Paraná, Brasil

E-mail: mayra@uenp.edu.br

João Pereira Torres

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7306-9872>

Universidade Estadual do Norte do Paraná, Brasil

E-mail: jptorres@uenp.edu.br

Resumo

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é cultivado em todo território nacional e representa a principal fonte de proteína vegetal na alimentação do brasileiro. Entretanto, a produção dessa cultura é afetada por fatores bióticos e abióticos com destaque para as doenças. A murcha de *Fusarium*, doença causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop), está entre as principais doenças desta cultura. O método mais eficiente para seu controle é a utilização de cultivares resistentes, no entanto, o desconhecimento da variabilidade genética e fisiológica do patógeno dificulta o desenvolvimento de cultivares resistentes pelos programas de melhoramento. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar a reação das principais cultivares comerciais de feijoeiro comum quanto a resistência a diferentes isolados de Fop. O banco de isolados monospóricos foi obtido a partir de plantas de feijão com sintomas da doença em áreas produtoras. Os isolados foram identificados morfológicamente e molecularmente por PCR. 14 cultivares comerciais de feijão foram inoculadas com 5 isolados monospóricos distintos e avaliadas quanto a severidade da murcha utilizando a escala proposta pelo CIAT. No geral, as cultivares comerciais de feijão comum avaliadas apresentaram reação de resistência e resistência intermediária frente aos isolados estudados sugerindo que possivelmente o marcador PCR-SCAR não tenha sido eficiente no diagnóstico da virulência do patógeno e que as cultivares testadas possam ter sido melhoradas não intencionalmente para a resistência a murcha de *Fusarium*.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*; Murcha de *Fusarium*; Resistência; Variabilidade patogênica.

Abstract

Common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) are grown throughout the country and represent the main source of vegetable protein in the Brazilian diet. However, its production is strongly affected by biotic and abiotic factors, especially by diseases. *Fusarium* wilt, a disease caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop), is among the main diseases of this culture. The most efficient method for its control is the use of resistant cultivars, however, the lack of knowledge of the genetic and physiological variability of the pathogen hinders the development of resistant cultivars by breeding programs. In this sense, the objective of the present work was to characterize the reaction of the main commercial cultivars of common bean regarding resistance to different isolates of Fop. The bank of monosporic isolates was obtained from bean plants with symptoms of the disease in producing areas. The isolates were identified morphologically and molecularly by PCR. 14 commercial bean cultivars were

inoculated with 5 distinct monosporic isolates and evaluated for wilt severity using the scale proposed by CIAT. In general, the commercial common bean cultivars evaluated showed resistance and intermediate resistance reactions to the studied Fop isolates, suggesting that possibly the PCR-SCAR marker was not efficient in the diagnosis of pathogen virulence and that the tested cultivars may have been unintentionally improved for *Fusarium* wilt resistance.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*; *Fusarium* wilt; Resistance; Pathogenic variability.

Resumen

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) se cultiva en todo el país y representa la principal fuente de proteína vegetal en la dieta brasileña. Sin embargo, la producción de este cultivo se ve afectada por factores bióticos y abióticos, especialmente enfermedades. Marchitez por *Fusarium*, una enfermedad causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop), se encuentra entre las principales enfermedades de esta cultura. El método más eficiente para su control es el uso de cultivares resistentes, sin embargo, el desconocimiento de la variabilidad genética y fisiológica del patógeno dificulta el desarrollo de cultivares resistentes mediante programas de mejoramiento. En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar la reacción de los principales cultivares comerciales de frijol común respecto a la resistencia a diferentes aislamientos de Fop. El banco de aislamientos monospóricos se obtuvo de plantas de frijol con síntomas de la enfermedad en áreas productoras. Los aislados se identificaron morfológicamente y molecularmente mediante PCR. Se inocularon 14 cultivares comerciales de frijol con 5 aislados de monosporas distintos y se evaluó la severidad del marchitamiento usando la escala propuesta por el CIAT. En general, los cultivares comerciales de frijol común evaluados mostraron reacción de resistencia y resistencia intermedia en comparación con los aislados estudiados, lo que sugiere que posiblemente el marcador PCR-SCAR no fue eficiente para diagnosticar la virulencia del patógeno y que los cultivares probados pueden haber sido mejorados involuntariamente. La resistencia al marchitamiento por *Fusarium*.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris*; Marchitez por *Fusarium*; Resistência; Variabilidade patógena.

1. Introdução

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a leguminosa de maior importância na alimentação humana mundial (Meziadi, et al., 2015). O Brasil é o terceiro maior produtor de feijão do mundo e o primeiro consumidor deste grão (CONAB, 2018). Apesar da reconhecida importância social e econômica do feijão no país, a produtividade média da cultura está muito abaixo do potencial produtivo das cultivares. O ambiente favorável ao desenvolvimento de patógenos associado à falta de práticas preventivas faz com que as doenças fúngicas afetem o desenvolvimento do feijoeiro (Wendland, et al., 2012).

A produção de grãos secos pode ser reduzida na ordem de 80% a 100% (Costa, et al., 2003) devido à murcha vascular que está associada às doenças causadas por *Fusarium* (Toledo-Souza, et al., 2012). A murcha de *Fusarium* é causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* Schlecht. f.sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder (Fop) o qual encontra-se presente no solo de diferentes regiões produtoras (Toledo-Souza, et al., 2012; Wordell Filho, et al., 2013). O patógeno sobrevive em resíduos de culturas na forma de clamidósporos, que são estruturas de resistência. Uma vez que o patógeno é introduzido na área produtora, dificilmente é eliminado por práticas culturais. Outro ponto muito importante é a perda excessiva de sementes devido à contaminação por Fop, já que quase 14% das sementes precisam de tratamento com fungicidas (Santos, et al., 1996).

A prática de controle mais viável e eficaz é a utilização de cultivares melhoradas geneticamente para resistência (Pereira, et al., 2009; Toledo-Souza, et al., 2012). O sucesso de cultivares resistentes, entretanto, depende do conhecimento dos genótipos disponíveis, dos mecanismos genéticos que desencadeiam a resistência e/ou a virulência e agressividade do patógeno (Paula Júnior, et al., 2015). Até o momento pouco se conhece sobre a virulência do Fop, o que se sabe, é que a família de genes efetores SIX está correlacionada a patogenicidade (Taylor, et al., 2016), pequenas proteínas efetoras são secretadas durante a colonização e fazem com que as vias hormonais e as respostas de defesa do hospedeiro sejam alteradas (Ma, et al., 2010; Lanubile, et al., 2016; Cziślowski, et al., 2018). No que tange a resistência do feijão a murcha de *Fusarium*, não há até o momento genes R identificados, embora o controle genético da resistência a murcha já tenha sido caracterizado como efetivo por um alelo de efeito dominante nas cultivares Tenderette, Early Gallatin e Pintado, um gene com dominância incompleta na cultivar Preto Uberabinha (Ribeiro & Hagedorn, 1979a) e oligogênico com um gene de efeito maior com dominância incompleta nas cultivares

Milionário 1732 e FT-Tarumã (Cândida, et al., 2009). Pereira et al. (2009) de forma semelhante concluiu que poucos genes devem governar a resistência a murcha de *Fusarium* dada a elevada herdabilidade da característica.

