



NOVOS AGENTES ETIOLÓGICOS DE DOENÇAS DO FEIJÃO-FAVA NO BRASIL

ENAYRA SILVA SOUSA

TERESINA, PIAUÍ

2016

ENAYRA SILVA SOUSA

NOVOS AGENTES ETIOLÓGICOS DE DOENÇAS DO FEIJÃO-FAVA NO BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal do Piauí, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração: Agricultura Tropical.

Orientador

Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior

Coorientador

Dr. Maruzanete Pereira de Melo

Teresina – PI

2016

NOVOS AGENTES ETIOLÓGICOS DE DOENÇAS DO FEIJÃO-FAVA NO BRASIL

ENAYRA SILVA SOUSA

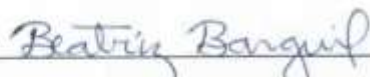
Bióloga

Aprovada em 30 / 06 / 2016Comissão Julgadora:

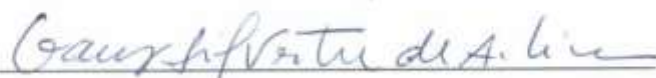
Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior – Presidente
CCA/UFPI

MARUZANETE PEREIRA DE MELO

Dr. Maruzanete Pereira de Melo – Titular
CCA/UFPI



Profa. Dra. Beatriz Meireles Barguil – Titular
UESPI



Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima – Titular
UFAL

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

S725n Sousa, Enayra Silva
Novos agentes etiológicos de doenças do feijão-fava no
Brasil / Enayra Sousa Silva - 2016.
77 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Agronômica) –
Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016
Orientação: Prof.Dr.José Evando Aguiar Beserra Júnior

1. *Phaseolus lunatus* 2. Antracnose 3. Podridão de raiz 4.
Podridão de carvão I. Título.

CDD 635.651

A meu amado filho David Sousa Castro, por todo amor e inspiração, a minha querida mãe Conceição Sousa e Sebastião Pereira, seu companheiro e ao meu irmão Aluisio Sousa por toda força, incentivo e por serem meu porto seguro, ao meu companheiro Fábio Castro pelo amor dedicado, pela compreensão em todos os momentos, aos meus sogros Deusa Maria e Francisco das Chagas, a Fabiana Maria pelo apoio dia após dia,

De todo coração,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo, pela vida, pela minha saúde e de meus familiares e por me cercar de pessoas abençoadas, que muito contribuíram para que eu chegasse até aqui.

A minha família, que com todo amor e paciência me apoiou em todas as decisões, que esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis, que soube compreender as minhas ausências, por vezes abrindo mão de seus próprios projetos em detrimento dos meus. Obrigada pela confiança!

Ao professor Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior, por toda paciência e dedicação nos ensinamentos, pelo apoio e exemplo.

Ao Dr. Maruzanete Pereira de Melo, pelo valioso auxílio na condução dos experimentos, além de toda paciência.

A professora Dr^a Beatriz Meireles Barguil pelas contribuições (acadêmicas e pessoais), ensinamentos e exemplo.

A Universidade Federal do Piauí, pelo acolhimento desde a graduação, representando um novo caminho em minha vida, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Agricultura Tropical e todos os professores que nele atuam pelo ensino de qualidade e oportunidade de aprender e crescer.

A todos os servidores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Produção Vegetal, da RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético) e do Departamento de Fitotecnia, pelo zelo profissional e auxílio nos mais diversos assuntos relacionados à pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudo.

Ao Coordenador da RIDESA, Prof. Dr. Francisco de Alcântara Neto, pela concessão de espaço laboratorial e casa de vegetação para condução dos experimentos.

Aos colegas da turma de mestrado José Monteiro, Mynor García, Sâmia Natacia, Janaína Mendes, Samara Raquel, Vicente Neto, Nilza Carvalho, Arthur Gonçalves, João Pedro, Maristela Pessoa, Carlos Frazão, Pedro Guimarães, Bruno Bitencourt, pela ajuda e pelo companheirismo.

Aos graduandos e bolsistas de Engenharia Agrônômica e Ciências Biológicas da UFPI e UESPI Emanoela Sousa, Maria Carneiro, Lorena Pires, Bruno Arcanjo, Antonio Dias, Alexandre Silva, Francisca Flávia, Alessandra Lima, e Rayssa Cavalcante pelo auxílio e por tornarem esses dois anos muito mais alegres.

Aos amigos Francilda Gomes, José Monteiro, Ana Cláudia Gomes, Danyelle Nascimento, Maria Carneiro, Emanoela Sousa, Simony Sousa, entre outros por estar sempre ao meu lado, por me ouvir e compreender, pela confiança e incentivo, meus sinceros agradecimentos!

“...educar é realizar a mais bela e complexa arte da inteligência. Educar é acreditar na vida e ter esperança no futuro, mesmo que os jovens nos decepcionem no presente. Educar é semear com sabedoria e colher com paciência”.

Augusto Cury

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| RESUMO GERAL..... | xii |
| GENERAL ABSTRACT..... | xiii |
| 1 INTRODUÇÃO GERAL..... | 14 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 16 |
| 2.1 Considerações sobre o feijão-fava..... | 16 |
| 2.2 Principais doenças fúngicas..... | 17 |
| 2.3 <i>Macrophomina phaseolina</i> | 20 |
| 2.4 Complexo <i>Fusarium solani</i> (FSSC)..... | 22 |
| 2.5 <i>Colletotrichum</i> spp..... | 24 |
| 2.6 Importância do teste de patogenicidade..... | 25 |
| 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 27 |
| CAPÍTULO 1. Primeiro relato de <i>Macrophomina phaseolina</i> em feijão-fava no Brasil..... | 35 |
| Resumo | 35 |
| Abstract | 36 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 37 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 38 |
| 2.1 Obtenção dos isolados..... | 38 |
| 2.2 Caracterização morfológica e molecular..... | 38 |
| 2.3 Teste de patogenicidade..... | 39 |
| 2.3.1 Método de grão de arroz infestado..... | 40 |
| 2.3.2 Método de discos de micélio..... | 40 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 40 |
| 3.1 Observação dos sintomas em plantas no campo..... | 40 |
| 3.2 Caracterização morfológica..... | 41 |

| | |
|--|----|
| 3.3 Caracterização molecular..... | 42 |
| 3.4 Teste de patogenicidade..... | 43 |
| 4 CONCLUSÕES..... | 45 |
| 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 46 |
| CAPÍTULO 2. Primeira ocorrência de podridão de raiz causada por <i>Fusarium falciforme</i> (FSSC 3 + 4) em feijão-fava no Brasil..... | 49 |
| Resumo..... | 49 |
| Abstract..... | 50 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 51 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 52 |
| 2.1 Obtenção dos isolados..... | 52 |
| 2.2 Caracterização morfológica..... | 53 |
| 2.3 Caracterização molecular..... | 53 |
| 2.3.1 Extração de DNA e PCR..... | 53 |
| 2.3.2 Análise filogenética..... | 54 |
| 2.4 Testes de patogenicidade..... | 54 |
| 2.4.1 Método de fermento de raízes e imersão em suspensão de esporos..... | 55 |
| 2.4.2 Método de discos de micélio..... | 55 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 56 |
| 3.1 Caracterização morfológica..... | 56 |
| 3.2 Análise molecular..... | 58 |
| 3.3 Teste de patogenicidade..... | 61 |
| 4 CONCLUSÕES..... | 61 |
| 5 REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 62 |
| CAPÍTULO 3. <i>Colletotrichum cliviae</i> e <i>Colletotrcihum fructicola</i> : novos agentes etiológicos da antracnose do feijão-fava no Brasil..... | 65 |
| Resumo..... | 65 |
| Abstract..... | 66 |

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 67 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 68 |
| 2.1 Obtenção dos isolados..... | 68 |
| 2.2 Avaliação da taxa de crescimento micelial..... | 68 |
| 2.3 Caracterização morfológica..... | 68 |
| 2.4 Caracterização molecular..... | 69 |
| 2.5 Teste de patogenicidade..... | 69 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 70 |
| 3.1 Caracterização morfológica..... | 70 |
| 3.2 Caracterização molecular..... | 72 |
| 3.3 Teste de patogenicidade..... | 73 |
| 4 CONCLUSÕES..... | 74 |
| 5 REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS..... | 75 |

NOVOS AGENTES ETIOLÓGICOS DE DOENÇAS DO FEIJÃO-FAVA NO BRASIL

RESUMO GERAL

Dentre as diversas doenças que afetam o feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) no Brasil, as fúngicas se destacam por terem ocorrência comum e causarem sintomas que podem levar a perdas de produção e a morte da planta. É preocupante a ocorrência frequente de podridões de raiz e colo, manchas foliares e doenças que causam morte de plântulas em pré ou pós-emergência em feijão-fava, que ainda não tem seus agentes etiológicos conhecidos no Brasil. Diante do exposto os objetivos deste trabalho foram: identificar por marcadores morfológicos e filogenia de genes “housekeeping” isolados de *Macrophomina* sp., *Fusarium* sp. e *Colletotrichum* sp. obtidos de plantas de feijão-fava naturalmente infectadas em campos de produção nos estados do Ceará e Piauí, e avaliar a patogenicidade desses isolados em plantas de feijão-fava; além de testar métodos de inoculação artificial de *Macrophomina* sp. e *Fusarium* sp. em plantas de feijão-fava. Os caracteres morfoculturais (aspecto e pigmentação da colônia, pigmentação, forma e tamanho de esporos) e a filogenia dos genes EF1- α (para *Macrophomina* sp.); EF1- α e RPB2 (para *Fusarium* sp.); e ITS, GAPDH, ACT e β -TUB (para *Colletotrichum* spp.) identificaram os isolados como *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium falciforme*, *Colletotrichum fructicola* e *Colletotrichum cliviae*. Todos os isolados testados foram patogênicos ao feijão-fava. Os métodos de inoculação do grão de arroz infestado, e disco de micélio foram eficientes na inoculação artificial de *M. phaseolina*, enquanto o método de ferimento e imersão das raízes em suspensão conidial foi o mais eficiente na indução de sintomas por *F. falciforme*. Este é o primeiro relato de *M. phaseolina*, *F. falciforme*, *C. fructicola* e *C. cliviae* causando doença em feijão-fava no Brasil. Este estudo fornece informações que contribuirão com o estabelecimento de estratégias de manejo da podridão cinzenta do caule, podridão de raiz e antracnose no feijão-fava.

Palavras-chave: Antracnose, *Phaseolus lunatus*, podridão de raiz, podridão de carvão.

NEW ETIOLOGIC AGENTS OF DISEASES OF LIMA BEAN IN BRAZIL

GENERAL ABSTRACT

Among the many diseases affecting the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Brazil, fungal stand out for having common occurrence and cause symptoms which can lead to production losses. It is worrying the occurrence of root and stem rot, the leaf spots and diseases that cause death of seedlings pre-emergence or post-emergence, which does not have its recognized etiologic agents. Given the facts the objectives of this work are: Identified by morphology and phylogeny, and evaluate the isolated pathogenicity of *Macrophomina* sp., *Fusarium* sp. and *Colletotrichum* spp. in lima bean plants; and test methods of artificial inoculation *Macrophomina* sp. and *Fusarium* sp. in lima bean plants. Morphoculture characters (colony appearance and pigmentation; pigmentation, shape and size of spores) and phylogeny of the genes EF1- α (for *Macrophomina* sp.), ITS GAPDH, ACT and β -Tub (for *Colletotrichum* spp.), and EF1- α and RPB2 (for *Fusarium* sp.) identified isolates as *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium falciforme*, *Colletotrichum fructicola* and *Colletotrichum cliviae*. All isolates tested were pathogenic to lima bean. The inoculation methods of infested grain of rice and mycelial discs were effective in artificial inoculation of *M. phaseolina*, while the injury and dipping the roots in conidial suspension method was the most efficient in the induction of symptoms by *F. falciforme*. This is the first description of *M. phaseolina*, *F. falciforme*, *C. fructicola* and *C. cliviae* causing disease in lima bean in Brazil. This study provides information that will contribute to the establishment of management strategies for gray stem rot, root rot and anthracnose in bean fava.

Keywords: Anthracnose, charcoal rot, *Phaseolus lunatus*, root rot.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O feijão-fava, também chamado de feijão de lima, ou simplesmente fava, é considerado a segunda espécie de maior importância do gênero *Phaseolus* (MAQUET et al., 1999), tendo grande relevância principalmente para a região Nordeste do Brasil, onde representa fonte de alimento e renda para a população e para os produtores familiares. Apesar do potencial de produção, a cultura tem recebido pouca atenção dos órgãos de pesquisa e extensão, resultando num conhecimento limitado a respeito de seu manejo nos mais diferentes aspectos (GOMES et al., 2015).

O feijão-fava é bem adaptado a regiões secas e tem boa produtividade tanto em períodos úmidos como secos (VIEIRA, 1992), porém sua produtividade ainda é baixa em relação às outras espécies de feijão consumidas no Brasil. Vários fatores são atribuídos a essa baixa produtividade, dentre eles destaca-se a ocorrência de doenças, que são pouco estudadas e muitas vezes de etiologia desconhecida no país. A identificação correta dessas doenças e de seus agentes causais é fundamental para a compreensão da interação planta-patógeno e para o estabelecimento de estratégias de manejo da cultura. Para Carvalho et al. (2015) são necessários mais estudos a fim de se conhecer as doenças que ocorrem na cultura, seus agentes etiológicos, como também a relação entre estas e o rendimento do feijão-fava.

Dentre as várias doenças que afetam o feijão-fava, as fúngicas se destacam por terem ocorrência comum e causarem sintomas que levam a perdas de produção ou qualidade dos grãos, até morte das plantas. São preocupantes a ocorrência de podridões de raízes e caules, as manchas foliares e doenças que causam morte de plântulas pré- ou pós-emergência. Nas fabáceas, de forma geral, diversas espécies de fungos são associados aos sintomas descritos, destacando-se *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* dentre outros (KIMATI et al., 2005).

A identificação correta dos patógenos é essencial no manejo das doenças em qualquer cultura, e o teste de patogenicidade é etapa essencial no processo de identificação de novos patógenos (ALFENAS; FERREIRA, 2007). Dessa forma os objetivos deste trabalho foram:

1. Avaliar a patogenicidade de isolados de *Macrophomina* sp., *Fusarium* sp. e *Colletotrichum* spp. em plantas de feijão-fava.
2. Realizar caracterização morfológica e a identificação molecular de isolados de *Macrophomina* sp., *Fusarium* sp. e *Colletotrichum* spp.
3. Testar diferentes métodos de inoculação artificial de *Macrophomina* sp. e *Fusarium* sp. em plantas de feijão-fava.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações sobre o feijão-fava

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), também conhecido como feijão de lima, é uma fabácea de alto valor comercial cultivado em vários países onde apresenta importância econômica e social, como países da América Central e do Sul, Estados Unidos e África (LONG et al., 2014; MARTÍNEZ-CASTILLO et al., 2015). É cultivado em diversos estados brasileiros, mas a produção se concentra na região Nordeste, que é responsável por 96,56 % da produção nacional (IBGE, 2014). Geralmente é plantado em pequenas propriedades consorciado com milho, mandioca ou mamona; tecnologias rudimentares de produção são utilizadas, com uso de sementes produzidas pelo agricultor, e ausência de estratégias modernas de adubação (GOMES et al., 2015).

Teorias têm sido sugeridas a fim de esclarecer os centros de origem e domesticação do feijão-fava. Estudos desenvolvidos por Mackie (1943) indicaram que todas as variedades de feijão-fava tiveram origem na Guatemala; sua dispersão teria se dado a partir de três rotas comerciais: a ramificação Inca que levava à América do Sul, a ramificação Hopi atingindo os Estados Unidos e a ramificação Caribe chegando às Antilhas e, daí, para o norte da América do Sul. Estudos recentes sugerem a ocorrência de diferentes eventos de domesticação do feijão-fava, possivelmente em regiões do México e na região entre a Guatemala e a Costa Rica (ANDUEZA-NOH et al., 2013; MARTÍNEZ-CASTILLO et al., 2015). Atualmente, o México é reconhecido como importante centro de domesticação, conservação e diversidade genética do feijão-fava (MARTÍNEZ-CASTILLO et al., 2015).

O feijão-fava tem grande importância sócio-econômica no Brasil devido à sua rusticidade. É usado como fonte de alimento na forma de grãos maduros ou verdes, devido ao elevado teor de proteína, destacando-se as variedades bege-clara e branca; é também fonte potencial de vitaminas e minerais (AZEVEDO et al., 2003; LONG et al., 2014). Representa uma fonte alternativa de proteína à população ou como fonte de renda, principalmente para pequenos produtores (SOARES et al., 2010). Além de ser usado na alimentação humana, o feijão-fava também pode ser recomendado para uso como adubo verde, tendo bons efeitos nas condições físicas,

químicas e biológicas do solo (PEGADO et al., 2008). É considerada uma forrageira de qualidade moderada, capaz de produzir grande quantidade de forragem para alimentação animal (GOMES et al., 2015).

Pertencente à ordem *Fabales*, família *Fabaceae* (Leguminosae), subfamília *Faboideae*, tribo *Phaseoleae*, gênero *Phaseolus*, o feijão-fava cultivado no Brasil é do tipo trepador, de crescimento indeterminado (CRONQUIST, 1988). A espécie *P. lunatus*, comparada a outras espécies do gênero, e com o gênero *Vigna*, apresenta elevada produtividade (VIEIRA et al., 1992). Visivelmente, como ocorre a outras espécies botânicas, o déficit hídrico pode afetar o desenvolvimento da cultura, principalmente quando se dá em mais de uma fase do desenvolvimento da planta (OLIVEIRA et al., 2014). O estresse hídrico grave pode levar a queda no rendimento e qualidade dos grãos (LONG, 2014). Além disso, KLEINER; FRET (1996) demonstraram que o cultivo em temperaturas elevadas (32 °C dia / 25 °C noite) estimula a floração antecipada nas cultivares estudadas - consideradas sensíveis - e que o estresse por calor aumenta a senescência e diminui o número e o peso total de grãos.

Apesar de seu potencial produtivo para a região, em 2014 o Nordeste brasileiro produziu somente 7.416 toneladas de grãos secos de feijão-fava, numa área plantada de 23.697 ha (IBGE, 2014), enquanto que a produção de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) alcançou 320.554 toneladas no mesmo ano (EMBRAPA, 2015). Tais dados demonstram a baixa produção de feijão-fava em relação a outras espécies de feijão consumidas na região Nordeste. Alguns fatores são determinantes para que isto ocorra, tais como as características organolépticas dos grãos, as características morfoagronômicas das variedades crioulas brasileiras como o hábito de crescimento indeterminado, o ciclo longo da cultura, a ausência de cultivares melhoradas e adaptadas a cada região, a falta de tecnologia de produção como também a ocorrência de doenças que reduzem sua produtividade (AZEVEDO et al., 2003; CARVALHO et al., 2015; GUIMARÃES, 2007).

2.2 Principais doenças fúngicas

O feijão-fava é hospedeiro de diversos microrganismos, alguns destes agem como patógenos provocando danos à cultura e prejuízo ao produtor. Dentre as

doenças destacam-se aquelas de origem fúngica, como a antracnose, a mela e a podridão do colo (CARVALHO et al., 2015).

