



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA  
DOUTORADO EM FITOTECNIA

SHAMYRA GEORGIA DE AZEVEDO E SILVA

**ANÁLISE FILOGENÉTICA E REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE MELOEIRO  
À LINHAGENS DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Fusarium solani***

MOSSORÓ

2020

SHAMYRA GEORGIA DE AZEVEDO E SILVA

**ANÁLISE FILOGENÉTICA E REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE MELOEIRO  
À LINHAGENS DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Fusarium solani***

Tese apresentada ao Doutorado em Fitotecnia do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor (a) em Fitotecnia.

Linha de Pesquisa: Proteção de Plantas

Orientador (a): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio

Co-orientador: Prof. Dr. Glauber Henrique de Sousa Nunes

MOSSORÓ

2020

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Biblioteca Central Orlando Teixeira (BCOT)**  
**Sector de Informação e Referência (SIR)**

G586a Georgia de Azevedo e Silva, Shamyra  
ANÁLISE FILOGENÉTICA E REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE  
MELOEIRO À LINHAGENS DO COMPLEXO DE ESPÉCIES  
Fusarium solani / Shamyra Georgia de Azevedo e  
Silva. - 2020.  
56 f. : il.

Orientadora: Márcia Michelle de Queiroz  
Ambrósio.

Coorientador: Glauber Henrique de Sousa Nunes.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural  
do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em  
Fitotecnia, 2020.

1. meloeiro. 2. podridão radicular. 3.  
patogenicidade. 4. filogenia. 5. resistência. I.  
Michelle de Queiroz Ambrósio, Márcia, orient. II.  
Henrique de Sousa Nunes, Glauber, co-orient. III.  
Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

SHAMYRA GEORGIA DE AZEVEDO E SILVA

**ANÁLISE FILOGENÉTICA E REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE MELÃO À  
LINHAGENS DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Fusarium solani***

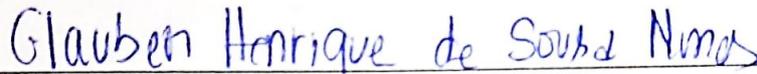
Tese apresentada ao Doutorado em Fitotecnia do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutora em Agronomia: Fitotecnia.

Linha de Pesquisa: Proteção de Plantas

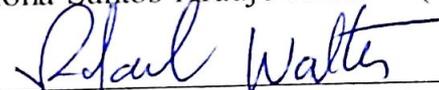
Defendida em: 18/02/2020.

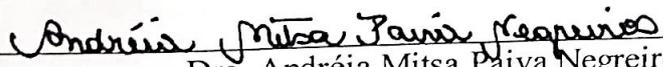
**BANCA EXAMINADORA**

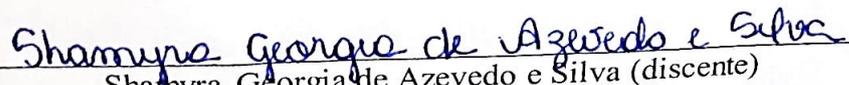
  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio (UFERSA)

  
Prof. Dr. Glauber Henrique de Sousa Nunes (UFERSA)

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Ioná Santos Araújo Holanda (UFERSA)

  
Dr. Rafael Walter (Top Gene)

  
Dra. Andréia Mitsa Paiva Negreiros

  
Shamyra Georgia de Azevedo e Silva (discente)

*A meus pais, por sempre me apoiar, incentivar e guiar meus passos. Pelas aulas de vida que ganhei de quem mais entendia da matéria e pelos sonhos que já realizei, inclusive, os mais loucos e irrealis. Por me fazer crer que tudo é possível, me ensinando a voar de pés no chão. Á vocês todo meu amor, carinho, respeito e gratidão, pois sem vocês nada disso seria possível! Foi por vocês e para vocês!!!*

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

À Deus por nunca me desamparar, agindo diante de minhas orações e meu desespero, pois se não fosse minha fé e os cuidados e a proteção de Deus eu não suportaria a longa e árdua jornada.

À Universidade Federal Rural do Semiárido – UFRSA, por todos os ensinamentos na minha vida acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFRSA, pela oportunidade de acesso ao ensino público de qualidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, pela concessão da bolsa.

A minha orientadora, Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio por ser este exemplo de mulher e profissional, sempre presente, paciente, carinhosa e cuidadosa com seus orientados, inspirando a todos aqueles que estão em sua volta. Obrigada por todo apoio, ensinamentos e incentivos!