Inicialmente, sete raças geográficas de Fop foram identificadas, raça 1 na Carolina do Sul (Ribeiro & Hagedorn, 1979a), raça 2 que inclui isolados brasileiros (Ribeiro & Hagedorn, 1979b), raça 3 presente na Colômbia (Salgado, et al., 1995), raça 4 no Estado de Colorado (Salgado & Schwartz, 1993), raças 5 e 7 na Grécia (Woo, et al., 1996; Alves-Santos, et al., 2002) e raça 6 na Espanha (Alves-Santos, et al., 2002). Até 2002 todos os isolados patogênicos do Brasil foram identificados como pertencentes a raça 2 (Woo, et al., 1996; Jiménez-Gasco, et al., 2002), mas atualmente há muita discussão sobre as metodologias adequadas para definição das raças fisiológicas de Fop e assim, certamente, um número muito maior de raças tem sido considerado. Henrique et al. (2015) sugeriram a ocorrência de 27 raças fisiológicas entre os isolados brasileiros considerando sua reação em cultivares de feijão comum. Assim, atualmente considera-se que haja uma alta variabilidade genética de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* o que certamente dificulta o melhoramento para a resistência no feijão.

Objetivou-se no presente estudo produzir e identificar isolados monospóricos de Fop altamente virulentos e caracterizar a reação de cultivares comerciais frente a inoculação. Ao contrário do esperado, as cultivares foram em sua maioria resistentes ou apresentaram resistência intermediária aos isolados molecularmente identificados como altamente virulentos.

2. Metodologia

Obtenção e caracterização dos isolados de Fop

Plantas de feijoeiro com sintomas típicos da murcha de *Fusarium* foram coletadas em lavouras comerciais da região de Planaltina (Minas Gerais), em áreas de pesquisa do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR/Londrina - Paraná) e em Arapotí (Paraná). Para a obtenção do inóculo inicial de Fop, utilizou-se o método de isolamento de patógenos de raízes das seis plantas com sintomas típicos de murcha de *Fusarium* como escurecimento de raiz, folhas murchas e amareladas. Desta forma, retirou-se pequenos fragmentos do xilema presente no colo e da raiz, sempre na margem da lesão entre a região de transição de tecido doente e tecido sadio. Os fragmentos passaram por desinfestação em álcool etílico 70%, seguido de

hipoclorito de sódio a 1%, ambos por um minuto e duas lavagens seguidas com água destilada esterilizada. Os fragmentos foram transferidos para placa de petri contendo papel filtro esterilizado e na sequência foram transferidos para placas contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), incubados em B.O.D (Incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio Marconi® Modelo MA415) a 25 °C ± 1 °C até o crescimento de micélio.

Para a obtenção de culturas puras, o micélio cotonoso que cresceu ao redor dos fragmentos foi repicado em três ciclos sucessivos, armazenados sob temperatura de 25 °C ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas (Menezes & Silva-Hanlin, 1997; Leslie & Summerell, 2006). Das culturas em crescimento, seis apenas apresentaram características morfológicas evidentes (coloração miceliar, pigmentação do meio) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*: APR1 (Arapoti -PR), IPR7 (Londrina – PR), PMG2 (Planaltina – MG) e PMG5 (Planaltina – Minas Gerais). A partir destas culturas procedeu-se com o estabelecimento de 15 isoaldos monospóricas por cultura, totalizando 90 isolados. Os esporos foram individualmente depositados em meio BDA segundo a técnica de microcultivo desenvolvida por Kane et al. (1997), verificou-se por microscopia óptica a presença de um único conídio para iniciar o cultivo monospórico.

Os isolados monospóricos foram submetidos a identificação molecular utilizando os primers SCAR-B310-A280 (A280: 5'TATACCGGACGGGCGTAGTGACGATGG3' e B310: 5'-CAGCCATTCATGGATGACATAACGAATTC3'), desenvolvido por Alves-Santos et al. (2002) e os primers para identificação de *F. solani* desenvolvidos por Arif et al. (2012), ITS-F – ITS-R: ITS-F5'CCAGAGGACCCCCTAACTCT3' e ITS-R 5'CTCTCCAGTTGCGAGGTGTT3', descartando algum tipo de contaminação por este fungo. As reações de PCR foram conduzidas observando as condições de amplificação especificadas pelos autores em termociclador da marca Veriti 96 Well Thermal Cycle®. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1,2% e corados com brometo de etídeo e fotodocumentado em transluminador UV.

Paralelamente, a análise morfológica dos isolados foi realizada em meio BDA observando-se as características macromorfológicas de pigmentação da colônia e micélio aéreo e micromorfológicas relacionadas a forma dos conídeos, presença e número de septos (Leslie & Summerell, 2006). Para tanto uma suspensão de conídeos em água destilada foi depositada sobre uma lâmina e observada em microscópio óptico (100x). Em ambas análises o isolado monospórico de Fop (IAC9453), cedido em parceria com o Instituto Agrônomo de

Campinas (IAC) foi utilizado como parâmetro de controle positivo para caracterizar os isolados obtidos nesse estudo.

Ensaio de Fenotipagem dos isolados de Fop em cultivares comerciais de feijão comum

Dos isolados monospóricos obtidos selecionou-se para o ensaio de severidade quatro isolados identificados como altamente virulentos na PCR-SCAR e morfológicamente identificados como Fop sendo eles PMG2 e PMG5 (Planaltina/ Minas Gerais), IPR7 (Londrina/Paraná) e APR1 (Arapoti/Paraná).

Previamente a realização do ensaio de severidade a patogenicidade dos isolados selecionados para o experimento foi confirmada nas plantas suscetíveis das cultivares IPA6 e Rosinha G2 utilizando o isolado IAC9453, cedido pelo IAC, como controle positivo. O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Universidade Estadual do Norte do Paraná, *campus* Luiz Meneghel, cidade de Bandeirantes, Paraná, localizada à 23°06' Latitude Sul e 50°21' Longitude Oeste, com 440 m de altitude.