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus & Moore, é comumente encontrada nas plantações de feijão-fava, especialmente no Nordeste do Brasil (CARVALHO et al., 2015). Este fungo é patógeno de diversas espécies vegetais, principalmente dicotiledôneas, tendo sido relatado em leguminosas e solanáceas (DAMM et al., 2009). Tem como características distintivas os conídios falciformes (falcados), hialinos, uninucleados e a presença de acérvulos com setas escuras, o micélio aéreo possui cor e aspecto diverso em meio batata-dextrose-agar, com a cor variando do branco, branco acinzentado, ao negro (JAGTAP; SONTAKKE, 2009).

Em feijão-fava os sintomas característicos da doença incluem lesões avermelhadas nas nervuras, manchas avermelhadas nas folhas e vagens, que evoluem para a queda de folíolos e deformação da vagem (CARVALHO et al., 2015). Em plantas de soja os sintomas ocorrem principalmente sob condições de alta umidade; variam de manchas escuras nas hastes e outras partes da planta, o apodrecimento e queda das vagens, além de aberturas das mesmas, com germinação de grãos ainda em formação (EMBRAPA, 2011).

Na soja, é sabido que o fungo é transmitido por sementes, onde provoca manchas deprimidas de coloração marrom-escuras. Pode ainda ficar latente após a queda dos cotilédones e, dependendo das condições ambientais, ao longo do ciclo da cultura, induzir os sintomas, após o florescimento nas folhas, hastes e vagens (NOETZOLD et al., 2014).

As estratégias de controle dessa doença na cultura da soja incluem rotação de culturas, uso de sementes sadias e controle químico; diferentes associações dos fungicidas carbendazim, epoxiconazol, piraclostrobina e ciproconazol tem se mostrado eficientes no controle da doença (PESQUEIRA et al., 2016). Para a cultura do feijão-fava ainda não há registro de fungicidas indicados para o tratamento da doença, e a busca de variedades resistentes revela-se, portanto, uma estratégia a ser utilizada (CARVALHO et al., 2015).

A mela causada pelo fungo *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (anamorfo *Rhizoctonia solani* Kuhn) é também uma das principais doenças fúngicas que ocorrem no feijão-fava, influenciada, dentre outros fatores, por elevadas temperaturas e umidade relativa do ar (CARVALHO et al., 2015). No feijão-caupi os

sintomas característicos da doença iniciam com pequenas lesões circulares com aspecto molhado nas folhas mais próximas ao solo, estas lesões evoluem e crescem, com o avanço da doença uma teia micélica acastanhada é formada, ligando as folhas afetadas, além de pecíolos, caules, flores e vagens, ao atingir as vagens o fungo provoca má formação de sementes, também é possível observar a presença de microesclerócios de cor creme nos tecidos da planta afetada (CARVALHO et al., 2015; NECHET; HALFELD-VIEIRA, 2006).

Para a soja, o controle da doença é realizado através de práticas culturais, como rotação de culturas, utilização de cobertura morta do solo com sistema de semeadura direta, entre outras, além de controle químico (EMBRAPA, 2011).

A podridão do colo causada por *Sclerotium rolfsii* Sacc é uma das doenças que provocam grandes perdas em leguminosas. Os sintomas comuns na soja variam de tombamento, amarelecimento e murcha da parte aérea, evoluindo para a morte da planta, onde é possível observar o crescimento de micélio branco no colo da planta e a presença de escleródios de cor creme que se tornam marrons com o passar do tempo. Alta umidade e temperaturas de 30 a 35 °C são favoráveis ao desenvolvimento do fungo (HENNING et al., 2014). Umidade do solo intermediária (70 % da capacidade de campo) e temperaturas de 25 a 30 °C favorecem a formação de escleródios de *S. rolfsii* em palhas de soja, milho e trigo (PINHEIRO et al., 2010). Em feijão-fava os sintomas iniciam-se com lesões deprimidas na região do colo inoculado da planta, recobertas por um micélio branco. Com o avanço da doença as plantas tornaram-se murchas e secas (SILVA et al., 2014).

Outras doenças importantes para o feijão-fava são a ferrugem e as podridões de fitófitoras. *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. é um dos agentes causais da ferrugem da soja nos Estados Unidos (LYNCH et al., 2006). No início da doença são observadas pequenas lesões de coloração variando entre o castanho e o dourado, com o passar dos dias, as lesões crescem e são formadas pústulas (urédias), estas se abrem em um ostíolo, através do qual os uredósporos são liberados (GOELLNER et al., 2010). Nos Estados Unidos, doenças semelhantes são provocadas por dois patógenos: *Phytophthora capsici* Leonian e *Phytophthora phaseoli* Thaxter. Os sintomas em folhas e vagens de feijão-fava variam de lesões escuras com presença de micélio branco sobre as vagens. *P. phaseoli* infecta também cachos de flores, brotos e pecíolos (DAVIDSON et al., 2002; EVANS et al., 2007).

No Brasil, ainda não foram obtidas variedades melhoradas de feijão-fava, nem tampouco há certificação de sementes para a cultura, ou defensivos que sejam recomendados para o controle de doenças. Nos Estados Unidos pesquisas foram desenvolvidas a fim de se obter fungicidas eficazes no controle de *P. phaseoli*, além da busca por cultivares resistentes a diferentes raças do patógeno, um dos mais invasivos para a cultura do feijão-fava naquele país (EVANS et al., 2007). No Brasil, a busca de fontes de resistência de feijão-fava a patógenos está apenas iniciando, mas com resultados promissores contra patógenos importantes como *C. truncatum*, *S. rolfisi* e *R. solani* (ASSUNÇÃO et al., 2011; CAVALCANTE et al., 2012; SANTOS et al., 2015; SILVA et al., 2014).

Em relação ao manejo adequado das doenças provocadas por fungos habitantes do solo sabe-se, de forma geral, que as condições de umidade do solo são consideradas essenciais para evitar o desenvolvimento de doenças que reduzem a produtividade de leguminosas como a soja, o feijão-caupi e feijão-comum; a rotação de culturas, com o trigo, tomate, girassol, alfafa é recomendada para evitar doenças fúngicas causadas por *R. solani*, *Fusarium* spp., *Sclerotium* sp. e *Sclerotinia* sp. (LONG, 2014).

2.3 *Macrophomina phaseolina*

Macrophomna phaseolina (Tassi) Goid é um fungo polífago, capaz de causar doença em mais de 500 espécies de plantas, incluindo culturas economicamente importantes, como soja, amendoim, milho, feijão-comum, feijão-mungo, sorgo, além de infectar plantas daninhas de forma sintomática ou assintomática, representando potencial fonte de inoculo no campo (DINGRA; SINCLAIR, 1978; FUHLBOHM et al., 2012; GUPTA et al., 2012; IQBAL; MUKHTAR, 2014; MAHDIZADEH et al., 2011; SALEH et al., 2010).

Pertencente ao filo Ascomycota, família Botryosphaeriaceae, *M. phaseolina* é o principal representante do gênero *Macrophomina*, haja vista a diversidade de hospedeiros que pode infectar e a frequência com que é encontrado no campo (GUPTA, et al., 2012; SARR et al., 2014). Em 2014 foi descrita a segunda espécie do gênero, *Macrophomina pseudophaseolina*, a qual é semelhante a *M. phaseolina* em termos de morfologia, distribuição e gama de hospedeiros. *M. pseudophaseolina*

foi encontrada infectando naturalmente plantas de quiabo, amendoim, *Hibiscus sabdarifa* e feijão-caupi no Senegal (SARR et al., 2014).

Macrophomina phaseolina é caracterizada por possuir picnídios de coloração marrom-escuro, medindo até 300 µm diâmetro, solitários ou agregados, com macroconídios ovóides ou elipsóides, hialinos quando imaturos e castanho-escuro após a maturação, de tamanho variando de (19–)22–26(–30) × (6–)8(–9) µm. Os microconídios são asseptados, hialinos, com formato variado, de elipsóide, subcilíndrico ou irregular, com medidas entre 5–8(–10) × 3–5 µm. A espécie apresenta micélio aéreo cinza escuro, cotonoso e abundante (SARR et al., 2014). O fungo produz microesclerócios e picnídios em tecidos do hospedeiro e tem maior ocorrência em regiões semiáridas. No Brasil, observa-se que altas temperaturas e compactação do solo facilitam o desenvolvimento do fungo (ALMEIDA et al., 2014).

Segundo Iqbal; Mukhtar (2014) a variabilidade na morfologia, fisiologia, genética e patogenicidade de *M. phaseolina* é necessária para o fungo ter melhor adaptação em resposta ao seu comportamento ambiental diversificado. Esse fungo possui grande quantidade de enzimas responsáveis pela degradação dos principais componentes da parede celular e cutícula das plantas, incluindo celulose, hemicelulose, pectina, lignina e cutina, além de grande adaptabilidade, o que explica sua polifagia (ISLAM et al., 2012).

Os sintomas observados durante o processo de infecção variam de podridão de raiz e caule, lesões escuras nos cotilédones, morte de plântulas, murcha, queima das folhas e morte em pré e pós-emergência (GUPTA et al., 2012; ALMEIDA et al., 2014). Em feijão-caupi os sintomas podem aparecer em diversas partes da planta, como caule, folhas e vagens (NECHET; HALFELD-VIEIRA, 2005). Na soja a evolução da infecção é facilitada pelo déficit hídrico do solo e altas temperaturas; após o florescimento as folhas tornam-se cloróticas, secam e adquirem coloração marrom; as plantas apresentam raízes cinzentas, cuja epiderme é facilmente destacada, mostrando massa de microesclerócios negros (ALMEIDA et al., 2014).

Na cultura do sorgo González et al. (2007) observaram que a falta de umidade no solo interfere com a incidência da doença e o número de escleródios de *M. phaseolina*. O fungo também pode ser encontrado em sementes; Em feijão-caupi incidência de 62 % foi encontrada em 119 amostras avaliadas (ATHAYDE SOBRINHO, 2004). Em feijão-fava foi detectada incidência média de 1,58 % em 34

amostras de sementes de feijão-fava obtidas em estados do nordeste brasileiro (MOTA, 2016).

O controle do patógeno é difícil, devido a sua grande gama de hospedeiros, e a elevada persistência do inoculo no solo e em restos de cultura, além de ser transmitido facilmente via sementes de feijão-fava (MOTA, 2016). Por estes motivos a busca de fontes de resistência ao fungo têm se mostrado uma alternativa de controle. Em feijão-caupi foram encontrados genótipos com resistência parcial a *M. phaseolina*. Em estudo desenvolvido com 35 genótipos de feijão-caupi, a cultivar BRS Pajeú apresentou resistência parcial ao fungo, porém nenhum dos genótipos estudados apresentou imunidade ou alta resistência ao patógeno (NORONHA et al., 2012). Populações segregantes de feijão-caupi também foram analisadas para resistência a esse patógeno. Das 70 combinações obtidas entre 19 genótipos, seis apresentaram maior concentração de alelos favoráveis à resistência a *M. phaseolina*, indicando elevado potencial na obtenção de linhagens resistentes (LIMA, 2015).

Segundo Saleh et al. (2010) os danos provocados por esse patógeno podem aumentar, tanto em áreas agrícolas, como em ecossistemas naturais, em um cenário de temperaturas mais elevadas e estresse hídrico mais frequente. Nos ecossistemas naturais esse aumento pode alterar a frequência relativa de plantas nativas, podendo até mesmo resultar na extinção de espécies sensíveis.

2.4 Complexo *Fusarium solani* (FSSC)

O gênero *Fusarium* é composto por uma grande diversidade de fungos dos mais variados hábitos de vida, sendo considerado um dos principais gêneros de fungos fitopatogênicos. *Fusarium* spp. podem causar danos em culturas de alto valor econômico e social, como soja, feijão e milho, além de eventualmente poder causar doenças em humanos e animais imunodeprimidos (O'DONNELL, 2000; SMITH, 2007). O gênero também é classificado como produtor de micotoxinas, substâncias tóxicas e potencialmente carcinogênicas, amplamente distribuídas em grãos utilizados na alimentação humana e animal (SMITH et al., 2007). São habitantes naturais do solo, tendo como estrutura de resistência os clamidósporos; podem também sobreviver em restos de cultura, hospedeiros alternativos e sementes infectadas, pois sobrevivem via clamidósporos aderidos externamente ao tegumento

das sementes (BALARDIN et al., 2005). As características morfológicas comuns a fungos desse gênero incluem a presença de uma pluralidade de conídios, muitas vezes diversificados em macroconídios curvados e microconídios, muitos são septados, com quantidade de septos variada (AOKI et al., 2005; WESTPHAL et al., 2008).

O Complexo *Fusarium solani* é considerado altamente diversificado, seus isolados estão distribuídos em três clados distintos: 1) isolados provenientes da Nova Zelândia; 2) isolados da América do Sul associados a podridão de raízes e recentemente com isolados provenientes da Ásia, e 3) isolados da África, Ásia e América do Sul, com representantes obtidos a partir do solo e principalmente associados a infecções em humanos imunodeprimidos (O' DONNELL, 2000; O' DONNELL et al., 2010; NALIM et al., 2011). Em 2016 foi incluída mais uma espécie ao clado 3, sendo patogênica a soja no Brasil (COSTA et al., 2016). Na cultura da soja, espécies do FSSC causam a doença conhecida como Podridão Vermelha da Raiz (PVR) ou Síndrome da Morte Súbita (SMS) (AOKI et al., 2003; AOKI et al., 2005).

Fusarium solani é o agente causal de podridão de raiz em plântulas de soja, com redução da emergência e rendimento de sementes, em condições de estufa e de campo (KILLEBREW et al., 1988). Os sintomas da doença podem ser observados nas folhas, clorose entre as nervuras e murcha são sintomas comuns, porém confundíveis com os sintomas de outras doenças foliares; as raízes sintomáticas apresentam podridão, coloração azulada pode ser observada nas raízes, gerada por massas de esporos aderidos ao tecido superficial da raiz principal (WESTPHAL et al., 2008).

Fusarium falciforme é uma espécie pertencente ao clado 3 do FSSC, sendo geralmente associada a infecções em humanos e encontrada em solos (CHEHRI, 2015; NALIM et al., 2011; ZHANG et al., 2006). As espécies de *Fusarium* associadas à SMS da soja na América do Sul são *F. brasiliense*, *Fusarium cuneirostrum*, *Fusarium crassistipitatum*, *Fusarium tucumaniae* e *Fusarium virguliforme* (AOKI et al., 2005; AOKI et al., 2012). Uma nova espécie dentro do complexo FSSC foi descrita causando podridão radicular na cultura da soja, chamado *Fusarium paranaense* sp. nov.; esta espécie encontra-se no clado 3, diferindo das demais espécies que causam sintomas na soja, que encontram-se no clado 2 do Complexo. *F. paranaense* está distribuído em diferentes regiões produtoras do país, e tem alta

variabilidade genética, possivelmente devido à ocorrência de reprodução sexuada (COSTA et al., 2016).

Mais estudos são necessários para melhorar o entendimento da associação entre FSSC e leguminosas, além de uma classificação adequada das espécies que ocorrem nas regiões produtoras de culturas suscetíveis ao patógeno.

2.5 *Colletotrichum* spp.

O gênero *Colletotrichum* é constituído por fungos que possuem diversificados estilos de vida, desde saprófitos, endófitos, epifíticos a patógenos que causam doenças e perdas em diversas culturas em todo o mundo (HYDE et al., 2009). Possui distribuição principalmente tropical e subtropical, embora existam algumas espécies que afetam culturas de clima temperado (CANNON et al., 2012). *C. gloeosporioides*, assim como *F. solani*, é atualmente classificado como um complexo de espécies diversas caracterizadas geneticamente (CANNON et al., 2012; HYDE et al., 2009). Os caracteres morfológicos que agrupam espécies neste Complexo incluem conídios lisos, cilíndricos e ligeiramente curvos, conídios medindo entre 12–20 × 4–6 µm e micélio de coloração e aspecto variado em meio batata-dextrose-agar, além do agrupamento filogenético a partir da análise em conjunto de genes “housekeeping” (WEIR et al., 2012).

São relatadas 22 espécies mais uma subespécie dentro do Complexo *C. gloeosporioides*, as quais foram identificadas a partir de análise filogenética de múltiplos genes (WEIR et al., 2012). *C. gloeosporioides* é um agregado de espécies que apresentam diferentes graus de patogenicidade, especificidade de hospedeiros e homogeneidade genética (HYDE et al., 2009). Associado a doenças em inúmeras espécies de plantas pelo mundo, muitas espécies deste Complexo ainda não tem sua relação de patogenicidade e especificidade de hospedeiros totalmente compreendidas (PHOULIVONG et al., 2010; WEIR et al., 2012).

As espécies exibem estratégias refinadas de infecção, o fungo pode permanecer quiescente no hospedeiro antes de mudar para o estado necrotrófico, as condições em que a mudança no estilo de vida do fungo ocorre ainda necessitam de melhores explicações (HYDE et al., 2009). Estas espécies são relatadas como agentes causais de doenças em fruteiras tropicais importantes como citros (LIMA et al., 2011), mamão (ANDRADE et al., 2007), manga, goiaba, maracujá (SILVA et al.,

2006), solanáceas (TOZZE JUNIOR et al., 2006), anonáceas (KAMEI et al., 2014) etc.

Espécies do Complexo *C. gloesporioides* são agentes causais de doenças em leguminosas, como exemplo a mancha foliar em *Mimosa caesalpinaefolia* Benth (CARNAÚBA et al., 2007) e *Stylosanthes* (WEEDS et al., 2003). No entanto, é comum a ocorrência de espécies de *Colletotrichum* de outros complexos causando doenças em leguminosas. Em feijão-caupi a antracnose tem como agente causal *C. lindemuthianum* (BALARDIN et al., 1997; NOGUEIRA; BRIOSO, 2015), *C. destructivum* (LATUNDE-DADA; O'CONNELL, 1996) e mancha café causada por *C. truncatum* (SPONHOLZ et al., 2006). Em feijão-fava o único fungo relacionado à antracnose é *C. truncatum*. A doença caracteriza-se por manchas vermelhas na face inferior das folhas, ao longo das nervuras e em cima das hastes e pecíolos jovens. As vagens podem ser acometidas por grandes lesões deprimidas e avermelhadas, onde se formam os acérvulos do patógeno (PAULA JÚNIOR et al., 1995).

A identificação correta de fungos do gênero *Colletotrichum* associados a plantas é uma necessidade e os estudos realizados devem abranger descrições morfológicas e moleculares, além de testes de patogenicidade a fim de esclarecer o papel biológico do fungo frente às espécies conhecidas (HYDE et al., 2009).

2.6 Importância do teste de patogenicidade

Em termos gerais o teste de patogenicidade é utilizado para testar a patogenicidade de um microrganismo sobre um hospedeiro; é uma das estratégias mais utilizadas na identificação de novos agentes etiológicos. Para Surico (2013) patogenicidade é a capacidade de um microrganismo causar doença num hospedeiro particular. O teste de patogenicidade segue os conhecidos Postulados de Koch, publicados por Robert Kochem 1882, aplicados, inicialmente a enfermidades humanas e em animais e adaptados a várias áreas de estudo, através deles Koch demonstrou a relação de causalidade entre microrganismos e doenças importantes para a época, como o antraz e a tuberculose (VOLCY, 2008).

