



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ**  
**CAMPUS LUIZ MENEGHEL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**MARIANA MAGESTO DE NEGREIROS**

**REAÇÃO DE CULTIVARES DE FEIJOEIRO COMUM A  
ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli***

**BANDEIRANTES, PR - BRASIL**  
**2018**

MARIANA MAGESTO DE NEGREIROS

**REAÇÃO DE CULTIVARES DE FEIJOEIRO COMUM A  
ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado  
em Agronomia, da Universidade Estadual do Norte  
do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel.

Orientador: Prof. Dr. João Pereira Torres

**BANDEIRANTES, PR, BRASIL  
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo autor, através do  
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UENP

M385r Magesto de Negreiros, Mariana  
Reação de cultivares de feijoeiro comum a isolados  
de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* / Mariana  
Magesto de Negreiros; orientador João Pereira  
Torres - Bandeirantes, 2018.  
70 p.

Agronomia) - Universidade Estadual do Norte do  
Paraná, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós  
Graduação em Agronomia, 2018.

1. *Phaseolus vulgaris*. 2. Murcha de *Fusarium*. 3.  
Resistência. 4. Variabilidade patogênica. I. Pereira  
Torres, João , orient. II. Título.

MARIANA MAGESTO DE NEGREIROS

**REAÇÃO DE CULTIVARES DE FEIJOEIRO COMUM A  
ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado  
em Agronomia, da Universidade Estadual do Norte  
do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. João Pereira Torres.....UENP

Prof. Dr. Marcelo Giovanetti Canteri.....UEL

Profª. Dra. Mayra Costa da Cruz Gallo de Carvalho.....UENP

Prof. Dr. João Tavares Bueno.....UENP

Prof. Dr. Ciro Hideki Sumida.....UEL

---

Prof. Dr. João Pereira Torres  
Orientador  
Universidade Estadual do Norte do Paraná,  
*Campus* Luiz Meneghel

## **Dedicatória**

Aos meus pais, Valdemir Vidal de Negreiros e  
Maristela Magesto de Negreiros,  
por todo amor, paciência e apoio.  
Para todas as pessoas que contribuíram para  
realização desta pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela graça da vida, saúde e forças para enfrentar todos os desafios que a vida nos coloca.

Aos meus pais pelo amor, apoio e colaboração nos momentos difíceis, felizes e de superação.

Meu orientador e professor Dr. João Pereira Torres, por me receber e conduzir minha experiência de realizar e concluir o mestrado, com conselhos, ensinamentos e aprendizados.

Ao também professor de Fitopatologia Dr. João Tavares Bueno, pela amizade, ensinamentos, paciência e oportunidades.

Com certeza, foram estes dois professores que com suas dedicações de anos a Fitopatologia e lecionar, despertaram em mim o amor a essa área, onde encontrei um caminho a seguir e vontade de continuar.

À também professora Dra. Mayra Costa da Cruz Gallo de Carvalho que acolheu o projeto e desenvolveu a parte de Biologia Molecular, com muito carinho, empolgação e ótimas ideias. Um exemplo para mim de dedicação e força de vontade de crescer. Agradeço de coração.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado neste período.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná, em especial aos pesquisadores Anésio Bianchini e Vânia Moda Cirino pelo convite de visita ao Instituto, colaboração com a doação de sementes de feijão e visita ao campo de feijão de Londrina - PR.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas, em especial a pesquisadora Margarida Ito, pela atenção e doação de um isolado para a pesquisa.

Também, a Fundação ABC, por ter dado a oportunidade de coleta de material na área experimental de plantio de feijão em Arapoti - PR.

A Fundação Araucária, pela concessão da bolsa de estudo.

E todas outras pessoas que contribuíram diretamente ou indiretamente para a finalização desta pesquisa.

**Obrigada!**

*Valeu a pena? Tudo vale a pena  
Se a alma não é pequena.  
Quem quer passar além do Bojador  
Tem que passar além da dor.  
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,  
Mas nele é que espelhou o céu.*

**(Fernando Pessoa)**

NEGREIROS, M. M. **Reação de cultivares de feijoeiro comum a isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli***: 2018. 67f. Dissertação de Mestrado em Agronomia - Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2018.

## RESUMO

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris*, murcha de Fusarium, resistência, variabilidade patogênica.

A murcha de Fusarium é uma doença causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (Fop). O método mais eficiente para seu controle é a utilização de cultivares resistentes, porém a variabilidade fisiológica do patógeno dificulta o desenvolvimento de cultivares resistentes pelos programas de melhoramento. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a reação das principais cultivares comerciais de feijoeiro comum do estado do Paraná (*Phaseolus vulgaris* L.) quanto a resistência a diferentes isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Obteve-se quatro isolados monospóricos de Fop, sendo dois do Paraná (IPR7 e APR1) e dois de Minas Gerais PMG2 e PMG5. Outros quatro isolados obtidos a partir de plantas sintomáticas do Paraná foram identificadas como *F. solani*. A identificação dos isolados foi realizada por PCR (SCAR-RAPD e PCR-ITS) e avaliação morfológica dos macro e microconídios. Os isolados de Fop foram ainda avaliados quanto a patogenicidade e agressividade em 15 cultivares comerciais de feijoeiro. A inoculação das plantas de feijão foi realizada pelo método de imersão de raízes em suspensão de conídios sob condições de casa de vegetação sendo as avaliações utilizando escala de notas de severidade proposta pelo CIAT aos 07, 14, 21, 28 e 32 dias após a inoculação. Foram obtidos isolados IPR7, PMG2, APR1 e PMG5, todos identificados como Fop, através de avaliação morfológica e molecular. Dos isolados produzidos a da planta P2 (Arapoti/PR), quatro foram identificados como *F. solani* (monospórico P2.3, P2.13, P2.14 e P2.15) e os demais como Fop. Os primers SCAR-RAPD não foram suficientes para identificar todos os isolados de Fop. Os isolados PMG5, PMG2, IPR7 e IAC9453 mostraram patogenicidade com reação de resistência intermediária em cultivares diferenciadoras e também nas de controle. As cultivares comerciais de feijoeiro comum avaliadas apresentaram reação de resistência e resistência intermediária frente aos isolados estudados.

NEGREIROS, M. M. **Common bean cultivars reaction to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates**: 2018. 67f. Dissertation for Master's degree in Agronomy - Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2018.

## ABSTRACT

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris*, Fusarium's wilt, genetic resistance, pathogenic variety.

Fusarium's wilt is a disease caused by the *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop) fungus. The most effective control method is the use of resistant cultivars, but the pathogen's physiological variability makes the resistant cultivars development difficult by the breeding programs. The objective of this paper is to characterize the reaction of the main commercial bean cultivars of Paraná's State (*Phaseolus vulgaris* L.) as to resistance to different *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates. There were obtained and characterized four isolated monosporic, two from different Paraná (IPR7 and APR1) and two from Minas Gerais (PMG2 and PMG5). Four other isolates obtained from symptomatic plants of Paraná were identified as *F. solani*. The identification of the isolates was performed by PCR (SCAR-RAPD and PCR-ITS) and morphological evaluation of macro and microconidia. Fop isolates were also evaluated for pathogenesis and aggressiveness in 15 common bean cultivars. The inoculation of the bean plants was performed by the root immersion method in suspension of conidia under greenhouse conditions, and the evaluations using a CIAT severity score scale at 07, 14, 21, 28 and 32 days after inoculation. Isolates IPR7, PMG2, APR1 and PMG5, all identified as Fop, were obtained by morphological and molecular evaluation. There were obtained isolated IPR7, PMG2, APR1 and PMG5, all identified as Fop, through morphological and molecular evaluation. Of the isolated produced from the P2 plant (Arapoti/PR), four were identified as *F. solani* (monosporic P2.3, P2.13, P2.14 e P2.15) and the other as Fop. The PMG5, PMG2, IPR7 and IAC9453 isolated were shown intermediates as to the pathogenesis on the differentiating cultivars and on the control ones too. The evaluated common bean commercial cultivars showed intermediary resistance and reactions as to the studied isolates.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>A CULTURA DO FEJJOEIRO .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2</b>	<b>PRINCIPAIS DOENÇAS DO FEJJOEIRO.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3</b>	<b><i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> F. SP. <i>PHASEOLI</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Variabilidade Patogênica .....</b>	<b>19</b>
<b>2.4</b>	<b>RESISTÊNCIA DO FEJJOEIRO À MURCHA DE <i>FUSARIUM</i> .....</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>28</b>
<b>ARTIGO 1: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DIFERENTES ISOLADOS DE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> F. SP. <i>PHASEOLI</i></b>		
<b>4</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
<b>5.1</b>	<b>Obtenção e caracterização dos isolados monospóricos de Fop .....</b>	<b>31</b>
<b>5.2</b>	<b>Teste de Patogenicidade.....</b>	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>6.1</b>	<b>Obtenção e Caracterização dos Isolados Monospóricos de Fop .....</b>	<b>35</b>
<b>6.2</b>	<b>Teste de Patogenicidade.....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>43</b>
<b>ARTIGO 2: REAÇÃO DE CULTIVARES COMERCIAIS DE FEJJOEIRO A ISOLADOS DE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> F. SP. <i>PHASEOLI</i></b>		
<b>8</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>9</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
<b>10</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>11</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>52</b>
<b>12</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>53</b>
<b>13</b>	<b>ANEXO.....</b>	<b>67</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a leguminosa de maior importância na alimentação humana mundial, principalmente em países subdesenvolvidos como os da América do Sul, Central e sudeste da África (MEZIADI et al., 2015). O Brasil está entre os maiores produtores mundiais e é o maior produtor e consumidor das Américas (FAOSTAT, 2013). Devido às condições edafoclimáticas do país, o feijoeiro pode ser cultivado durante o ano inteiro, na maioria das regiões (LIMA et al., 2013).

Segundo o Nono Levantamento de Safra da Companhia Nacional de Abastecimento, a estimativa de produção brasileira de feijão nas três safras de 2017/2018, será de 3.334,4 mil toneladas em uma área de 3.197,2 mil hectares, distribuídos em todos os estados brasileiros. No entanto, a média nacional de produtividade é considerada baixa, em torno de 1.043 kg.ha<sup>-1</sup>, visto que o potencial produtivo da cultura em condições adequadas pode atingir valores acima de 4.000 kg.ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2018). A baixa produtividade nas lavouras de feijão ocorre devido a diversos fatores, entre os quais as doenças. Elas tornam-se importantes por serem transmitidas, principalmente pelas sementes. O ambiente favorável associado à falta de práticas preventivas faz com que as doenças tornem-se um problema no manejo do feijoeiro. Várias doenças acometem a cultura, com destaque para as fúngicas (WENDLAND, 2012).

Dentre as doenças do feijoeiro comum causadas por fungos habitantes de solo, destaca-se a murcha ou amarelecimento de Fusarium, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* Schlecht. f.sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder, considerada uma das mais importantes (COSTA, 1982; PASTOR-CORRALES & ABAWI, 1987; ZAMBOLIM, 1987; GOULART, 1988; PAULA JÚNIOR, 2004; SALA, 2006).

A incidência da murcha de Fusarium no rendimento do feijoeiro comum é variável, podendo afetar apenas algumas plantas ou até 80% da lavoura (SARTORATO & RAVA, 1994; SALA, 2006; PEREIRA, 2008) estando a doença praticamente disseminada em todo o território nacional. O fungo é o principal patógeno de solo do feijão em áreas sob pivô central, devido ao seu cultivo sucessivo na mesma área (RAVA, 1996; TOLEDO-SOUZA, 2012).

A resistência genética é um importante componente de controle por ser uma tecnologia de fácil uso, segura e eficiente, além de ser menos agressiva ao ambiente (GONÇALVES-VIDIGAL, 2013). Para o manejo do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp.

*phaseoli*, o controle químico é pouco eficiente. Assim a adoção de cultivares resistentes representa a melhor prática (PAULA JÚNIOR, 2004). Um dos principais fatores que dificultam o desenvolvimento de cultivares resistentes é a variabilidade fisiológica do fungo. Práticas de manejo podem não ser suficientes para manter a doença em baixos níveis de infestação (ABAWI, 1989; ABAWI & PASTOR-CORRALES, 1990; SARTORATO & RAVA, 1994; PAULA JÚNIOR, 2006). No entanto, são escassas pesquisas sobre resistência de cultivares comerciais de feijoeiro à murcha de *Fusarium*. Além disso, o fungo apresenta uma vasta variabilidade patogênica por todo país, já identificadas raças diferentes causadoras da doença.

Assim, objetivou-se neste estudo caracterizar a virulência e patogenicidade de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* obtidos de diferentes regiões produtoras e avaliar as principais cultivares comerciais de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) mais plantadas no Paraná quanto a reação de resistência frente a esses isolados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO

O feijoeiro comum é a espécie mais cultivada do gênero *Phaseolus*, pertencente à família Leguminosae, subfamília Papilionoidae sendo classificado como *Phaseolus vulgaris* L. (SANTOS & GALVILANES, 1998). Esta espécie possui ciclo variando de 61 a 110 dias. Admitem-se dois *pools* gênicos, ou seja, dois locais de domesticação, sendo um Andino e outro Mesoamericano (GEPTS, 2014). Trata-se de uma planta anual diplóide com 22 cromossomos e autógama, com 95% de autopolinização.

O cultivo do feijoeiro é difundido em todo o território nacional, no sistema solteiro ou consorciado com outras culturas. Segundo Aidar (2009), devido a sua ampla adaptação edafoclimática, o feijoeiro faz parte da maioria dos sistemas de produção de pequenos e médios produtores, onde a produção é destinada ao consumo familiar e à geração de renda. Considerando todos os gêneros e espécies englobados como feijão nas estatísticas da FAO, há aproximadamente 110 países produtores em todo o mundo, sendo o Brasil o maior produtor do gênero *Phaseolus*.

Além da sua importância na alimentação da população brasileira e mundial, a cadeia de produção, beneficiamento e comercialização, geram ocupação e renda, principalmente à classe menos privilegiada e desta forma, o feijão torna-se um dos produtos agrícolas de maior importância econômico-social, devido principalmente à mão de obra empregada durante o ciclo da cultura (ABREU, 2008).

O mercado mundial movimenta anualmente cerca de 26,5 milhões de toneladas do grão, sendo Myanmar, Índia e Brasil os maiores produtores. Um dos maiores entraves à exportação está no fato de o maior volume da produção nacional ser do grupo carioca, de alta perecibilidade, que apesar de contar com a preferência nacional, tem aceitação limitada em outros países do mundo. Todavia, para suprir as necessidades de demanda interna, o Brasil importa em torno de 150 mil toneladas por ano, sendo a maioria de feijão comum preto proveniente da Argentina (CONAB, 2017).

O acesso ao mercado internacional representa um salto importante nas estratégias de produção e comercialização. Produzir para o mercado externo significa atingir níveis superiores de qualidade dos produtos, tendo em vista as exigentes condições que prevalecem no comércio internacional, além da competitividade nos custos de produção. A exportação é uma etapa a ser conquistada com outras cultivares, pois o Brasil tem clima, área disponível e

alta tecnologia, podendo produzir qualquer variedade e se adaptar às exigências de qualquer mercado (RUAS, 2017).

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos componentes básicos da dieta dos brasileiros e constitui a sua principal fonte de proteína vegetal. É tradicionalmente e diariamente consumido pelas diferentes classes sociais, na dieta da maior parte da população residente tanto no meio rural como urbano, nas cinco regiões geográficas do país. O consumo nacional tem variado, nos anos de 2010 a 2015, o consumo estava entre 3,3 e 3,6 milhões de toneladas. Em 2016, recuou para 2,8 milhões de toneladas, o menor número registrado na história, devido ao expressivo aumento dos preços provocados pela retração da área plantada e principalmente pelas condições climáticas adversas (CONAB, 2018).

Essa leguminosa é produzida em pequenas, médias e grandes propriedades rurais, evidenciando a sua importância socioeconômica. Observa-se, na maioria das regiões de produção, que o feijão faz parte do ciclo de rotação de culturas, técnica que consiste em alternar espécies vegetais numa mesma área agrícola, com vistas a contribuir para o controle de pragas e doenças, além de minimizar o desgaste do solo (SILVA & WANDER, 2013).