A severidade dos isolados foi avaliada por meio da inoculação de 14 cultivares comerciais das quais a Preto Uberabinha é considerada como padrão de resistência a raça 1 de F e IPA6 suscetível as raças 1 e 2, ambas funcionando como diferenciadoras (Nascimento, et al., 1995).

Para o preparo dos inóculos os isolados monospóricos foram cultivados em placas de Petri em meio BDA, à temperatura de 25 °C ± 1 °C, durante sete dias, para obtenção dos microconídios a partir dos quais foi feita a suspensão de inóculo. A concentração de cada suspensão foi ajustada em câmara de Neubauer, com calibração de 10⁶ conídios/ml como recomendado por Pastor-Corrales & Abawi (1987).

A semeadura das cultivares foi realizada em bandejas plásticas contendo substrato comercial, terra e areia (3:1:1), mantidas em casa de vegetação para germinação e crescimento. O sistema radicular de plântulas com as primeiras folhas expandidas (entre 6 e 8 dias depois da semeadura), foi imerso por 5 min na suspensão de inóculo (Pastor-Corrales & Abawi, 1987). Plântulas cujas raízes foram imersas em água destilada estéril serviram como testemunhas (falso inoculadas). Posteriormente, as plantas foram transplantadas em vasos plásticos, contendo terra, areia e substrato (3:1:1). Para evitar avaliações equivocadas em

relação aos sintomas visuais da parte aérea, todos os vasos receberam adubado granulado 20:10:20 (1,0g) 15 dias após a inoculação (dai).

A severidade da doença foi avaliada 30 dai com base no índice de severidade desenvolvido pelo CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), onde cultivares com média de 1,0 a 3,0 foram consideradas resistentes, de 3,1 a 6,0 intermediárias e 6,1 a 9,0 suscetíveis (Pastor-Corrales & Abawi,1987).

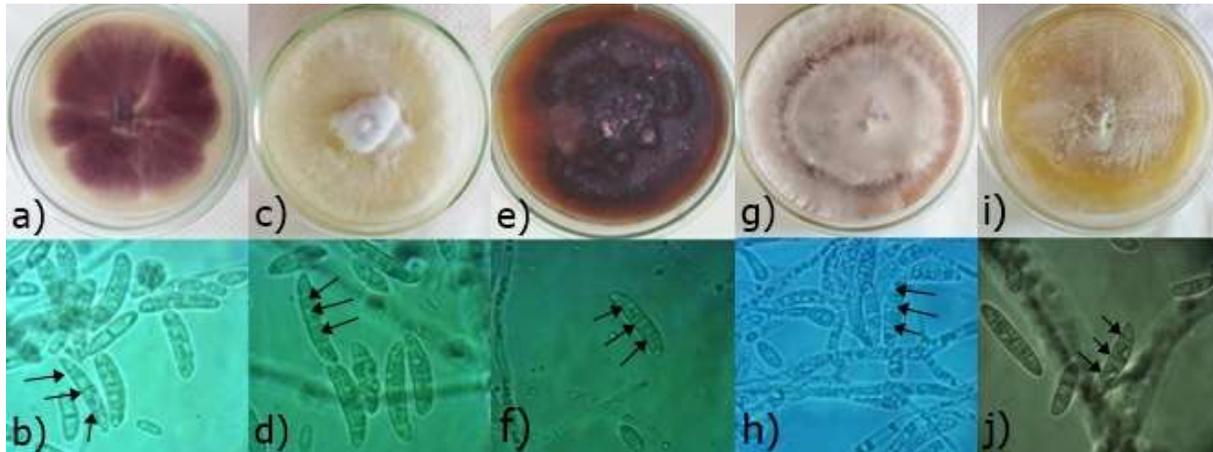
O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições por tratamento e esquema fatorial composto por 14 cultivares e 5 isolados (Henrique et al., 2015).

3. Resultados e Discussão

Dos 90 isolados obtidos a partir das culturas realizadas das 6 plantas sintomáticas coletadas a campo, 71 foram identificados como Fop a partir da análise morfológica em microscópio óptico. Todos os 15 isolados monospóricos produzidos a partir dos cultivos iniciais APR1, PMG2, PMG5 e IPR7 (Figura 1) foram identificados como Fop e 11 isolados monospóricos do cultivo inicial APR2. A análise molecular com os primers para a região ITS de *Fusarium solani* corroborou com as análises morfológicas realizadas ao microscópio óptico ao passo que todos os 75 isolados identificados ao microscópio como Fop foram negativos na PCR e os outros 18 isolados amplificaram o produto de tamanho esperado sendo, portanto, identificados como *Fusarium solani*.

Entre os isolados caracterizados como Fop foi observada grande variação na pigmentação do micélio que variou de amarelo claro a marrom-vermelho e violeta. O micélio apresentou textura cotonosa e formato arredondado de borda da colônia (Figura 1). Assim, as variações apresentadas estão de acordo com a chave a taxonômica de Kristensen et al. (2005) e os padrões associados ao Fop (Leslie & Summerell, 2006). Os isolados monospóricos produzidos mostraram macroconídios com as suas extremidades curvadas com 3 a 6 septos, característica exclusiva de Fop (Leslie & Summerell, 2006) (Figura 1).

Figura 1: Caracterização morfológica dos Isolados monospóricos de Fop. Caracterização macromorfológica das colônias formadas pelos isolados em meio BDA seguida da análise em microscópio óptico dos macro e microconídios em 100x. (A e b) isolado PGM2; (c e d) isolado PMG5; (e e f) isolado IPR7; (g e h) isolado APR1 e (i e j) isolado IAC9453. As setas indicam os septos no interior dos macroconídios.



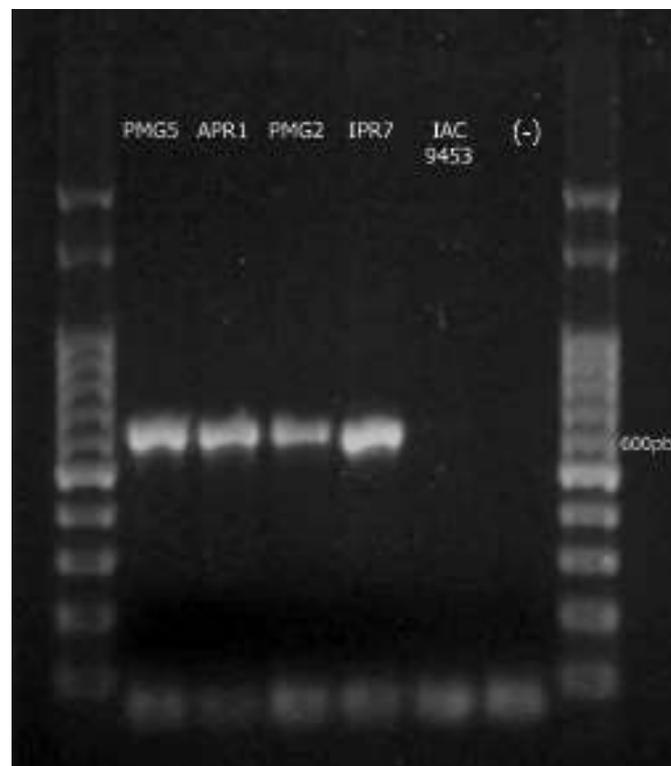
Fonte: Autores.