Os postulados de Koch são raramente realizados para diagnósticos de rotina, mas são extremamente importantes na identificação de agentes etiológicos de novas doenças (RILEY et al., 2002). O teste é usado para confirmar a relação causal entre a doença e o microrganismo associado, como também para determinar a gama de

hospedeiros de um patógeno e medir a virulência de diferentes isolados de um mesmo patógeno (BURGESS et al., 2008). Volcy (2008) faz uma revisão sobre a relação dos Postulados de Koch com a fitopatologia ao longo do tempo, no qual o conhecimento adquirido com esta metodologia permitiu uma mudança significativa na compreensão dos fatores que levam a ocorrência de uma doença em plantas e, apesar de sua longa história, os Postulados têm resistido ao tempo e a era das ferramentas moleculares, graças à sua consistência, estabilidade, coerência conceitual e o uso do raciocínio lógico. Dentre os fatores que precisam ser considerados nos testes de patogenicidade incluem temperatura, quantidade de água, deficiências ou toxicidades de nutrientes, inóculo no solo, além de condições gerais de crescimento das plantas (BURGESS et al., 2008).

Sem a devida identificação da doença e seu agente causal, as medidas de controle empregadas podem ser desperdícios de tempo e dinheiro, o diagnóstico adequado é, portanto, vital (RILEY et al., 2002). Como já citado o feijão-fava é hospedeiro de uma vasta gama de patógenos, entretanto, para alguns fungos frequentemente encontrados em associação com o feijão-fava, a capacidade de causar doença ainda não foi comprovada, logo é de fundamental importância a realização dos testes de patogenicidade visando estabelecer a relação causal das doenças observadas em campo.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A. Inoculação de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**, p. 117-137, 2007.
- ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S.; FARIAS, J. R. B.; OLIVEIRA, M. C.N.; FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; COSTA, J. M.; GAUDENCIO, C. A. **Macrophomina phaseolina em soja**. Londrina: Embrapa soja, n. 346. 55 p., 2014.
- ANDRADE, E. M.; UESUGI, C. H.; UENO, B.; FERREIRA, M. A. S. V. Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 21-31, 2007.
- ANDUEZA-NOH, R. H.; SERRANO-SERRANO, M. L.; CHACOÓN SÁNCHEZ, M. I.; SANCHÉZ DEL PINO, I.; CAMACHO-PÉREZ, L.; COELLO-COELLO, J.; MIJANGOS CORTES, J.; DEBOUCK, D.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J. Multiple domestications of the Mesoamerican gene pool of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.): evidence from chloroplast DNA sequences. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 60, n. 3, p. 1069-1086, 2013.
- AOKI, T.; O'DONNELL, K.; HOMMA, Y.; LATTANZI, A. R. Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex - *F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. **Mycologia**, v. 95, n. 4, p. 660-684, 2003.
- AOKI, T.; O'DONNELL, K.; SCANDIANI, M. M. Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae* and *F. virguliforme*. **Mycoscience**, v. 46, n. 3, p. 162-183, 2005.
- AOKI, T.; SCANDIANI, M.M.; O'DONNELL, K. Phenotypic, molecular, and pathogenetic characterization of *Fusarium crassistipitatum* sp. nov., a novel soybean sudden death syndrome pathogen from Argentina and Brazil. **Mycoscience**, v. 53, n. 3, p.167-186, 2012.
- ASSUNÇÃO I. P.; NASCIMENTO L. D.; FERREIRA, M. F; OLIVEIRA, F. J.; MICHEREFF, S.J .; LIMA, G. S. A. Reaction of faba bean genotypes to *Rhizoctonia solani* and resistance stability. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 492-497, 2011.
- ATHAYDE SOBRINHO, C. **Patossistema caupi x *Macrophomina phaseolina*: Método de detecção em sementes, esporulação e controle do patógeno**. Tese (Doutorado Fitopatologia)–Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 139 p., 2004.
- AZEVEDO, J. N.; FRANCO, L.J. D. ARAÚJO, R. O. C. **Composição química de sete variedades de feijão-fava**. Teresina: Embrapa Meio Norte, 2003. 4 p. (Comunicado Técnico).

BALARDIN, R. S.; JAROSZ, A. M.; KELLY, J. D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South Central, and North America. **Phytopathology**, v.87, n.12, p.1184-1191, 1997.

BALARDIN, C. R.; CELMER A. F.; COSTA, E. C.; MENEGHETTI, R. C.;BALARDIN, R. S. Possibilidade de transmissão de *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, agente causal da podridão vermelha da raiz da soja, através da semente. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 6, p. 574-581, 2005.

BURGESS, L. W.; KNIGHT, T. E.; TESORIEO, L.; PHAN, H.T. **Diagnostic manual for plant diseases in Vietnam**. Canberra, Australian Centre for International Agricultural. Section 8.Pathogenicity testing Research, n. 129, p.88-94.2008.

CARNAÚBA, J. P.; SOBRAL, M. F.; AMORIM, E. P. R.; SILVA, A. P.; SILVA, K. M. M. Ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* em *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth no estado de Alagoas. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 3, p. 313-313, 2007.

CARVALHO, E. M. S.; BESERRA JR., J. E. A.; BARGUIL, B. M. Lima Bean Diseases. In: FERREIRA, A. S. A.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F. (Org.). **Phaseolus lunatus: Diversity, Growth and Production**. New York: Nova Science Publishers, p. 113-133, 2015.

CAVALCANTE, G. R. S.; CARVALHO, E. M. S.; GOMES, R. L. F.; SANTOS, A. R. B.; SANTOS, CLAUDIANE. M. P. M.S. Reação de subamostras de feijão-fava à antracnose. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 4, p. 329-333, 2012.

CANNON, P. F.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U.; WEIR, B. S. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology**, n. 73, p. 181-213, 2012.

CHEHRI, K.; SALLEH, B.; ZAKARIA, L. Morphological and phylogenetic analysis of *Fusarium solani* species complex in Malaysia. **Microbial Ecology**, v. 69, n. 3, p. 457-471, 2015.

COSTA , S. S.; MATOS, K. S.; TESSMANN, D. J.; SEIXAS,C. D. S., PFENNING, L. H. *Fusarium paranaense* sp. nov., a member of the *Fusarium solani* species complex causes root rot on soybean in Brazil. **Fungal Biology**, v. 120, n. 1, p. 51-60, 2016.

CRONQUIST, A. **Devolution and Classification of Flowering Plants**. New York: New York Botanical Garden, 555p., 1988.

DAMM, U.; WOUDEBERG, J.H.C.; CANNON, P.F.; CROUS, P.W. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 45-87, 2009.

DAVIDSON, C. R.; CARROLL, R. B.; EVANS, T. A.; MULROONEY, R. P.; KIM, S. H. First Report of *Phytophthora capsici* infecting lima bean (*Phaseolus lunatus*) in the Mid-Atlantic region. **Plant Disease**, v. 86, n.9, p. 1049, 2002.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Biology and Pathology of *Macrophomina phaseolina***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 166 p., 1978.

EMBRAPA SOJA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil 2012 e 2013**. Londrina: [s.n.], 2011.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola - IBGE (1985-2014)**, elaborado na Embrapa Arroz e Feijão por SILVA, O. F. Home Page, setembro / 2015. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm> >. Acesso em: 04 abr. 2016.

EVANS, T. A.; MULROONEY, R.P.; GREGORY, N.F.; KEE, E. Lima bean downy mildew: impact, etiology, and management strategies for Delaware and the mid-Atlantic region, U. S. **Plant Disease**, v. 9, n. 2, p. 128-135, 2007.

FUHLBOHM M. J.; RYLEY, M. J.; AITKEN, E. A. B. New weed hosts of *Macrophomina phaseolina* in Australia. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 7, n. 1, p. 193-195, 2012.

GOELLNER, K.; LOEHRER, M.; LANGENBACH, C.; CONRATH, U. W. E.; KOCH, E.; SCHAFFRATH, U. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular Plant Pathology**, v. 1, n. 2, p. 169-177, 2010.

GOMES, R. L. F.; SOARES, C. A.; GÂNDARA, F. C.; BURLE, M. L. Aspects of crop and socioeconomic management of the Lima bean within Northeastern Brazil. In: FERREIRA, A. S. A.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F. (Org.). **Phaseolus lunatus: Diversity, Growth and Production**. New York: Nova Science Publishers, v. 1, p. 135-151, 2015.

GONZALEZ, R; PINEDA, J; GRATEROL, Y. Cuantificación de inóculo en el suelo e incidencia de *Macrophomina phaseolina* sobre híbridos de sorgo en tres localidades de los Llanos Centrooccidentales de Venezuela. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 24, n. 4, p. 627-641, 2007.

GUIMARÃES, W. N. R.; MARTINS, L. S. S.; SILVA, E. F. D.; FERRAZ, G. M.G.; OLIVEIRA, F. J. Caracterização morfológica e molecular de acessos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 37-45, 2007.

GUPTA, G. K.; SHARMA, S. K.; RAMTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*(Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Journal of Phytopathology**, v. 160, n. 1, p. 167-180, 2012.

HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M.; FERREIRA, L. P.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M.; DIAS, W. P. **Manual de Identificação de Doenças da Soja**. Londrina: Embrapa Soja, 76 p., 2014.

HYDE, K. D.; CAI, L.; CANNON, P. F.; CROUCH, J. A.; CROUS, P. W.; DAMM, U.; GOODWIN, P. H.; CHEN, H. L.; JOHNSTON, P. R.; JONES, E. B. G.; LIU, Z. Y.; MCKENZIE, E. H. C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S. R.; PFENNING, L. H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R. G.; TAN, Y. P.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z. *Colletotrichum* - names in current use. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 1, p. 147–183, 2009.

HYDE, K. D.; CAI, L.; MCKENZIE, E. H. C.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z.; PRIHASTUTI, H. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, v. 39, n.1, p.1-17, 2009.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal Culturas Temporárias e Permanentes**. Rio de Janeiro, v. 41, 100 p., 2014.

IQBAL, U.; MUKHTAR, T. Morphological and Pathogenic Variability among *Macrophomina phaseolina* Isolates Associated with Mungbean (*Vigna radiata* L.) Wilczek from Pakistan. **The Scientific World Journal**, vol. 2014, 2014.

ISLAM, M. S.; HAQUE, M. S.; ISLAM, M. M.; EMDAD, E. M.; HALIM, A.; HOSSEN, Q. M.; HOSSAIN, M. Z.; AHMED, B.; RAHIM, S.; RAHMAN, M. S.; ALAM, M. M.; HOU, S.; WAN, X.; SAITO, J. A.; ALAM, M. Tools to kill: genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 493, 9 p., 2012.

JAGTAP, G. P.; SONTAKKE, P. L. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum truncatum* isolates pathogenic to Soybean. **African Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 12, p. 1483-1487, 2009.

KILLEBREW, J. F.; ROY, K. W.; LAWRENCE, G. W.; MCLEAN, K. S.; HODGES, H. H. Greenhouse and field evaluation of *Fusarium solani* pathogenicity to soybean seedlings. **Plant Disease**, v. 72, n. 12, p. 1067-1070, 1988.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. Ed. Agronômica Ceres, v. 2, 663 p., 2005.

KLEINER, K. R.; FRETT, J. J. The effects of high temperature on *Phaseolus lunatus* yield. **Annual Report-Bean Improvement Cooperative**, v. 39, p. 65-66, 1996.

LATUNDE-DADA, A.O.; O'CONNELL, R.J.; NASH, C. Infection process and identity of the hemibiotrophic anthracnose fungus (*Colletotrichum destructivum*) from cowpea (*Vigna unguiculata*). **Mycological Research**, v. 100, n. 9, p.1133–1141, 1996.

LIMA, W. G.; SPÓSITO, M. B.; AMORIM, L.; GONÇALVES, F. P.; DE FILHO P. A. M. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. **European Journal of Plant Pathology**, v. 131, n.1, p. 157-165, 2011.

LIMA, L. R. L. **Cruzamentos dialélicos para resistência a *Macrophomina phaseolina* e a *Thanatephorus cucumeris* em feijão-caupi**. (Dissertação de mestrado). Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. Universidade Federal do Piauí. Teresina, 65 p., 2015.

LONG, R. **Lima bean production in California**. ANR catalog, University of California, 24 p., 2014. Disponível em: <<http://anrcatalog.ucanr.edu>>. Acesso em 15 out.2015.

LYNCH, T. N.; MAROIS, J. J.; WRIGHT, D. L.; HARMON, P. F.; HARMON, C. L.; MILES, M. R.; HARTMAN, G. L. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* on *Phaseolus* spp in the United States. **Plant Disease**, v. 90, n. 7, p. 970, 2006.

MACKIE, W. W. Origin dispersal and variability of the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L). **Hilgardia**, v.15, n.1, p.1-29, 1943.

MAHDIZADEH, V.; SAFAIE, N.; AGHAJANI, M. A. New hosts of *Macrophomina phaseolina* in Iran. **Journal of Plant Pathology**, v. 93, n. 4 (supplement), p. 63-89, 2011.

MAQUET, A.; VEKEMANS, X.Z.; BAUDOIN, J.P. Phylogenetic study on wild allies of lima bean, *Phaseolus lunatus* L. (Fabaceae), and implications on its origin. **Plant Systematics and Evolution**, v. 218, n. 1-2, p. 43-54, 1999.

MARTÍNEZ-CASTILLO, J; ANDUEZA-NOH, R. H.; CHACÓN -SÁNCHEZ, M.I. Recent advances in the study of the evolution of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Mexico. In: FERREIRA, A.S.A., LOPES, A.C.A., GOMES, R.L.F. (Org.). **Phaseolus lunatus: Diversity, Growth and Production**. New York: Nova Science Publishers, p. 43-62, 2015.

MOTA, J. M. **Diversidade fúngica e transmissão de *Colletotrichum truncatum* e *Macrophomina phaseolina* em sementes de feijão-fava**. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Produção vegetal) Universidade Federal do Piauí. Teresina – PI, 63 p., 2016.

NALIM, F. A.; SAMUELS, G. J.; WIJESUNDERA, R. L.; GEISER, D. M. New species from the *Fusarium solani* species complex derived from perithecia and soil in the Old World tropics. **Mycologia**, v. 103, n. 6, p. 1302-1330, 2011.

NECHET, K. L.; HALFED VIEIRA, B. A. **Ocorrência do fungo *Macrophomina phaseolina* em feijão-caupi no estado de Roraima**. Boa Vista: Embrapa Roraima. Embrapa Roraima. Comunicado Técnico, n. 2, 8 p., 2005.

NECHET, K. L.; HALFELD VIEIRA, B. A. Severidade da mela (*Rhizoctonia solani*) em genótipos de feijão-caupi em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31 (suplemento), p. 374, 2006.

- NOGUEIRA, M. S. R.; BRIOSO, P. S. T. Fase anamórfica de *Glomerella cingulata* em feijão-caupi no Estado do Rio de Janeiro. **Comunicata Scientiae**, v. 6, n. 2, p. 246-249, 2015.
- NOETZOLD, R., ALVES, M. C.; CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A. Q.; Variabilidade espacial de *Colletotrichum truncatum* em campo de soja sob três níveis de sanidade de sementes. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 1, p. 16-23, 2014.
- NORONHA, M. A.; SILVA, K. J. D.; GONCALVES, S. R.; LIMA, L. R. L. **Avaliação da resistência de genótipos de feijão-caupi a *Macrophomina phaseolina***. Embrapa Tabuleiros Costeiros. (Comunicado Técnico), 4 p., 2012.
- O'DONNELL, K. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, v. 92, n. 5, p. 919-938, 2000.
- O'DONNELL, K.; SINK, S.; SCANDIANI, M.M.; LUQUE, A.; COLLETO, A.; BIASOLI, M.; LENZI, L.; SALAS, G.; GONZÁLEZ, V. ; PLOPER, L.D.; FORMENTO, N.; PIOLI, R.N.; AOKI, T.; YANG, X.B.; SARVER, B.A.J. Soybean sudden death syndrome species diversity within North and South America revealed by multilocus genotyping. **Phytopathology**, v. 100, n. 1, p. 58-71, 2010.
- OLIVEIRA, A. E. S.; SIMEÃO, M.; MOUSINHO, F. E. P.; GOMES, R. L. F. Desenvolvimento do feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) sob déficit hídrico cultivado em ambiente protegido. **HOLOS**, v. 1, p. 143-151, 2014.
- PAULA JÚNIOR, T. J.; SILVA, M. B.; VIEIRA, R. F. Doenças causadas por fungos em hortaliças leguminosas. **Informe Agropecuário**, v. 17, n. 182, p. 63-71, 1995.
- PEGADO, C. M. A.; BARBOSA, L. J. N.; MENDES, J. E.M. F.; SOUTO, P. C.; SOUTO, J. S. Decomposição superficial e subsuperficial de folhas de fava (*Phaseolus lunatus* L.) na região do brejo da Paraíba, Brasil. **Revista Caatinga**, v. 21, n. 1, p. 218-223, 2008.
- PESQUEIRA, A. S.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L. Associação de fungicidas no controle da antracnose da soja no Mato Grosso do Sul. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 203-212, 2016.
- PHOULIVONG, S.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E. H. C.; ABDELSALAM, K.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity**, v. 44, n. 1, p. 33-43, 2010.
- PINHEIRO, V. R.; SEIXAS, C. D. S.; GODOY, C. V.; SOARES, R. M.; OLIVEIRA, M. C. N.; ALMEIDA, A. M. R. Development of *Sclerotium rolfsii* sclerotia on soybean, corn, and wheat straw, under different soil temperatures and moisture contents. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 45, n. 3, p. 332-334, 2010.
- RILEY, M. B.; WILLIAMSON, M. R.; MALOY, O. **Plant Disease Diagnosis**. The Plant Health Instructor, 2002. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/PlantDiseaseDiagnosis.aspx>> Acesso em: 02 Fev. 2016.

ROJAS, E. I.; REHNER, S. A.; SAMUELS, G. J.; VAN BAELE, S. A.; HERRE, E. A.; CANNON, P.; CHEN, R.; PANG, J. F.; WANG, R. W.; ZHANG, Y. P.; PENG, Y. Q.; SHA, T. *Colletotrichum gloeosporioides* s. l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: Multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. **Mycologia**, v. 102, n. 6, p. 1318-1338, 2010.

SALEH, A. A.; AHMED, H. U.; TODD, T. C.; TRAVERS, S. E. Related nest of *Macrophomina phaseolina* isolates from tall grass prairie, maize, soybean and sorghum. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 1, p. 79-91, 2010.

SANTOS, A. R. B.; SIMEÃO, M.; BARROS, P. S.; CAVALCANTE, G. R. S.; CARVALHO, E. M. S. Seleção de subamostras de feijão-fava para resistência à antracnose. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 9, n. 3, p. 268-278, 2015.

SARR, M. P.; NDIAYE, M'BAYE; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 53, n. 2, p. 250-268, 2014.

SILVA, K. S.; REBOUÇAS, T. N. H.; LEMOS, O. L.; BOMFIM, M. P.; BOMFIM, A. A.; ESQUIVEL, G. L.; BARRETO, A. P. P.; SÃO JOSÉ, A. R.; DIAS, N. O.; TAVARES, G. M. Patogenicidade causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) em diferentes espécies frutíferas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 131-133, 2006.

SILVA, J. A.; OLIVEIRA, M. G.; SOUZA, L. T.; ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. A.; MICHEREFF, S. J. Reação de genótipos de feijão-fava a *Sclerotium rolfsii*. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 98-101, 2014.