O feijão é cultivado em praticamente todo o território brasileiro, a cultura apresenta três safras e está inserida em todos os 27 estados brasileiros, características essas que tornam esse grão único nos contextos econômico e de abastecimento brasileiro. Grande parte da produção está concentrada nos estados do PR, MG, BA, SP, GO, SC, RS, CE, PE e PA, responsáveis por praticamente 85% da produção nacional distribuídas em três safras distintas (águas, seca e inverno). Considerando as três safras no período 2017/2018, estima-se que a área cultivada no Brasil será de 3.197 mil hectares, com aumento de 0,5% em relação à safra passada, e produção média anual de 3.334,4 mil toneladas, 1,9% menor que a última temporada (CONAB, 2018).

Considerando a safra passada, aproximadamente 40,2% da produção do feijão “Primeira Safra” ocorre na região Sul, com destaque para o Paraná. A região Sudeste representa 30%, e os estados de Minas Gerais e São Paulo são os maiores produtores. A região Centro-Oeste representa 13,1% do feijão produzido com destaque para Goiás. Na região Nordeste, cuja representação é 16,3%, a Bahia é o maior produtor (CONAB, 2018).

No Brasil, são cultivados inúmeros cultivares de feijoeiro comum que normalmente possuem sementes pequenas, embora possam também ser encontrados, em algumas regiões, tamanho médio e grande, como os feijões jalo e rajados, e também o branco importado, encontrado nos supermercados conhecidos como Grãos Especiais. Ressalta-se que as

pesquisas dessas cultivares vêm resultando em qualidade do grão e em agregação de valor. Diante dos riscos em armazenar o feijão carioca, mesmo que por um curto período, pesquisadores desenvolveram cultivares, já disponíveis no mercado, que mantêm a tonalidade do tegumento do grão por mais de um ano. Dentre essas novas variedades, pode-se citar as variedades Dama, Milênio, Alvorada, Estilo, Requite e ANFC9. Tais sementes aos poucos estão ganhando mercado devido à boa produtividade e bom caldo (RUAS, 2017).

Fator que necessita de atenção é que boa parte do plantio no Brasil é efetuada com grãos. O produtor colhe a sua safra e reserva uma parte da produção para utilizá-la como semente (MENTEN, 2017).

A cultura do feijoeiro vem apresentando grandes avanços quanto à produção e à produtividade. Parte disso se deve às pesquisas, destacando-se o desenvolvimento de cultivares de feijoeiro mais produtivas e adaptadas (RAMALHO, 2002; ABREU, 2008; CARNEIRO, 2009).

A escolha da área para o cultivo do feijoeiro é de fundamental importância, sendo a preferência dada às áreas onde o clima seja ameno e com altas taxas de pluviosidade. De acordo com Silveira & Stone (2002), o rendimento do feijoeiro é afetado pela condição hídrica do solo e conforme Paula Júnior et al. (2007), o consumo de água pelo feijoeiro durante todo o ciclo é de 350 a 450 mm de água. A temperatura média ideal para o desenvolvimento da cultura varia de 18 a 24 °C, durante o dia e de 15 a 21 °C, durante a noite. Sob temperaturas elevadas, próximas de 35°C, praticamente não ocorre vigeno de vagens (RAMALHO, 2005).

Em alguns casos, é inviabilizado por doenças que acometem a cultura e é uma das principais causas da baixa produtividade no país. Devido ao aumento da produção em larga escala, técnicas antes não empregadas na cultura como, por exemplo, a irrigação, vem sendo utilizadas, a qual contribuiu para a disseminação de doenças que não eram consideradas de risco para a cultura (PAULA JÚNIOR et al., 2007).

## 2.2 PRINCIPAIS DOENÇAS DO FEIJOEIRO

As doenças limitam a produção de feijão e reduzem a qualidade fisiológica, sanitária, nutricional e comercial do produto. A incidência, a intensidade dessas doenças e os prejuízos causados variam de acordo com a região, época de plantio, sistema de plantio, cultivar utilizada, qualidade sanitária da semente e as condições climáticas. O conhecimento das

doenças, dos danos que causam, da fase de desenvolvimento das plantas e das condições favoráveis à sua ocorrência são fundamentais para que medidas de controle eficazes sejam adotadas (ROSOLEN & MARUBAYASHI, 1994).

Entre as doenças fúngicas que mais afetam o feijão, Chiorato et al. (2015) citam a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) e a murcha de Fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*). Estes patógenos encontram-se amplamente disseminados nas principais regiões produtoras do Brasil, e a utilização de cultivares resistentes, juntamente com a adaptabilidade e estabilidade dos genótipos, é o método mais eficiente para a manutenção da produtividade da cultura (SILVA et al., 2013; CHIORATO et al., 2015).

A podridão-radicular-seca, causada pelo fungo *Fusarium solani*, causa também sérios prejuízos à cultura do feijoeiro. A doença afeta inicialmente as regiões do hipocótilo e da raiz principal das plântulas, causando lesões longitudinais, afiladas e de coloração avermelhada. A raiz principal e a parte mais baixa do caule podem secar; conseqüentemente, o crescimento torna-se mais lento e há o amarelecimento e a queda das folhas, reduzindo a produção da lavoura (EMBRAPA, 2003).

Para as doenças causadas por patógenos de solo não existe um controle químico eficiente e o manejo e rotação de culturas também não se mostra totalmente eficaz. A ausência ou a inadequada rotação de culturas, principalmente em áreas de pivô central, a falta de medidas preventivas de controle da disseminação e o aumento da compactação do solo fizeram com que a murcha de Fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*) se tornasse uma das principais doenças da cultura no Brasil (PAULA JÚNIOR, 2004; PEREIRA ET AL., 2009).

Desta forma, para o controle da doença, amenizar os danos econômicos, uma vez introduzido o patógeno na área, a utilização de cultivares resistentes vem sendo a alternativa mais viável e eficaz (SARTORATO & RAVA, 1994; ABAWI, 1989; ABAWI & PASTOR-CORRALES, 1990; PAULA JÚNIOR, 2006).

### 2.3 FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. PHASEOLI

Dentre as doenças foliares e radiculares que atacam o feijoeiro, pode-se destacar o amarelecimento ou murcha de Fusarium causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp.

*phaseoli* (Fop), pois pode reduzir significativamente a produção das plantas na lavoura (WORDELL et al., 2013).

O patógeno foi relatado pela primeira vez por Harter em 1929 (ALOJ et al., 1987) na Califórnia, EUA. Posteriormente, provas de patogenicidade constataram que o fungo podia ser separado de outras formas especiais (*formae speciales*) de *Fusarium oxysporum*, sendo proposto o nome de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (KENDRICK & SNYDER, 1942).

Cardoso et al. (1966) relataram a doença no Brasil no município de Laranjal Paulista-SP, causando sintomas típicos da doença na variedade Rosinha. Posteriormente foi diagnosticada em feijoeiro do tipo vagem, provenientes dos municípios paulistas de Juquiá, Cosmópolis, Campinas, Itariri, Mogi Guaçu e Barão Geraldo (Campinas). Sintomas típicos de murcha de *Fusarium* também foram relatados por Mohan et al. (1983), em regiões do estado do Paraná. No estado de Minas Gerais a ocorrência da doença foi contatada em 1986, relatada por Zambolim et al. (1987) e Goulart (1988).

Pertencente à divisão de fungos mitospóricos (imperfeitos) *Fusarium* spp, reino Fungi, classe dos Hyphomycetes (conídeos fora de corpos de frutificação), ordem Moniliales e família Tuberculariaceae (conídios agrupados em esporodóquio), o gênero *Fusarium* é representado por aproximadamente 1.414 espécies, 348 variedades e mais de 150 *formae speciales* descritas na literatura (ALEXOPOULOS, 1996; INDEX FUNGORUM, 2018).

O *Fusarium oxysporum* é uma espécie importante do gênero *Fusarium* e apresenta variabilidade dentro do gênero, podendo ser encontrada tanto populações patogênicas quanto não patogênicas (SARTORATO & RAVA, 1994). As *formae speciales* (f. sp.) dividem a espécie em grupos patogênicos de uma única espécie hospedeira (BAAYEN et al., 2000). Já a subdivisão de raças é baseada na expressão da virulência entre genótipos de uma mesma espécie hospedeira. São encontradas mais de 150 *formae speciales* no complexo *Fusarium oxysporum*, cada umas delas representada por um grupo de isolados com padrão de virulência específico e consequentemente com eficiência distinta em ocasionar a murcha em seu hospedeiro (KENDRICK & SNYDER, 1942; CORRELL, 1991; BAAYEN et al., 2000).

Esse fungo produz macroconídios, microconídios e clamidósporos. Os microconídios do Fop (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*) são unicelulares ou bicelulares, de forma variável, podendo ser ovais ou elípticos, retos ou curvos, com três a cinco septos. Os macroconídios são os esporos típicos do gênero *Fusarium* sp., fusóides e pontiagudos nas

duas extremidades (meia lua, canoa), apresentando paredes finas e de três a sete septos (predominantemente com três septos). Os clamidósporos são esporos redondos produzidos no meio ou na ponta de um micélio mais velho ou em um macroconídio. Apresentam parede lisa ou rugosa, são terminais ou intercalares, geralmente solitários, mas podem apresentar-se em pares ou cadeias. (SARTORATO & RAVA, 1994; BIANCHINI et al., 2005). As células conidiogênicas são monofiáides curtas denominadas também de falsas cabeças. Uma característica que diferencia *F. solani* de Fop, é a formação de monofiáides longas por *F. solani* e apresenta conídios não septados (NELSON et al., 1993; LESLIE & SUMMERELL, 2006).

Em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), as colônias crescem rapidamente, em média 1,1 cm ao dia. No início o micélio cresce sobre o meio apresentando coloração branca, mas com o passar do tempo adquire coloração púrpura, avermelhada, alaranjada e roxa (BOOTH, 1977).

A caracterização de espécies dentro desse gênero é um tanto quanto complicada pela sua grande variabilidade morfológica. Leslie e Summerell (2006) orientam que, para ter uma boa caracterização morfológica é necessário obter culturas saudáveis do fungo, cultivadas a partir de um único esporo (cultura monospórica) e submetê-las a meios de cultivo e condições apropriadas de crescimento.

O fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, penetra pelo sistema de raízes e se move inter e intracelularmente até invadir os elementos de vasos do xilema. A infecção progride por meio do crescimento do micélio e do transporte de microconídios pela seiva bruta. Os conídios podem ficar presos nas perfurações e nos tabiques dos vasos, germinam e penetram as paredes celulares e produzem microconídios nos vasos adjacentes. Este ciclo é repetido até que o sistema vascular seja colonizado (COSTA, 2006).

A infecção ocorre, geralmente, próxima à ponta das raízes, mas, também pode ocorrer por ferimentos e/ou aberturas naturais. Pesquisas apontam que a presença de nematóides (*Meloidogyne* spp. e *Pratylenchus* spp.) na área favorece a interação e infecção de Fop. (HAWKSWORTH et al., 1995; NELSON et al., 1993). Um estudo evidencia a influência da interação entre o *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e o nematoide *Meloidogyne javanica* no aumento da severidade dos sintomas da murcha de Fusarium, levando à quebra da resistência na cultivar 'Pérola' (SIMÃO et al., 2010).

Como sintoma, inicialmente ocorre amarelecimento das folhas basais da planta, progredindo posteriormente para as folhas da parte superior. É também possível observar a perda da turgescência das folhas, podendo levar, em casos mais severos, à morte das plantas. A doença pode afetar apenas parte das folhas ou ramos, devido à localização dos vasos colonizados. O crescimento do fungo no interior dos vasos pode dar ao tecido vascular coloração avermelhada podendo facilmente ser observado em cortes transversais de caules doentes. Sob alta umidade, desenvolvem-se sobre o caule estruturas de coloração rosada, constituídas de micélio e conídios do patógeno (ABAWI, 1989; WENDLAND, 2012; NIÑO-SANCHÉZ, 2015).

Os isolados mais agressivos colonizam massivamente o tecido e, como consequência, ocorre impedimento do transporte de água e sais minerais levando ao aparecimento dos sintomas que caracterizam a doença. Após a invasão dos vasos do xilema, a doença manifesta-se por perda da turgescência, o amarelecimento progressivo das folhas inferiores para as superiores ao nível de algumas folhas e ramos ou, em casos mais severos, em toda planta. A infecção pode ocorrer no estágio de plântula e como consequência, estas não apresentam um desenvolvimento normal, tornando-se raquíticas quando adultas. A doença também pode provocar desfolha precoce. Nas vagens, podem ocorrer lesões aquosas e a contaminação das sementes externamente (SARTORATO & RAVA, 1994).

O fungo é favorecido por temperaturas de 24 a 28°C, solos arenosos e ácidos (PAULA JÚNIOR, 2004). O crescimento micelial e a penetração das raízes por *Fusarium oxysporum* são favorecidos em condições úmidas, enquanto os sintomas de murcha são mais severos em condições secas (MICHEREFF, 2005).

O patógeno sobrevive no solo em restos culturais ou na forma de clamidósporos os quais por serem estruturas de resistência, resistem por longo período (AGRIOS, 2005). Assim, esse patógeno que inicialmente apresenta seus danos em reboleiras, com o passar do tempo pode se propagar por toda área de cultivo. O Fop é disseminado dentro e entre as lavouras por meio do movimento do solo, fragmento infectado do hospedeiro, água de drenagem ou irrigação e sementes contaminadas (SARTORATO & RAVA, 1994). Após a colheita, sementes contaminadas constituirão o principal potencial de disseminação a longas distâncias. De fato, a incidência de Fop nas sementes está entre 1 e 14%, entretanto, a taxa de transmissão pode atingir 43% (SANTOS et al., 1996; SOUSA et al., 2014).

O controle do patógeno pode ser feito por várias formas de manejo tais como, o uso de sementes não contaminadas certificadas de campos de produção, para evitar a introdução em áreas ainda livres, utilização de cultivares de feijão resistentes ao patógeno e/ou rotações de culturas por longos períodos. Ainda assim, a prática mais viável e eficaz o uso de cultivares resistentes (SARTORATO & RAVA, 1994; PAULA JÚNIOR et al., 2004).

No entanto, a maioria das cultivares de feijão são suscetíveis ao Fop, devido principalmente, a variabilidade genética e/ou fisiológica do fungo (SARTORATO & RAVA, 1994; EMBRAPA, 2017).

### 2.3.1 Variabilidade Patogênica

Trabalhos realizados evidenciam a importância de estudos de variabilidade genética da espécie *Fusarium oxysporum* e estudo da evolução das raças do patógeno em diferentes locais do mundo. Em feijoeiro, a variabilidade de raças fisiológicas do fungo Fop também foi estudada por diversos autores. Na literatura são descritas sete raças fisiológicas, os estudos comprovam a grande capacidade de mutação do patógeno, porém todos os autores comentam que há a necessidade de maiores estudos, exaltando assim, a importância de uma classificação de raças fisiológicas mais apurada e robusta (RIBEIRO & HAGEDORN, 1979; SALGADO & SCHWARTZ, 1993; WOO et al., 1996; ITO et al., 1997; ALVES-SANTOS et al., 2002).

Embora as raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* difiram em sintomatologia, epidemiologia e virulência, testes de patogenicidade apropriados podem auxiliar a diferenciar os genótipos (RONCERO et al., 2003). A diversidade e variação patogênica de Fop devem ser considerados fatores importantes no processo de melhoramento para resistência do feijoeiro (SALGADO et al., 1995; WOO et al., 1996).

Segundo Bergamin Filho et al. (2011), o termo raça é usado para designar variantes de uma espécie fitopatogênica que causam doença em uma variedade de uma espécie de hospedeiro, mas não em outra (especificidade em nível interespecífico).

Ribeiro & Hagedorn (1979) propuseram a classificação de isolados de Fop em raças fisiológicas, desde então diversos experimentos foram realizados em todo o mundo para a determinação de raças de Fop.