A falta de uniformidade em algumas das características morfológicas que se observa para o Fop associado a dificuldade que algumas técnicas apresentam para identificação de microfungos e o baixo número de características que funcionam como diferenciadores morfológicos são, sem dúvida, um grande obstáculo a identificação precisa das espécies (Leslie & Summerell 2006; Bruns, et al., 1990; O'donnell, 2009; Summerell, et al., 2010; Lievens, et al., 2008). Somado a isso, é muito comum a ocorrência de *Fusarium solani phaseoli* em associação ao Fop (Xue, et al., 2015; Borba, et al., 2017) o que torna fundamental o desenvolvimento de uma base de identificação precisa e que possa ser acessada de forma rápida sempre que necessário. Atualmente, a identificação molecular, baseada em PCR e suas variações se tornaram por esses motivos uma ferramenta fundamental no diagnóstico de fitopatógenos. No entanto, diagnóstico moleculares já estão disponíveis para algumas espécies de *Fusarium* como *Fusarium solani* (Arif, et al; 2012), várias formae speciales de *Fusarium oxysporum* (Lievens, et al., 2008), porém não há na literatura primers descritos para diagnóstico molecular de Fop. Os primers desenvolvidos por Alves-Santos, et al. (2002) destinam-se ao diagnóstico de isolados altamente virulentos em relação aos avirulentos ou pouco virulentos. Tais primers desenvolvidos inicialmente a partir da técnica de RAPD-SCAR foram posteriormente caracterizados como específicos para o gene FTF1 de

Fop (Ramos, et al., 2007) o que suporta seu uso no diagnóstico da virulência ou patogenicidade de Fop.

Quando os primers SCAR-B310 – A280 foram utilizados, todos os 15 isolados identificados como *Fusarium solani* não apresentaram amplificação do fragmento. Por outro lado, dos 71 isolados identificados como Fop os produzidos a partir dos inóculos iniciais PMG2, PMG5, IPR7 e APR1 (um total de 60 isolados monospóricos) resultaram na amplificação do fragmento esperado de 609pb (Figura 2). No entanto, o isolado IAC9453, cedido pelo IAC de Campinas (São Paulo, Brasil), não resultou na amplificação do fragmento SCARB310-A280, o que, segundo os autores, o classificaria como pouco virulento ou não virulento.

Figura 2: PCR RAPD-SCAR dos isolados de Fop. Gel de agarose a 1,5 % com produto amplificado por PCR utilizando os primers SCAR B310-A280 (609pb) (Alves-Santos, et al., 2002). Nas colunas estão identificados os 4 isolados de Fop caracterizados molecularmente como altamente virulentos: PMG2, PMG5, IPR7, APR1 e o isolado monospórico cedido pelo IAC, IAC9453. (-) controle negativo para a reação de PCR, (M) Marcador molecular 100pb.



Fonte: Autores.

No ensaio de fenotipagem estabelecido com os 4 isolados identificados como altamente virulentos (PMG2, PMG5, IPR7 e APR1), o isolado IAC9453 e 14 cultivares de feijão, as reações das cultivares aos isolados foram, em média, a esperada segundo os boletins técnicos das Instituições de origem (Tabela 1). Esse resultado é muito importante considerando que os isolados utilizados foram produzidos no presente estudo e que há diferentes isolados no ensaio. No entanto, surpreendentemente, a maior parte das reações isolado X cultivar foram classificadas como reação de resistência (aproximadamente 62%) (Figura 3 e Tabela 1). Esse resultado não era a princípio esperado já que exceto pelo isolado IAC9453, todos os demais foram positivos para a PCR-SCAR destinada a detecção de isolados altamente virulentos. Somado a isso, sabe-se que o melhoramento genético dos grupos carioca e preto vem sendo realizado pelas Instituições públicas do Brasil há mais de 30 anos buscando características outras que não a resistência a murcha de *Fusarium*, a qual passou a ser importante em todo o território nacional apenas mais recentemente.

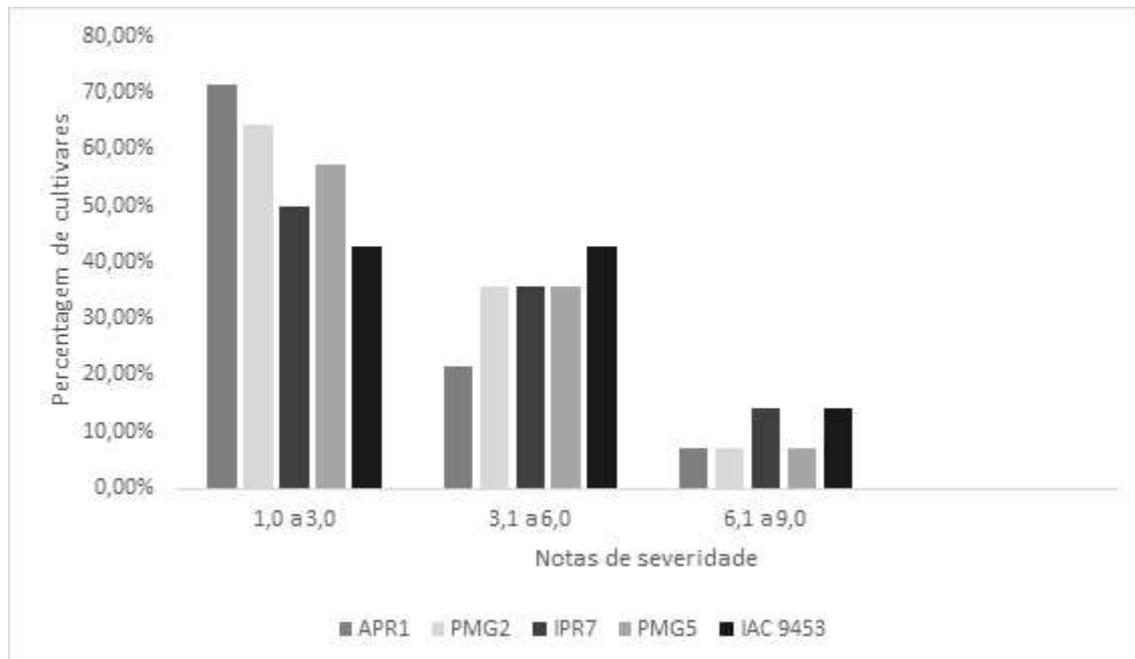
Tabela 1: Reação das cultivares de feijão comum após 30 dias da inoculação com isolados monospóricos de Fop (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*). Na primeira coluna estão listadas as cultivares utilizadas no estudo e nas demais colunas os isolados avaliados: PMG5, PMG2, IPR17, APR1 e IAC9453. Na última coluna encontra-se as informações de reação a murcha disponibilizadas pelas Instituições de origem de cada cultivar. A avaliação foi realizada segundo a escala proposta pelo CIAT onde cultivares com média de 1,0 a 3,0 foram consideradas resistentes (R), de 3,1 a 6,0 intermediárias (I) e 6,1 a 9,0 suscetíveis (S) (Pastor-Corrales & Abawi, 1987). Entre parênteses são apresentadas as médias das avaliações obtidas a partir das cinco repetições avaliadas.