SMITH, S. N. An overview of ecological and habitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. **Plant Pathology Bulletin**, v. 16, n. 3, p. 97-120, 2007.

SOARES, C. A.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; GÂNDARA, F. C. In: LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; ARAUJO, A. S. F. de. **A cultura do feijão-fava no meio-norte do Brasil**. Teresina: EDUFPI, 2010. p. 239-263.

SPONHOLZ, C.; FILHO, F. R. F.; MAIA, C. B.; RIBEIRO, V. Q.; CARDOSO, M. O. **Reação de genótipos de feijão-caupi ao *Colletotrichum truncatum***. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Embrapa Meio-Norte, Teresina, 19 p., 2006.

SURICO, G. The concepts of plant pathogenicity, virulence/avirulence and effector proteins by a teacher of plant pathology. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 52, n. 3, p. 399-417, 2013.

TOZZE JR., H. J.; MELLO, M. B. A.; MASSOLA JR., N. S. Morphological and physiological characterization of *Colletotrichum* sp. isolates from solanaceous crops. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 1, p. 71-79, 2006.

VIEIRA, R. F.; VIEIRA, C.; ANDRADE, G. A. Comparações agronômicas de feijões dos gêneros *Vigna* e *Phaseolus* com o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n. 6, p. 841-850, 1992.

VOLCY, C. Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología. Una revisión. **Agronomia Colombiana**, v. 26, n. 1, p. 107-115, 2008.

WEEDS, P. L.; CHAKRABORTY, S.; FERNANDES, C. D.; CHARCHAR, M. J. D'A.; RAMESH, C. R.; KEXIAN, Y.; KELEMU, S. Genetic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes* spp. at centers of origin and utilization. **Phytopathology**, v. 93, n. 2, p. 176-185, 2003.

WEIR, B.; JOHNSTON, P.R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p.115-180, 2012.

WESTPHAL, A.; ABNEY, T. S.; XING, L.; SHANER, G. E. Síndrome de la muerte súbita de la soja. Trans. Silvina L. Giammaria. **The Plant Health Instructor**, 2008. Disponível em:

<<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/SuddenDeathEsp.aspx> > Acesso em: 02 Abr. 2016.

ZHANG, N.; O'DONNELL, K.; SUTTON, D.A.; NALIM, F.A.; SUMMERBELL, R.C.; PADHYE, A.A.; GEISER, D.M. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2186-2190, 2006.

CAPÍTULO 1

Primeiro relato de *Macrophomina phaseolina* em feijão-fava no Brasil

RESUMO

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é uma importante leguminosa cultivada no Nordeste do Brasil. A podridão de carvão, causada pelo fungo habitante do solo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., é doença severa de muitas espécies cultivadas no Brasil, como soja e feijão-caupi. Em fevereiro e abril de 2015, durante visitas técnicas a campos de produção de feijão-fava nos municípios de Esperantina-PI e Assaré-CE, Brasil, foram observadas plântulas exibindo sintomas de podridão de carvão e plantas adultas com vagens cobertas com micélio fúngico. O objetivo deste estudo foi identificar o agente causal dessa doença em feijão-fava e realizar teste de patogenicidade. Dois isolados fúngicos foram identificados por análises morfológicas e por sequenciamento do gene EF-1 α . Com base nos caracteres morfológico e filogenético os isolados foram identificados como *M. phaseolina* e agruparam com o isolado ex-type com suporte de bootstrap de 99 %. Ambos os isolados foram patogênicos ao feijão-fava, var. Boca de Moça, por dois métodos de inoculação durante a semeadura: 1. discos de meio de cultura com micélio. 2. grãos de arroz infestados. Todas as plantas inoculadas, independente do método de inoculação, apresentaram sintomas semelhantes àqueles observados em plantas naturalmente infectadas no campo. O fungo foi reisolado de todas as plantas, completando os Postulados de Koch. Este é o primeiro relato de *M. phaseolina* infectando feijão-fava no Brasil.

Palavras-chave: *Phaseolus lunatus*; podridão cinzenta; podridão de carvão.

First report of *Macrophomina phaseolina* in lima bean in Brazil

ABSTRACT

The lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is an important legume that has been growing in the northeast of Brazil. The charcoal rot, caused by fungus that inhabits in the soil *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., is a severe disease of many species grown in Brazil, such as soybean and cowpea. In February and April 2015, during technical visits to lima bean production fields in the municipalities of Esperantina-PI and Assaré-CE, Brazil, seedlings were observed with charcoal rot symptoms and adult plants with pods covered with mycelium. The objective of this study was to identify the causative agent of the disease in lima bean and perform pathogenicity test. Two fungal isolates were identified by morphological analysis and sequencing of the EF-1 α gene. On the basis of morphological characters and phylogenetic the isolates were identified as *M. phaseolina* and grouped with the isolated ex-type with 99 % bootstrap support. Both isolates were pathogenic to lima bean, var. "Boca de Moça", for two methods of inoculation for sowing: 1. culture medium disks with mycelial. 2. infested rice grains. All the inoculated plants, regardless of the method of inoculation, present similar symptoms to those observed in naturally infected plants in the field. The fungus was reisolated from all plants, completing Koch's postulates. This is the first report of *M. phaseolina* infecting lima bean in Brazil.

Keywords: *Phaseolus lunatus*; gray rot; charcoal rot.

1 INTRODUÇÃO

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é uma fabácea nativa das Américas Central e do Sul cultivada principalmente em regiões tropicais e semi-tropicais ao redor do mundo (MARTÍNEZ-CASTILLO et al., 2014). No Brasil é considerada a segunda espécie de maior importância agrícola do gênero *Phaseolus*, tendo grande importância principalmente para a região Nordeste, onde representa fonte de alimento e renda para a população e produtores familiares (MAQUET et al., 1999; CARVALHO et al., 2015). O feijão-fava é bem adaptado a regiões secas e tem boa produtividade tanto em períodos úmidos como secos (VIEIRA, 1992), porém sua produtividade ainda é baixa em relação às outras espécies de feijão consumidas no Brasil.

Em 2014 foram produzidas 7.416 toneladas de grãos de feijão-fava em uma área de 23.697 ha (IBGE, 2014). Vários fatores são atribuídos a essa baixa produtividade, dentre eles destaca-se a ocorrência de doenças, que são pouco estudadas e muitas vezes de etiologia desconhecida (CARVALHO et al., 2015). A identificação correta dessas doenças e seus agentes causais são cruciais para o estabelecimento de estratégias mais eficazes de manejo da cultura.

Em visitas técnicas a campos de produção de feijão-fava nos municípios de Esperantina-Piauí e Assaré-Ceará, Brasil, foram observadas plântulas exibindo sintomas de podridão de carvão e manchas foliares, e plantas adultas com vagens cobertas com micélio fúngico. Os sintomas são semelhantes àqueles observados em soja e feijão-caupi provocados por *Macrophomina phaseolina*. Esta espécie é considerada polífaga, capaz de causar doenças em uma grande diversidade de espécies de plantas (GUPTA et al., 2012).

O fungo possui mecanismos de infecção diversificados, que lhe permitem degradar a parede celular de diversos hospedeiros e sobreviver por vários anos em restos de cultura no solo, através de microesclerócios que constituem a principal fonte de inóculo do fungo (GUPTA et al., 2012; ISLAM et al., 2012). Os sintomas observados nas diferentes espécies infectadas variam de lesões escurecidas no caule e nas raízes, podridão, murcha, seca, tombamento e folhas com coloração marrom-escura; a presença de microesclerócios nos tecidos da planta é um sinal recorrente em diferentes hospedeiros (ALMEIDA et al., 2014; GUPTA et al., 2012; SUN et al., 2015; ZHANG et al., 2011). Após a infecção das mudas, os sintomas

podem ser observados nos cotilédones, no caule e nas hastes das plantas e, se as condições de ambiente continuarem favoráveis o fungo pode causar a morte da planta (GUPTA et al., 2012).

Considerando a ausência de relatos da patogenicidade de *M. phaseolina* em feijão-fava no Brasil este trabalho teve como objetivos identificar o agente causal da podridão de carvão em feijão-fava pela utilização de marcadores morfológicos, caracterização molecular e teste de patogenicidade, além de avaliar a eficiência de diferentes métodos de inoculação artificial do fungo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos isolados

Os isolados foram obtidos a partir de plantas de feijão-fava cultivadas nos estados do Piauí e Ceará, Brasil, com sintomas de podridão de carvão do caule ou seca. Fragmentos de raízes, caules e folhas foram desinfestadas superficialmente com álcool 70 %, hipoclorito de sódio a 2 % e enxaguadas duas vezes com água destilada e esterilizada (ADE). As amostras foram plaqueadas em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e incubadas em estufa a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 horas, por quatro dias. Os isolados foram identificados conforme morfologia, preservados em microtubos e depositados na Coleção Micológica Maria Menezes da Universidade Federal Rural de Recife.

2.2 Caracterização morfológica e molecular

A partir de uma coleção de oito isolados, CMM-3540 de Esperantina-PI e CMM-3543 de Assaré-CE foram selecionados para a identificação morfológica e molecular. Avaliaram-se características como a cor e o aspecto do micélio aéreo, tamanho e forma dos conídios, como também a presença ou ausência de microesclerócios em meio de cultura. Para avaliação da velocidade de crescimento micelial, discos de 5 mm de meio contendo estruturas do fungo, retirados da área periférica de colônias puras com quatro dias de crescimento, foram transferidos para placas de Petri com meio de cultura BDA e incubadas em estufa incubadora a 25 ± 2

°C, com fotoperíodo de 12 horas. A medição do crescimento da colônia foi feita com uso de régua milimetrada a cada 24 horas, medindo-se o diâmetro da colônia em dois sentidos perpendiculares entre si; as medições foram feitas até que o fungo atingisse toda a área da placa. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com dois tratamentos (isolados) e cinco repetições.

A caracterização molecular foi realizada transferindo-se os isolados para placas com meio Extrato de Malte 2 % e a partir destas realizados cultivos monospóricos. Os isolados tiveram DNA extraído utilizando Wizard Genomic DNA Purification Kit® (Promega). As reações foram realizadas utilizando o kit GoTaq® Colorless Master Mix (Promega). Na amplificação do gene EF (Elongation factor 1- α) foram utilizados os primers EF1-728F Forward (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') (CARBONE; KOHN, 1999) e Ef-2 Reverse (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') (O'DONNELL et al., 1998). Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) e posteriormente sequenciados, nas direções senso e antisenso no Instituto Biológico de São Paulo. Os eletroferogramas foram analisados com o auxílio do programa SeqAssem (HEPPERLE, 2004). As sequências editadas foram comparadas com sequências depositadas no GenBank por meio da ferramenta BLAST n (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Alinhamentos múltiplos das sequências foram gerados utilizando-se o programa CLUSTALW implementado pelo programa MEGA v.6.0 (TAMURA et al., 2013). Os alinhamentos foram corrigidos manualmente e análise realizada com o programa MEGA v.6.0 utilizando o método de máxima parcimônia.

2.3 Testes de Patogenicidade

A patogenicidade dos isolados foi testada através de dois métodos de inoculação em plantas de feijão-fava: 1. deposição de discos de meio BDA com micélio do fungo na cova de semeadura, 2. deposição de grãos de arroz infestados com o fungo na cova de semeadura, adaptado de Songa et al. (1997). Utilizaram-se sementes de feijão-fava, variedade crioula Boca-de-moça (Acesso UFPI-894) previamente desinfestadas em hipoclorito de sódio 2 % por dois minutos, enxaguadas em ADE e secas em papel toalha. A semeadura foi realizada em vasos plásticos com capacidade de 2,8 litros, contendo solo autoclavado duas vezes a 121

°C durante uma hora. A parcela experimental consistiu de um vaso com três plantas. Os experimentos foram realizados duas vezes, com sete repetições cada. As plantas foram avaliadas diariamente, durante 30 dias.

2.3.1 Método do grão de arroz infestado

O inóculo foi preparado em Erlenmeyers de 500 mL, no qual depositaram-se 100 g de arroz com casca, acrescidos de 100 mL de água destilada. O substrato foi autoclavado a 121 °C por 20 minutos. Após o completo resfriamento do substrato cinco discos de micélio de 5 mm foram retirados da área periférica de colônias com quatro dias de idade e depositados nos Erlenmeyer contendo o substrato. Os frascos foram incubados em estufa incubadora a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 horas, até a completa colonização dos grãos. Para garantir uma colonização uniforme, os frascos foram agitados manualmente e diariamente. Inocularam-se cinco grãos de arroz infestados em cada cova de semeadura, as sementes desinfestadas foram depositadas sobre os grãos e cobertas com solo. No tratamento testemunha utilizaram-se grãos de arroz autoclavados não colonizados pelo fungo.

2.3.2 Método de discos de micélio

Cinco discos de meio de cultura BDA mais micélio fúngico de 5 mm obtidos de culturas puras com quatro dias de crescimento foram depositados nas covas de semeadura. As sementes, previamente desinfestadas como descrito anteriormente, foram semeadas sobre os discos e uma pequena quantidade de solo foi colocada sobre as mesmas. No tratamento testemunha foram inoculados discos de meio de cultura BDA sem o fungo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Observação dos sintomas em plantas no campo

Nos meses de fevereiro e abril de 2015 foram observadas plântulas e plantas, respectivamente, de feijão-fava com sintomas de podridão de carvão e vagens próximas ao solo cobertas com micélio cinza (Figura 1A, B). As plântulas com folhas

cotiledonares expandidas apresentavam, na altura dos cotilédones, cancrs pretos, deprimidos e com margens bem definidas, que expandiam em direção ao hipocótilo e epicótilo, às vezes rodeando completamente o caule (Figura 1B). Após a remoção das plantas infectadas do solo foram observadas massas de microesclerócios formados sobre os tecidos infectados (Figura 1E).

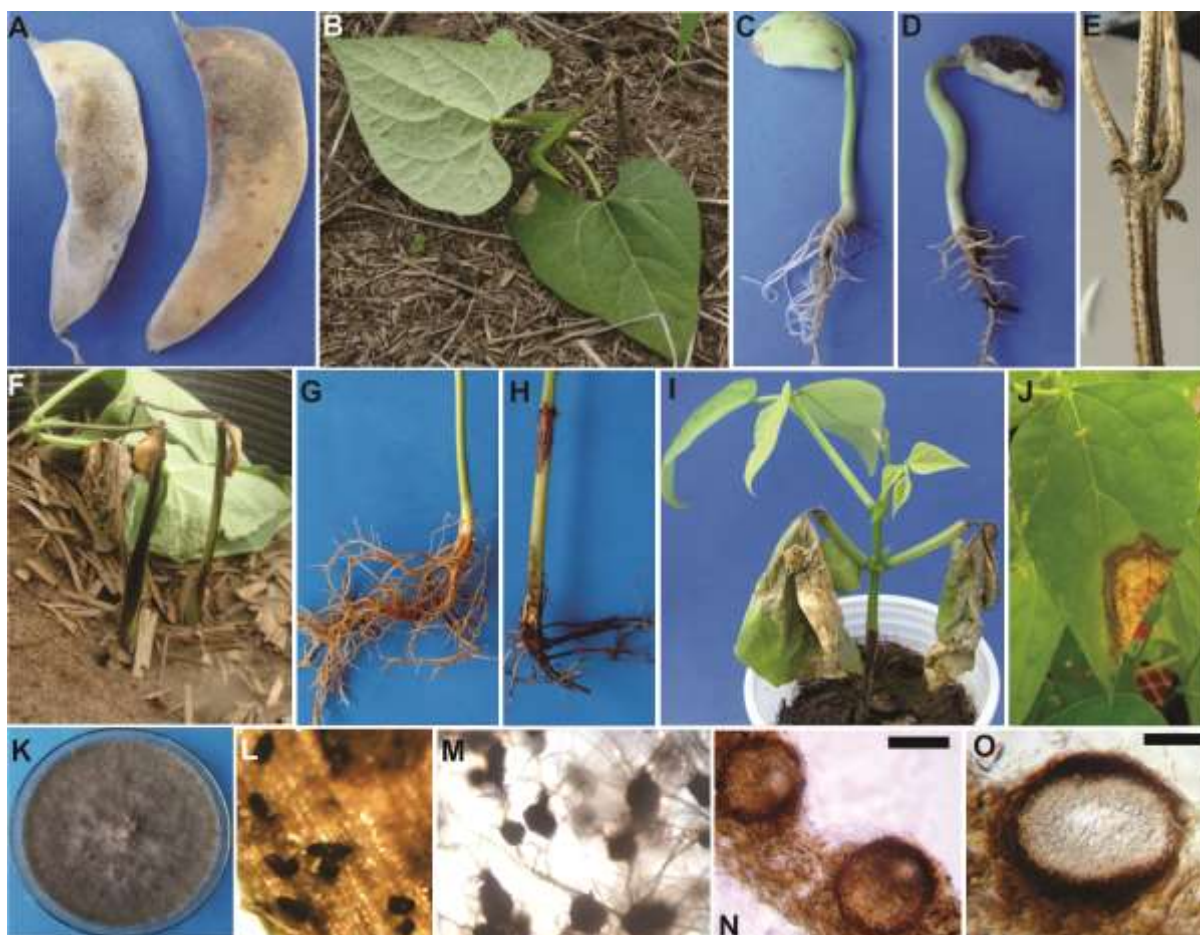


Figura 1. *Macrophomina phaseolina* em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). (A) Micélio sobre a vagem; (B) Sintoma de podridão de carvão em caule e tombamento em campo; (C) Cotilédone saudável; (D) Cotilédone com lesão escura e massa de microesclerócios; (E) Microesclerócios em caule; (F) Tombamento em plantas inoculadas; (G) Raiz saudável; (H) Podridão de carvão em raiz inoculada; (I, J) Sintomas foliares, com presença de picnídios em plantas inoculadas; (K) *M. phaseolina* em meio BDA; (L) Microesclerócios em caule de planta inoculada; (M) Massa de microesclerócios produzidos em meio BDA; (N) Picnídios na superfície de folha de planta inoculada; (O) Picnídio com conídios. Barra: N-O = 20 μ m.

3.2 Caracterização morfológica

Os dois isolados obtidos formaram colônias inicialmente brancas, que se tornaram cinza escuro a partir do segundo dia, atingindo 9 cm de diâmetro, com

micélio aéreo abundante, no quarto dia de incubação (Figura 1K). Não foi observada formação de picnídios em meio de cultura, porém estes foram abundantes nos tecidos foliares sintomáticos, com formato globoso e tamanho variando entre 121-205,30 μm . Os conídios formados são hialinos, ovóides, medindo de 26-31,71 x 10-12,41 μm , medidas que os classificam como macroconídios conforme identificação proposta por Sarr et al. (2014). Aos quatro dias de incubação foram observados microesclerócios negros com tamanho variado (50-96,42 μm) (Figura 1M). Características semelhantes foram observadas em *M. phaseolina* isolada de feijão Adzuki (*Vigna angularis* Willd. Ohwi & Ohashi) e em feijão Mungo (*Vigna radiata* L.) na China (SUN et al., 2015; ZHANG et al., 2011).