Na literatura são citadas sete raças patogênicas relacionadas a regiões geográficas (SALGADO et al., 1995). A raça 1 foi identificada na Carolina do Sul (EUA) e em Portici (Itália) (RIBEIRO & HAGEDORN, 1979), a raça 2 inclui isolados do Brasil (RIBEIRO & HAGEDORN, 1979), a raça 3 ocorre na Colômbia (SALGADO et al., 1995), a raça 4 inclui um isolado do Colorado (EUA) (SALGADO & SCHWARTZ, 1993), a raça 5 foi identificada na Grécia (Kastoria) (WOO et al., 1996), a raça 6 foi identificada na Espanha e a raça 7 na Grécia (Chryssoupolis) (ALVES-SANTOS et al., 2002). Inclusive, vários desses isolados formaram diferentes grupos de compatibilidade vegetativa (GCVs) quando comparados com isolados provenientes do Brasil, Colômbia e EUA (Colorado e Carolina do Sul). Os quatro isolados das Américas estão associados a diferentes GCVs e nenhum deles era compatível vegetativamente com qualquer um dos isolados espanhóis, patogênicos ou não patogênicos. (ALVES-SANTOS et al., 1999).

Woo et al. (1996) analisando 11 isolados de diferentes regiões do mundo e utilizando quatro metodologias (testes de patogenicidade com cultivares diferenciadores, GCVs, RAPD e RFLP), encontraram as raças 2 (dois isolados do Brasil), raça 3 (quatro isolados da Colômbia) e raça 5 (dois isolados da Grécia), e, pela primeira vez, a raça 4 (um isolado de Colorado, EUA) e 1 (um isolado da Carolina do Sul, EUA e outro de Portici, Itália). Esse fato foi corroborado por Alves-Santos et al. (2002), que além de agrupar nove isolados em três GCVs diferentes e encontrar a presença de dois grupos com diferença na virulência, esses indivíduos foram classificados pela primeira vez como as raças 6 (isolados de El Barco de Ávila, Espanha) e 7 (isolados de Chryssoupolis, Grécia).

No Brasil, Nascimento et al. (1995) caracterizaram dezessete isolados patogênicos de Fop provenientes de São Paulo, Pernambuco e Paraná, constataram somente a ocorrência da raça 2, o que indicou uma possível prevalência desta raça no país. Ela foi descrita inicialmente como brasileira por Ribeiro & Hagedorn (1979). Ito et al. (1997), em estudo de variabilidade deste mesmo fungo envolvendo sete isolados de diferentes regiões do Brasil, constataram a presença de quatro raças.

No entanto, Zanotti et al. (2006) além de separar 11 isolados patogênicos de 9 não patogênicos utilizando RAPDs, encontraram que a distância entre os grupos patogênicos B (dois isolados) e G (um isolado) não foram compatíveis com os valores da distância observada dentro da raça. Esses autores concluíram que embora esses resultados sejam preliminares, era possível a existência de mais de uma raça deste fungo no país. Essa hipótese

foi comprovada por Wendland et al. (2012). Utilizando a combinação de PCR e cinco cultivares diferenciadores em seis isolados coletados no Paraná, Rio Grande do Sul, Pernambuco e Goiás, identificaram no país, raças 2 (isolados Fop 45 e Fop 46), pela primeira vez as raças 3 (Fop 48) e 6 (Fop 42 e Fop 51). Inclusive um isolado do estudo (Fop 02) não apresentou sintomas nos cultivares diferenciadores, embora o resultado da PCR tenha confirmado sua especificidade. Esse fato revelou a existência de novas raças do patógeno, as quais as cultivares diferenciadoras atuais não seriam capazes de identificar. Recentemente foi encontrado que a variabilidade na patogenicidade de Fop é maior do que o relatado até agora, ou seja, que não está limitada às sete raças (HENRIQUE et al., 2015).

Em experimentos visando à identificação de raças fisiológicas, isolados são inoculados em cultivares diferenciadoras pré-determinadas. Das 12 cultivares diferenciadoras para raças de Fop utilizadas, oito cultivares foram propostas pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT): Mortiño, TIB 3042, Diacol Calima, HF 465-63-1, RIZ 30, BAT 477, IPA 1 e A-211). Nascimento et al. (1995), propôs em seu estudo quatro cultivares diferenciadoras (Preto Uberabinha, Bush Blue Lake-274 (BBL-274), Tenderette e IPA-6 apenas para classificar as raças brasileira e americana. Alves-Santos et al. (2002) e Woo et al. (1996), utilizaram parte destas cultivares diferenciadoras.

A reação ao patógeno das cultivares apresentadas nos métodos de classificação encontra-se na Tabela 1. Segundo a literatura, as cultivares A 211, RIZ 30, BAT 477 e Tenderette são suscetíveis a raça 1 (americana) do fungo. O segundo grupo de cultivares que apresenta suscetibilidade às raças 1 (americana) e 2 (brasileira): Bush Blue Lake (BBL – 274) e IPA 6. O grupo de cultivares IPA 1 e Preto Uberabinha é suscetível a raça 2 (brasileira). Os genótipos TIB 3042, Diacol Calima e Mortiño são resistentes as raças 1 e 2; sendo que o genótipo Diacol Calima apresenta também suscetibilidade as raças 6 e 7 classificadas por Alves-Santos et al. (2002). O genótipo, HF 465-63-1, apresenta apenas suscetibilidade à raça 6 do fungo.

**Tabela 1:** Reação das cultivares de feijoeiro utilizadas nos métodos de identificação de raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, conforme CIAT, Nascimento et al. (1995), Woo et al. (1996) e Alves-Santos et al. (2002).

Cultivares	Raças						
	Raça 1	Raça 2	Raça 3	Raça 4	Raça 5	Raça 6	Raça 7
A 211 <sup>acd</sup>	S	S	R	S	S	S	R
Riz 30 <sup>ac</sup>	S	S	R	S	S	-	-
Batt 447 <sup>acd</sup>	S	R	R	S	S	S	S
Ipa 1 <sup>acd</sup>	R	S	R	S	S	S	R
TIB 3042 <sup>ac</sup>	R	R	S	S	S	-	-
Diacol Calima <sup>acd</sup>	R	R	S	S	R	S	S
Mortiño <sup>ac</sup>	R	R	S	S	R	-	-
HF 465-63-1 <sup>acd</sup>	R	R	R	R	R	S	R
Tenderette <sup>b</sup>	S	R	-	-	-	-	-
Ipa 6 <sup>b</sup>	S	S	-	-	-	-	-
BBL – 274 <sup>b</sup>	S	S	-	-	-	-	-
Preto Uberabinha <sup>b</sup>	R	S	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>CIAT; <sup>b</sup>Nascimento et al. (1995); <sup>c</sup>Woo et al. (1996); <sup>d</sup>Alves-Santos et al. (2002). Letras: S (suscetível) e R (resistente).

Em estudo realizado por Henrique et al. (2015) caracteriza e classifica 23 isolados monospóricos de Fop provenientes de diversas regiões do país. Foram inoculados e classificados em raças fisiológicas a partir das três propostas de classificação (NASCIMENTO et al., 1995; WOO et al., 1996 e ALVES-SANTOS et al., 2002) e uma nova combinação utilizando todas as 12 cultivares diferenciadoras descritas acima (tabela 1), baseando-se na utilização de valores binários para cada genótipo, assim como já utilizado para a classificação do patógeno da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) (CIAT, 1990) e semelhante ao patógeno da mancha-angular (*Pseudocercospora griseola*) (PASTOR-CORRALES & JARA, 1995). A partir dos resultados encontrados pela nova proposta, constatou-se falha dos atuais métodos de classificação das raças fisiológicas do Fop. Essa proposta de um novo conjunto de diferenciadoras para classificação de isolados em raças foi realizada devido a várias tentativas de que não resultavam numa classificação uniforme. Nas propostas encontradas na literatura observou-se que um mesmo isolado comporta-se diferentemente em cada situação.

Em função da variabilidade fisiológica obtida é importante ressaltar que o fungo do gênero *Fusarium* é um microrganismo que apresenta reprodução assexuada

predominantemente, portanto, não apresenta variação devido à recombinação meiótica. Possivelmente, o cultivo contínuo de feijoeiro comum sob um alto potencial de inóculo pode estar associado a uma heterocariose frequente (variabilidade/raças), do que ocorreria em um sistema de rotação de culturas ou períodos de pousio entre uma cultura do feijão e a próxima. Atualmente, a ocorrência de heterocariose também pode ser facilitada pelo estabelecimento dessa cultura em áreas irrigadas, a maioria das quais estão infestadas pelo patógeno (HENRIQUE et al., 2015).

Entretanto, a ausência de trabalhos com outros isolados em linhagens e cultivares com características agrônômicas de interesse são escassos. O conjunto de diferenciadoras e principalmente a forma de como são avaliadas não apresentam eficiência e uniformidade para a classificação das diferentes raças, pois um mesmo isolado, utilizando diferentes propostas, pode ser classificado de maneira distinta. Há a necessidade de se estipular uma classificação única e abranger assim maior número de raças.

## **2.4 RESISTÊNCIA DO FEIJOEIRO À MURCHA DE FUSARIUM**

No melhoramento visando resistência a doenças, algumas informações são importantes. Entre essas podem ser citadas: estudo da etiologia e variabilidade do patógeno, identificação de fontes de resistência e o estudo do controle genético desta resistência (BORÉM & MIRANDA, 2005).

Em feijoeiro, a resistência ao Fop já foi relatada como raça-específica (BRICK et al., 2004) e pode ser compreendida como resistência vertical, onde as classes fenotípicas predominantes são resistência e suscetibilidade. De fato, resultados contrastantes podem ser atribuídos ao uso de isolados distintos em cultivares e linhagens de diversos centros de origem (ZAMBOLIM et al., 2014).

O melhoramento genético do feijoeiro no Brasil é realizado basicamente por empresas públicas. Dentre essas, destacam-se o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), o Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), a Embrapa Arroz e Feijão (CNPAF), a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e as Universidades Federais de Viçosa e Lavras (UFV e UFLA).

A pesquisa tem explorado basicamente mecanismos de resistência de herança simples (PEREIRA, 2004; COSTA, 2006; MARCONDES, 2010). A resistência genética de herança

monogênica atrai os melhoristas por ser de fácil manipulação e assim poder ser rapidamente introgridida em materiais suscetíveis por meio da utilização de métodos simples, com o retrocruzamento. Esse procedimento, embora amplamente utilizado, faz com que as cultivares tenham um período de vida útil curto em virtude da pressão de seleção que causa e da grande capacidade de variação patogênica dos organismos causadores de doenças. Isto leva à constante exploração da variabilidade genética existente na espécie em busca de novas fontes de resistência (JOHNSON, 1984; CRUTE & PINK, 1996).

Visto a dificuldade de desenvolvimento de cultivares resistentes a diversas raças do patógeno, ao longo dos anos, diversos autores estudaram a herança genética de resistência do feijoeiro ao fungo da murcha de *Fusarium*. Ribeiro & Hagedorn (1979) constataram que a resistência à raça brasileira é controlada por um único gene dominante, presente na variedade Tenderette, enquanto que a resistência à raça americana, presente na variedade Preto Uberabinha, é determinada por um gene com dominância incompleta.

A obtenção de fontes de resistência é uma das principais etapas de um programa de melhoramento que visa à resistência a doenças, e com esse objetivo alguns trabalhos já foram realizados para identificar fontes de resistência ao Fop. Rava et al. (1996), testando 99 genótipos (70 cultivares e 29 linhagens) de feijão-comum, relataram que somente seis das cultivares (IAPAR 44, Milionário 1732, FT Tarumã, Serrano, São José e Rico 1735) apresentaram resistência aos dois isolados utilizados. Maringoni & Lauretti (1999) publicaram que os genótipos Xan 160, PI 150414, A 417, PI 175829 roxo, Xan 161, A 420, PI 163117 e PI 175829 branco foram resistentes à Fop. Pereira et al. (2002) avaliaram a reação de 12 cultivares ao isolado FOP 46, observaram que Pérola, Vi 13-8-3, EEP 558, CF 880065, Vi 12-1-2, Vi 3-13-1, Vi 10-2-1, Vi 16-3-3, Carnaval e Novirex foram resistentes, enquanto Turmalina e Rosinha foram suscetíveis. Avaliando a reação de 27 cultivares e 142 linhagens quanto ao Fop, Rocha Júnior et al. (1998) encontraram que das cultivares avaliadas somente a Carioca MG, Ouro Negro, Diacol Calima, CNF 05, Jalo e Negro Argel comportaram-se como resistentes.

Algumas cultivares como IAC Maravilha, IAC Uma, New York 2114-12, IAPAR 31, IPA-6, Diamante Negro, IAC Carioca Piatã, IAPAR 65 são consideradas como moderadamente resistentes ao Fop (NASCIMENTO, 1999). As cultivares Carioca Precoce e Grafite foram observadas como as menos suscetíveis em estudos conduzidos por Miranda et al. (2007).

A resistência a múltiplas raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* foi citada por Sala et al. (2006), que avaliou 104 genótipos que apresentaram 33% de resistência às raças 1, 2, 3 e 4 do patógeno.

A resistência pode ser entendida como o resultado de todos os fatores, os quais tendem a diminuir a agressividade ou a atividade patogênica de um patógeno quando em contato com um potencial hospedeiro (BARNETT, 1959). Os mecanismos de resistência podem ser divididos em estruturais, que funcionam como barreiras físicas impedindo a entrada do patógeno e a colonização dos tecidos e, bioquímicos que tendem a gerar condições adversas ao patógeno. Ambos os mecanismos podem ter respostas formadas pré e pós-infecção (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

Dois condições necessitam ser atendidas para a instalação das murchas vasculares: o patógeno deve conseguir entrar no sistema vascular e posteriormente continuar se desenvolvendo dentro dele (TALBOYS, 1972). Assim, plantas que apresentem células da epiderme e do córtex mais cutinizadas e/ou suberizadas tendem a ser mais resistentes a patógenos causadores de murchas vasculares por dificultar a entrada e a colonização. Do mesmo modo atuam a hipertrofia das paredes celulares com deposição de lignina e a produção de tiloses. A produção de substâncias como géis, gomas, caloses e outras nas células do xilema, também são sabidamente responsáveis pela resistência de plantas a patógenos causadores de murchas. Estas substâncias funcionam como barreiras ao desenvolvimento dos patógenos, dificultando o desenvolvimento de hifas de fungos e a livre circulação de esporos e células bacterianas pelos elementos de vaso do xilema. De forma semelhante aos mecanismos de resistência estruturais, metabólitos secundários podem estar relacionados à resistência por impedir à entrada e a colonização do sistema vascular por patógenos causadores de murchas. As fitoalexinas e algumas substâncias relacionadas à terpenóides são os metabólitos mais citados quando se trata de resistência à murchas vasculares (BARNETT, 1959; BECKMAN, 1961; BECKMAN, 1964; DIMOND, 1970; TALBOYS, 1972)

Estudos a respeito do processo infeccioso e dos mecanismos de resistência ao Fop no feijoeiro são escassos. Existem evidências da não existência de imunidade do feijoeiro quanto ao Fop. Dongo & Müller (1969) e Ribeiro & Ferraz (1984), em trabalhos visando à seleção de cultivares de feijoeiros resistentes à murcha de *Fusarium*, relataram ter isolado o fungo dos tecidos de caule das linhagens que não apresentavam sintomas externos da doença, mesmo sem observação de escurecimento vascular. López-Duque & Müller (1969) realizaram estudos

histológicos com a utilização de microscopia de luz em cultivares de feijão resistentes e suscetíveis a doença, e relataram a presença de gomas no xilema do caule de cultivares de feijão infectadas por Fop. No entanto, deduziram que estas substâncias não estavam envolvidas na resistência, pois as maiores severidades dos sintomas correlacionaram-se com as maiores quantidades de gomas. Estes mesmos autores não observaram diferenças anatômicas em tecidos de caule de cultivares de feijoeiro tolerantes e suscetíveis quando inoculadas com o fungo.

Alguns estudos têm sugerido que a arquitetura do sistema radicular e a presença de numerosas raízes adventícias em plantas de feijoeiro têm contribuído para a resistência desta leguminosa à *Fusarium solani* (SNAPP, 2003; ROMÁN-AVILÉS, 2004; CICHY, 2007). Nenhum estudo específico com este mesmo objetivo foi realizado para o *Fusarium* (Fop) em questão. Entretanto, Dongo & Müller (1969) relataram que algumas variedades de feijão resistentes apresentavam raízes laterais em maior número e vigor se comparadas às variedades suscetíveis ao Fop.