Cultivares	Isolados de Fop					Reação à murcha de <i>Fusarium</i>
	PGM5	PGM2	IPR7	APR1	IAC9453	
Comerciais						
Campos Gerais	R(3)	R(2,6)	R(3)	R(2,6)	R(2,2)	IAPAR/Intermediária

Andorinha	R(3)	I(3,4)	I(4,6)	I(4,2)	I(4,6)	IAPAR/Sem informação
Saracura	R(1,8)	R(2,2)	R(3)	R(1,4)	R(1,4)	IAPAR/Intermediária
Tangará	R(1,8)	R(2,2)	R(3)	R(1,8)	I(3,4)	IAPAR/Resistente
Curió	R(3)	I(3,4)	I(4,2)	I(4,2)	R(1,4)	IAPAR/Intermediária
ANFC9	R(3)	R(2,2)	I(3,4)	R(1,8)	R(2,6)	AN/ Sem informação
Sintonia	I(6)	I(5,6)	I(5,4)	I(5,2)	I(5,4)	IAC/Intermediária
Eldorado	R(1)	R(1,8)	R(1)	R(1,4)	I(5,4)	IAPAR/Intermediária
Rosinha G2	S (6,2)	S(6,1)	S(6,3)	S(6,3)	S(6,5)	IAPAR/Suscetível
IPA6	I(4,5)	I(5,0)	S(6,5)	I(4,0)	S(7,0)	Suscetível
Preto						IAPAR/Resistente
Uberabinha	I(4,4)	I(4,2)	I(4)	I(5)	S (6,3)	
Bem Te Vi	R(1,4)	R(2,2)	R(1,8)	R(2,2)	R(1,4)	IAPAR/ Sem informação
Tuiuiú	R(1,4)	R(2,2)	R(1,8)	R(1,4)	I(3,4)	IAPAR/Resistente
Jalo	R(1,8)	R(1)	R(1,8)	R(3)	R(1,8)	Embrapa/Intermediária

Fonte: Autores.

Figura 3: Distribuição das notas de severidade das 14 cultivares de feijão comum após 30 dias da inoculação com Fop. Porcentagem de cultivares classificada de acordo com a escala CIAT como resistentes a murcha de *Fusarium* (1,0 a 3,0), intermediárias (3,1 a 6,0) e suscetíveis (6,1 a 9,0) por isolado inoculado: PMG5, PMG2, IPR7, APR1 e IAC9453.



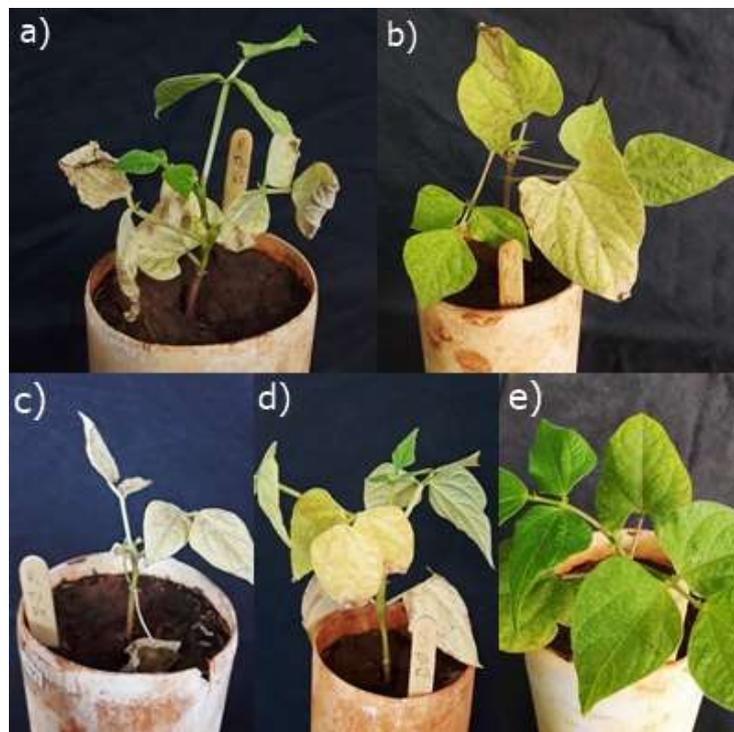
Fonte: Autores.

Por outro lado, o melhoramento genético do feijão comum destina-se frequentemente a qualidade dos grãos e como o Fop coloniza o tecido vascular causando perda de turgescência, amarelecimento e desfolha, a colonização pelo Fop prejudica o enchimento dos grãos e a produtividade. Assim, é possível supor que ao selecionar características relacionadas a produtividade nas áreas infectadas com Fop o melhorista acabará realizando melhoramento empírico para a murcha. Isso explicaria o grande número de cultivares resistentes e com resistência intermediária a doença ainda que o melhoramento intencional não tenha sido realizado. De outra forma, cultivares suscetíveis podem ser produzidas em regiões não infectadas ou em estágio ainda de reboleiras.