3.3 Caracterização molecular

A identificação dos isolados foi confirmada pela amplificação e sequenciamento do gene EF-1 α . Os isolados CMM3540 e CMM3543 agruparam na árvore filogenética com o espécime tipo CBS 205.47, juntamente com isolados de *M. phaseolina* de diferentes espécies do gênero *Phaseolus* e com isolado de soja, com suporte de bootstrap de 99 % (Figura 2). A caracterização molecular é um passo importante na identificação correta deste fungo, haja vista a similaridade morfológica entre *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina*, espécie recém descrita no Senegal, pois há apenas uma leve redução no tamanho dos conídios entre estas espécies (SARR et al., 2014).

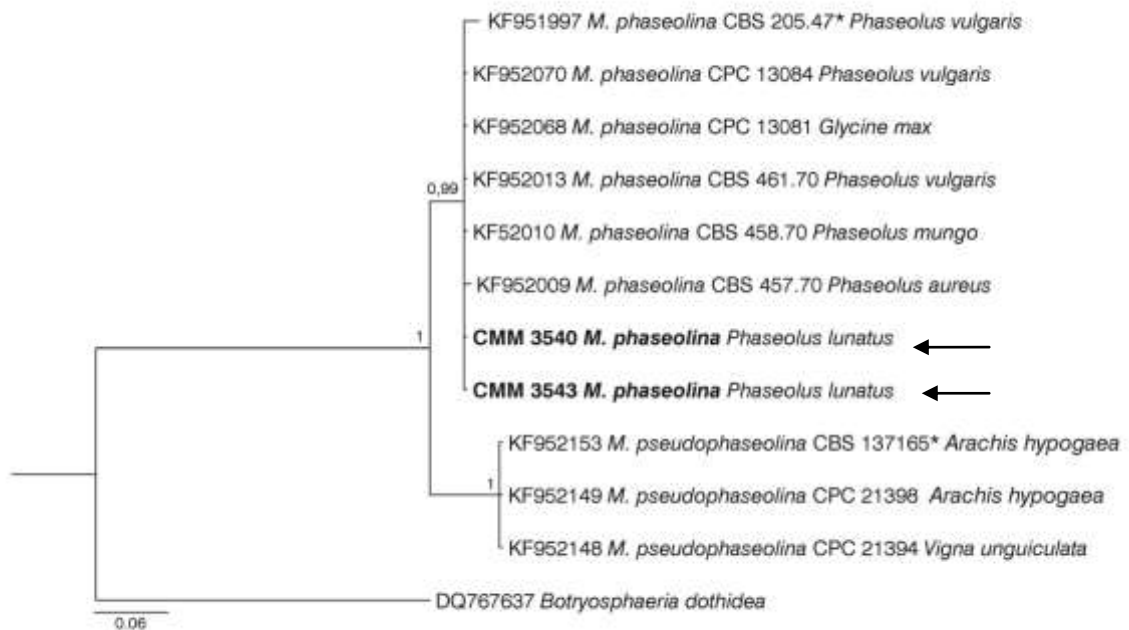


Figura 2. Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene EF-1α de *Macrophomina phaseolina*. A árvore foi construída usando o método da máxima parcimônia. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore, e os valores debootstrap (1000 repetições) são indicados acima dos internódios. *Botryosphaeria dothidea* foi usada como outgroup.

3.4 Teste de Patogenicidade

Os dois métodos de inoculação foram eficazes na indução de sintomas nas plantas de feijão-fava. Nenhum sintoma foi observado nas plantas utilizadas como controle. *M. phaseolina* foi reisolado de todas as plantas inoculadas, completando os Postulados de Koch. Nas plantas inoculadas os sintomas variaram, ocorrendo podridões de sementes (Figura 1D) com crescimento de micélio fúngico sobre o tegumento, presença de lesões escuras no hipocótilo e epicótilo (Figura 1F), provocando a ruptura do caule e tombamento de plantas com folhas verdadeiras já desenvolvidas, além de seca e morte de plântulas (Figura 1I).

Nas plantas que se desenvolveram os sintomas surgiram quatro dias após a germinação das sementes, iniciando com uma mancha de cor variando do vermelho ao marrom escuro na região de inserção dos cotilédones e se desenvolveram com o passar dos dias em direção ao hipocótilo e epicótilo (Figura 1H). A partir do sexto dia após a inoculação microesclerócios em abundância começaram a ser formados no caule (Figura 1L). Foram observadas plântulas com sistema radicular reduzido

(Figura 1H). Algumas plantas exibiram colonização sistêmica em suas folhas cotiledonares, que murcharam e secaram, com a formação, em sequência, de numerosos picnídios (Figura 1N, O). Eventualmente foram observadas manchas marrons circulares que, com o passar dos dias, tornaram-se assimétricas, atingindo boa parte do limbo no primeiro par de folhas verdadeiras (Figura 1J). Sintomas semelhantes foram observados em folhas de *Phaseolus aureus* Roxb. (TANDEL et al., 2015).

A natureza sistêmica da infecção em *M. phaseolina* em feijão guandu (*Cajanus cajan* L.) foi revelada por exames histopatológicos, nos quais foram encontrados micélio e microesclerócios do fungo na medula e córtex do pecíolo (MAURYA et al., 2013). Os sintomas na raiz das plantas variaram desde ausência de sintomas à podridão negra com redução do sistema radicular (Figura 1H). Os sintomas das plantas inoculadas observados neste trabalho se assemelham àqueles de outras leguminosas como soja, feijão guandu, feijão Adzuki e feijão Mungo (GUPTA et al., 2012; MAURYA et al., 2013; SUN et al., 2015; ZHANG et al., 2011).

Neste trabalho ambos os isolados foram patogênicos ao feijão-fava, havendo diferenças na incidência dos sintomas entre os diferentes métodos de inoculação. Na tabela 1 é possível observar a porcentagem de sementes mortas com presença de micélio fúngico no tegumento, plantas tombadas e plantas que apresentaram lesões necróticas no caule em cada um dos métodos de inoculação.

Tabela 1. Porcentagem de sementes mortas (SM), plantas tombadas (PT) e plantas com lesões necróticas (PL) no caule nos diferentes métodos de inoculação de *Macrophomina phaseolina* em feijão-fava. Teresina, 2016

| Isolado | Método de inoculação | | | | | |
|---------|--------------------------|---------------|--------------|------------------|---------------|---------------|
| | Arroz infestado | | | Disco de micélio | | |
| | SM | PT | PL* | SM | PT | PL* |
| CMM3540 | 4,7% (1/21) ¹ | 61,9% (13/21) | 33,3% (7/21) | 4,7% (1/21) | 47,6% (10/21) | 47,6% (10/21) |
| CMM3543 | 4,7% (1/21) | 71,4% (15/21) | 23,8% (5/21) | 0,0% (0/21) | 100% (21/21) | 0,0% (0/21) |

¹Proporção de plantas com os sintomas descritos (n° de plantas sintomáticas/n° de plantas inoculadas).

*As plantas não morreram até o final das avaliações.

Dez dias após a emergência (DAE) ficou evidente a diferença entre os métodos de inoculação; a ocorrência de tombamento com morte das plantas foi a

característica que mais variou entre os métodos, pois 71,4 % das plantas inoculadas com arroz infestado desenvolveram tombamento, contra 100 % das plantas inoculadas com discos de micélio (Tabela 1). Nos testes de patogenicidade de *M. phaseolina* diversas metodologias têm sido utilizadas, desde fermento com palito infestado pelo fungo em órgãos da planta, infestação de sementes, a incorporação de estruturas do fungo a diferentes substratos etc. (AMUSA et al., 2007; KHANZADA et al., 2012). O método de deposição de disco de micélio no solo mostrou-se eficaz na inoculação artificial de *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina* em diferentes variedades de feijão-caupi (NDIAYE et al., 2015). Na inoculação do patógeno em *Abelmoschus esculentus* L. maior mortalidade e incidência de podridão foi observada no método de infestação do solo com microesclerócios do fungo (KHANZADA et al., 2012).

Macrophomina phaseolina foi detectada nas principais leguminosas cultivadas no Mundo. No entanto, no feijão-fava existem apenas dois relatos de ocorrência natural, na Índia e nos Estados Unidos (FARR; ROSSMAN, 2016). Para nosso conhecimento, este é o primeiro registro de *M. phaseolina* causando podridão de carvão em feijão-fava no Brasil.

O presente estudo é uma ferramenta valiosa na compreensão dos processos que envolvem a infecção do patógeno no feijão-fava, sendo base para demais estudos que visem estabelecer estratégias de manejo das doenças que atingem a cultura.

4 CONCLUSÕES

Macrophomina phaseolina é o agente causal da podridão de carvão em feijão-fava.

O método de inoculação baseado na deposição de discos de micélio do fungo no solo junto às sementes no momento da semeadura mostrou-se o método mais eficaz para a indução artificial de sintomas em feijão-fava.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S.; FARIAS, J. R. B.; OLIVEIRA, M. C. N.; FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; COSTA, J.M.; GAUDENCIO, C. A. ***Macrophomina phaseolina* em soja**. Londrina: Embrapa Soja, 55 p. 2014.
- AMUSA, N. A.; OKECHUKWU, R. U.; AKINFENWA, B. Reactions of cowpea to infection by *Macrophomina phaseolina* isolates from leguminous plants in Nigeria. **African Journal of Agricultural Research**, v. 2, n. 3, p. 73-75, 2007.
- CARBONE I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v. 9, p. 553-556, 1999.
- CARVALHO, E. M. S.; BESERRA JR., J. E. A.; BARGUIL, B. M. Lima Bean Diseases. In: FERREIRA, A. S. A.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F. (Org.). ***Phaseolus lunatus: Diversity, Growth and Production***. New York: Nova Science Publishers, p. 113-133, 2015.
- FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y. **Fungus-Host Distribution Database**, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Disponível em <<http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/>>. Acesso em: 06 Mai. 2016.
- GUPTA, G. K.; SHARMA, S. K.; RAMTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Journal of Phytopathology**, v. 160, n. 1, p. 167-180, 2012.
- HEPPERLE, D. **A sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences**. Win32-Version, 2004. Disponível em: <<http://www.sequentix.de.>>. Acesso em: 04 Abr. 2016.
- IBGE. **Produção Agrícola Municipal: Culturas Temporárias e Permanentes**. Rio de Janeiro, v. 41, 100 p., 2014.
- ISLAM, M. S.; HAQUE, M. S.; ISLAM, M. M.; EMDAD, E. M.; HALIM, A.; HOSSEN, Q. M.; HOSSAIN, M. Z.; AHMED, B.; RAHIM, S.; RAHMAN, M. S.; ALAM, M. M.; HOU, S.; WAN, X.; SAITO, J. A.; ALAM, M. Tools to kill: genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 493, 2012.
- KHANZADA, A. M.; LODHI, A. M.; SHAH, N.; MAITLO, S. A. Effect of different inoculation methods and inoculum levels of *Macrophomina phaseolina* on okra. **International Journal of Phytopathology**, v. 1, n. 1, p. 01-05, 2012.
- MARTÍNEZ-CASTILLO, J.; CAMACHO-PÉREZ, L.; VILLANUEVA-VIRAMONTES, S.; ANDUEZA-NOH, R. H.; CHACÓN-SÁNCHEZ, M. I. Genetic structure within the Mesoamerican gene pool of wild *Phaseolus lunatus* (Fabaceae) from Mexico as revealed by microsatellite markers: Implications for conservation and the

domestication of the species. **American Journal of Botany**, v. 101, n. 5, p. 851-864, 2014.

MAURYA, S. K.; KAUR, S.; CHAUHAN, V. B. Histopathology of *Macrophomina* stem canker disease in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). **International Journal of Phytopathology**, v. 2, n. 3, p. 187-192, 2013.

MAQUET, A.; VEKEMANS, X. Z.; BAUDOIN, J. P. Phylogenetic study on wild allies of lima bean, *Phaseolus lunatus* L. (Fabaceae), and implications on its origin. **Plant Systematics and Evolution**, v. 218, n.1-2, p.43-54, 1999.

MOTA, J. M. **Diversidade fúngica e transmissão de *Colletotrichum truncatum* e *Macrophomina phaseolina* em sementes de feijão-fava**. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Produção vegetal) Universidade Federal do Piauí. Teresina – PI, 63 p., 2016.

NDIAYE, M; SARR, M. P.; CISSE, N.; NDOYE, I. Is the recently described *Macrophomina pseudophaseolina* pathogenically different from *Macrophomina phaseolina*? **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 45, p. 2232 -2238, 2015.

O'DONNELL, K.; KISTLER, H. C.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R.C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 5, p. 2044-2049, 1998.

SARR, M. P.; NDIAYE, M'BAYE; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 53, n. 2, p. 250-268, 2014.

SONGA, W.; HILLOCKS, R.J.; MWANGO'MBE, A. W.; BURUCHARA, R.; RONNO, W. K. Screening common bean accessions for resistance to charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) in eastern Kenya. **Experimental Agriculture**, v. 33, n. 4, p. 459-468, 1997.

SUN, S.; WANG, X.; ZHU, Z.; WANG, M. Occurrence of Charcoal Rot Caused by *Macrophomina phaseolina*, an Emerging Disease of Adzuki Bean in China. **Journal of Phytopathology**, v. 164, n. 3, p. 1-5, 2015.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TANDEL, D. H.; SABALPARA, A. N.; PATEL R. C.; PATEL, V. R. Prevalence of Green gram leaf blight caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. **International Journal of Engineering and Advanced Research Technology**, v. 1, p. 54-56, 2015.

VIEIRA, R. F.; VIEIRA, C.; ANDRADE, G. A. Comparações Agronômicas de Feijões dos gêneros *Vigna* e *Phaseolus* com o Feijão-Comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n. 6, p. 841-850, 1992.

ZHANG, J. Q.; ZHU, Z. D.; DUAN, C. X.; WANG, X. M.; LI, H. J. First report of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on mung bean in China. **Plant Disease**, v. 95, n. 7, p. 872, 2011.

CAPÍTULO 2

Primeira ocorrência de podridão de raiz causada por *Fusarium falciforme* (FSSC 3 + 4) em feijão-fava no Brasil

RESUMO

Espécies do Complexo *Fusarium solani* são patógenos de solo agressivos, responsáveis por podridões de raízes em diversas culturas pelo mundo. O feijão-fava é cultivado em diversos países tropicais e subtropicais; no Brasil, é importante fonte de alimento e renda para a população e agricultores familiares, principalmente na região Nordeste. Durante visitas técnicas a campos de produtores nos municípios de Tanque e Teresina, Piauí, Brasil, foram observados sintomas de podridão de raízes em plantas de feijão-fava. Os isolados obtidos a partir destas plantas foram identificados morfológicamente como pertencentes ao Complexo *Fusarium solani*. O objetivo deste estudo foi identificar o agente causal da podridão de raízes em feijão-fava e realizar teste de patogenicidade através de dois métodos de inoculação do fungo. O método de fermento e imersão das raízes em suspensão conidial foi o mais eficiente na indução de sintomas nas plantas em casa de vegetação. Os isolados fúngicos foram reisolados das plantas inoculadas, cumprindo os Postulados de Koch. A análise molecular utilizando os genes EF-1 α e RPB2 confirmou a identidade dos isolados como *Fusarium falciforme*, com suporte de bootstrap de 100 %. Este é o primeiro relato de infecção natural de espécie do Complexo *Fusarium solani* em feijão-fava no Brasil.

Palavras-chave: filogenia molecular, patogenicidade, *Phaseolus lunatus* L., podridão vermelha da raiz.

First occurrence of root rot caused by *Fusarium falciforme* (FSSC 3 + 4) in lima bean in Brazil

ABSTRACT

The Complex *Fusarium solani* species are aggressive soil pathogens, responsible for rotting of roots in much growth around the world. The lima bean is grown in many tropical and subtropical countries. In Brazil, it is an important source of food and income for the population and family farmers, especially in the Northeast. During technical visits in producing fields in the cities of Tanque and Teresina, Piauí, Brazil, it was observed root rot symptoms in lima bean plants. The isolates obtained from these plants were morphologically identified as belonging to the Complex *Fusarium solani*. The objective of this study was to identify the causal agent of root rot in lima bean and conduct pathogenicity test through two fungal inoculation methods. The wound and soaking the roots in conidial suspension method was the most efficient in inducing symptoms in plants in the greenhouse. Fungal isolates were reisolated from inoculated plants, fulfilling Koch's postulates. Molecular analysis using EF-1 α and RPB2 genes confirmed the identity of the isolates as *Fusarium falciforme* with 100 % bootstrap support. This is the first report of natural infection of Complex *Fusarium solani* species in lima bean in Brazil.

Keywords: molecular phylogeny, pathogenicity, *Phaseolus lunatus* L., red root rot.

1 INTRODUÇÃO

Fungos do gênero *Fusarium* são habitantes naturais do solo e apresentam diversidade de hospedeiros e estilos de vida, além de algumas espécies serem produtoras de micotoxinas (SMITH, 2007). Dentre os representantes do gênero, *Fusarium solani* se destaca por possuir diversificados hábitos de vida, dentre eles patógenos oportunistas associados a infecções em humanos e fitopatógenos responsáveis por doenças que levam a perdas em diversas culturas agronomicamente importantes (SMITH, 2007).

Fusarium solani species complex (FSSC), como é atualmente denominado, é formado por aproximadamente 50 espécies filogenéticas (O'DONNELL et al., 2008; ZHANG et al., 2006), divididas em três clados. As espécies dos clados 1 e 2 são geralmente associadas a doenças e morte de plantas, enquanto espécies do clado 3 são, na sua maioria, saprófitas de ambientes diversos ou relacionadas a infecções oportunistas em humanos. Isolados identificados como pertencentes ao clado 3 também têm sido isolados a partir de leguminosas como soja, ervilha, lentilha e feijoeiro, causando podridão de raízes (CHITRAMPALAM; NELSON JR., 2016).

A podridão de raiz é um sintoma típico de infecção das plantas por fungos habitantes do solo. Na cultura da soja fungos do complexo FSSC são responsáveis pela síndrome de morte súbita (SDS) ou podridão vermelha da raiz (AOKI et al., 2005; COSTA et al., 2016); os sintomas frequentes incluem clorose internerval e murcha foliar, além de podridão radicular com lesões evidentes e redução de desenvolvimento da planta (WESTPHAL et al., 2008).

Fusarium falciforme é uma espécie distribuída em solos de diversos países (CHEHRI, 2015; NALIM et al., 2011), além de ser relacionada a infecções oportunistas que afetam humanos e animais (ZHANG et al., 2006). No Brasil está associada a podridão de raízes em grão-de-bico (CABRAL et al., 2016). Nos Estados Unidos a espécie foi isolada a partir de raízes de soja (CHITRAMPALAM; NELSON JR., 2016).

Diferentes espécies tem sido relacionadas à podridão de raízes em soja e feijões ao redor do mundo (AOKI, et al., 2012; AOKI et al., 2005; BILGI et al., 2011), e ferramentas moleculares modernas tem auxiliado na identificação mais apurada de espécies que afetam leguminosas, haja vista a dificuldade de identificação com uso apenas da morfologia e gama de hospedeiros.

Fusarium paranaense, espécie do FSSC relacionada filogeneticamente a *F. falciforme*, é amplamente distribuída em regiões produtoras de soja no Brasil, induzindo sintomas de podridão radicular semelhantes àqueles observados por outras espécies de referência, como *Fusarium tucumaniae*, *Fusarium brasiliense* e *Fusarium crassistipitatum* (COSTA et al., 2016). No feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* e *Fusarium graminearum* induzem sintomas de podridão, com descoloração da raiz e desenvolvimento de lesões escuras nas raízes e hipocótilo (BILGI et al., 2011). Em feijão adzuki (*Vigna angularis* L.) e feijão mungo (*Vigna radiata* L.) *Fusarium azukicola* causa podridão radicular, clorose e necrose foliar, além de acentuada redução de tamanho e peso das plantas infectadas (AOKI et al., 2012).