Ao meu Coorientador, Glauber Henrique de Sousa Nunes, pelos ensinamentos. Ao Professor Ludwig H. Pffening, e toda equipe do laboratório de Micologia da Universidade Federal de Lavras – UFLA, pela oportunidade de parceria e apoio que me foi dado.

A Ioná Santos Araújo Holanda, professora e ex-orientadora que se tornou amiga, aquela que me aguenta desde a Graduação, quem me ensinou a ser a profissional que sou hoje, exemplo de ética, justiça e profissionalismo, sempre nos ensinando a lutar pelo que acreditamos. A você todo meu respeito, carinho e gratidão!

A todos do Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia, em especial a Louise, Técnica de Laboratório, que se tornou uma grande amiga e confidente, que tanto me ajudou e me ensinou, sempre tão prestativa com todos, modelo de profissional e amiga fiel. Sua ajuda e seus conselhos foram essenciais durante toda essa jornada.

Aos amigos que a Microbiologia me deu: Luan, Geovane, Bruna, Darlan, Isadora, Karol, Gisellya, Uilma, Jarlan, Isabel e todos que fazem parte da equipe do Laboratório de Microbiologia da UFRSA, agradeço pela ajuda, carinho, amizade e atenção.

Á meu querido irmão Godofredo, exemplo de pessoa e profissional que és, pelo amor que sempre dedicou à profissão e que tanto me serviu de inspiração para tentar trilhar uma carreira tão brilhante quanto a sua. Agradeço também a minha cunhada Angelica que sempre me apoiou desde a época da graduação, me amparou e incentivou, aos meus

sobrinhos, Ruan e Amy, pois seu amor, carinho e dedicação são de extrema importância, bem como de toda a família são essenciais, principalmente nos momentos em que fraquejamos. E a Nalva, que de funcionária tornou-se parte integrante da família, minha eterna gratidão e respeito por sempre nos cuidar com tanto carinho.

A meu “querido Jhon”, amigo e companheiro de vida, pela ajuda, incentivo, carinho, respeito e principalmente paciência.

A meus amados pais Geovah e Salete, pelas vezes que mesmo sem saber fui guiada, seguindo os seus sinais e enfrentando meus medos mais brutais, conseguimos enfrentar mais esta batalha, e já passamos por tantas! Não existem adjetivos capazes de expressar o amor, respeito, admiração e gratidão que sinto por vocês por serem meus pais. Á vocês o meu melhor MUITO OBRIGADO!

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação profissional, me ajudando a chegar até aqui.

“ O sucesso não tem a ver com o lugar de onde  
você veio, e sim com a confiança que você tem  
e o esforço que você está disposto a investir. ”

(Michelle Obama).

## RESUMO

O Brasil é o maior produtor mundial de frutas tropicais, e o Rio Grande do Norte se destaca com o melão. No entanto, a produtividade e a qualidade dos frutos são reduzidas devido à podridão radicular causada por *Fusarium*. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivos: (a) caracterizar uma coleção de 31 isolados obtidos de plantas de melão com sintomas de podridão radicular por meio de análise filogenética molecular das regiões EF-1 $\alpha$  + RPB2; (b) verificar a patogenicidade destes isolados para plântulas de melão e (c) avaliar a reação de diferentes genótipos de meloeiro à isolados de *Fusarium solani* provenientes das diferentes regiões produtoras de melão do Nordeste Brasileiro, visando selecionar genótipos com potencial de utilização em programas de melhoramento. No primeiro trabalho, uma coleção de 31 isolados obtidos de plantas de melão com sintomas de podridão radicular foram submetidos a análise filogenética molecular das regiões gênicas EF-1 $\alpha$  e RPB2 e avaliação da patogenicidade em cultivar comercial 'Goldex<sup>®</sup>', utilizando dois diferentes métodos de inoculação (palito de dente e arroz). A análise filogenética da Máxima Parcimônia de EF-1 $\alpha$  + RPB2 mostrou que 29 isolados foram identificados como *F. falciforme* (FSSC 3 + 4), e dois como *Neocosmospora suttoniana* (FSSC 20), ambos descritos pela primeira vez em *Cucurbitaceas*. A avaliação da patogenicidade mostrou que os isolados foram patogênicos em ambas as metodologias. No segundo trabalho, utilizou-se sete isolados pertencentes ao Complexo de Espécies *Fusarium solani*, quatro obtidos de fazendas produtoras da região semiárida do Nordeste Brasileiro, e três foram isolados de abóbora (*Cucurbita* spp.) provenientes de diferentes localidades do Estado de Minas Gerais. Os experimentos para análise da resistência dos genótipos foram realizados utilizando a metodologia do palito de dente, e as avaliações ocorreram aos 60 dias após inoculação. Os resultados de severidade foram avaliados pelos testes de Scott-Knott e a metodologia de modelos mistos REML/BLUP. Os híbridos comerciais Pele de Sapo e Gália demonstraram maior resistência em relação aos demais híbridos, já o Amarelo e Harper foram classificados como suscetíveis para a maioria dos isolados. Entre os acessos, o AC-42 destacou-se como o mais promissor para futuros estudos relacionados ao melhoramento genético, e os acessos FOM-01 e C-14 foram os mais susceptíveis. As análises estatísticas apresentaram precisões elevadas e indicaram variabilidade patogênica entre isolados e genótipos.