Antes de atingir o interior dos vasos do xilema, patógenos vasculares precisam romper as paredes altamente estruturadas e rígidas dessas células (YADETA & THOMMA, 2013). Em raízes resistentes existe uma relação negativa entre taxas mais baixas de colonização e respostas precoces de defesa, quando comparadas a suscetíveis (ZVIRIN et al., 2010; XUE et al., 2014; 2015). Plantas podem ativar um sistema imune de defesa nessas células do xilema de forma coordenada, que consiste em respostas físicas (material de oclusão e revestimento vascular) e químicas (vários compostos metabólicos, fitoalexinas, peroxidases e fenólicos). Possivelmente, pela capacidade que o Fop possui de colonizar vasos do xilema e atingir tecidos superiores (NIÑO-SÁNCHEZ et al., 2015), esses dois mecanismos de resistência podem ser muito importantes para o feijoeiro.

Alves-Santos (2002) isolaram *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* patogênicos, e identificaram um marcador RAPD específico para cepas altamente virulentas. O marcador SCAR-RAPD desenvolvido já foi utilizado com eficácia na identificação de isolados altamente virulentos brasileiros, no entanto, não pode ser usado como diagnóstico molecular da contaminação por FOP uma vez que isolados menos virulentos, mas patogênicos, escapam a detecção. Além disso, há ainda pouco conhecimento sobre o número de raças e variabilidade genética do Fop no Brasil e não há na literatura trabalhos voltados a obtenção de isolados geneticamente uniformes (monospóricos) de Fop com origem brasileira que possam subsidiar

os estudos subsequentes para desenvolvimento de testes diagnósticos e ensaios de fenotipagem.

Assim, o estudo sobre a resistência das cultivares de feijão no Brasil, deve ser constante, visto a importância da doença para a cultura e a falta de informações sistematizadas sobre as cultivares mais plantadas no país. Há ampla diversidade no germoplasma brasileiro quanto à resistência ao Fop. Com isso, as pesquisas realizadas serão utilizadas para novas fontes de resistência, sobretudo novas linhagens que estão em fase de recomendação para o cultivo.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a reação das principais cultivares comerciais de feijoeiro comum do estado do Paraná (*Phaseolus vulgaris* L.) quanto à resistência a diferentes isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Obter isolados monospóricos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* de diferentes regiões produtoras de feijão.

2- Caracterizar os isolados obtidos quanto à virulência e agressividade em cultivares de feijoeiro diferenciadoras e com reação já conhecida.

3- Caracterizar a reação das principais cultivares comerciais de feijoeiro comum mais plantadas no estado do Paraná frente aos isolados obtidos.

**ARTIGO 1: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DIFERENTES ISOLADOS DE  
*FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *PHASEOLI***

## 4 INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é afetada por vários tipos de patógenos que causam doenças e acarretam perdas significativas na produção. A murcha de Fusarium, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop), encontra-se entre as mais importantes doenças do feijoeiro comum, causadas por fungos de solo. Uma vez que o Fop está presente na maioria das diferentes regiões produtoras de feijão (PASTOR-CORRALES & ABAWI, 1987; SALA et al., 2006).

O patógeno sobrevive no solo em resíduos de culturas e forma de clamidósporos, que são estruturas de resistência. Uma vez o patógeno introduzido em um campo, dificilmente é eliminado por práticas culturais. A prática de controle mais viável e eficaz é usar cultivares resistentes (SARTORATO & RAVA, 1994) e, livrar a lavoura de sementes contaminadas. A produção de cultivares resistentes, entretanto, depende do conhecimento dos mecanismos genéticos que desencadeiam a resistência e/ou a virulência e agressividade do patógeno.

Até agora apenas um gene maior de resistência ao Fop foi mapeado na cultivar Tenderette (RIBEIRO & HAGEDORN, 1979) e o grupo de cultivares IPA 6, Rosinha G2 e Preto Uberabinha é suscetível a raça 2 (brasileira) (NASCIMENTO et al., 1995). Por outro lado, as variações dentro da espécie de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, identificadas como raças, dificultam a seleção de fontes de resistência, devido às grandes diferenças na severidade da doença. Ito et al. (1997), trabalhando com sete isolados do patógeno, constataram quatro raças fisiológicas no Brasil. Alves-Santos et al. (2002) isolaram *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* patogênicos, identificando um marcador RAPD específico para raças altamente virulentas das sete raças presentes na literatura. No Brasil, havia uma sugestão inicial de que apenas uma raça de Fop estaria representada, a raça 2 (NASCIMENTO et al., 1995) mas, recentemente essa ideia vem sendo questionada por alguns autores que sugerem haver um número bem maior, talvez acima de sete raças (HENRIQUE et al., 2015).

Além disso, há ainda pouco conhecimento sobre o número de raças e variabilidade genética do Fop no Brasil e estudos subsequentes para o desenvolvimento de testes diagnósticos e ensaios de fenotipagem são necessários.

Com isso, o objetivo deste trabalho foi caracterizar isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* de diferentes regiões produtoras de feijão quanto à virulência e agressividade em cultivares de feijoeiro.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Obtenção e caracterização dos isolados monospóricos de Fop

Plantas com sintomas típicos da murcha de *Fusarium* foram coletadas a partir de lavouras comerciais em Planaltina, Minas Gerais; e em áreas do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Londrina, e da Fundação ABC, Arapoti, Paraná, nas quais o cultivo de feijão comum ocorre há pelo menos dez anos.

Para o isolamento do Fop, foi utilizado o método de isolamento de patógenos de raiz. Foram utilizadas três plantas como fonte de inóculo de Arapoti (Fundação ABC), duas plantas de Londrina (IAPAR) e 3 plantas de Planaltina que apresentavam escurecimento de raiz, sintoma típico da doença. As raízes das plantas amostradas foram lavadas em água corrente e sabão e com auxílio de um instrumento cortante, devidamente flambado, expôs-se a parte interna do tecido afetado, e com um estilete esterilizado, retirou-se pequenos fragmentos do caule (xilema) e da raiz, da margem da lesão na 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 com água destilada esterilizada. Com auxílio de uma pinça flambada, os fragmentos foram transferidos, após as lavagens, para placa de Petri contendo papel filtro esterilizado e na sequência foram transferidos para placas contendo meio BDA, e a seguir incubados sob temperatura de  $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  e fotoperíodo de 12 horas (MENEZES & SILVA, 1997).

Para a obtenção de culturas puras, o micélio cotonoso que cresceu ao redor dos fragmentos foi repicado em três ciclos sucessivos (LESLIE e SUMMERELL, 2006).

Dos inóculos com características morfológicas evidentes (coloração e crescimento da colônia, pigmentação do meio) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* obtidos nos isolamentos foram realizadas 15 culturas monospóricas de cada isolado, por meio de plaqueamento de suspensão de conídios sobre meio de cultura BDA. Com o auxílio de uma pinça de platina flambada e desinfetada em álcool 70% foi retirada uma quantidade de micélio da cultura inicial e a partir desta obteve-se uma suspensão de esporos na concentração de  $1 \times 10^6$  em solução de água e Tween 80 (0,5%) para desfazer a tensão superficial existente entre os esporos, garantindo assim o isolamento de esporos únicos. Os esporos foram individualmente depositados em meio BDA segundo a técnica de microcultivo desenvolvida por Kane (1997) e verificou-se por microscopia a presença de um único conídio para cultivo monospórico em BDA.

Os 120 isolados monospóricos obtidos (8 plantas doadoras x 15 culturas monospóricas) foram identificados por PCR e por análise morfológica em microscopia óptica (Benedetti, 2017). Para a identificação molecular pares de primers específicos previamente descritos por Arif et al. (2012), amplificam uma região ITS específica de *Fusarium solani*, ITS-F – ITS-R: ITS-F5'CCAGAGGACCCCCTAACTCT3' e ITS-R 5'CTCTCCAGTTGCGAGGTGTT3' e permitiu avaliar se havia contaminação por *F. solani*. Já para a identificação molecular de Fop, foram usados os primers SCAR-RAPD, relacionado a virulência e desenvolvido por Alves-Santos (2002), scarB310-A280 (A280: 5'TATACCGGACGGGCGTAGTGACGATGG3' e B310: 5'-CAGCCATTCATGGATGACATAACGAATTC3'). Os isolados foram ainda morfológicamente avaliados quanto ao número de septos nos macroconídios por microscopia. Em ambas as análises um isolado monospórico de Fop (IAC9453), cedido para este estudo em parceria com o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) foi utilizado como controle positivo para caracterizar os isolados obtidos.

## 5.2 Teste de Patogenicidade

O teste de patogenicidade foi realizado com três isolados monospóricos identificados como Fop e com o controle IAC9453 a partir da observação de reações de diferentes cultivares de feijão comum com o objetivo de identificar perfis distintos de virulência e agressividade. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação da Universidade Estadual do Norte do Paraná, *campus* Luiz Meneghel, cidade de Bandeirantes, com quatro cultivares caracterizadas na literatura. Para a inoculação foram utilizados os isolados de Fop nominados PMG2, PMG5, IPR7 e IAC9453.

A patogenicidade dos isolados foi avaliada através da inoculação de plantas de feijoeiro de duas cultivares diferenciadoras, Preto Uberabinha e IPA-6. As cultivares suscetíveis IAC Alvorada e a Rosinha G2 foram utilizadas nos testes para confirmar a patogenicidade dos isolados (NASCIMENTO et al., 1995).

Para o ensaio de patogenicidade, as culturas monospóricas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* foram cultivadas em placas de Petri contendo BDA, à temperatura de 27 °C ± 1 °C, durante sete dias. Após a esporulação 10 ml de água destilada esterilizada foram utilizados para suspender os esporos. Com o auxílio de uma alça de Drigalski, retirou-se cuidadosamente o micélio da placa, para assim obter conídios (macro e micro). Então,

transferiram-se os 10 ml de água com a suspensão de conídios para filtragem com duas camadas de gaze, retirando resquícios de fragmentos do micélio presente. Procedeu-se com a quantificação do inóculo em câmara de Neubauer, com calibração para a concentração de  $10^6$  conídios/ml (PASTOR-CARRALES & ABAWI, 1987) a qual foi imediatamente utilizada na inoculação das plantas de feijão.

A semeadura das cultivares foi realizada em bandejas de plásticos com substrato comercial, terra e areia (3:1), previamente desinfestadas com água e hipoclorito de sódio a 1%, mantidas em casa de vegetação para germinação e crescimento. Quando as plantas de feijão apresentavam o primeiro par de folhas unifolioladas completamente expandida, elas foram retiradas das bandejas e submetidas à inoculação.

Para inoculação das plantas foi utilizado o Método de Imersão das Raízes, o qual se baseia na imersão do sistema radicular lavado em água corrente e 1/3 de seu comprimento cortado e mergulhado na suspensão de macro e macroconídios. As raízes ficaram em imersão na suspensão durante cinco minutos, e posteriormente foram replantadas em vasos plásticos, contendo terra, areia e substrato (PASTOR-CORRALES & ABAWI, 1987). Para evitar avaliações equivocadas em relação aos sintomas visuais na parte aérea, todas as plantas foram adubadas aos 15 DAI com adubo granulado 20:10:20 (1,0 g).

As avaliações foram realizadas 07, 14, 21, 28 e 32 dias após a inoculação. A patogenicidade foi avaliada por meio da presença de sintomas como clorose das folhas, murcha, redução de crescimento e escurecimento vascular. A severidade da doença foi avaliada com base no índice de severidade da doença, desenvolvido no Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, 1990), o qual consiste das notas: 1= nenhum sintoma foliar; 3 = de uma a três folhas, que representa 1% a 10% de folhas sintomáticas, com suave murchamento de plantas e cloróticas; 5 = cerca de 11% a 25% de folhas sintomáticas, moderada murcha nas plantas; 7 = aproximadamente 26% a 50% de folhas e ramos sintomáticos, com severa murcha de plantas; 9 = 75% ou mais das folhas e ramos murchos e cloróticos, levando a planta à morte. As 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, 1987).

Após todas as avaliações realizadas, amostras da região basal do caule (xilema) no sentido da raiz foram cuidadosamente cortadas com lâmina previamente esterilizada, para verificação do escurecimento dos vasos, e por fim, o reisolamento do fungo para confirmação da infecção e colonização pelo Fop nas plantas sintomáticas.

O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento. Cada tratamento consistiu em uma cultivar inoculada com um isolado. Como controle negativo (testemunha) foram utilizadas três plantas de cada cultivar inoculadas com água destilada esterilizada. As médias de severidade foram submetidas à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5 % de probabilidade, com o auxílio do software ASSISTAT (SILVA & AZEVEDO, 2016).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Obtenção e Caracterização dos Isolados Monospóricos de Fop

As plantas sintomáticas analisadas e que passaram pelo processo de isolamento de patógenos, no Laboratório de Fitopatologia, estão descritas na tabela abaixo (Tabela 2).

**Tabela 2:** Características de crescimento de Fop em meio BDQ e manutenção dos isolados, cultivo monospóricos, armazenados ou descartados.

Plantas Sintomáticas (Origem)		Crescimento do fungo		Cultivo em meio BDA
		Sim	Não	
<b>Arapoti (Paraná)</b>	Planta 1	X		Monospórico
	Planta 2	X		Monospórico
	Planta 3	X		Armazenado
	Planta 4	X		Armazenado
	Planta 5		X	Descartado
	Planta 6		X	Descartado
	Planta 7		X	Descartado
	Planta 8		X	Descartado
	Planta 9	X		Armazenado
	Planta 10	X		Armazenado
<b>IAPAR (Londrina)</b>	Planta 1		X	Descartado
	Planta 2		X	Descartado
	Planta 3		X	Descartado
	Planta 4		X	Descartado
	Planta 5	X		Armazenado
	Planta 6	X		Monospórico
	Planta 7	X		Monospórico
	Planta 8		X	Descartado
	Planta 9		X	Descartado
	Planta 10		X	Descartado
<b>Planaltina (Minas Gerais)</b>	Planta 1	X		Armazenado
	Planta 2	X		Monospórico
	Planta 3	X		Armazenado
	Planta 4	X		Monospórico
	Planta 5	X		Monospórico
	Planta 6	X		Armazenado
	Planta 7		X	Descartado
	Planta 8		X	Descartado
	Planta 9	X		Armazenado
	Planta 10		X	Descartado

Observa-se que nem de todas as plantas provenientes das áreas contaminadas com Fop ocorreram o crescimento em placa do patógeno, não sendo possível assim o isolamento do fungo. Essas placas foram descartadas após uma análise visual das colônias, micélios, coloração do meio e outros contaminantes presentes.

Os isolados produzidos a partir da planta 6, originária do IAPAR, mesmo com característica como coloração avermelhada do meio, não puderam ser identificados como *F. solani* ou Fop pela análise morfológica. Com análise da pigmentação das colônias, nos cultivos monospóricos, foi possível concluir que este não apresentava aspectos característicos, sendo assim excluído das análises de patogenicidade e microscopia.

Foram obtidas 15 placas com isolados monospóricos referentes a cada isolado das plantas escolhido com características morfológicas comum de Fop (coloração e crescimento da colônia, pigmentação do meio) (Anexo 1). Resultando assim em 105 placas com isolados monospóricos (seis representantes das coletas em campo e o isolado do IAC). Estes monospóricos foram nominados, conforme a tabela abaixo (Tabela 3).

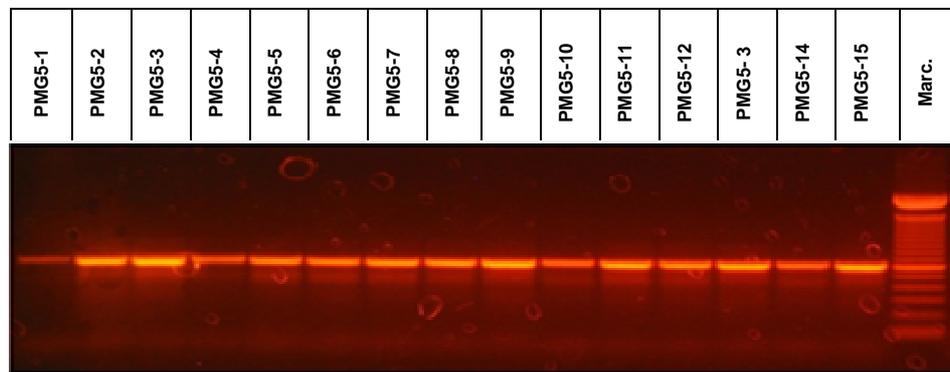
**Tabela 3:** Nomenclatura adotada para isolados monospóricos obtidos de plantas com sintomatologia da murcha de Fusarium, de diferentes locais e cultivares.