O feijão-fava é uma cultura de alto valor social e econômico no Brasil, principalmente na região Nordeste do país, cultivado por agricultores familiares com uso de tecnologia rudimentar, fator que contribui para seu baixo rendimento (GOMES et al., 2015). Nesse país, poucas doenças fúngicas foram descritas em feijão-fava (CARVALHO et al., 2015). A podridão vermelha da raiz em feijão-fava é uma doença de agente etiológico desconhecido no Brasil.

Portanto, este estudo teve como objetivos identificar com base nos marcadores morfológicos e filogenia, avaliar a patogenicidade de dois isolados de *Fusarium* sp. em plantas de feijão-fava, a fim de confirmar a etiologia da podridão vermelha de raiz e, a avaliação de dois métodos de inoculação artificial do patógeno.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos isolados

Plantas de feijão-fava exibindo sintomas de murcha foram coletadas e levadas ao laboratório, onde fragmentos de raízes e caule foram desinfestados superficialmente com etanol 70 %, hipoclorito de sódio 2 %, lavados duas vezes com água destilada e esterilizada (ADE). Os fragmentos foram plaqueados em meio BDA (batata-dextrose-agar). As amostras foram incubadas em câmara incubadora a 25 ± 2 °C por sete dias, período no qual o crescimento e as características do fungo foram verificados diariamente. Dois isolados foram obtidos a partir de raízes com

sintomas de podridão, MPM 134, proveniente do município de Tanque, Piauí, e EMJS 12 da cidade de Teresina, Piauí. Os isolados foram identificados conforme morfologia, preservados em microtubos e depositados na Coleção Micológica Maria Menezes da Universidade Federal Rural de Recife.

2.2 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica foi adaptada de Aoki et al. (2003). Os isolados foram incubados em placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio BDA e em placas com meio “Synthetic Nutrient Deficient Agar” (SNA) contendo folhas de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.). As placas foram incubadas em câmara incubadora a 25 ± 2 °C, sendo utilizadas cinco repetições para cada tratamento. A determinação do crescimento micelial foi avaliada em meio BDA, com as placas mantidas no escuro durante quatro dias em câmara incubadora a 25 ± 2 °C e a 37 ± 2 °C. Em seguida foi realizada a medição do diâmetro da colônia com auxílio de régua milimetrada, na ocasião também foram observadas características como cor, odor e aspecto do micélio. As características morfológicas da cultura foram avaliadas em SNA + folha de cravo, 14 dias após o plaqueamento em câmara incubadora, com fotoperíodo de 12 horas. No microscópio óptico foram avaliados tamanho, forma e septação dos conídios, tipos de fiálides, macroconídios, presença de clamidósporos e conidióforos. Para determinação do tamanho e forma dos conídios foram avaliados 50 conídios de cada um dos isolados. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos (isolados) e cinco repetições.

2.3 Caracterização molecular

2.3.1 Extração de DNA e PCR

Os isolados foram cultivados em meio líquido de malte 2 % por três dias, em agitação de 100 rpm sob temperatura ambiente. O micélio fúngico foi purificado e macerado em nitrogênio líquido e o DNA extraído por meio do kit Wizard Genomic DNA Purification Kit® (Promega).

As reações de PCR foram realizadas no termociclador My Cycler™ (BIORAD). Para o gene EF-1 α (Fator de alongação 1- α) foram utilizados os primers

Ef-1 Forward (5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') e Ef-2 Reverse (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') (O'DONNEL et al., 1998); e para segunda maior subunidade da RNA polimerase (RPB2): 5F2 Forward (5'-GGGGWGAYCAGAAGAAGGC-3') e 7cR Reverse (5'-CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT-3') (O'DONNEL et al., 2008). O programa de ciclos para o gene EF-1 α foi de 94 °C por 1 min; 34 ciclos: 94 °C, por 30 s, 62 °C por 45 s; 72 °C por 1 min, 72 °C por 5 min. Para RPB2 a sequência utilizada foi de 94 °C por 90 s; 40 ciclos: 94 °C, por 30 s; 55 °C, por 90 s e 1 ciclo de 68 °C, por 2 min, 68 °C por 5 min. Os produtos da PCR obtidos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1 % corado com GelRed (Biotium) e visualizados com transiluminador. A purificação dos fragmentos amplificados foi feita através do Kit GenElute PCR Clean-up (Sigma-Aldrich). Os fragmentos foram sequenciados pela empresa Macrogen, USA, e os eletroferogramas gerados foram analisados por meio do programa SeqAssem (HEPPERLE, 2004).

2.3.2 Análise filogenética

A análise filogenética foi realizada com base no sequenciamento dos genes EF-1 α e RPB2. As sequências editadas foram comparadas com a base de dados GenBank por meio do programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Alinhamentos múltiplos das sequências foram gerados utilizando-se o programa CLUSTALW implementado pelo programa MEGA v.6.0 (TAMURA et al., 2013). Os alinhamentos foram corrigidos manualmente. A análise foi realizada com o programa MEGA v.6.0 utilizando o método de máxima parcimônia.

2.4 Teste de patogenicidade

Foram avaliados dois métodos de inoculação em plantas de feijão-fava e soja: 1. deposição de discos de micélio na cova de semeadura, 2. técnica do ferimento das raízes e imersão em suspensão de conídios. Os experimentos foram realizados duas vezes: uma no período seco (setembro a novembro de 2015) e outra no período das chuvas (dezembro de 2015 a fevereiro de 2016). As plantas foram mantidas em casa de vegetação até o final dos experimentos.

2.4.1 Método de fermento de raízes e imersão em suspensão de esporos

Sementes de feijão-fava variedade crioula Boca-de-Moça (Acesso UFPI-894) e soja (Embrapa BRS 333) foram desinfestadas em álcool 70 %, hipoclorito de sódio 2 %, enxaguadas em ADE e colocadas para secar em papel toalha, depois semeadas em copos plásticos de 200 mL contendo solo autoclavado por 1 hora a 121 °C por duas vezes. Foi semeada uma semente por copo. A suspensão conidial foi preparada acrescentando-se ADE a placas contendo estruturas dos isolados com 14 dias de crescimento. Os conídios foram separados do micélio por meio de raspagem com alça de Drigalski, a suspensão obtida foi filtrada em gaze estéril e ajustada para a concentração de 1×10^6 conídios mL⁻¹ com auxílio de câmara de Neubauer. Aos 10 dias após a emergência as plantas foram cuidadosamente arrancadas dos copos e tiveram suas raízes lavadas em água destilada e podadas em aproximadamente quatro centímetros, depois foram imersas por cinco minutos na suspensão conidial. As plantas foram replantadas em vasos plásticos com solo, na proporção de 2:1 (solo/substrato vegetal), autoclavado, como descrito previamente. As plantas de feijão-fava foram mantidas em vasos com capacidade para 8 litros de solo e as plantas de soja em vasos com capacidade para 3,8 litros. As plantas foram irrigadas diariamente e avaliadas aos 60 dias após inoculação (DAI), quando foi observada a ausência ou presença de sintomas nas raízes e parte aérea. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com sete vasos com três plantas cada (21 repetições). No tratamento controle as plantas tiveram as raízes imersas somente em ADE.

2.4.2 Método dos discos de micélio

Cinco discos de micélio de 5 mm provenientes da área periférica de culturas puras dos isolados fúngicos com sete dias de crescimento foram depositados nas covas de semeadura em vasos plásticos com capacidade de 8 litros para feijão-fava e 3,8 litros para soja, contendo solo, nas condições descritas anteriormente. As sementes, previamente desinfestadas, foram semeadas sobre os discos, sendo utilizados sete vasos, com três sementes cada (21 repetições). No tratamento controle utilizaram-se discos de meio de cultura BDA, sem o fungo. Como na

metodologia anterior a avaliação foi feita avaliando-se a ausência ou presença de sintomas nas raízes e na parte aérea das plantas aos 60 DAI.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização morfológica

De acordo com as características morfológicas os dois isolados obtidos (MPM134 e EMJS12) foram identificados como pertencentes ao Complexo *Fusarium solani*. Os isolados apresentaram micélio aéreo levemente cotonoso com coloração que variava do branco ao creme, com reverso bronzeado ou amarelado (Figura 1E). Os macroconídios exibiam formato falciforme ou falcado, com septos evidentes e coloração hialina (Figura 1F), alguns alongados, com ápices mais pontiagudos. Ambos os isolados apresentaram monofiálides longas, com conidióforos em falsas cabeças (Figura 1 G, H); os microconídios exibiram formato cilíndrico ou elipsóide com tamanho variado e ápices arredondados, alguns apresentaram formato mais ovalado, todos com coloração hialina (Figura 1I).

Houve variação da quantidade de septos entre os microconídios dos dois isolados (Tabela 1). As espécies do Complexo *F. solani* apresentam grandes variações em meio de cultura, como a forma e tamanho dos macroconídios e microconídios, e abundância ou escassez de microconídios, a pigmentação da cultura etc. (SMITH, 2007). Isolados de *F. falciforme* obtidos de espécies vegetais cultivadas e de solo provenientes da Malásia apresentam coloração que variava do branco ao amarelo, macroconídios com 3 a 4 septos e microconídios com 0 a 1 septo (CHEHRI et al., 2015).

Tabela 1. Características morfológicas de isolados de *Fusarium falciforme* obtidos de feijão-fava no Estado do Piauí. Teresina, 2016

| Isolado | Coloração (frente/verso) ¹ | Macroconídio ^{2,4} | Microconídio ^{2,4} | Septos ^{2,5} | TCM ³ |
|---------|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------|------------------|
| EMJS12 | Branco/amarelado | 21-27,5 x 4-6 | 9-16,9 x 3-5,9 | 3-4 / 0-2 | 12,39 |
| MPM134 | Creme/bronzeado | 17,7-32,8 x 3,5-6 | 9-18,62 x 2-8,78 | 3-4 / 0-1 | 11,98 |

¹Em meio BDA. ²Em meio SNA+folha de cravo aos 14 dias após a incubação a 25 °C.

³Taxa de crescimento micelial em meio SNA, após 96 horas de incubação no escuro a 25 °C. ⁴Comprimento x largura (µm). ⁵Macroconídio / Microconídio.

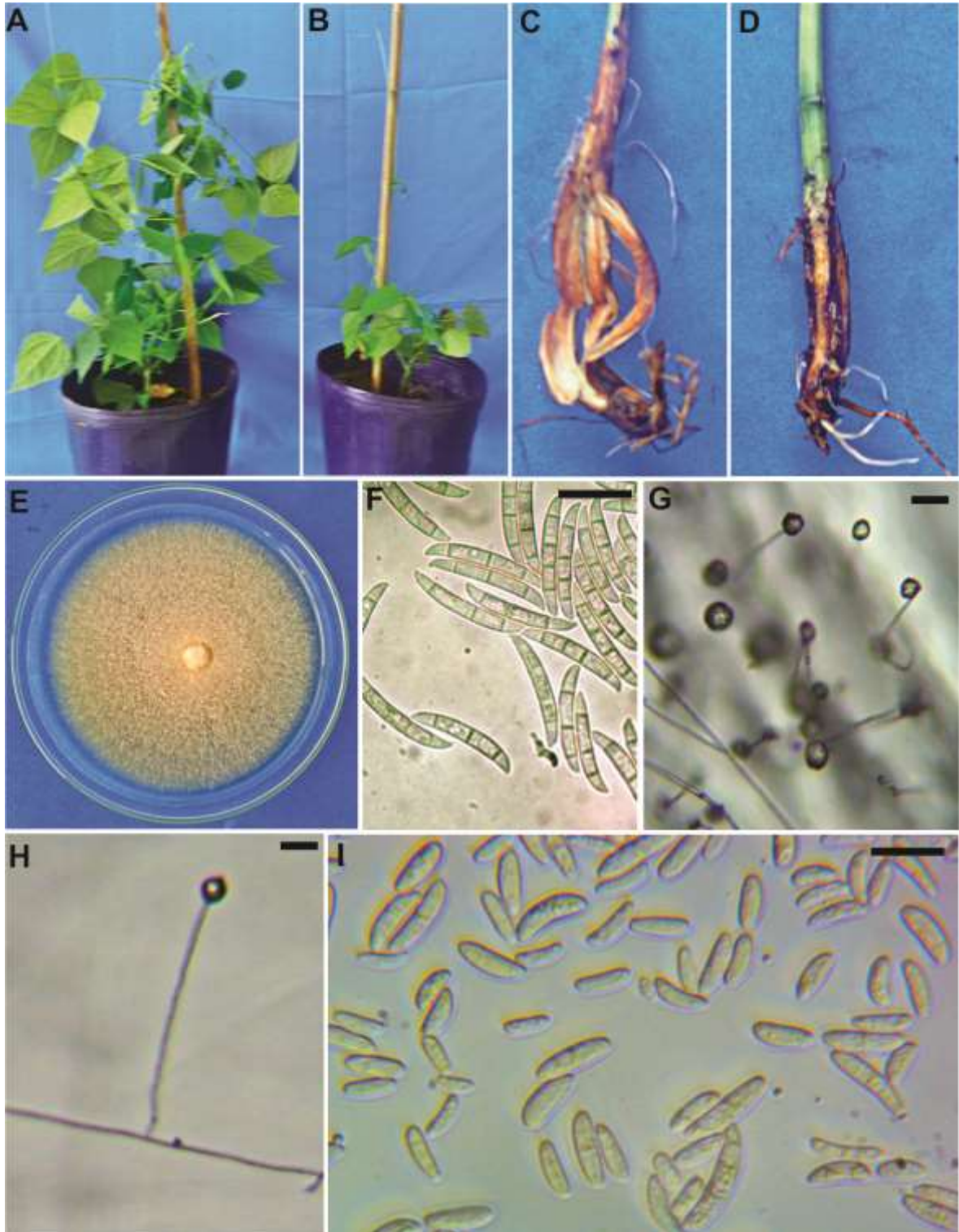


Figura 1. *Fusarium falciforme* em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). (A) Planta não inoculada aos 60 dias após a inoculação (DAI); (B) Planta inoculada aos 60 DAI com forte redução de crescimento; (C) Podridão vermelha da raiz de planta inoculada aos 60 DAI; (D) Podridão de raiz de planta inoculada aos 60 DAI; (E) Aspecto da cultura em meio BDA; (F) Macroconídios em meio SNA + folha de cravo com septos evidentes; (G) Conidióforos em falsas cabeças; (H) Monofiálide longa, característica dos isolados MPM134 e EMJS12; (I) Microconídios em meio SNA + folha de cravo. Barras: F-I: = 40 µm; G-H: = 10 µm.

Os dois isolados produziram grande quantidade de clamidósporos hialinos, uni ou bicelulares, com aspecto liso ou verrugoso (dados não mostrados). Não foi observada a formação de estruturas sexuais. Com relação à taxa de crescimento houve pouca variação entre os isolados, com taxas de crescimento médio de 11,98 mm/dia e 12,39 mm/dia para MPM134 e EMJS12 a 25° C, respectivamente (Tabela 1). Ambos tiveram crescimento superior a 30 mm em quatro dias. Isolados de *F. paranaense* obtidos de soja no Brasil apresentam taxas de crescimento semelhantes (COSTA et al., 2016), assim como isolados de *F. falciforme* obtidos de espécies vegetais cultivadas e de solo provenientes da Malásia, que apresentaram crescimento médio de 30 mm após 4 dias, em meio BDA a 25 °C (CHEHRI et al., 2015). Além disso, os dois isolados deste estudo cresceram a 37 °C, demonstrando a capacidade do fungo em sobreviver e desenvolver a temperatura média do corpo humano. Esta característica já foi relatada para isolados pertencentes ao clado 3 do FSSC obtidos de soja (CHITRAMPALAM; NELSON JR., 2016), e também para isolados do clado 1, que foram capazes de crescer e esporular a 37 °C, além de mostrarem-se patogênicos a curcubitáceas (MEHL; EPSTEIN, 2007).

3.2 Análise molecular

Os isolados EMJS12 e MPM134 mantiveram-se próximos filogeneticamente (94 % bootstrap), formando um grupo monofilético (100 % bootstrap) com isolados de *F. falciforme* obtidos de humanos imunodeprimidos (Figura 2). *F. falciforme* é comumente relacionado a infecções oportunistas em humanos imunodeprimidos, além de ser comumente isolado de solo em diversos países (ZHANG et al., 2006; NALIM et al., 2011). *F. falciforme* é considerado uma espécie filogeneticamente relacionada à *F. paranaense*, espécie patogênica à soja no Brasil (COSTA et al., 2016). O clado 3 compreende a maioria das espécies do FSSC conhecidas, entre elas espécies obtidas a partir de amostras de solo, fitopatógenos e as espécies de importância clínica identificadas (ZHANG et al., 2006).

A análise de diferentes genes têm se mostrado uma ferramenta eficaz na identificação de espécies pertencentes ao FSSC, entre eles os genes ITS, RPB2, EF-1, são amplamente utilizados, de forma individual ou combinada, sendo a análise multigênica mais utilizada na identificação de espécies filogenéticas dentro do FSSC (AOKI et al., 2003; CHEHRI et al., 2014; COSTA et al., 2016; O`DONNELL et al.,

2008). Neste estudo, como em outros já citados, o uso dos genes EF-1 α e RPB2 foram eficientes na identificação de *F. falciforme*, formando um grupo distinto na árvore filogenética, agrupando com isolados de referência com elevado suporte de bootstrap (100 %) (Figura 2).

Os dois isolados foram patogênicos ao feijão-fava. Considerando os dois experimentos (42 plantas inoculadas por método), apenas duas plantas inoculadas pelo método do disco de micélio apresentaram sintomas. Por outro lado, todas as 42 plantas de feijão-fava inoculadas pelo método de ferimentos de raiz apresentaram sintomas evidentes de podridão de raiz (Figura 1 C, D). Este resultado corrobora aqueles obtidos por Melgar; Roy (1994) e Roy (1997), onde *F. solani* só foi capaz de infectar plantas de *P. lunatus* através da inoculação por ferimento com palito infestado. Esses resultados sugerem que o feijão-fava parece ser hospedeiro menos suscetível a *Fusarium* spp., pois métodos agressivos de inoculação são necessários para que o processo de infecção ocorra.

Nas plantas de feijão-fava inoculadas pelo método de ferimento de raízes a podridão foi caracterizada por coloração negra e diminuição do desenvolvimento da raiz; as raízes principais e secundárias apresentaram necrose, com desenvolvimento comprometido, as plantas também exibiram estrias longitudinais amarronzadas na região do colo (Figura 1D). O corte da raiz exibiu tecidos com colação entre vermelho e marrom, com córtex de cor creme (Figura 1C). O único sintoma reflexo observado foi o subdesenvolvimento (Figura 1B). Nenhum sintoma foi notado nas plantas de soja inoculadas.