**Palavras-chave:** Meloeiro. Podridão radicular. Patogenicidade. Filogenia. Resistência.

## ABSTRACT

Brazil is the world's largest producer of tropical fruits, and Rio Grande do Norte stands out with melons. However, fruit productivity and quality are reduced due to root rot caused by *Fusarium*. Therefore, the present work had as objectives: (a) to characterize a collection of 31 isolates obtained from melon plants with symptoms of root rot through molecular phylogenetic analysis of the EF-1 $\alpha$  + RPB2 regions; (b) to verify the pathogenicity of these isolates for melon seedlings and (c) to evaluate the reaction of different melon genotypes to *Fusarium solani* isolates from different melon producing regions of Northeast Brazil, in order to select genotypes with potential for use in improvement. In the first study, a collection of 31 isolates obtained from melon plants with symptoms of root rot were subjected to molecular phylogenetic analysis of the EF-1 $\alpha$  and RPB2 gene regions and pathogenicity assessment in commercial 'Goldex<sup>®</sup>' cultivar, using two different inoculation methods (toothpick and rice). Phylogenetic analysis of the Maximum Parsimony of EF-1 $\alpha$  + RPB2 showed that 29 isolates were identified as *F. falciforme* (FSSC 3 + 4), and two as *Neocosmospora suttoniana* (FSSC 20), both described for the first time in *Cucurbitaceas*. The evaluation of pathogenicity showed that the isolates were pathogenic in both methodologies. In the second work, seven isolates belonging to the *Fusarium Solani* Species Complex were used, four obtained from farms in the semiarid region of Northeast Brazil, and three were isolated from pumpkin (*Cucurbita* spp.) From different locations in the State of Minas Gerais. The experiments to analyze the resistance of the genotypes were carried out using the toothpick methodology, and the evaluations occurred at 60 days after inoculation. The severity results were evaluated by the Scott-Knott tests and the REML / BLUP mixed model methodology. The commercial hybrids Pele de Sapo and Gália showed greater resistance in relation to the other hybrids, while Amarelo and Harper were classified as susceptible for most isolates. Among the accessions, AC-42 stood out as the most promising for future studies related to genetic improvement, and accessions FOM – 01 and C-14 were the most susceptible. Statistical analyzes showed high precision and indicated pathogenetic variability between isolates and genotypes.

**Keywords:** Muskmelon. Root rot. Pathogenicity. Phylogeny. Resistance.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

- Figura 1** - Sintomas causados por *Fusarium solani* em plantas de melão. A = Sintomas de reboleiras na plantação de meloeiro; B = Podridão radicular no campo causada por *F. solani*; C = Teste de patogenicidade usando o método palito; D = Sistema vascular da planta começando a apodrecer após a inoculação do patógeno..... 28
- Figura 2** - Árvore filogenética Máxima de Parcimônia das espécies do complexo *Fusarium solani*, usando sequências de RPB2. Probabilidades posteriores  $\geq 0,90$  e valores máximos de inicialização de parcimônia  $\geq 70\%$ , 1.000 repetições estão acima dos nós. IC = 0,621, IR = 0,661 na análise de parcimônia máxima. Esta árvore está suportada nas sequências *F. plagianthi* e *F. illudens*. Abreviações: MP-I a MP-VII - *mating populations*; Cepa do tipo T; ET - estirpe do tipo ex; CML - Coleção Micológica de Lavras; NRRL - Northern Regional Research Laboratory; FRC - Centro de Pesquisa *Fusarium*; GJS - Coleção de Gary J. Samuels mantida na coleção USDA-ARS Beltsville..... 29
- Figura 3** - Árvore filogenética de Máxima Parcimônia de espécies do complexo de espécies *Fusarium solani*, usando sequências de EF1- $\alpha$  e RPB2. Esta árvore está suportada nas sequências *F. plagianthi* e *F. illudens*. Valores de *bootstrap* de máxima parcimônia  $\geq 70\%$  das 1000 réplicas e probabilidades posteriores  $\geq 0,90$  e estão acima dos nós. IC = 0,654 e IR = 0,660 na de análise máxima parcimônia. Abreviaturas: MP-I a MP-VII - *mating populations*; CML - Coleção Micológica de Lavras; NRRL - Northern Regional Research Laboratory; Centro de Pesquisa FRC - *Fusarium* Research Center; CBS - Centraalbureau voor Schimmelcultures, Academia Real Holandesa de Artes e Ciências, Holanda..... 30
- Figura 4** - Virulência dos isolados utilizando as metodologias de palito de dente e arroz infestado, com escala de pontuação de 0 (zero) a 5 (cinco). Onde 0 = nenhum sintoma, 1 = menos de 3% do tecido infectado, 2 = 3-10% do tecido infectado, 3 = 11-25% do tecido infectado, 4 = 26-50% do tecido infectado e 5 = mais de 50% do tecido infectado..... 32