Pouco se conhece sobre a resistência a Fop mas estudos já realizados sugerem que a mesma possa ser monogênica (Ribeiro & Hagedorn, 1979a; Cândida, et al., 2009), oligogênica (Leitão, et al., 2020) ou ainda poligênica (Pereira, et al., 2009). A cultivar Preto Uberabinha segundo Ribeiro & Hagedorn (1979a) possui o gene denominado Fop-2 (dominância incompleta) e que confere resistência a raça 1 ou raça americana mas é suscetível

a raça brasileira ou raça 2 (Nascimento, et al., 1995). Nossos resultados revelaram reação de suscetibilidade da Preto Uberabinha apenas para o isolado IAC9453, reação intermediária para os demais isolados e nenhuma resposta de resistência (Tabela 1 e Figura 4) o que sugere que o isolado IAC9453 possa representar a raça 2 ou raça brasileira e que nenhum dos isolados produzidos nesse estudo represente a raça 1 ou raça americana mas que provavelmente outras raças estão presentes entre os isolados produzidos. A cultivar IPA6 foi também suscetível para o isolado IAC9453 (Tabela 1) o que pode sugerir que esse isolado pertença a raça brasileira (Nascimento, et al., 1995). No entanto IPA6 mostrou reação intermediária para outros isolados o que também sugere que outras raças além da 1 e 2 possam estar representadas entre os isolados.

Figura 4: Reações de feijoeiro comum 30 dias após inoculação com isolados monospóricos de Fop. a) Reação de suscetibilidade: cultivar Preto Uberabinha inoculada com o isolado IAC9453; b) Reação Intermediária: cultivar Preto Uberabinha inoculada com o isolado PMG5; c) Reação de suscetibilidade: cultivar Rosinha G2 inoculada com o isolado R; d) Reação Intermediária: Cultivar Sintonia inoculada com o isolado IAC9453; e) Reação de resistência: Cultivar Eldorado inoculada com o isolado PMG2.



Fonte: Autores.

Em um trabalho recente, Henrique et al. (2015) fenotipou a reação de cultivares a 15 isolados de Fop brasileiros entre elas as cultivares Preto Uberabinha e IPA6 as quais apresentaram tanto respostas de resistência quanto respostas de suscetibilidade aos isolados testados. Muito importante, os autores utilizaram 3 diferentes abordagens para a fenotipagem (Nascimento, et al., 1995; Woo, et al., 1996; Alves-Santos, et al., 2002) e observaram que além de não haver concordância entre as abordagens quanto ao estabelecimento das raças patotípicas entre os isolados, muitos isolados permanecem não classificados em cada sistema de classificação. Tais resultados demonstram claramente haver problemas nos sistemas de classificação bem como sugerem que a variabilidade de raças para o Fop é muito maior que a inicialmente sugerida. Os resultados alcançados no presente estudo corroboram com os previamente reportados (Henrique, et al., 2015) sugerindo que a definição de raças geográficas para Fop não é suficiente para abarcar toda a variabilidade patológica do fungo já que segundo essa definição não seria esperada variabilidade na reação das cultivares Preto Uberabinha e IPA6 aos isolados testados.

O isolado PMG5 foi o menos agressivo, resultando em resposta de resistência para 78% das cultivares ao passo que o isolado IAC9453 foi o mais agressivo resultando em reações de suscetibilidade em 14% das cultivares testadas (Figura 3). Entre as cultivares avaliadas Campos Gerais, Saracura, Bem te vi e Jalo foram resistentes a todos os isolados avaliados (Tabela 1). Pouco se conhece sobre as reações das cultivares brasileiras à murcha de *Fusarium*, os poucos relatos que dispomos estão voltados a fenotipagem de linhagens ou populações segregantes de feijão comum a um ou mais isolados de Fop (Costa, et al., 2007; Cândida, et al., 2009; Pereira, et al., 2009). Porém, em todos esses relatos observa-se variação nas reações de linhagens tanto do grupo carioca quanto do grupo preto apresentando respostas de suscetibilidade extrema até resistência. Ainda, é possível observar que uma grande parte das linhagens testadas (40 à 60%) apresenta resposta de resistência à murcha o que é explicado por alguns autores pelo predomínio da atividade de pequenos produtores no plantio do feijão que reutilizam seus grãos sucessivamente como sementes levando as cultivares altamente resistentes (Pereira, et al., 2009).

Nenhuma das cultivares avaliadas apresentou simultaneamente resposta de resistência e de suscetibilidade em função do isolado inoculado o que já era esperado visto que não conhecemos as raças às quais os isolados produzidos pertencem. No entanto, a variação de respostas R a I e S a I observada nas cultivares (Tabela 1 e Figura 4) indica que mais de uma raça foi amostrada corroborando com resultados prévios onde duas ou mais raças patotípicas

foram observadas entre isolados de Fop brasileiros (Henrique, et al., 2015; Möller, et al., 2011).

Quanto a virulência, foi surpreendente o fato de que o isolado mais virulento, IAC9453 foi o único negativo na PCR-SCAR e que todos os demais embora caracterizados pela PCR como altamente virulentos apresentaram em sua maior parte reação de resistência entre as cultivares. Os primers PCR-SCAR foram desenvolvidos a partir do isolamento de uma marca anônima exclusiva de isolados altamente virulentos em um conjunto de 50 isolados, dos quais 2 tinham origem brasileira (Alves-Santos, et al., 2002). Posteriormente foi observado que os primers flanqueiam uma região do gene FTF1 (*Fusarium* transcription fator 1) o qual relaciona-se a virulência (Ramos, et al., 2007; Niño-Sánchez, et al., 2016). Esse gene no entanto, pode estar presente em uma ou mais cópias, em cromossomos supranumerários que são transmitidos entre linhagens e parecem permitir uma grande quantidade de variação por mecanismos não meióticos (Ma, et al., 2010).

Assim, é razoável supor que marcadores desenvolvidos com base nessas regiões sejam especialmente instáveis permitindo recombinação entre a marca e a virulência. Möller et al. (2011) encontraram resultado semelhante ao passo que um dos isolados foi positivo para a PCR-SCAR e não mostrou qualquer sintoma de murcha entre as cultivares estudadas. Embora Fop não se produza por meiose, outros mecanismos para geração de variabilidade são possíveis por meio do ciclo parasexual o qual envolve a fusão de hifas, formação de células com dois núcleos e a união do material genético dos dois núcleos em uma única célula. A ocorrência desse fenômeno é comum em *Fusarium* (Ming, et al., 1966) e pode ser comum também no Fop. Cruz et al. (2018), além de identificar a ocorrência de muita variabilidade genética entre os 53 isolados de Fop estudados não conseguiu relacionar a variabilidade as regiões amostradas o que, tratando-se de um fungo de reprodução assexual pode ser explicado pela ocorrência de clones distintos em cada região e de mecanismos outros para geração de variabilidade genética.