No presente estudo ambos os isolados de *F. falciforme* foram reisolados a partir de fragmentos de raiz de todas as plantas de feijão-fava e soja inoculadas, mesmo das plantas assintomáticas. O feijão-fava parece se comportar como hospedeiro "reservatório" ou hospedeiro alternativo de espécies de *Fusarium*. *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* foi recuperado de tecidos internos da raiz de feijão-fava colonizadas pelo fungo, de forma assintomática (DINGRA; COELHO NETO, 2001). Logo o uso do feijão-fava para adubação verde em regiões com histórico de ocorrência de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* não é indicado, pois a cultura poderia funcionar como fonte de inóculo do patógeno.

Foi possível observar a colonização de *F. falciforme* nas raízes de soja deste estudo, através de seu reisolamento. Essa característica precisa ser melhor avaliada

em campo, para uma possível definição do papel de *F. falciforme* na cultura do feijão-fava e da soja.

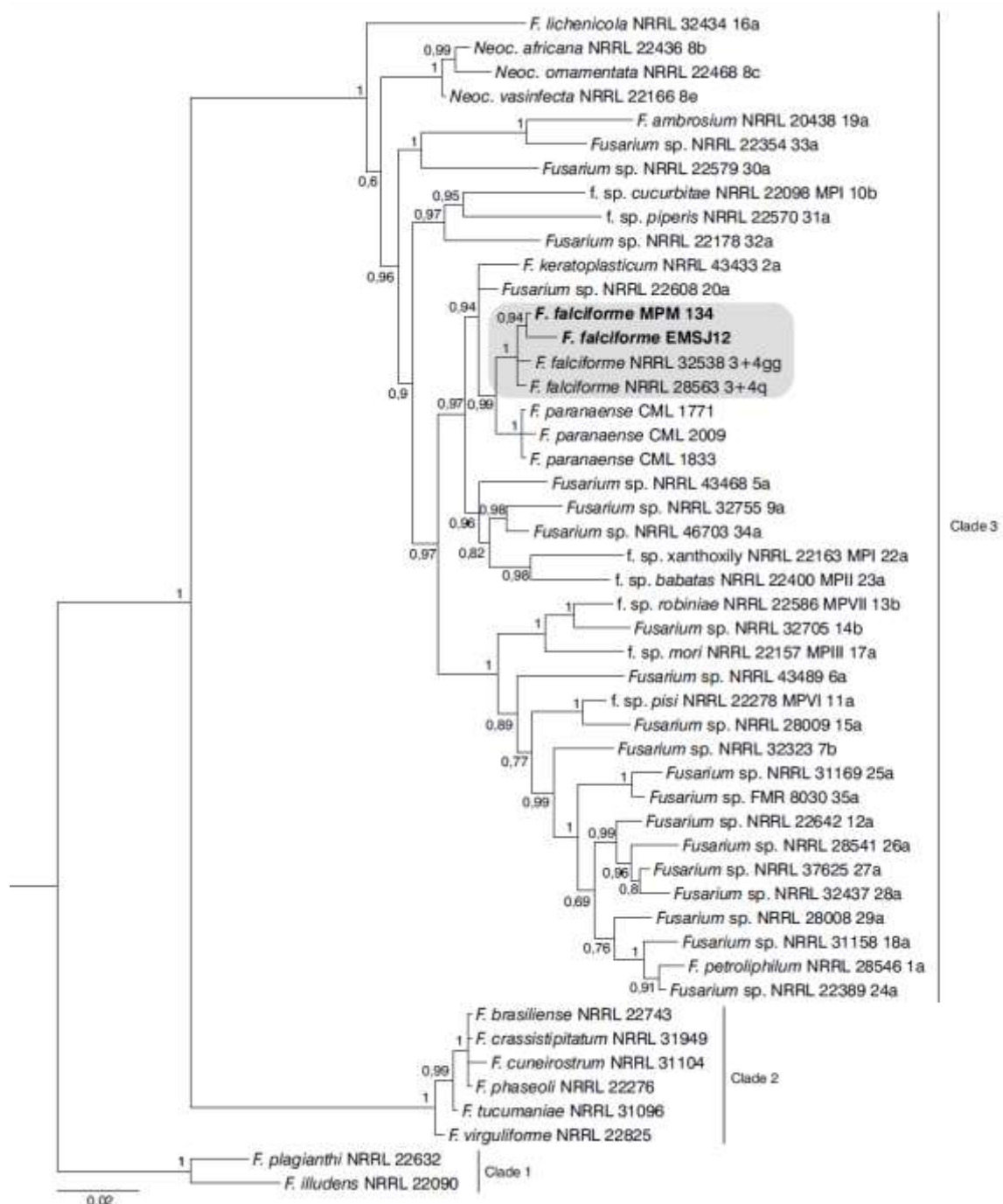


Figura 2. Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica dos genes EF-1 α e RPB2 de isolados de *Fusarium falciforme* de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). A árvore foi construída usando o método da máxima parcimônia. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore, e os valores de bootstrap (1000 repetições) são indicados acima dos internódios. *Fusarium plagianthi* e *F. illudens* foram usados como outgroups.

3.3 Teste de patogenicidade

Não foram detectados sintomas foliares de clorose ou amarelecimento, enquanto a murcha foi um sintoma pouco presente nas plantas de feijão-fava, principalmente no experimento realizado no período seco. O surgimento de sintomas foliares não é condição sempre presente em plantas inoculadas com *Fusarium* spp. Costa et al. (2016) não detectaram sintomas foliares em plantas de soja inoculadas com 49 isolados de espécies do FSSC. Sintomas foliares também não foram detectados por Roy (1997) em plantas inoculadas com *F. solani* f. sp. *phaseoli*. Os mecanismos de diferenciação genética e preferência de hospedeiros destas espécies precisam ser melhor estudadas, haja vista a não patogenicidade dos isolados de *F. falciforme* a soja neste estudo.

Para nosso conhecimento, este é o primeiro relato de *F. falciforme* causando podridão de raiz em feijão-fava no Brasil.

4 CONCLUSÕES

Os dois isolados de *F. falciforme* foram patogênicos ao feijão-fava, induzindo sintomas de podridão de raiz.

O método de inoculação utilizando ferimento de raízes foi eficiente na inoculação artificial de isolados de *F. falciforme* em feijão-fava.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOKI, T.; O'DONNELL, K.; HOMMA, Y.; LATTANZI, A. R. Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex - *F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. **Mycologia**, v. 95, n. 4, p. 660-684, 2003.
- AOKI, T.; O'DONNELL, K.; SCANDIANI, M. M. Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae* and *F. virguliforme*. **Mycoscience**, v. 46, n. 3, p. 162-183, 2005.
- AOKI, T.; TANAKA, F.; SUGA, H.; HYAKUMACHI, M.; SCANDIANI, M. M.; O'DONNELL, K. *Fusarium azukicola* sp. nov., an exotic azuki bean root-rot pathogen in Hokkaido, Japan. **Mycologia**, v. 104, n. 5, p. 1068-1084, 2012.
- BILGI, V. N.; BRADLEY, C. A.; MATHEW, F. M.; ALI, S.; RASMUSSEN, J. B. Root rot of dry edible bean caused by *Fusarium graminearum*. Online. **Plant Health Progress**, v. 10, p.1094, 2011.
- CABRAL, C. S.; MELO, M. P.; FONSECA, M. E. N.; BOITEUX, L. S.; REIS, A. A root rot of chickpea caused by isolates of the *Fusarium solani* Species Complex in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, n. 10, p2171, 2016.
- CARVALHO, E. M. S.; BESERRA JR.; J. E. A. ; BARGUIL, B. M. Lima bean diseases In: LOPES, A. C. A.; GOMES, R.L.F.; ARAÚJO, A.S.F. (Org.). **Phaseolus lunatus: diversity, growth and production**. Nova Science Publishers, New York, p. 113-134, 2015.
- CHEHRI, K.; SALLEH, B.; ZAKARIA, L. Morphological and phylogenetic analysis of *Fusarium solani* species complex in Malaysia. **Microbial Ecology**, v. 69, n. 3, p. 457-471, 2015.
- CHEHRI, K. First report on *Fusarium virguliforme* in Persian Gulf Beach soils. **Journal of Mycology Research**, v. 2, n. 2, p. 55-61, 2015.
- CHITRAMPALAM, P.; NELSON JR., B. Multilocus phylogeny reveals an association of agriculturally important *Fusarium solani* species complex (FSSC) 11, and clinically important FSSC 5 and FSSC 3+ 4 with soybean roots in the north central United States. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 109, n. 2, p. 335-347, 2016.
- COSTA, S. S.; MATOS, K. S.; TESSMANN, D. J.; SEIXAS, C. D. S.; PFENNING, L. H. *Fusarium paranaense* sp. nov., a member of the *Fusarium solani* species complex causes root rot on soybean in Brazil. **Fungal Biology**, v. 120, n. 1, p. 51-60, 2016.
- DHINGRA, O. D.; COELHO NETO, R. A. Reservoir and non-reservoir hosts of bean-wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Journal of Phytopathology**, v. 149, n. 7-8, p. 463-467, 2001.

GOMES, R. L. F.; SOARES, C. A.; GÂNDARA, F. C.; BURLE, M. L. Aspects of crop and socioeconomic management of the Lima bean within Northeastern Brazil. In: FERREIRA, A. S. A.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F. (Org.). ***Phaseolus lunatus: Diversity, Growth and Production***. New York: Nova Science Publishers, v. 1, p. 135-151. 2015.

HEPPERLE, D. **A sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences**. Win32-Version, 2004. Disponível em: <<http://www.sequentix.de>>. Acesso em 04 Abr. 2016.

MELGAR, J.; ROY, K. W. Soybean sudden death syndrome: cultivar reactions to inoculation in a controlled environment and host range and virulence of casual agent. **Plant Disease**, v. 78, n. 3, p. 265-268, 1994.

MEHL, H. L.; EPSTEIN, L. *Fusarium solani* species complex isolates conspecific with *Fusarium solani* f. sp. cucurbitae race 2 from naturally infected human and plant tissue and environmental sources are equally virulent on plants, grow at 37 C and are interfertile. **Environmental microbiology**, v. 9, n. 9, p. 2189-2199, 2007.

NALIM, F. A.; SAMUELS, G. J.; WIJESUNDERA, R. L.; GEISER, D. M. New species from the *Fusarium solani* species complex derived from perithecia and soil in the Old World tropics. **Mycologia**, v. 103, n. 6, p. 1302-1330, 2011.

O'DONNELL, K.; KISTLER, H. C.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R.C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 5, p. 2044-2049, 1998.

O'DONNELL, K.; SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A.; MCCARTHY, D.; RINALDI, M. G.; BRANDT, M. E.; ZHANG, N.; GEISER, D. M. 2008. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2477-2490, 2008.

ROY, K. W. *Fusarium solani* on soybean roots: Nomenclature of the casual agent of sudden death syndrome and identity and relevance of *F. solani* form B. **Plant Disease**, v. 81, n. 3, p. 259-266, 1997.

SMITH, S. N. An overview of ecological and habitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. **Plant Pathology Bulletin**, v. 16, n. 3, p. 97-120, 2007.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

WESTPHAL, A.; ABNEY, T. S.; XING, L.; SHANER, G. E. Síndrome de la muerte súbita de la soja. Trans. Silvina L. Giammaria. **The Plant Health Instructor**, 2008. <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/SuddenDeathEsp.aspx>> Acesso em: 02 Abr. 2016

ZHANG, N.; O'DONNELL, K.; SUTTON, D.A.; NALIM, F.A.; SUMMERBELL, R.C.; PADHYE, A.A.; GEISER, D.M. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2186-2190, 2006.

CAPÍTULO 3

***Colletotrichum cliviae* e *Colletotrichum fructicola*: Novos agentes etiológicos da antracnose do feijão-fava no Brasil**

RESUMO

O feijão-fava é uma leguminosa cultivada por pequenos agricultores principalmente na região Nordeste do Brasil. A antracnose é uma doença amplamente distribuída nessa região e capaz de comprometer a produção de grãos de feijão-fava. Durante o primeiro semestre de 2015, no município de Teresina, Piauí, Brasil, foram observadas plantas de feijão-fava com sintomas de manchas foliares. O objetivo deste estudo foi determinar o agente causal da antracnose em feijão-fava. Baseado nos caracteres morfológicos e na análise multilocus dos genes GAPDH, ACT, ITS e β -Tub, dois isolados fúngicos foram identificados como *Colletotrichum cliviae* e *Colletotrichum fructicola*. A ocorrência da fase teleomórfica de *C. cliviae* foi confirmada pela formação de peritécios e ascósporos. Os isolados foram patogênicos a feijão-fava, que exibiu os mesmos sintomas observados em campo. Os postulados de Koch foram completados após reisolamento dos isolados. Este é o primeiro relato de antracnose em feijão-fava no Brasil causada por *C. cliviae* e *C. fructicola*.

Palavras-chave: Filogenia molecular, *Phaseolus lunatus* L., mancha foliar, análise multilocus.

***Colletotrichum cliviae* and *Colletotrichum fructicola*: New etiological agents of
lima bean anthracnose in Brazil**

ABSTRACT

The lima bean is a legume cultivated by small farmers mainly in the Northeast region of Brazil. Anthracnose, caused by *Colletotrichum truncatum*, is a widely distributed disease in this region and could affect the production of lima beans. During the first half of 2015 in the city of Teresina, Piauí, Brazil, we could observe lima bean plants with symptoms of leaf spot. The purpose of this study was to determine the causal agent of distinct anthracnose in lima bean. Based on morphological characters and multilocus analysis of "housekeeping" GAPDH, ACT, ITS and β -Tub genes, two fungal isolates were identified as *Colletotrichum cliviae* and *Colletotrichum fructicola*. The occurrence of teleomorphic stage in *C. cliviae* was confirmed by the formation of perithecia and ascospores. The isolates were pathogenic to lima bean, which exhibited the same symptoms observed in the field. Koch's postulates were completed after the reisolation of the isolated. This is the first report of anthracnose caused *C. cliviae* and *C. fructicola* in lima bean in Brazil.

Keywords: Molecular phylogeny, *Phaseolus lunatus* L., leaf spot, multilocus analysis.

1 INTRODUÇÃO

Fungos do gênero *Colletotrichum* estão amplamente distribuídos em regiões tropicais e subtropicais e podem causar doenças em uma grande variedade de plantas lenhosas e herbáceas (CANNON et al., 2012). A antracnose do feijão-fava é uma doença facilmente encontrada nos campos produtores no Brasil, especialmente na região Nordeste. Embora não existam estimativas de perda, sabe-se que a doença provoca danos consideráveis a cultura (CARVALHO et al., 2015). Seu agente etiológico, *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus & Moore, é descrito como um importante patógeno responsável por causar severas doenças em leguminosas e solanáceas, além de reduzir a germinação e a viabilidade de sementes (BEGUM et al., 2008).

Fungos do gênero *Colletotrichum* têm sido organizados filogeneticamente em clados ou complexos; atualmente sabe-se da existência de nove grandes clados, mais há algumas espécies que não foram alocadas a nenhum dos clados conhecidos (CANNON et al., 2012). O Complexo *Colletotrichum gloeosporioides* é considerado um dos maiores clados do gênero; seus representantes infectam espécies vegetais agronomicamente importantes como frutíferas, leguminosas e cereais (CANNON et al., 2012; HYDE et al., 2009; WEIR et al., 2012). O avanço das pesquisas e análises multigênicas associados a estudos morfológicos tem revelado novos agentes etiológicos de doenças antes atribuídas a *C. gloeosporioides* (WEIR et al., 2012) e novas espécies são descritas associadas a plantas de várias famílias botânicas pelo mundo (ROJAS et al., 2010; YANG et al., 2012).

Diferentes doenças têm sido descritas para o feijão-fava, porém o conhecimento de patógenos associados à cultura no Brasil ainda é limitado. A identificação de doenças e seus respectivos agentes etiológicos, e estimativas de perdas relacionadas a estas são informações que subsidiarão a expansão de seu cultivo (CARVALHO et al., 2015). Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo identificar o agente causal das manchas foliares em feijão-fava pela avaliação das características morfológicas e filogenéticas do(s) patógeno(s), e pelo teste de patogenicidade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos isolados

As plantas foram coletadas durante visitas técnicas a áreas experimentais da Universidade Federal do Piauí na cidade de Teresina-Piauí, Brasil, durante o primeiro semestre de 2015. As plantas sintomáticas foram levadas ao laboratório, onde fragmentos de folhas, pecíolos e caules foram desinfestados em etanol 70 % e hipoclorito de sódio 2 %, ambos por um minuto, seguido de dois enxágues em água destilada e autoclavada (ADE) por um minuto.

2.2 Avaliação da taxa de crescimento micelial

Discos de 5 mm de meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) sintético, contendo estruturas do fungo, foram retirados da área periférica das colônias com sete dias de crescimento e transferidos para placas de Petri de 90 mm com BDA e incubadas em câmara a 25 ± 2 °C. A medição do crescimento das colônias foi feita com o uso de régua milimetrada a cada 24 horas, medindo-se o diâmetro da colônia, em dois sentidos perpendiculares entre si. As medições foram feitas até que o fungo atingisse a borda da placa. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com dois tratamentos (dois isolados) e cinco repetições.

2.3 Caracterização morfológica

Foram avaliados a coloração e o aspecto do micélio, além da cor, tamanho e formato das estruturas reprodutivas. As culturas foram mantidas em meio BDA sob fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25 ± 2 °C durante sete dias. Para obtenção dos esporos, 10 mL de água destilada foram adicionada às placas contendo o patógeno, realizando-se raspagem com alça de Drigalski, e a suspensão filtrada em camada dupla de gaze esterilizada. Uma gota da suspensão obtida foi aplicada sobre lâmina de microscopia e analisada em microscópio ótico equipado com câmera fotográfica.

2.4 Caracterização molecular

O DNA dos isolados foi extraído utilizando Wizard Genomic DNA Purification Kit® (Promega, Madison, WI, USA). As reações de PCR para a região ITS (Internal Transcribed Spacer) e para os genes GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), ACT (Actin) e β -Tub (β -Tubulin), foram realizadas utilizando o kit GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, Madison, WI, USA). Foram utilizados os *primers* ITS1 e ITS4 para a região ITS (WHITE et al., 1990), e para os genes GAPDH, ACT e β -Tub foram usados os *primers* GDF1 e GDR1 (GUERBER et al., 2003), ACT-512F e ACT783R (CARBONE; KOHN, 1999), e T1 e Bt2b (O'DONNELL; CIGELNIK, 1997; GLASS; DONALDSON, 1995) respectivamente. As condições de PCR foram: desnaturação inicial a 94 °C durante 30 s, hibridação a 54 °C durante 1 min e extensão a 54 °C durante 1 min, seguido por uma extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram analisados em géis de agarose a 2 % após coloração com GelRed™ (Biotium Inc., CA, EUA). Os fragmentos gênicos foram sequenciados, nas direções senso e antisenso, pela empresa MacroGen, USA.

As sequências editadas foram comparadas com a base de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information – NCBI, por meio do programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>). Alinhamentos múltiplos das sequências foram gerados utilizando-se o programa CLUSTALW implementado pelo programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). Os alinhamentos foram ajustados manualmente. A análise foi realizada com o programa MEGA 6.0 utilizando o método de máxima verossimilhança.

2.5 Teste de patogenicidade

Para avaliação da patogenicidade, os isolados EMJS 08 e ESS 09, ambos de Teresina-Piauí, foram inoculados em plantas de feijão-fava, variedade crioula Boca-de-Moça (Acesso UFPI-894). Ao todo 21 plantas foram cultivadas em copos plásticos de 300 mL contendo substrato formado pela mistura de solo/palha vegetal na proporção de 2:1, sendo semeada uma semente por copo. Sete plantas foram inoculadas com cada isolado fúngico, enquanto outras sete plantas foram usadas como testemunhas.