Local (Planta de origem)	Cultivares	Nome do isolado - Identificação
Arapoti – Paraná (P1)	Não Informado	APR1 - Fop
Londrina – Paraná (P7)	Não Informado	IPR7 - Fop
Minas Gerais (P2)	Pérola	PMG2 - Fop
Minas Gerais (P5)	Pérola	PMG5 - Fop
IAC – Campinas/SP	Não Informado	IAC9453 - Fop
Minas Gerais (P4)	Pérola	PMG4 – <i>F. solani</i>
Arapoti – Paraná (P2)	Não Informado	APR2 – Fop / <i>F. solani</i>

Foi observada variação na pigmentação do micélio em uma das colônias monospóricas do isolado IPR7 e quatro colônias do isolado PMG2, as demais colônias apresentaram pigmentação (frente e verso), textura do micélio aéreo e formato de borda da colônia dentro dos padrões de coloração referentes à Fop como citado por Leslie e Summerell (2006), e o isolado monospórico IAC9453, cedido pelo IAC/Campinas-SP, conforme esperado, foram morfológicamente caracterizado como Fop.

Os 15 isolados referentes ao PMG4 foram identificados como *F. solani*. Os demais isolados produzidos como IPR7, PMG2, APR1 e PMG5, os isolados monospóricos foram identificados como Fop. Dos isolados produzidos a partir do APR2, quatro foram identificados como *F. solani* (monospórico P2.3, P2.13, P2.14 e P2.15) e os demais como *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Na amplificação com os primers SCAR-B310 – A280 (ALVES-SANTOS, 2002), todos os isolados monospóricos obtidos a partir do PMG5, PMG2 e APR1, resultaram na amplificação do fragmento de ~609pb identificado e descrito por Alves-Santos et al. (2002) (Figura1).

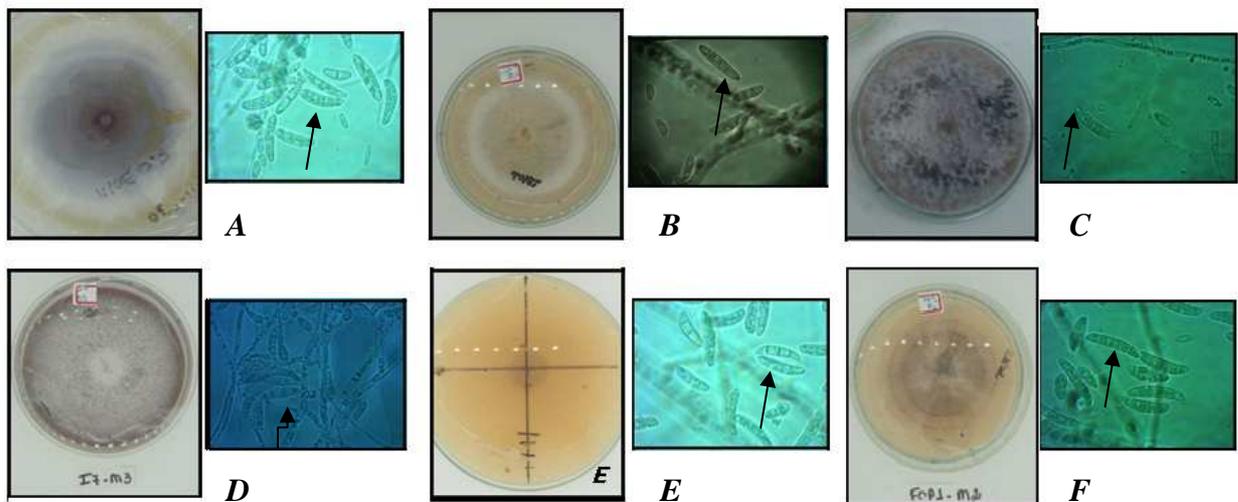


**Figura 1:** Bandas amplificadas dos isolados PMG5 de Minas Gerais apresentando amplificação dos seus cultivos monósporos apresentando alta virulência por amplificar o primers SCAR (~609pb); Marcador molecular 100pb com fragmento de maior intensidade equivalente à 500pb.

Os primers ITS-F – ITS-R (Amif et al., 2012) possibilitaram a identificação molecular dos isolados de *F. solani* nos materiais monospóricos produzidos a partir do PMG4; e também possibilitaram a identificação dos isolados 3, 13, 14 e 15, produzidos a partir do APR2 como sendo *F. solani*. Para os demais isolados a PCR com os primers ITS-F – ITS-R não resultaram em amplificação. Tais resultados corroboram com os obtidos tanto na análise morfológica dos micélios quanto os obtidos a partir da observação microscópica dos macro e microconídios (BENEDETTI, 2017).

As análises morfológicas e visualização dos macro e microconídios (Figura 2) possibilitaram confirmar os resultados obtidos com as PCRs específicas acima mencionadas, uma vez que os isolados positivos para ITS-F – ITS-R, apresentaram esporos não septados, enquanto aqueles positivos para os primers SCAR-RAPD e os negativos para o marcados ITS-F – ITS-R apresentaram esporos com 3-6 septos e morfologia em meia lua.

Ainda, foi possível observar que os primers SCAR não foram suficientes para identificar todos os isolados de Fop. Alguns isolados foram identificados pela união dos resultados negativo na PCR realizada com os primers ITS desenvolvidos para *F. solani* e análise microscópica positiva para esporos *F. oxysporum*, são representados por: todos monospóricos PMG4 e monopóricos P2.3, P2.13, P2.14 e P2.15 (conjunto do monospóricos P2). Estes, portanto, foram isolados caracterizados como *Fusarium solani*.



**Figura 2:** Crescimento micelial em meio BDA e observação microscópica em aumento 80x dos isolados monospóricos. Flechas apontam os microconídios. A) Fop, isolado PMG5; B) Fop, isolado PMG2; C) Fop, IAC9453; D) Fop, isolado IPR7; E) Fop, isolado APR2; F) Fop, isolado APR1.

Os monospóricos produzidos a partir dos isolados PMG5, IPR7, APR1, PMG2 e APR2 (monospóricos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12) mostraram macroconídios com 3 a 6 septos com as suas extremidades curvadas, característica exclusiva de Fop. Os isolados IPR7 e APR2 não amplificaram na análise molecular, seguindo o protocolo proposto por Alves-Santos et al. (2002). Tal resultado demonstra a variabilidade do patógeno, pois mesmo caracterizado como Fop, não se pode afirmar sua alta virulência.

Estes resultados demonstram que em uma mesma área de produção de feijoeiro, os dois patógenos podem colonizar simultaneamente a mesma planta. Há confusão de sintomas, dificultando o diagnóstico mais preciso no campo, podendo implicar em mais complexidade no manejo.

A caracterização morfológica do *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* é de difícil conclusão, pela falta de conhecimento do fungo, e poucas referências literárias nesse campo (LESLIE e SUMMERELL, 2006). As análises morfológicas realizadas no presente estudo

também mostraram haver variação de pigmentação do micélio, variando do branco ao roxo intenso, dentro de uma mesma população de isolados. Esse resultado coincide com os obtidos em outros trabalhos realizados com *Fusarium oxysporum* (NELSON ET AL., 1993; LESLIE & SUMMERELL, 2003, VELOSO, 2013).

A falta de correlação entre patógeno e raças deixa a identificação de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* muito mais complexa. Isso pode ocorrer pela inativação total ou parcial dos genes de virulência que resulta na perda de patogenicidade sem alterar sua estrutura filogenética geral (SKOVGAARD et al. 2002).

Alves-Santos et al. (2002) mostraram a amplificação de 100% dos isolados virulentos de Fop obtidos na Espanha. No entanto, para o isolado IAC9453 cedido pelo IAC de Campinas (São Paulo, Brasil), não houve a amplificação do primer, o que, segundo Alves-Santos et al. (2002), indicaria a existência de uma nova raça de Fop. Assim é possível sugerir que a distinção entre isolados brasileiros altamente virulentos e não virulentos apenas com base no marcador SCAR-RAPD seja insuficiente, devido a variabilidade existente. A identificação de novos marcadores a partir do background genético de isolados e raças encontrados no Brasil possa ser mais efetiva para essa caracterização e identificação.

## 6.2 Teste de Patogenicidade

Dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* obtidos em coletas e testados quanto à patogenicidade, todos se apresentaram patogênicos às cultivares de feijoeiro IAC Alvorada e Rosinha G2 (Tabela 4). Estas duas cultivares são utilizadas como controle positivo em pesquisas, pois apresentam suscetibilidade a doença.

Uma suscetibilidade mais acentuada de IPA-6 aos isolados inoculados era esperada, como previamente afirmado na literatura (IPA, 1996; MIRANDA et al., 1996; NASCIMENTO et al., 1995), confirmando assim, a patogenicidade dos mesmos.

Observou-se que houve aumento gradativo nas médias das avaliações após 14 DAI, seguindo o método do CIAT. Isso pode ser justificado pelo fato da doença começar sua manifestação com sintomas mais nítidos na parte aérea, já ocorrendo sua infecção e colonização nas plantas de feijoeiro. Resultados similares foram obtidos por Pereira et al. (2008), com avaliação da severidade aos 21 DAI. Entretanto, Cavalcanti et al. (2002) e Nascimento et al. (1995), avaliando linhagens de feijão inoculadas com Fop, concluíram que a data mais adequada para realização das avaliações foi aos 30 DAI. Alguns estudos

relataram avaliações de severidade da murcha de *Fusarium* apenas aos 11 e 12 DAI (CÂNDIDA et al., 2009; COSTA et al., 2007; RAVA et al., 1996).

Foi estabelecida suscetibilidade intermediária para o genótipo Preto Uberabinha, considerado suscetível apenas à raça brasileira (ALVES-SANTOS et al., 2002; NASCIMENTO et al., 1995). Nas avaliações, foi o que apresentou desenvolvimento melhor das plantas, quando comparados com os outros tratamentos.

Quando analisados desta forma, nota-se que praticamente não houve diferença significativa entre as cultivares frente aos isolados. Porém, houve diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre os isolados utilizados, sendo o isolado PMG5 e PMG2 foram equivalentes estatisticamente e menos agressivos. Ao passo que IPR7 e IAC9453 mostraram-se mais virulentos comparativamente aos dois primeiros, e estatisticamente equivalentes entre si (Tabela 4).

De forma geral, as cultivares Rosinha G2, IAC Alvorada e Preto Uberabinha apresentaram reação intermediária (notas de 3,4 a 5,8) frente aos quatro isolados avaliados. Já a cultivar IPA-6 apresentou reação intermediária aos isolados PMG5, PMG2 e IAC9453 e suscetibilidade frente ao isolado IPR7.

Os isolados obtidos e avaliados neste estudo, apresentaram pouca variabilidade quanto à virulência na avaliação fenológica, sendo patogênicos nas cultivares avaliadas.

**Tabela 4:** Médias obtidas da 5ª avaliação realizada com cultivares de feijoeiro inoculadas com o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop).

ISOLADOS DE FOP				
CULTIVARES	PMG2	PMG5	IPR7	IAC9453
<b>Rosinha</b>	3,4 aB I	4,6 abAB I	5,8 aA I	5,0 aAB I
<b>IAC Alvorada</b>	3,4 aB I	5,4 aAB I	5,8 aA I	5,8 aA I
<b>Preto Uberabinha</b>	3,8 aA I	4,2 abA I	3,8 bA I	5,4 aA I
<b>IPA-6</b>	4,2 aB I	3,4 bB I	7,4 aA S	5,0 aB I

dms para colunas = 1.89, classificadas com letras minúsculas (Isolados); dms para linhas = 2.01 classificadas com letras maiúsculas (cultivares). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV% = 29.85. Letras I: resistência intermediária. Letra S: suscetível.

Conclui-se que o isolado mais agressivo foi IPR7, seguido do IAC9453, os quais apresentaram médias de notas CIAT entre 3,8 a 7,4. Das cultivares testadas, a Rosinha G2

mostrou diferença estatística apenas entre os isolados PMG2 e IPR7. A IAC Alvorada entre PMG2 e IPR7, PMG2 e IAC9453 (IPR7 e IAC9453 mostraram-se igualmente agressivos); e a cultivar IPA6 mostrou diferença apenas com isolado IPR7. Para Preto Uberabinha não houve diferença entre os isolados, sendo esta a cultivar com comportamento intermediário frente às médias segundo o CIAT.

É interessante notar que as notas médias variaram de 3,4 a 7,4 e que os primers SCAR-RAPD proposto por Alves-Santos (2002) em teoria resultaria no diagnóstico apenas dos isolados com notas acima de 7,0. Os isolados inoculados PMG2 e PMG5 foram positivos para os primers SCAR-RAPD, mas nas cultivares apresentaram-se menos agressivos que o esperado. O isolado PMG2, por exemplo, foi positivo para o marcador SCAR-RAPD e, no entanto sua média CIAT foi de 3,4 a 4,2, ou seja, seria considerado de baixa virulência e consequentemente não deveria ter resultado em PCR positiva para os primers SCAR-RAPD. Já isolados IPR7 e IAC9453 foram negativos na análise molecular com os primers identificadores de Fop com alta virulência, no entanto mostraram reação intermediária nas cultivares inoculadas.

O estudo da variabilidade fisiológica do patógeno é de grande importância para um programa de melhoramento, pois a existência de raças do patógeno pressupõe que um genótipo identificado como resistente numa região de cultivo pode ou não manter esta característica em outra região. Ribeiro & Hagedorn (1979) observaram a semelhança na patogenicidade de isolados provenientes dos EUA e da Holanda, os quais foram diferentes dos isolados brasileiros.

As raízes de todas as plantas foram fotografadas e o patógeno foi recuperado em placas de Petri contendo BDAA para uma análise futura, confirmando assim a inoculação e infecção do fungo nas plantas.

As observações e resultados com sintomas em raízes confirmaram que as cultivares Rosinha G2 e IAC Alvorada são suscetíveis à Fop. O amarelecimento e murchamento das plantas foram observados pela primeira vez aos 15 dias após inoculação (DAI). Outros sintomas observados foram baixa estatura, com dificuldades no desenvolvimento quando comparadas às testemunhas. Posteriormente mostraram descoloração vascular e necrose dos tecidos do caule. Aos 21 DAI, a maioria das plantas de Rosinha G2, IAC Alvorada e IPA-6 estavam com murcha e cloróticas. As plantas da cultivar Preto Uberabinha tornaram-se um pouco cloróticas e sofreram menor redução no crescimento em comparação às plantas não inoculadas e as demais cultivares diferenciadoras.

Descoloração vascular dos tecidos do tronco, indicando a colonização por Fop, foi observada em todas cultivares inoculadas, porém sintomas foram mais intensos nas plantas de Rosinha G2, IPA6 e IAC Alvorada do que nas plantas de Preto Uberabinha. No entanto, mesmo com pouco sintoma e vermelhidão no caule, houve o crescimento do fungo, quando colocado um fragmento em placa com BDA.

Em estudos envolvendo seleção de cultivares de feijão resistentes à murcha de *Fusarium*, Dongo & Müller (1969) e Ribeiro & Ferraz (1984) também re-isolaram Fop de tecidos-tronco de plantas de genótipos sem sintomas de doenças externas.

Outros estudos sugeriram que a resistência do hospedeiro à infecção por patógenos que colonizam o xilema pode estar ligada ao espessamento das paredes celulares. Hall et al. (2011) comparando cultivares de algodão moderadamente resistentes e suscetíveis a *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* encontraram um espessamento mais pronunciado das paredes celulares do xilema das plantas moderadamente resistentes. Com base nos resultados obtidos no estudo, uma hipótese plausível para a resistência da cultivar Manteigão Fosco 11 à infecção por Fop é a de que as paredes celulares do xilema pareciam ser mais achatadas em comparação às demais cultivares (PEREIRA et al., 2013).