4. Considerações Finais

Considerando que o melhoramento para a resistência a murcha de *Fusarium* é ainda incipiente, a resposta de resistência observada na maioria das reações isolado x cultivar obtida nesse estudo sugere que algum melhoramento não intencional da característica esteja ocorrendo. Não foi possível no presente estudo associar o marcador SCARB310-A280 ao

diagnóstico da virulência nos isolados amostrados o que indica que o mesmo não tenha sido eficiente na discriminação da virulência. Assim, será agora necessário ampliar o diagnóstico molecular e fenotípico dos isolados obtidos bem como investigar novos marcadores que funcionem de forma mais estável para os isolados de Fop brasileiros.

Novas pesquisas com obtenção de mais isolados, caracterizações moleculares e de patogenicidade em cultivares diferenciadoras bem estabelecidas devem ser realizadas para o melhor conhecimento deste patógeno, uma vez que o Fop apresenta alta variabilidade fisiológica e de virulência e que ainda não há métodos uniformizados para avaliação dessa variabilidade.

Referências

Alves-Santos, F.M.; Benito, E.P.; Eslava, A.P.; Díaz-Mínguez, J.M. (2002). Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. *Plant Pathology*, 51 (5), 605–611. doi: 10.1046/j.1365-3059.2002.00745.x

Arif, M.; Chawla, S.; Zaidi, M.W.; Rayar, J.K.; Variar, M.; Singh, U.S. (2012). Development of specific primers for genus *Fusarium* and *F. solani* using rDNA sub-unit and transcription elongation factor (TEF-1 α) gene. *African Journal of Biotechnology*, 11 (2), 444-447. doi: 10.5897/AJB10.489

Borba, M. C., Garcés-Fiallos, F. R., Stadnik, M. J. (2017). Reactions of black bean seedlings and adult plants to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli*. *Crop Protection*, 96, 221-227. doi: 10.1016/j.cropro.2017.02.019

Bruns, T. D., Fogel, R., Taylor, J. W. (1990). Amplification and Sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. *Mycologia*, 82 (2), 75-185. doi: 10.2307/3759846

Cândida, D.V.; Costa, J.G.; Rava, C.A.; Carneiro, M.S. (2009). Controle genético da murcha de fusário (*Fusarium oxysporum*) em feijoeiro comum. *Tropical Plant Pathology*, 34, 379-384. doi: 10.1590/S1982-56762009000600003

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. (2018). *Perspectivas para a Agropecuária*. Obtido, em <https://www.conab.gov.br/perspectivas-para-a-agropecuaria>

Costa, H., Ferrão, M. A. G., Ventura, J. A., Liberato, J. R., Pacova, B. E. V. (2003). Murcha de *Fusarium* do feijoeiro. *EMCAPA (Comunicado Técnico, 69)*. Obtido, em <https://biblioteca.incaper.es.gov.br/digital/bitstream/item/1368/1/BRT-comunicadotecnico-n69-Emcapa.pdf>

Costa, J. G. C.; Rava, C. A.; Puríssimo, J. D. (2007). Obtenção de linhagens de feijoeiro comum resistentes à murcha-de-fusário. *Revista Ceres*, 54, 447-542. Obtido em <http://www.ceres.ufv.br/ojs/index.php/ceres/article/view/3252/1147>

Czislowski, E.; Smith, S. F.; Zander, M.; O’neill, W. T.; Meldrum, R. A.; Tran-nguyen, L. T. T.; Batley, J.; Aitken, E. A. B. (2018). Investigation of the diversity of effector genes in the banana pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, reveals evidence of horizontal gene transfer. *Molecular Plant Pathology*, 19 (5), 1155–1171. doi: 10.1111/mpp.12594

Cruz, A. F., Silva, L. F., Sousa, T. V., Nicoli, A., De Paula Junior, T. J., Caixeta, E. T., Zambolim, L. (2018). Molecular diversity in *Fusarium oxysporum* isolates from common bean fields in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 152, 343–354. doi: 10.1007/s10658-018-1479-7

Henrique, F. H., Carbonell, S. A. M., Ito, M. F., Gonçalves, J. G. R., Sasserón, G. R., Chiorato, A. F. (2015). Classification of physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common bean. *Bragantia*, 74 (1), 84–92. doi: 10.1590/1678-4499.0265

Jiménez-Gasco, M. M., Milgroom, M. G., Jiménez-Díaz, R. M. (2002). Gene genealogies support *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* as a monophyletic group. *Plant Pathology*, 51, 72-77.

Kane, J.; Summerbell, R.; Sigler, L.; Kraiden, S.; Land, G. (1997). *Laboratory handbook of Dermatophytes: A Clinical Guide and Laboratory Manual of Dermatophytes and Other Filamentous Fungi*. Belmont, USA: Star Publishing Co.

Kristensen, R., Torp, M., Kosiak, B., Holst-Jensen, A. (2005). Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycological research*, 109, 173-186. doi: 10.1017/S0953756204002114

Lanubile, A., Ellis, M. L., Marrocco, A., Munkvold, G. P. (2016). Association of effector Six6 with vascular wilt symptoms caused by *Fusarium oxysporum* on soybean. *Phytopathology*, 106, 1404-1412. doi: 10.1094/PHYTO-03-16-0118-R

Leitão, S. T., Malosetti, M., Song, Q., Eeuwijk, F. V., Rubiales, D., Patto, M. C. V. (2020). Natural variation in Portuguese common bean germplasm reveals new sources of resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* and resistance-associated candidate genes. *Phytopathology*, 110(3), 663-647. doi: 10.1094/PHYTO-06-19-0207-R

Leslie, F. J. & Summerell, A.B. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Sydney, Austrália: Blackwell Publishing.

Lievens, B., Rep, M., Thomma, B. P. H. J. (2008). Recent developments in the molecular discrimination of *formae speciales* of *Fusarium oxysporum*. *Pest Management Science*, 64, 781-788. doi: 10.1002/ps.1564

Ma, L.J., Van Der Does, H.C., Borkovich, K.A., Coleman, J.J., Daboussi, M.J., Di Pietro, A. (2010). Dufresne, M., Freitag, M., Grabherr, M., Henrissat, B., and Houterman, P.M. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, 464, 367–373. doi: 10.1038/nature08850

Menezes, M. & Silva-Hanlin, D.M.W. (1997). *Guia prático para fungos fitopatogênicos*. Recife, Brasil: UFRPE.