O inóculo foi preparado adicionando-se 10 mL de água destilada esterilizada, acrescida de Tween 20 às placas de cada isolado cultivado em meio BDA, seguindo-se de raspagem com auxílio de alça de Drigalski e filtragem da suspensão em camada dupla de gaze estéril. As concentrações dos esporos foram ajustadas com auxílio de câmara de Neubauer e a suspensão final obtida na concentração de 1×10^5 esporos mL^{-1} . As plantas foram inoculadas aos 10 dias após a emergência (DAE), através da pulverização da suspensão de esporos nas superfícies superior e inferior das folhas até o ponto de escorrimento. As testemunhas foram pulverizadas apenas com água destilada. Após a inoculação as plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas, utilizando sacos plásticos, os quais foram retirados e as plantas mantidas em ambiente com temperatura controlada a 25 ± 2 °C, onde foram observadas até a morte da primeira planta inoculada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica dos isolados (EMJS08 e ESS09) em meio BDA revelou fungos com micélio aéreo aveludado de coloração cinza claro a cinza escuro e reverso preto (Figura 1B).

Tabela 1. Características morfológicas de representantes do gênero *Colletotrichum* isolados de folhas de plantas de *Phaseolus lunatus* L. Teresina, 2016

| | Coloração ¹ (frente/verso) | Conídios ^{1,3} | TCM ² BDA | Peritécios ¹ |
|---------------|--|--|-------------------------|-------------------------|
| EMJS08 | Cinza claro/preto | 11,18 (9,02-13,33) x 4,44 (3,13-5,75) | 12,8 | Ausente |
| ESS09 | Cinza escuro/preto | - | 12,4 | Presente |

¹Em meio BDA a 25 ± 2 °C. ²Taxa de crescimento micelial em mm/dia. ³Comprimento/largura (μm).

A taxa de crescimento micelial variou pouco entre os isolados (Tabela 1). A taxa de crescimento micelial isoladamente não é um fator de identificação essencial, haja vista a variação de crescimento em diferentes condições ambientais e meios de cultura, além da plasticidade morfofisiológica habitual do gênero *Colletotrichum*, mas

pode constituir informação importante a respeito da variabilidade de espécies do gênero (SERRA et al., 2011).

Os conídios produzidos pelo isolado EMJS08 foram hialinos, asseptados, com formato cilíndrico e ápices arredondados (Figura 1C). Alguns conídios possuíam ápices levemente afilados em uma das extremidades. Quanto ao tamanho, o isolado EMJS08 apresentou conídios de comprimento médio de 11,18 μm (9,02-13,33) e largura de 4,44 μm (3,13-5,75) (Tabela 1). Essas medidas de comprimento são menores que aquelas descritas para espécies do Complexo *C. gloeosporioides*, demonstrando a sua plasticidade morfológica, que muitas vezes torna inviável a identificação de suas espécies através de morfologia (WEIR et al., 2012). Não foi observada a presença de peritécios ou ascósporos neste isolado.

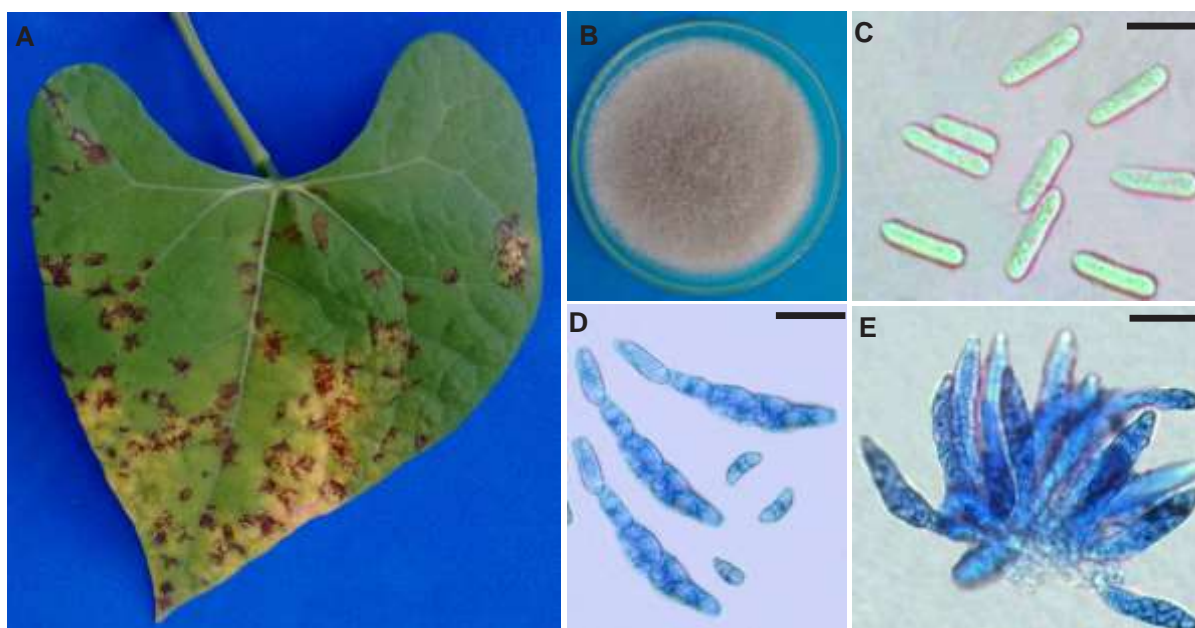


Figura 1. Representantes do gênero *Colletotrichum* em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). (A) Sintomas na superfície adaxial da folha de feijão-fava, com início de amarelecimento; (B) Isolado ESS09 em meio batata-dextrose-agar (BDA); (C) Conídios do isolado EMJS08 em meio BDA; (D) Ascósporos do isolado ESS09 em meio BDA; (E) Conjunto de ascos do isolado ESS09 produzido em meio BDA. Barras: D= 40 μm ; C = 20 μm ; E = 40 μm .

O isolado ESS09 não produziu conídios, o que confirma a ausência da fase assexuada em meio de cultura BDA. Ascósporos e clamidósporos foram produzidos em abundância; os ascósporos apresentaram-se curvados, hialinos, com formação de septo ou ausência do mesmo, com medidas de comprimento entre 7,12-13,41 μm e largura entre 1,81-6,88 μm (Figura 1D). Os clamidósporos foram circulares e de

textura lisa. A formação de peritécios ocorreu após 20 dias de incubação em BDA a 25 ± 2 °C. Os ascos observados continham oito ascósporos. A presença da estrutura sexual indica a formação da fase teleomórfica. A formação de peritécios em meio de cultura é uma característica morfológica distintiva em isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de folhas e frutos de macieira (GONZALEZ et al., 2006). Cerca de 30 espécies de *Colletotrichum* spp. tem formas sexuais descritas, entre elas *C. gloeosporioides* (CANNON et al., 2012).

3.2 Caracterização molecular

O sequenciamento e a análise multilocus de genes concatenados (ITS, GAPDH, ACT e β -Tub) foi eficiente na identificação dos isolados (Figura 2). O isolado EMJS08 foi identificado como *Colletotrichum fructicola* com suporte de bootstrap de 95 %, enquanto o isolado ESS09 foi identificado como *Colletotrichum cliviae* com suporte de bootstrap de 100 %.

Colletotrichum cliviae foi originalmente descrito infectando folhas de *Clivia miniata* na China (YANG et al., 2009), sendo posteriormente associado a diversas famílias botânicas, entre elas destacam-se Orchidaceae (YANG et al., 2011), *Saccharum* spp. e *Phaseolus* spp. (SHARMA et al., 2013). No Brasil, a espécie já foi relatada infectando frutos de manga no estado de Pernambuco (VIEIRA et al., 2014) e causando antracnose na cultura da soja no estado do Tocantins (DIAS, 2014). Filogeneticamente a espécie encontra-se isolada dos grandes clados do gênero, sendo considerada espécie irmã do clado *C. orbiculare* (CANNON et al., 2012). Estudos envolvendo *C. cliviae* ainda são escassos, o que dificulta a compreensão da posição filogenética da espécie.

Isolados de *C. fructicola* foram identificados pela análise dos genes β -Tub e glutamina sintetase (GS) como agentes causais da antracnose do feijão comum e do feijão caupi (ATGHIA et al., 2015).

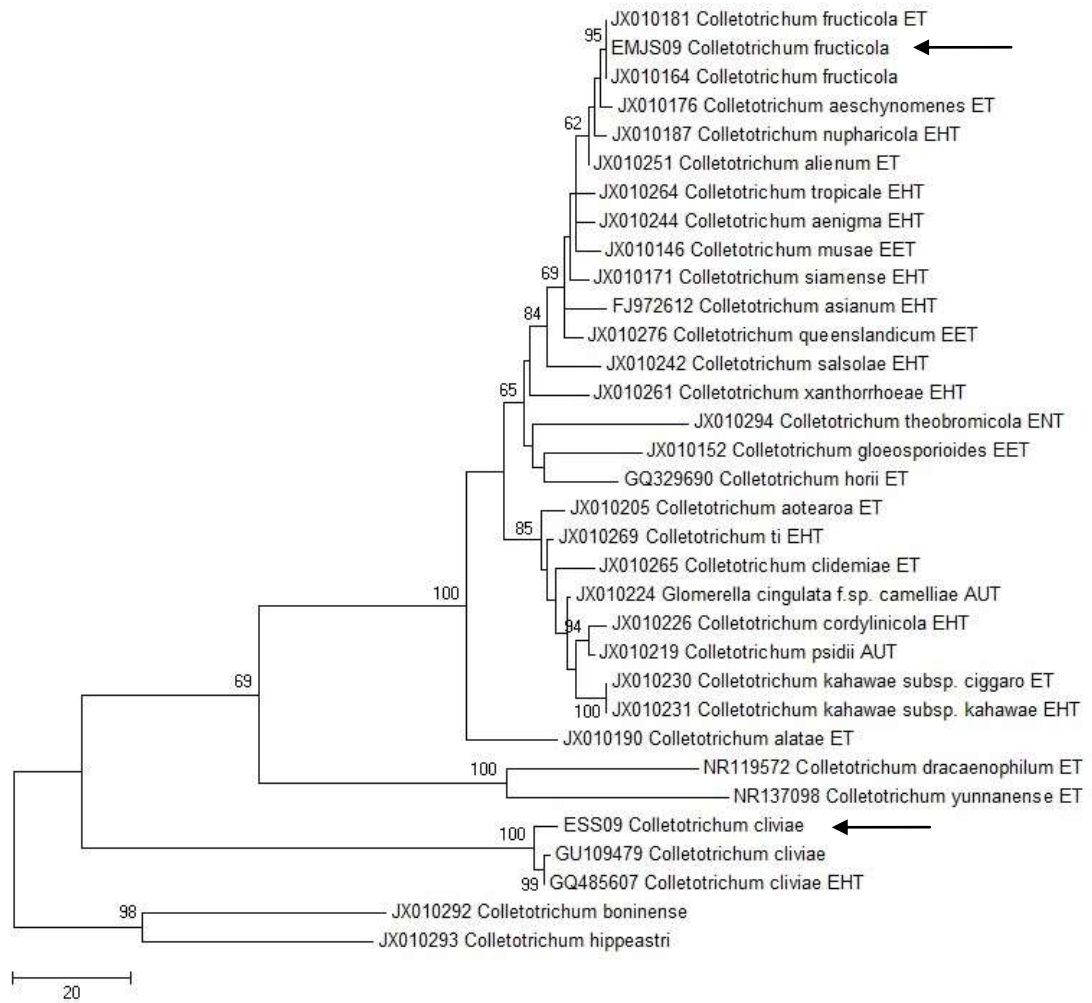


Figura 2. Árvore filogenética construída pelo método da máxima verossimilhança de isolados de *Colletotrichum* obtidos de *Phaseolus lunatus*. A árvore foi construída usando sequências concatenadas dos genes ITS, GAPDH, ACT e β -Tub. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore, e os valores debootstrap (1000 repetições) são indicados acima dos internódios. *Colletotrichum boninense* a *C. hippeastri* foram usadas como outgroups.

3.3 Teste de patogenicidade

Ambos os isolados induziram sintomas de mancha foliar nas plântulas de feijão-fava inoculadas (Figura 1A). Os sintomas foram observados a partir do terceiro dias após a inoculação (DAI), e consistiram em pontos vermelhos inicialmente arredondados na superfície adaxial das folhas, os quais aumentaram de tamanho, tornando-se irregulares com o avanço da doença (Figura 1A). A seguir houve amarelecimento das folhas, com posterior murcha, seca e queda. Algumas folhas ao acaso apresentaram sintomas nas nervuras da superfície abaxial. Lesões avermelhadas também foram encontradas nos pecíolos e caules, sintomas estes

semelhantes àqueles provocados por *C. truncatum* em feijão-fava, porém, na infecção por este fungo, os sintomas são predominantes nas nervuras e as manchas foliares são irregulares ao longo do limbo foliar (PAULA-JÚNIOR et al., 1995).

Apesar de os sintomas de avermelhamento das nervuras serem tipicamente induzidas por *C. truncatum* (CARVALHO et al., 2015), em nenhuma das plantas utilizadas neste estudo *C. truncatum* foi isolado. Aos 10 DAI foi observado amarelecimento e morte das plantas inoculadas. A associação de diferentes espécies de *Colletotrichum* causando a mesma doença em um único hospedeiro parece comum. Em anonáceas, *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. fragariae* e *C. magna* são agentes etiológicos da antracnose no estado de Alagoas (KAMEI et al., 2014). No pimentão (*Capsicum annuum* L.), diversas espécies de *Colletotrichum* são capazes de causar antracnose (THAN et al., 2008).

Este é o primeiro relato de *C. fructicola*, uma espécie representante do Complexo *C. gloeosporioides*, e *C. cliviae* infectando naturalmente *P. lunatus* no Brasil. Estes resultados abrem caminho para a adoção de medidas de manejo e subsidia estudos de avaliação de fontes de resistência e controle químico.

4 CONCLUSÕES

Baseado na análise dos marcadores morfológicos, filogenia e teste de patogenicidade concluímos que *Colletotrichum fructicola* e *Colletotrichum cliviae* são agentes etiológicos da antracnose em feijão-fava no Brasil.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATGHIA, O.; ALIZADEH, A.; FOTOUHIFAR, K. B.; DAMM, U.; STUKENBROCK, E. H.; JAVAN-NIKKHAH, M. First Report of *Colletotrichum fructicola* as the causal agent of Anthracnose on Common Bean and Cowpea. **Mycologia Iranica**, v. 2, n. 2, p.135-136, 2015.
- BEGUM, M. M.; SARIAH, M.; PUTEH, A. B.; ABIDIN, M. Z. Pathogenicity of *Colletotrichum truncatum* and its influence on soybean seed quality. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 10, n. 4, p. 393-398, 2008.
- CANNON, P. F.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U.; WEIR, B. S. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology**, n. 73, p. 181-213, 2012.
- CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, n. 03, p. 553–556, 1999.
- CARVALHO, E. M. S.; BESERRA JR., J. E. A.; BARGUIL, B. M. Lima Bean Diseases. In: FERREIRA, A. S. A.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F. (Org.). **Phaseolus lunatus: Diversity, Growth and Production**. New York: Nova Science Publishers, p. 113-133, 2015.
- DIAS, M. D. **Etiologia, diversidade do agente causal e controle químico da antracnose da soja**. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 128 p., 2014.
- GLASS, N. L.; DONALDSON, G. Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1323-1330, 1995.
- GONZÁLEZ, E.; SUTTON, T. B.; CORRELL, J. C. Clarification of the etiology of *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular, and pathogenicity tests. **Phytopathology**, v. 96, n. 9, p. 982-992, 2006.
- GUERBER, J. C.; LIU, B.; CORRELL, J. C.; JOHNSTON, P. R. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. **Mycologia**, v. 95, p. 872-895, 2003.
- HYDE, K. D.; CAI, L.; CANNON, P. F.; CROUCH, J. A.; CROUS, P. W.; DAMM, U.; GOODWIN, P. H.; CHEN, H. L.; JOHNSTON, P. R.; JONES, E. B. G.; LIU, Z. Y.; MCKENZIE, E. H. C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S. R.; PFENNING, L. H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R. G.; TAN, Y. P.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z. *Colletotrichum* - names in current use. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 1, p. 147–183, 2009.
- HYDE, K. D.; CAI, L.; MCKENZIE, E. H. C.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z.; PRIHASTUTI, H. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, v. 39, n.1, p.1-17, 2009.

- KAMEI, S. H.; COSTA, J. F. O.; NETTO, B. S. M.; ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S. A. Identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose de anonáceas no estado de Alagoas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, 2014.
- O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 7, p. 103-116, 1997.
- PAULA JÚNIOR, T. J.; SILVA, M. B.; VIEIRA, R. F. Doenças causadas por fungos em hortaliças leguminosas. **Informe Agropecuário**, v. 17, n. 182, p. 63-71, 1995.
- ROJAS, E. I.; REHNER, S. A.; SAMUELS, G. J.; VAN BAEL, S. A.; HERRE E. A.; CANNON P.; CHEN, R.; PANG, J. F.; WANG, R. W.; ZHANG, Y. P.; PENG, Y. Q.; SHA, T. *Colletotrichum gloeosporioides* associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: Multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. **Mycologia**, v. 102, n. 6, p. 1318-1338, 2010.
- SERRA, I. M. R. S.; COELHO, R. S. B.; FERRAZ, G. M. G.; MONTARROYOS, A. V. V.; SILVA, D. S. Diversidade fenotípica e patogênica de *Colletotrichum*, agente causal da antracnose em mangueira, e identificação de espécie. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 42-51, 2011.
- SHARMA, G.; PINNAKA, A. K.; SHENOY, B. D. ITS-based diversity of *Colletotrichum* from India. **Current Research in Environmental & Applied Mycology**, v. 3, n. 2, p. 194-220, 2013.
- TAMURA, K., STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S., MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.
- THAN, P. P.; PRIHASTUTI, H.; PHOULIVONG, S.; TAYLOR, P. W.; HYDE, K. D. Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 10, p. 764-778, 2008.
- WEIR, B.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, n.1, p. 115-180, 2012.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S. J. W. T.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SHINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.) PCR Protocols: A guide to methods and applications, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.
- YANG, Y. L.; LIU, Z. Y., CAI, L.; HYDE, K. D.; YU, Z. N.; MCKENZIE, E. H. C. *Colletotrichum* anthracnose of Amaryllidaceae. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 123-146, 2009.
- YANG, Y.; CAI, L.; YU, Z.; LIU, Z. Y.; HYDE, K. D. *Colletotrichum* species on Orchidaceae in southwest China. **Cryptogamie Mycologie**, v. 32, n. 3, p. 229-253, 2011.

YANG, Y.; LIU, Z.; CAI, L.; HYDE, K. D. New species and notes of *Colletotrichum* on daylilies (*Hemerocallis* spp.). **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 3, p. 165-174, 2012.

VIEIRA, W. A.; MICHEREFF, S. J.; de MORAIS JR, M. A.; HYDE, K. D.; CÂMARA, M. P. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, v. 67, n. 1, p. 181-202, 2014.