Embora existam alguns relatos sobre as diferenças na histopatologia de tecidos de caule de cultivares resistentes e suscetíveis infectadas por Fop, estudos detalhados que abordam o processo infeccioso em tecidos vegetais são escassos, principalmente comparando as reações de cultivares resistentes, intermediárias e suscetíveis.

Não foi possível, apesar de esforços, conseguir um número mínimo de cultivares diferenciadoras que completasse uma das propostas de classificação por raças relatada na literatura. A proposta envolvendo o menor número de cultivares, Nascimento et al. (1995), estabelece quatro (Preto Uberabinha, BBL-274, Tenderette e IPA-6), das quais neste estudo conseguiu-se acesso à duas sementes, Preto Uberabinha e IPA-6. As cultivares Rosinha G2 e IAC Alvorada são mais relacionadas na literatura como testemunhas suscetíveis, ou outras características de interesse (HENRIQUE et al., 2011). Porém não são classificadas como diferenciadoras de raças.

## 7 CONCLUSÕES

Dos isolados obtidos, quatro foram caracterizados como *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e um como *Fusarium solani*. Destes cinco, os monospóricos PMG5, PMG2 e APR1 foram classificados como altamente agressivos na avaliação molecular e também caracterizados morfológicamente. Isolados monospóricos do IPR7 foram confirmados como Fop através de sua morfologia, sendo negativos para análise molecular. Os primers SCAR-RAPD não foram suficientes para identificar todos os isolados de Fop. Os isolados apresentaram reação intermediária à inoculação nas cultivares diferenciadoras e de controle no estudo fenológico. A cultivar IPA-6 mostrou reação de suscetibilidade ao isolado IPR7.

**ARTIGO 2: REAÇÃO DE CULTIVARES COMERCIAIS DE FEJJOEIRO A  
ISOLADOS DE *FUSARIUM OXYSPOURUM* F. SP. *PHASEOLI***

## 8 INTRODUÇÃO

A murcha de Fusarium causada pelo patógeno habitante de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop) é uma das doenças mais importantes do feijoeiro e está presente em regiões produtoras de vários países, inclusive no Brasil (ABAWI & PASTOR-CORRALES, 1990; ALVES-SANTOS, 2002; BURUCHARA & CAMACHO, 2000; TOLEDO-SOUZA, 2012).

No Brasil, a ocorrência de Fop é predominante em todas as áreas produtoras de feijoeiro-comum (ABAWI & PASTOR-CORRALES, 1990; TOLEDO-SOUZA, 2012), contribuindo de forma efetiva para a redução de sua produtividade. Segundo Ramalho (2012), isto se deve aos plantios sucessivos do feijoeiro, ausência de rotação de culturas e uso de cultivares suscetíveis a Fop, inviabilizando o cultivo do feijoeiro sob irrigação por pivô central em várias áreas produtoras.

A introdução do patógeno em áreas isenta ocorre, em geral, por meio de sementes infectadas e uso de implementos agrícolas contaminados. Este fungo sobrevive tanto saprofiticamente ou pela produção de estruturas de resistência (clamidósporos), que permanecem viáveis no solo durante vários anos, o que aumenta a dificuldade em seu controle (BARBOSA & GONZAGA, 2012).

Em virtude de ser um fungo habitante de solo e colonizar o sistema vascular, não se recomenda o uso de fungicidas na parte aérea da planta. O manejo com a doença restringe-se à rotação de culturas, tratamento de sementes e uso de cultivares resistentes. Cross et al. (2000) relatam que o uso de cultivares resistentes é o método mais efetivo de controlar as perdas econômicas causadas pela murcha de Fusarium.

Há variação nos resultados de trabalhos que abordam a reação de cultivares quanto à resistência à murcha de Fusarium do feijoeiro. A falta de padronização de metodologias de inoculação e avaliação e a grande influência ambiental na severidade da murcha de Fusarium, possivelmente, têm contribuído para a discrepância dos resultados. Com isso, o objetivo desse trabalho, foi avaliar a reação das principais cultivares de feijoeiros comum do Paraná a diferentes isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

## 9 MATERIAL E MÉTODOS

Em casa de vegetação da Universidade Estadual do Norte do Paraná, *campus* Luiz Meneghel, 15 cultivares (Tabela 5) foram avaliadas quanto à reação ao Fop. Cinco isolados monospóricos de origens diferentes, já caracterizados morfológicamente e molecularmente, foram utilizados para este experimento: APR1, PMG2, IPR7, PMG5 e IAC9453. Foram inoculadas cinco repetições para cada cultivar. Como testemunhas, outras cinco plantas de cada cultivar tiveram suas raízes mergulhadas somente em água. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso. Cada repetição consistiu em um vaso com uma planta inoculada com um isolado diferente, identificados pela metodologia proposta por Alves-Santos et al. (2002).

**Tabela 5:** Origem e principais características de interesse das cultivares comerciais de feijoeiro utilizadas na inoculação com Fop.

Cultivares	Origem <sup>1</sup>	Característica de Interesse <sup>2</sup>
Campos Gerais	IAPAR	Moderadamente Resistente
Andorinha	IAPAR	Sem Informação
Saracura	IAPAR	Moderadamente Resistente
Tangará	IAPAR	Resistente
Curió	IAPAR	Moderadamente Resistente
ANFC 9	IAPAR	Sem Informação
IPR 139	IAPAR	Moderadamente Suscetível
Eldorado	IAPAR	Moderadamente Suscetível
Bem-te-vi	IAPAR	Sem Informação
Tuiuiú	IAPAR	Resistente
Uirapuru	IAPAR	Suscetível
Jalo	EMBRAPA	Moderadamente Resistente
Esteio	EMBRAPA	Moderadamente Suscetível
Estilo	EMBRAPA	Suscetível
Sintonia	IAC	Moderadamente Resistente

<sup>(1)</sup>Embrapa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; IAC, Instituto Agronômico de Campinas; Iapar, Instituto Agronômico do Paraná. <sup>(2)</sup>Características obtidas das Instituições de Origem.

Para o experimento, as culturas monospóricas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* foram cultivadas em placas de Petri contendo BDA, à temperatura de 27 °C ± 1 °C, durante sete dias. Após a esporulação, 10 ml de água destilada esterilizada foram utilizados para suspender os esporos. Com o auxílio de uma alça de Drigalski, retirou-se cuidadosamente o

micélio da placa, para assim obter conídios (macro e micro). Então, transferiram-se os 10 ml de água contendo a suspensão de conídios para filtragem com duas camadas de gaze, retirando resquícios de fragmentos do micélio presente. Procedeu-se com a quantificação do inóculo em câmara de Neubauer, com calibração para a concentração de 10<sup>6</sup> conídios/ml (PASTOR-CARRALES & ABAWI, 1987) a qual foi imediatamente utilizada na inoculação das plantas de feijão.

A semeadura das cultivares foi realizada em bandejas de plásticos com substrato comercial, terra e areia (3:1), previamente desinfestadas com água e hipoclorito de sódio a 1%, mantidas em casa de vegetação para germinação e crescimento. Quando as plantas de feijão apresentavam o primeiro par de folhas unifolioladas completamente expandida, estas foram retiradas das bandejas e submetidas à inoculação.

Para inoculação das plantas foi utilizado o Método de Imersão das Raízes, o qual consiste na imersão do sistema radicular lavado em água corrente e 1/3 de seu comprimento cortado e mergulhado na suspensão de macro e macroconídios. As raízes ficaram em imersão na suspensão durante cinco minutos, e posteriormente foram replantadas em vasos plásticos, contendo terra, areia e substrato (PASTOR-CORRALES & ABAWI, 1987). Para evitar avaliações equivocadas em relação aos sintomas visuais na parte aérea, todas as plantas foram adubadas aos 15 DAI com adubo granulado 20:10:20 (1,0 g).

As avaliações foram realizadas aos 7, 14, 21, 28 e 32 dias após a inoculação (DAI). Para a incidência, qualquer sintoma visível de murcha de Fusarium em plantas foi registrado, como clorose das folhas, murcha, redução de crescimento. A severidade da doença foi avaliada com base no índice de severidade da doença do CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) o qual consiste das notas: 1 = nenhum sintoma foliar; 3 = de uma a três folhas, que representa 1% a 10% de folhas sintomáticas, com suave murchamento de plantas e cloróticas; 5 = cerca de 11% a 25% de folhas sintomáticas, moderada murcha nas plantas; 7 = aproximadamente 26% a 50% de folhas e ramos sintomáticos, com severa murcha de plantas; 9 = 75% ou mais das folhas e ramos murchos e cloróticos, levando a planta à morte. As 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, 1987).

As médias de severidade foram submetidas à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott para cultivares e Tukey para isolados com significância de 5 % de probabilidade, com o software ASSISTAT (SILVA & AZEVEDO, 2016).

## 10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas avaliações das cultivares comerciais de feijoeiro comum, frente aos isolados APR1, PMG2, IPR7, PMG2 e IAC9453, houve interação e diferença estatística significativa nos resultados obtidos.

Abaixo (Tabela 6) encontra-se a distribuição de médias da 5ª avaliação das notas de severidade da doença. Observa-se que as notas variaram de 1.0 (resistente) a 5.4 (intermediárias). Foi possível verificar que as cultivares classificadas como resistentes a todos os isolados foram Campos Gerais, Saracura, Bem Te Vi, Uirapuru, Jalo e Sintonia, sendo potenciais fontes de resistência ao patógeno. Nenhuma mostrou reação de suscetibilidade (6,1 a 9,0) frente aos cinco isolados estudados neste experimento.

De acordo com a escala CIAT, a cultivar Andorinha mostrou reação intermediária a quatro dos isolados, mantendo resistência ao isolado APR1. Esta cultivar não apresenta nas características fornecidas pelo IAPAR, informação quanto à doença de murcha de Fusarium, assim, não tendo base para alguma comparação. O mesmo ocorre com as cultivares Bem Te Vi, resistente a todos os isolados, e ANFC9, reação de resistência a quatro isolados e intermediário para um isolado, não tendo informações.

Cultivares como Campos Gerais, Saracura, Jalo e Sintonia mostraram-se resistentes aos isolados inoculados. Segundo IAPAR, EMBRAPA e IAC, estas são classificadas como moderadamente resistentes, portanto, os resultados quanto à reação foram dentro do esperado. Com destaque para a cultivar Jalo que foi a com maior desenvolvimento em altura, vigor e folhas praticamente sem clorose.

Uirapuru e Estilo são consideradas como suscetíveis à doença causada por Fop. Porém, com a inoculação destes isolados mostraram reação de resistência dentro da escala de médias do CIAT. Visto a variabilidade patogênica dos diferentes isolados deste trabalho, é possível um resultado conflitante às reações. Mesmo, por exemplo, o isolado PMG5 ter sido amplificado como altamente virulento com os primers SCAR-RAPD (ALVES-SANTOS et al., 2002), nestas avaliações com este grupo de cultivares, o isolado não expressou sua alta virulência. Com isso, não se pode afirmar uma validade para o primer em isolados obtidos de diferentes regiões geográficas dos utilizados em seu trabalho.

**Tabela 6:** Médias\* obtidas da 5ª avaliação realizada com cultivares comerciais de feijoeiro inoculadas com o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Cultivares Comerciais x Isolados de Fop								
Cultivares Comerciais	Isolados de Fop							
	APR1	PMG2	IPR7	PMG5	IAC9453			
<b>Campos Gerais</b>	3.0 aA <b>R</b>	2.6 bA <b>R</b>	3.0 bA <b>R</b>	2.6 bA <b>R</b>	2.2 cA <b>R</b>			
<b>Andorinha</b>	3.0 aA <b>R</b>	3.4 aA <b>I</b>	4.6 aA <b>I</b>	4.2 aA <b>I</b>	4.6 aA <b>I</b>			
<b>Saracura</b>	1.8 bA <b>R</b>	2.2 bA <b>R</b>	3.0 bA <b>R</b>	1.4 bA <b>R</b>	1.4 cA <b>R</b>			
<b>Tangará</b>	1.8 bA <b>R</b>	2.2 bA <b>R</b>	3.0 bA <b>R</b>	1.8 bA <b>R</b>	3.4 bA <b>I</b>			
<b>Curió</b>	3.0 aAB <b>R</b>	3.4 aA <b>I</b>	4.2 aA <b>I</b>	4.2 aA <b>I</b>	1.4 cB <b>R</b>			
<b>ANFC9</b>	3.0 aA <b>R</b>	2.2 bA <b>R</b>	3.4 bA <b>I</b>	1.8 bA <b>R</b>	2.6 cA <b>R</b>			
<b>IPR139</b>	3.0 aAB <b>R</b>	4.2 aA <b>I</b>	3.4 bAB <b>I</b>	1.8 bB <b>R</b>	3.4 bAB <b>I</b>			
<b>Eldorado</b>	1.0 bB <b>R</b>	1.8 bB <b>R</b>	1.0 cB <b>R</b>	1.4 bB <b>R</b>	5.4 aA <b>I</b>			
<b>Bem Te Vi</b>	1.4 bA <b>R</b>	2.2 bA <b>R</b>	1.8 cA <b>R</b>	2.2 bA <b>R</b>	1.4 cA <b>R</b>			
<b>Tuiuiú</b>	1.4 bB <b>R</b>	2.2 bAB <b>R</b>	1.8 cAB <b>R</b>	1.4 bB <b>R</b>	3.4 bA <b>I</b>			
<b>Uirapuru</b>	1.0 bA <b>R</b>	1.4 bA <b>R</b>	2.2 cAB <b>R</b>	1.4 bB <b>R</b>	2.2 cA <b>R</b>			
<b>Jalo</b>	1.8 bAB <b>R</b>	1.0 bB <b>R</b>	1.8 cAB <b>R</b>	3.0 aA <b>R</b>	1.8 cAB <b>R</b>			
<b>Esteio</b>	4.2 aA <b>I</b>	4.2 aA <b>I</b>	3.0 bAB <b>R</b>	1.8 bB <b>R</b>	2.2 cB <b>R</b>			
<b>Estilo</b>	1.0 bB <b>R</b>	1.4 bB <b>R</b>	1.0 cB <b>R</b>	3.4 aA <b>I</b>	1.4 cB <b>R</b>			
<b>Sintonia</b>	1.8 bA <b>R</b>	2.6 bA <b>R</b>	1.4 cA <b>R</b>	2.2 bA <b>R</b>	1.8 cA <b>R</b>			

\*analisadas de acordo com a escala proposta pelo CIAT. Classificadas com letras minúsculas (cultivares): as médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Classificadas com letras maiúsculas (isolados): as médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV% = 42.15. Letras I: Intermediária; R: resistente.

O isolado IAC9453 inoculado nas cultivares Tangará, Eldorado e Tuiuiú fez com que estas apresentassem reação intermediária. Para a inoculação dos outros isolados, as cultivares foram classificadas como resistente. Tangará e Tuiuiú são apresentadas pelo IAPAR como resistentes a murcha de *Fusarium*, corroborando com os resultados deste experimento frente

aos isolados APR1, PMG2, PMG5 e IPR7. No caso da cv. Eldorado sua característica a doença é de moderadamente suscetível, porém, foi avaliada como resistente a estes isolados.



**Figura 3:** Plantas de feijão inoculadas com isolados de Fop.

De acordo com os resultados as cultivares com resistência intermediária aos isolados APR1, PMG2 e IPR7 foram Curió, IPR139 e Esteio. Mas foram resistentes ao isolado PMG5 (Esteio e IPR139) e isolado IAC9453 (Curió e Esteio). Estas estão dentro do esperado de reação ao patógeno, visto que já são caracterizadas como moderadamente suscetíveis (IAPAR e EMBRAPA).

Sintomas da murcha de Fusarium como clorose, desfolha, murcha, e nanismo foram mais precoces e intensos no cv. Esteio. A clorose seguida de murcha nas folhas inferiores foi o primeiro sintoma registrado aos 14 e 21 DAI nas plantas das cv. Esteio e Curió, respectivamente.

A doença nas plantas das cultivares Andorinha e Eldorado, inoculadas com o isolado IAC9453, evoluiu causando clorose intensa aos 30 DAI. Em contraste, a maioria das plantas da cv. Eldorado não apresentaram sintomas em relação aos outros isolados do experimento.