### CAPÍTULO 3

- Figura 1** - Figura 1: Inóculos. A = Isolado de *F. solani* colonizando palitos de dente. B = Controle. Palitos de dente não infestados com inóculo. UFERSA, Mossoró/RN, 2019..... 44
- Figura 2** - Figura 2: Genótipos de meloeiro inoculados e separados de acordo com a escala de notas descrita por Ambrósio et al. (2015). A = 0 - assintomático; B = 1 - menos de 3% dos tecidos infectados; C = 2 - 3-10% dos tecidos infectados; E = 4 - 26-50% dos tecidos infectados; F = 5 - mais de 50% dos tecidos infectados. UFERSA, Mossoró/RN, 2019..... 45

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1</b> - Isolados de <i>Fusarium solani</i> obtidos de plantas de <i>Cucumis melo</i> com sintomas de podridão radicular e sequências de referência incluídas neste estudo.....	24
--	----

### CAPÍTULO 3

<b>Tabela 1</b> - Isolados utilizados e suas respectivas linhagens dentro do complexo <i>Fusarium solani</i> .....	43
<b>Tabela 2</b> - Valor de F obtidos conforme análise de variância (ATS) não paramétrica para severidade avaliada em acessos de meloeiro inoculados com <i>Fusarium solani</i> . Mossoró-RN, 2019.....	46
<b>Tabela 3</b> - Rank da severidade média da doença para cada genótipo e isolado do Complexo de Espécies <i>Fusarium solani</i> .....	47
<b>Tabela 4</b> - Estimativa da capacidade geral de combinação (CGC) de acessos de meloeiro e isolados do Complexo de Espécies <i>F. solani</i> .....	49

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>13</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>13</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>20</b>
<b>A PODRIDÃO DE <i>Fusarium</i> EM MELOEIRO É CAUSADA POR DUAS ESPÉCIES DO COMPLEXO DE ESPÉCIES <i>Fusarium solani</i> (FSSC) .....</b>	<b>20</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Isolamento e sequenciamento de DNA.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2 Testes de Patogenicidade.....</b>	<b>27</b>
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>39</b>
<b>AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE MELOEIRO A LINHAGENS DO COMPLEXO <i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.....</b>	<b>39</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
<b>2.1 Área Experimental.....</b>	<b>43</b>
<b>2.2 Germoplasma.....</b>	<b>43</b>
<b>2.3 Isolados e preparação do inóculo.....</b>	<b>43</b>
<b>2.4 Montagem dos experimentos e avaliações.....</b>	<b>44</b>
<b>2.5 Análises Estatísticas.....</b>	<b>45</b>
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
<b>4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>

## CAPÍTULO I

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

O Melão (*Cucumis melo* L.) é uma olerícola de destaque no Brasil, sendo a segunda fruta mais exportada em valor e a primeira em volume, gerando nas últimas safras um total de US\$ 162,9 milhões, o que corresponde a 21,7 % do total das exportações de frutas frescas do Brasil. O Nordeste brasileiro responde por 95,5 % da produção e exportação de melão e os principais produtores são Rio Grande do Norte e o Ceará. Mesmo havendo uma diminuição de área plantada nos últimos anos, a produtividade fechou em torno de 2145 caixas/hectare para 2018/19 (alta de 26 % frente ao mesmo período da safra 2017/18). Os frutos produzidos têm como destino principal os países da Comunidade Europeia (Espanha, Holanda e Reino Unido) (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2019).