Meziadi, C.; Richard, M.M.S.; Derquennes, A.; Thareau, V.; Blanchet, S.; Gratiás, A.; Pflieger, S., Geffroy, V. (2015). Development of molecular markers linked to disease resistance genes in common bean based on whole genome sequence. *Plant Science*, 242, 352-357. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.09.006

Ming, Y. N., Lin, P. C., Yu, T. F. (1966). Heterokaryosis in *Fusarium fujikuroi* (Saw.) Wr. *Scientia Sinica Online*, 15 (3), 371:378. Recuperado de <https://europepmc.org/article/med/5933025>

Möller, P. A., Wendland, A., Cortes, M. V. C. B., Pereira, R. J., Lobo Junior, M., Melo, L. C., Pereira, H. S., Costa, J. G. C. (2011). *Repositório de informação tecnológica da Embrapa*.

Nascimento, S.R.C.; Maringoni, A.C.; Kurozawa, C. (1995). Comportamento de variedades e linhagens de feijoeiro ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Fitopatologia Brasileira*, 20 (3) 458-463. Recuperado de https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000103&pid=S1413-7054201100050001100011&lng=en

Niño-Sánchez, J.; Casado-Del Castillo, V.; Tello, V.; De Veja-Bartol, J.J; Ramos, B.; Sukno, S.A.; Mínguez, J.M.D. (2016). The FTF gene family regulates virulence and expression of SIX effectors in *Fusarium oxysporum*, *Molecular Plant Pathology*, 17(7), 1124-1139. doi: 10.1111/mpp.12373

O'donnell, K.; Gueidan, C.; Sink, S.; Johnston, P.R.; Crous, P.W.; Glenn, A.; Riley, R.; Zitomer, N.C.; Colyer, P.; Waalwijk, C.; Van Der Lee, T.; Moretti, A.; Kang, S.; Kim, H-S.; Geiser, D.M.; Juba, J.H.; Baayen, R.P.; Cromey, M.G.; Bithell, S.; Sutton, D.A.; Skovgaard, K.; Ploetz, R.; Kistler, H.C.; Elliott, M.; Davis, M.; Sarver, B.A.J. (2009). A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 936-948. doi: 10.1016/j.fgb.2009.08.006

Pastor-Corrales, M. A. & Abawi, G. S. (1987). Reactions of selected bean germplasm to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Plant Disease*, 71, 990-993. Recuperado de https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1987Articles/PlantDisease71n11_990.PDF

Paula Júnior, T. J.; Vieira, R. F.; Teixeira, H.; Lobo Junior, M.; Wendland, A. (2015). Doenças do feijoeiro: estratégias integradas de manejo. In J. Carneiro, T. Paula Júnior; A. Borém (Eds.), *Feijão: do plantio à colheita* (pp. 270-299). Viçosa, Brasil: Editora UFV.

Pereira, M.J.Z.; Ramalho, M.A.P.; Abreu, A.F.B. (2009). Inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* Brazilian race 2 in common bean. *Scientia Agricola*, 66, 788-792. doi: 10.1590/S0103-90162009000600010

Ramos, B., Alves-Santos, F. M., García-Sánchez, A., Martín-Rodríguez, N., Eslava, A. P., Díaz-Mínguez, J. M. (2007). The gene coding for a new transcription factor (*ftf1*) of *Fusarium oxysporum* is only expressed during infection of common bean. *Science Direct*, 44, 864-876. doi: 10.1016/j.fgb.2007.03.003

Ribeiro, R. L. D. & Hagedorn, D. J. (1979a). Inheritance of resistance in beans to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology*, 69, 859-61. doi: 10.1590/S0103-90162009000600010

Ribeiro, R. L. D. & Hagedorn, D. J. (1979b). Screening for resistance to a pathogenic specialization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* the causal agent of bean yellows. *Phytopathology*, 69, 272-276. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/db0e/5ed4134f74dd330a966eeb81af41728980a2.pdf>

Salgado, M. O. & Schwartz, H. F. (1993). Physiological specialization and effects of inoculum concentration on *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common beans. *Plant Disease*, 79, 492-496. Recuperado de https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1993Articles/PlantDisease77n05_492.PDF

Salgado, M. O.; Schwartz, H. F.; Brick, M. A. (1995). Inheritance of resistance to a Colorado race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common beans. *Plant Disease*. 79, 279-281. Recuperado de https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1995Articles/PlantDisease79n03_279.PDF

Santos, G. R., Costa, H., Pelúzio, J. M., Miranda, G. V. (1996). Transporte, transmissibilidade e patogenicidade da micoflora associada às sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Ceres*, 43(249), 621-627. Recuperado de <http://www.ceres.ufv.br/ojs/index.php/ceres/article/view/2365/375>

Summerell, B. A., Laurence, M. H., Edward, C. Y., Leslie, J. F. (2010). Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal diversity*, 44, 3-13. doi: 10.1007/s13225-010-0060-2

Taylor, A., Vagany, V., Jackson, A.C., Harrison, R.J., Rainoni, A. and Clarkson, J.P. (2016). Identification of pathogenicity-related genes in *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepa*. *Molecular Plant Pathology*, 17, 1032–1047. doi: 10.1111/mpp.12346

Toledo-Souza, E.D.D.; Silveira, P.M.D.; Café-Filho, A.C.; Lobo Júnior, M. (2012). *Fusarium* wilt incidence and common bean yield according to the preceding crop and the soil tillage system. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47, 1031-1037. doi: 10.1590/S0100-204X2012000800002

Wendland, A., Möller, P. A., Cortes, M. V. B., Lobo, M., Jr., Melo, L. C., Pereira, H. S., Costa, G. C., & Faria, L. C. (2012). Novas raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* identificadas via detecção específica por PCR. *Summa Phytopathologica*, 38. Recuperado de <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/935424>

Woo, S. L., Zoina, A., Sorbo, G. D., Lorito, M., Nanni, B., Scala, F., Noviello, C. (1996). Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs and RAPD. *Phytopathology*, 86 (9), 966–973. doi: 10.1094/phyto-86-966

Wordell Filho, J. A.; De Freitas, M. B.; Stadnik, M. J.; Theodoro, G. F. (2013). Manejo de doenças na cultura do feijão. In: Wordell, J. A. F.; Chiaradia, L. A.; Balbinot, A. (Eds), *Manejo fitossanitário na cultura do feijão* (pp. 9-48), Florianópolis: DIOESC.

Xue, R. F., Wu, J., Zhu, Z., Wang, L., Wang, S. M., Blair, M. W. (2015). Differentially expressed genes in resistant and susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *PLoS One*, 10 (6), 1-20. doi: 10.1371/journal.pone.0127698

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Mariana Magesto Negreiros – 30%

Anderson Roberto Benedetti – 30%

Bruna Martins Carvalho – 10%

Aline Garcia da Silva – 10%

Mayra Costa da Cruz Gallo de Carvalho – 10%

João Pereira Torres – 10%