Apesar dos resultados, não se pode descartar outros sintomas apresentados, como redução de crescimento. Vale ressaltar que isso só foi detectado pela existência de testemunhas sadias de cada cultivar, o que permitiu a comparação com as plantas inoculadas.

É válido ressaltar que mesmo para as cultivares resistentes como, por exemplo, BRSMG Talismã foi constatada redução do crescimento como sintoma da doença (AZEVEDO et al., 2015).

Pereira et. al. (2013) em estudo com diferentes escalas de avaliação quanto à reação de Fop em feijoeiro indicou, as linhagens Manteigão Fosco 11 e CVIII-85-11 com notas mínimas de severidade, ou seja, não foi visualizado qualquer sintoma da murcha de *Fusarium*, enquanto foram constatados sintomas únicos de redução do crescimento e clorose de baixa intensidade. A reação de cultivares de feijão quando inoculadas com Fop estudada por Dongo & Müller (1969), relataram que algumas cultivares de feijão apresentavam redução do crescimento. Este sintoma, algumas vezes, foi o único observado.

A maioria das cultivares de feijoeiro recomendadas dos grupos comerciais preto e carioca, os mais cultivados no Brasil, apresentaram reação intermediária ou de suscetibilidade a murcha de *Fusarium* (AZEVEDO et al., 2015). Neste presente estudo com o banco de isolados obtidos, esta foi à reação da maioria das cultivares avaliadas também..

Avaliações com linhagens quanto a resistência ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* foram realizadas por diversos autores. Em trabalho realizado por Sala et al. (2006), onde avaliaram linhagens de feijoeiro quanto às raças 1, 2, 3 e 4 da murcha de *Fusarium*, e relataram a dificuldade de encontrar cultivares resistentes ao patógeno a quatro raças de Fop. Foi determinado que 35, das 104 avaliadas, se mostraram resistentes ao fungo sendo úteis para a utilização em programas de melhoramento. Pereira et al. (2011), utilizando linhagens provenientes do banco de germoplasma da Universidade Federal de Lavras (UFLA) encontraram que 134 das linhagens, das 175 avaliadas, mostraram-se suscetíveis ao Fop.

Tanto este experimento com cultivares comerciais já em uso por produtores de feijão, como outros com linhagens, podem ser utilizados e indicados para VCU (Valor de Cultivo e Uso) para posterior recomendação de novas cultivares ao setor produtivo.

Novas pesquisas com obtenção de mais isolados, caracterizações e novas inoculações em cultivares diferentes devem ser realizadas em cultivares para o melhor conhecimento deste patógeno estudado que apresenta uma vasta variabilidade fisiológica e patogênica.

## 11 CONCLUSÕES

As cultivares comerciais Campos Gerais, Saracura, Bem Te Vi, Uirapuru, Jalo e Sintonia apresentam reação de resistência frente à inoculação dos isolados PMG5, PMG2, APR1, IPR7 e IAC9453. O isolado IAC9453 demonstrou as maiores médias, sendo assim o mais agressivo nas avaliações. Isolado APR1 demonstrou ser o menos virulento, todas cultivares tiveram reação de resistência frente a este, exceto a cultivar Esteio que foi intermediária. Nenhuma cultivar comercial de feijoeiro comum mostrou-se total suscetibilidade aos cinco isolados de Fop deste trabalho.

## 12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAWI, G.S. & PASTOR-CORRALES M.A. **Podridão da raiz do feijão na América Latina e África: diagnóstico, metodologias de pesquisa e estratégias de gestão.** Cali Colômbia. CIAT, 1990.

ABAWI G.S. **Problemas de produção de feijão nos trópicos.** 2nd Ed. Cali Colômbia. CIAT. p.p. 105-157. 1989.

ABREU, A. F. B. **Cultivo do Feijão da Primeira e Segunda Safra na Região Sul de Minas Gerais: Importância Econômica 2008.** Disponível em: <<http://migre.me/7oqdR>>. Acesso em: 15/05/2018. *Agropecuário*, 25:99-112, 2008.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology.** 2. ed. Burlington: Elsevier Academic Press, 922 p, 2005.

AIDAR, H. **Cultivo do feijoeiro comum.** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão; Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 2003.

AIDAR, H.; KLUTHCOUSKI, J. **Realidade versus sustentabilidade na produção do feijoeiro comum.** In: KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F.; AIDAR, H. Fundamentos para uma agricultura sustentável, com ênfase na cultura do feijoeiro. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p. 23-33, 2009.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.J.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology.** 4ed. New York: J. Wiley, 880 p, 1996.

ALVES-SANTOS, F. M. ET AL. **Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 8, p. 3335–3340, 1999.

ALVES-SANTOS, F.M.; BENITO, E.P.; ESLAVA, A.P.; DÍAZ-MÍNGUEZ, J.M. **Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece.** Plant Pathology, v. 51, n. 5, p. 605–611, 2002.

ALOJ, B.; MARZIANO, F.; ZOINA, A.; NOVIELLO, C. **Osservazione su una nuova razza fisiologica del *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.** Annali Facoltà Scienze Agrarie Università Studi Napoli Portici 4, 51–4, 1987.

ARIF, M.; CHAWLA, S.; ZAIDI, M.W.; RAYAR, J.K.; VARIAR, M.; SINGH, U.S. **Development of specific primers for genus *Fusarium* and *F. solani* using rDNA sub-unit and transcription elongation factor (TEF-1 $\alpha$ ) gene.** African Journal of Biotechnology Vol. 11(2), pp. 444-447, 5 January, 2012.

AZEVEDO, C.V.G., et al. **Adaptabilidade, estabilidade e resistência a patógenos em genótipos de feijoeiro.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 50, n. 10, p. 912-922, 2015.

BAAYEN, R.P.; O'DONNELL, K.; BONANTS, P.J.M.; CIGELNIK, E.; KROON, L.P.N.M.; ROEBROECK, E.J.A.; WAALWIJK, C. **Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic *formae speciales* causing wilt and rot disease.** Ecology and Population Biology, 2000.

BARNETT, H.L. **Plant disease resistance.** Annual Review Microbiology, 13:191-210, 1959.

BECKMAN, C.H. **Host responses to vascular infection.** Annual Review of Phytopathologic, v.2, p.231-252, 1964.

BECKMAN, C.H.; MACE, M.E.; HALMOS, S.; McGAHAN, M.W. **Physical barriers associated with resistance in fusarium wilt of bananas.** Phytopathology, v.51, p.507-515, 1961.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos.** 4.ed. São Paulo: Ceres, vol.01. 704p, 2011.

BIANCHINI, A.; MARRIZONI, A. C.; CAMEIRO, S. N. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo, v. 2. p. 333-349, 2005.

BOOTH, C. **Fusarium: laboratory guide to the identification of the major species**. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 1977.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. 4. ed. Viçosa: UFV, v.1, 525 p., 2005.

BRICK, M.A.; OGG, J.B.; SCHWARTZ, H.F.; BYRNE, P.F.; KELLY, J.D. **Resistance to multiple races of Fusarium wilt in common bean**. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 47:131-132, 2004.

CÂNDIDA, D.V.; COSTA, J.G.; RAVA, C.A.; CARNEIRO, M.S. **Controle genético da murcha de fusário (*Fusarium oxysporum*) em feijoeiro comum**. Tropical Plant Pathology, 34:379-384, 2009.

CARDOSO, C. O. N.; KIMATI, H.; FERNANDES, N. G. **Nota sobre a ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Schlecht.) Kendrick & Snyder causando murcha vascular em feijoeiro comum**. Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, n.23 p.273-276, 1966.

CARNEIRO, M. S.; CÂNDIDA, D. V.; COSTA, J. G. C.; RAVA, C. A. **Controle genético da murcha do fusário (*Fusarium oxysporum*) em feijoeiro comum**. Tropical Plant Pathology, v.34 n.6 nov/dez. 2009.

CASTELLANI A. **Viability of some pathogenic fungi in distilled water**. Journal Tropical Medicine & Hygiene, Baltimore, v. 24, p. 270-276, 1939.

CAVALCANTI, L. S.; COELHO, R. S. B.; PEREZ, J. O. **Utilização de dois métodos de inoculação na avaliação da resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli***. Ciência Rural, 32:1-5, 2002.

CHIORATO, A.F.; CARBONELL, S.A.M.; BOSETTI, F.; SASSERON, G.R.; LOPES, R.L.T.; AZEVEDO, C.V.G. **Common bean genotypes for agronomic and market-related traits in VCU trials.** *Scientia Agricola*, v.72, p.34-40, 2015.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). **Research constraints provisionally identified by CIAT.** Workshop on Advanced Phaseolus Bean Research Network, Palmira, CO, 1990.

CICHY, K.A.; SNAPP, S.S.; KIRK, W.W. **Fusarium root rot incidence and root architecture in grafted common bean lines.** *Plant Soil*, v.300, p.233-244, 2007.

CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Perspectivas para a Agropecuária.** Brasília, v.5, p. 1-112, set. 2017. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/perspectivas-para-a-agropecuaria>>. Acesso em: 06/08/2018.

CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Nono levantamento de acompanhamento da safra brasileira grãos 2017/2018.** Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_06\\_09\\_09\\_00\\_00\\_boletim\\_graos\\_junho\\_\\_2018\\_-\\_final.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_06_09_09_00_00_boletim_graos_junho__2018_-_final.pdf)>. Acesso em: 23/06/2018.

CORRELL, J.C. **The relationship between formae speciales, races, and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*.** *Phytopathology*, Saint Paul, 1991.

COSTA, A.F.; MENEZES, M.; MIRANDA, P. **Ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) em Pernambuco e Alagoas.** REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, Goiânia. Embrapa-CNPAP, p.282-284, 1982.

COSTA, J.G.C.; RAVA, C.A.; PURÍSSIMO, J.D. **Linhagens de feijoeiro comum resistentes à murcha-de-fusário.** Embrapa Arroz e Feijão, 19 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9571; 21), 2006.

COSTA, J.G.C.; RAVA, C.A.; PURÍSSIMO, J.D. **Obtenção de linhagens de feijoeiro comum resistentes a murcha-de-fusário.** Revista Ceres, 54:447-542, 2007.

CRUTE, I. C.; PINK, D. A. **Genetics and utilization of pathogen resistance in plants.** The Plant Cell, 8:1747-1755, 1996.

EMBRAPA, **Agência de Informação da Embrapa Arroz e Feijão 2003.** Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/>>. Acesso em: 13/05/2018.

DIMOND, A.E. **Biophysics and biochemistry of the vascular wilt syndrome.** Annual Review of Phytopathologic, v.8, p.301-322, 1970.

DONGO, S.L.; MÜLLER, L.E. **Estudios sobre la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* en el frijol.** II. Pruebas varietales. Turrialba v.19, p.82-90, 1969.

FAOSTAT: **FAO Statistical Databases 2013.** Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acesso em: 27 maio 2018.

GEPTS, P. **Beans, Origins and Development.** In: C. Smith (ed.), Encyclopedia of Global Archaeology. Springer, pp. 822-827, 2014.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; CRUZ, A.S.; LACANALLO, G.F.; VIDIGAL FILHO, P.S.; SOUSA, L.L.; PACHECO, C.M.N.A.; MCCLEAN, P.; GEPTS, P.; PASTOR-CORRALES, M.A. **Co-segregation analysis and mapping of the anthracnose Co-10 and angular leaf spot Phg-ON disease-resistance genes in the common bean cultivar Ouro Negro.** Theor Appl Genet. 126:2245-2255, 2013.

GONTIA-MISHRA, I.; TRIPATHI, N.; TIWARI, S. **A simple and rapid DNA extraction protocol for filamentous fungi efficient for molecular studies.** Indian J. Biotechnol, 13:536- 539, 2014.

GOULART, A.C.P. **Doenças do feijoeiro na Região Norte de Minas Gerais. Fitopatologia Brasileira, Brasília**, v.13, p.230-232, 1988.

JOHNSON, R. **A critical analysis of durable resistance.** Annual Review of Phytopathologic, 22:309-330, 1984.

HALL, C.; HEATH, R.; GUEST, D.I. **Rapid and intense accumulation of terpenoid phytoalexins in infected xylem tissues of cotton (*Gossypium hirsutum*) resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*.** Physiological and Molecular Plant Pathology 76:182-188, 2011.

HAWKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D.N. **Dictionary of the fungi.** Ainsworth & Bisby's, Cambridge: CAB International, 8 ed., 616 p, 1995.

HENRIQUE, F. H. ET AL. **Classification of physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common bean.** Bragantia, v. 74, n. 1, p. 84–92, 2015.

HENRIQUE, F. H; CARBONELL, S. A. M. ; ITO, M. F.; GONÇALVES, J. G. R.; PERINA, E. F.; LOPES, R. L. T.; CHIORATO, A. F. **Classificação e Caracterização de Raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em feijoeiro comum.** Anais do 6º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, Búzios-RJ, 2011.

INDEX FUNGORUM. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>>, acessado Maio de 2018.

ITO, M. F.; CARBONELL, S. A. M.; POMPEU, A. S.; RAVAGNANI, S.; LOT, R. C.; RODRIGUES, L. C. N. **Variabilidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.** Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 22. supl., p. 270-271, 1997.

IPA (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária). Feijão IPA-6. In: **Cultivares recomendadas pela Empresa IPA**, Pernambuco, p.27-28, 1996.

KANE, J.; SUMMERBELL, R.; SIGLER, L.; KRAJDEN, S.; LAND, G. **Laboratory handbook of Dermatophytes: a Clinical Guide and Laboratory Manual of Dermatophytes and Other Filamentous Fungi**. Star Publishing Co., Belmont, Ca, 1997.

KENDRIK, J. B.; SNYDER, W. C. **Fusarium yellows of beans**. Phytopathology, St. Paul, v. 32, p. 1010-1014, 1942.

KOVGAARD, K.; BODKER, L.; ROSENDAHL, S. **Population structure and pathogenicity of members of the *Fusarium oxysporum* complex isolated from soil and root necrosis of pea (*Pisum sativum* L.)**. FEMS, Microbiology Ecology 42, 367–74, 2002.

LESLIE, F. J. AND SUMMERELL, A.B. **The Fusarium Laboratory Manual**. Sydney - Austrália: Blackwell Publishing, 2006.

LIMA, L. K. DE. ET AL. **Repeatability of adaptability and stability parameters of common bean in unpredictable environments**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 48, Set. 2013.

LÓPEZ-DUQUE, S.L.; MÜLLER, L.E. **Estudio sobre la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* en frijol**. I. Patogenesis histología sintomatologica. Turrialba, 19:71-81, 1969.

MARCONDES, E.H.K.; SANTOS, J.B.; PEREIRA, H.S. **Seleção de linhagens de feijoeiro com tipo de grão carioca e com os alelos co-4 e co-5 de resistência à antracnose**. Ciência e Agrotecnologia, v. 34, p. 975-982, 2010.

MARINGONI, A.C.; LAURETTI, R.L.B. **Reação de genótipos de feijoeiro comum a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Macrophomina phaseolina* e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli***. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 34, v: 535-542, 1999.

MENEZES, M.; SILVA-HANLIN, D.M.W. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, 106p, 1997.

MEZIADI, C.; RICHARD, M.M.S.; DERQUENNES, A.; THAREAU, V.; BLANCHET, S.; GRATIAS, A.; PFLIEGER, S., GEFFROY, V. **Development of molecular markers linked to disease resistance genes in common bean based on whole genome sequence.** Plant Science. 2015.

MICHEREFF, S.J. ET AL. **Manejo integrado de doenças radiculares.** In: MICHEREFF, S.J. et al. Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife: UFRPE, p.367-388, 2005.

MIRANDA, B.A.; LOBO, J.R.; M & CUNHA, M.G. **Reação de cultivares do feijoeiro comum as podridões radiculares causadas por *Rizoctonia solani* e *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*.** Pesquisa Agropecuária Tropical v.37, p. 221-226, 2007.

MIRANDA, P.; COSTA, A.F.; REIS, O.V. & GONÇALVES, M.C. **Comportamento de linhas promissoras de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).** Pesquisa Agropecuária Pernambucana, 9, 11-17, 1996.

MOHAN, S. K. ET AL. **Doenças do feijoeiro no estado do Paraná: guia para identificação e controle.** Londrina: Fundação Instituto Agrônômico do Paraná, p. 26. 1983.

NASCIMENTO, S.R.C.; KUROZAWA, C. & MARINGONI, A.C. **Comportamento de cultivares e linhagens de feijoeiro em relação à podridão radicular de *Fusarium*.** Summa Phytopathologica v. 25, p. 214-217, 1999.

NASCIMENTO, S.R.C.; MARINGONI, A.C.; KUROZAWA, C. **Comportamento de variedades e linhagens de feijoeiro ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.** Fitopatologia Brasileira, v.20, n.3, p.458-463, set. 1995.

NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F.O. **Fusarium species: an illustrated manual for identification.** University Park: The Pennsylvania State University Press, 1993.

NIÑO-SÁNCHEZ, J.; TELLO, V.; CASADO-DEL, C.V., THON, M.R.; BENITO, E.P.; DÍAZ-MÍNGUEZ, J.M. **Gene expression patterns and dynamics of the colonization of**

common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by highly virulent and weakly virulent strains of *Fusarium oxysporum*. *Front. Microbiol.* 6: 234, 2015.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, pp. 417-453, 1995.

PASTOR-CORRALES, M. A.; ABAWI, G. S. **Reactions of selected bean germplasms to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli***. *Plant Disease*, n.71 p.990-993, 1987.

PASTOR-CORRALES, M. A.; JARA, C. E. **La evolución de *Phaeoisariopsis griseola* com el frijol común en América Latina**. *Fitopatologia Colombiana*, n.19 p.15-24, 1995.

PAULA JÚNIOR, T.J.; LOBO JÚNIOR, M.; SARTORATO, A.; VIEIRA, R.F.; CARNEIRO, J.E.S.; ZAMBOLIM, L. **Manejo Integrado de Doenças do feijoeiro em áreas irrigadas - Guia Técnico**. Viçosa MG, Brasil. EPAMIG-CTZM, 2006.

PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R. F.; CHAGAS, J. M.; CARNEIRO, J. E. S.; ARAÚJO, A. A.; VENZON, M.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B.; ANDRADE, M.J.B. **Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). EPAMIG: 101 Culturas: Manual de Tecnologia Agrícola**. Belo Horizonte, p. 331-342, 2007.

PAULA JÚNIOR, T. J.; VIEIRA, R. F.; ZAMBOLIM, L. **Manejo integrado de doenças do feijoeiro**. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 25, n. 223, p. 99-112, 2004.

PEREIRA, J.M.; VIEIRA, R.F.; MARARRA, L.O. **Reação de cultivares e linhagens de feijão a murcha-de-fusarium**. *Revista Ceres*, v.49, p.71-74, 2002.

PEREIRA, M.J.Z.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. **Reação de linhagens de feijoeiro ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em condições controladas**. *Ciência e Agrotecnologia*, 35:940-947, 2011.

PEREIRA, ALISSON C. ET AL. **Infection process of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* on resistant, intermediate and susceptible bean cultivars.** Tropical Plant Pathology, Brasília, v. 38, n. 4, p. 323-328, Aug. 2013.

PEREIRA, M.J.Z.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. **Estratégias para eficiência da seleção de feijoeiro quanto à resistência à murcha-de-fusário.** Pesquisa agropecuária brasileira 43: 721-728, 2008.

RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B.; CARNEIRO, J.E.S.; GONÇALVES, F.M.A.; SANTOS, J.B.; DEL PELOSO, M.J.; FARIAS, L.C.; CARNEIRO, G.E.S.; PEREIRA FILHO, I.A. **O Talismã de sua lavoura de feijoeiro. Embrapa Arroz e Feijão (CNPAP).** Santo Antônio de Goiás, 4 p. Comunicado Técnico, 36, 2002.

RAMALHO, M.A.P.; FERREIRA, D.F.; OLIVEIRA, A.C. de. **Experimentação em genética e melhoramento de plantas.** 2.ed.Lavras: UFLA, 322p, 2005.

RAVA, C. A.; SARTORATO, A.; COSTA, J. G. C. **Reação de genótipos de feijoeiro comum ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em casa de vegetação.** Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 21, n. 2, p. 296-300, 1996.

RIBEIRO, C.A.G.; FERRAZ, S. **Resistência varietal do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.** Fitopatologia Brasileira, v.9, p.37-44, 1984.

RIBEIRO, R. DE L.D. & HAGEDORN, D.J. **Inheritance and nature of resistance in beans to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.** Phytopathology, v.69 p. 859-861, 1979.

RIBEIRO R. DE L.D. & HAGEDORN, D.J. **Screening for resistance to and pathogenic specialization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the causal agent of bean yellows.** Phytopathology, v.69 p. 272-276, 1979.

ROCHA JÚNIOR, W.C.; SANTOS, J.B.; MENDES-COSTA, M.C. **Reação de cultivares e linhagens de feijão à *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.** Fitopatologia Brasileira, v.23, p.407-409, 1998.

ROMÁN-AVILÉS, B.; SNAPP, S.S.; KELLY, J.D. **Assesing root traits associated with root rot resistance in common bean.** Field Crops Research, 86:147-156, 2004.

RONCERO, M. I. G. ET AL. **Fusarium as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens.** Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 62, n. 2, p. 87–98, 2003.

ROSOLEN, C. A. & MURUBAYASHI, O. M. **Seja o doutor do seu feijoeiro.** Arquivo do Agrônomo, Piracicaba, 1 dez. 1994. Encarte das Informações Agronômicas, Suplemento 68, p. 1-18. Disponível em: <<http://migre.me/7oq1P>>. Acesso em: 27/05/ 2018.

RUAS, J. F. **Feijão.** Perspectivas Agropecuárias., Brasília, v.5, p. 45-58, set. 2017.

SALGADO, M. O. & SCHWARTZ, H. F. **Physiological specialization end effects of inoculum concentration on *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* in common beans.** Plant Disease, n.79 p.492-496, 1993.

SALA GM; ITO MF; CARBONELL SAM. **Reaction of genotypes of commom bean to four races of *Fusarium oxysporum* f. sp *phaseoli*.** Summa Phytopathologica 32: 286-287, 2006.

SANTOS, G. R. D. et al. **Transporte, transmissibilidade e patogenicidade da micoflora associada às sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).** Revista Ceres, v. 43, n. 249, p. 621–627, 1996.

SANTOS, J. B. & GAVILANES, M. L. Botânica. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais.** Viçosa, p.55-81, 1998.

SOUSA, M. V. DE. et al. **Real-time quantitative PCR assays for the rapid detection and quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* (common bean) seeds.** Plant Pathology, v. 64, n. 2, p. 478–488, 2014.

SARTORATO A. & RAVA C.A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle.** Brasília, EMBRAPA – Sistema de Produção Integrado. p.175-190, 1994.

SNAPP, S.; KIRK, W.; ROMÁN-AVILÉS, B.; KELLY, J. **Root traits play a role in integrated management of Fusarium root rot in snap beans.** HortScience, 38:187-191, 2003.

SILVA, F. de A. S. e; AZEVEDO, C. A. V. de. **The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data.** Afr. J. Agric. Res, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.

SILVA, G.A.P. et al. **Análise da adaptabilidade e estabilidade de produção em ensaios regionais de feijoeiro para o Estado de São Paulo.** Revista Ceres, v.60, p.59-65, 2013.

SILVA, O. F. & WANDER, A. E. **O feijão-comum no Brasil: passado, presente e futuro.** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2013.

SILVEIRA, P. M. da; STONE, L. F. **Manejo da irrigação do feijoeiro.** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, Comunicado Técnico, 38, 4p, 2002.

SIMÃO, GERVÁSIO ET AL . **Reação de cultivares e linhagens de feijoeiro em relação a Meloidogyne javanica e Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli.** Ciência Rural, Santa Maria, v. 40, n. 5, p. 1003-1008, May 2010.

TALBOYS, P.W. **Resistance to vascular wilt fungi.** Proceedings of the Royal Society, 181:319-332, 1972.

TOLEDO-SOUZA, E.D.D.; SILVEIRA, P.M.D.; CAFÉ-FILHO, A.C.; LOBO JÚNIOR, M. **Fusarium wilt incidence and common bean yield according to the preceding crop and the soil tillage system.** Pesquisa Agropecuária Brasileira 47: 1031-1037, 2012.

TU, J.C. **Effects of soil compaction, temperature, and moisture on the development of the Fusarium root rot complexo pea in southwestern.** Ontário. Phytoprotection. 75: 125-131, 1994.

VELOSO, J.S. **Diversidade genética, morfológica e patogênica de isolados de *Fusarium oxysporum* associados à murcha em feijão-caupi**. 2013. 49f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013.

ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G.M. **Doenças do feijoeiro e seu controle. Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v.4, n.46, p.50-63, 1987.

ZAMBOLIM, L.; JESUS JUNIOR, W.C.; RODRIGUES, F.A. **O Essencial da Fitopatologia: Controle de Doenças de Plantas**. Suprema Gráfica e Editora, 576 p., 2014.

ZANOTTI, M. G. S.; QUEIROZ, M. V. DE; DOS SANTOS, J. K.; ROCHA, R. B.; BARROS, E. G. DE; ARAÚJO, E. F. **Analysis of genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates, pathogenic and non-pathogenic to common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Journal of Phytopathology, v. 154, p. 545-549, 2006.

ZANOTTI, MICHELE G. S. ET AL. **Distribuição do elemento transponível impala em isolados de *Fusarium oxysporum* patogênicos e não-patogênicos ao feijoeiro**. Fitopatologia Brasileira. Brasília, v. 30, n. 3, p. 244-249, June 2005.

ZVIRIN, T. et al. **Differential colonization and defence responses of resistant and susceptible melon lines infected by *Fusarium oxysporum* race 1-2**. Plant Pathology, v. 59, n. 3, p. 576–585, 2010.

WENDLAND, A.; MÖLLER, P. A.; CORTES, M. V. B.; LOBO JUNIOR, M.; MELO, L. C.; PEREIRA, H. S.; COSTA, J. G. C.; FARIA, L. C. **Novas raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* identificadas via detecção específica por PCR**. Summa Phytopathologica, São Paulo, v. 38, fev. 2012.

WOO, S. L. ET AL. **Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs and RAPD**. Phytopathology, v. 86, n. 9, p. 966–973, 1996.

WORDELL FILHO, J. A.; DE FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J.; THEODORO, G. F. **Manejo de doenças na cultura do feijão.** In: WORDELL, J. A. F.; CHIARADIA, L. A.; BALBINOT, A. Manejo fitossanitário na cultura do feijão. Florianópolis, v. 1, p 9-47, 2013.

XUE, R. F. et al. **Cloning and characterization of a novel secretory root expressed peroxidase gene from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.** Molecular Breeding, 34, n. 3, p. 855–870, 2014.

XUE, R. F. **Differentially expressed genes in resistant and susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.** PLoS One, v. 10, n. 6, p. e0127698, 2015.

YADETA, K. A.; THOMMA, B. P. H. J. **The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens.** Frontiers in Plant Science, v.23, n. 4, p. 97, 2013.

## 13 ANEXO

**Anexo 1:** Características gerais identificadas: Morfológicas: coloração, textura de micélio, número de células dos macro e microconídios; Identificação molecular: primers ITS para *F. solani* (ARIF et al., 2012) e primers SCAR- RAPD para Fop (ALVES-SANTOS et al., 2002) para isolados de FOP de alta virulência; Identificação: caracterização da espécie do gênero *Fusarium*. Laboratório de Biotecnologia – UENP.

Isolados	Características Morfológicas			Identificação Molecular		Espécie	
	Nomes	Micélio		Conídeos (nºcélulas)	ITS		SCAR
		Cor	Textura				
R1	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>	
R2	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>	
R3	Roxo	Cotonoso	5/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>	
R4	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>	
R5	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>	
R6	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>	
R7	Roxo	Cotonoso	3/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>	
R8	Roxo	Cotonoso	3/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>	
R9	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>	
R10	Roxo	Cotonoso	5/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>	
R11	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>	
R12	Roxo	Cotonoso	3/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>	
R13	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>	
R14	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>	
R15	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>	
P4.1	Salmão	Lisa	1/1.	+	-	<i>Fusarium solani</i>	
P4.2	Salmão	Lisa	1/1.	+	-	<i>Fusarium solani</i>	
P4.3	Salmão	Lisa	3/1.	+	-	<i>Fusarium solani</i>	
P4.4	Salmão	Lisa	1/1.	+	-	<i>Fusarium solani</i>	
P4.5	Salmão	Lisa	1/1.	+	-	<i>Fusarium solani</i>	
P4.6	Salmão	Lisa	1/1.	+	-	<i>Fusarium solani</i>	
P4.7	Salmão	Lisa	1/1.	+	-	<i>Fusarium solani</i>	
P4.8	Salmão	Lisa	2/1.	+	-	<i>Fusarium solani</i>	
P4.9	Salmão	Lisa	3/1.	+	-	<i>Fusarium solani</i>	
P4.10	Salmão	Lisa	1/1.	+	-	<i>Fusarium solani</i>	
P4.11	Salmão	Lisa	1/1.	+	-	<i>Fusarium solani</i>	
P4.12	Salmão	Lisa	1/1.	+	-	<i>Fusarium solani</i>	
P4.13	Salmão	Lisa	1/1.	+	-	<i>Fusarium solani</i>	
P4.14	Salmão	Lisa	1/1.	+	-	<i>Fusarium solani</i>	
P4.15	Salmão	Lisa	1/1.	+	-	<i>Fusarium solani</i>	

I7.1	Branco	Cotonoso	4/1.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
I7.2	Branco	Cotonoso	4/1 e 2.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
I7.3	Roxo	Cotonoso	3/1 e 2.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
I7.4	Branco	Cotonoso	4/1.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
I7.5	Branco	Cotonoso	4/1 e 2.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
I7.6	Branco	Cotonoso	5/1 e 2.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
I7.7	Branco	Cotonoso	5/1.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
I7.8	Branco	Cotonoso	4/1 e 2.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
I7.9	Branco	Cotonoso	4/1.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
I7.10	Branco	Cotonoso	4/1 e 2.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
I7.11	Branco	Cotonoso	3/1.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
I7.12	Branco	Cotonoso	4/1 e 2.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
I7.13	Branco	Cotonoso	4/1.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
I7.14	Branco	Cotonoso	4/1.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
I7.15	Branco	Cotonoso	4/1.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP1.1	Branco	Cotonoso	4 e 5/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP1.2	Branco	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP1.3	Branco	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP1.4	Branco	Cotonoso	4 e 5/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP1.5	Branco	Cotonoso	3/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP1.6	Branco	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP1.7	Branco	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP1.8	Branco	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP1.9	Branco	Cotonoso	3/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP1.10	Branco	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP1.11	Branco	Cotonoso	4 e 5/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP1.12	Branco	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP1.13	Branco	Cotonoso	4 e 3/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP1.14	Branco	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP1.15	Branco	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP6.1	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP6.2	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP6.3	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP6.4	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP6.5	Roxo I	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP6.6	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP6.7	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP6.8	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP6.9	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP6.10	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP6.11	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP6.12	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP6.13	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
FOP6.14	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>

FOP6.15	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	+	<i>Fusarium oxysporum</i>
P2.1	Branco	Cotonoso	4/1 e 2.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
P2.2	Branco	Cotonoso	4/1 e 2.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
P2.3	Branco	Lisa	1/1.	+	-	<i>Fusarium solani</i>
P2.4	Branco	Cotonoso	4/1 e 2.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
P2.5	Branco	Cotonoso	5/1 e 2.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
P2.6	Branco	Cotonoso	4/1 e 2.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
P2.7	Branco	Cotonoso	3/1 e 2.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
P2.8	Branco	Cotonoso	4/1 e 2.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
P2.9	Branco	Cotonoso	4/1 e 2.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
P2.10	Branco	Cotonoso	4/1 e 2.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
P2.11	Branco	Cotonoso	4/1 e 2.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
P2.12	Branco	Lisa	1 e 2/ 1	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
P2.13	Branco	Lisa	1/1.	+	-	<i>Fusarium solani</i>
P2.14	Branco	Lisa	1/1.	+	-	<i>Fusarium solani</i>
P2.15	Branco	Lisa	1/1.	+	-	<i>Fusarium solani</i>
FOP9453	Roxo	Cotonoso	4/1 e 2.	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>