As razões do destaque destas regiões, no cultivo desta olerícola, são as condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da cultura como altas temperaturas ( $> 28$  °C média anual), baixa precipitação pluviométrica ( $\approx 600$  mm ano<sup>-1</sup>), a alta luminosidade e a adoção de alta tecnologia pelas empresas produtoras. Mesmo o Nordeste apresentando excelente adaptação às condições edafoclimáticas, inúmeros fatores têm contribuído para a queda da produtividade e da qualidade dos frutos, entre os quais se sobressai a ocorrência de doenças. Estas se constituem como um dos entraves ao desenvolvimento da cultura do melão, pois inibem iniciativas empresariais de produção e de exportação, sendo capaz de prejudicar investimentos que poderiam gerar capital e trabalho (VIANA et al., 2001), destacando-se as doenças causadas por patógenos habitantes do solo, dentre estes, *Fusarium solani* (Mart.) Appel & Wollenw (ANDRADE et al., 2005).

O *F. solani* é o causador de podridões de raiz e do colo em meloeiro, podendo parasitar as plantas desde o seu estágio inicial de desenvolvimento até completar seu ciclo vegetativo. No entanto, o desenvolvimento dos sintomas só é iniciado com a frutificação das plantas, o que sugere que o *stress* da formação do fruto pode ser o fator de desenvolvimento da doença, seguido do declínio de ramos (AL-MAWAALI et al., 2013), com o escurecimento das raízes mais novas, evoluindo para as raízes mais velhas (BEDENDO, 2011), contribuindo para a redução da absorção de água e nutrientes. Por se tratar de um fitopatógeno habitante do solo, possui uma ampla gama de hospedeiros, apresentando estruturas de resistência denominada clamidósporos, capazes de

permanecer viáveis no solo por longos períodos, tornando o controle da doença extremamente difícil de realizar (BRUTON, 1996).

O controle químico é complexo pois não existem produtos específicos registrados na cultura do meloeiro no Brasil com a finalidade de controlar este fitopatógeno (AGROFIT, 2020). O tratamento de solo com produtos químicos envolvia o uso de fumigantes, como o brometo de metila para o controle de patógenos, entretanto, com a restrição no uso deste produto, aumentaram os riscos com patógenos habitantes do solo. No controle biológico de doenças também são escassos os progressos, devido aos poucos antagonistas, que nem sempre são competitivos o suficiente. Com efeito, uma abordagem apropriada é aquela baseada no manejo integrado da doença, caracterizada pela adoção de princípios e medidas visando o patógeno, hospedeiro e ambiente, pela redução ou eliminação do inóculo inicial, redução da taxa de progresso da doença e manipulação do período de tempo em que a cultura permanece exposta ao patógeno em condições de campo (MICHEREFF et al., 2005). A resposta da cultura a patógenos habitantes do solo pode ser influenciada pelo nível de resistência, densidade do inóculo e virulência do patógeno, e pelas condições ambientais (BRUTON, 1998).

Para o estudo e estabelecimento de medidas para o manejo da doença é fundamental a correta identificação do patógeno. Para a caracterização de uma espécie o ideal, além do uso de marcadores morfológicos, é realizar análises de filogenia molecular e testes de patogenicidade, pois corroboram com conceito e permitem a determinação objetiva de agentes etiológicos (COVERT et al., 2007). O fungo *F. solani* era descrito na literatura como o agente etiológico que provoca a podridão do colo em meloeiro baseado em caracteres morfológicos, porém, o conceito de espécies baseado apenas em caracteres morfológicos não reflete a diversidade real de espécies e populações presentes neste grupo, podendo omitir a variabilidade genética das populações, assim como as relações filogenéticas, distribuição geográfica, espécies biológicas e variedade de hospedeiro (O'DONNELL, 2000). Isto reforça a necessidade do uso de ferramentas que sejam capazes de distinguir entre espécies biológicas e filogeneticamente distintas (O'DONNELL, 2000; O'DONNELL et al., 2008).

Conhecimentos gerados nas últimas décadas por meio da filogenia molecular e de conceitos biológicos, permitiram uma definição mais acurada no sistema de identificação das espécies que anteriormente eram descritas apenas como *F. solani* (MATUO; SNYDER, 1973; O'DONNELL, 2000). Análises de filogenia molecular baseadas nas regiões TEF - 1 $\alpha$ , 28S, rDNA e ITS evidenciaram que isolados com características gerais

de *F. solani* formam um complexo de espécies filogeneticamente distintas, agrupadas em três clados principais, algumas delas definidas também como espécies biológicas ou *Mating Population* (MP) (O'DONNELL, 2000; ZHANG et al., 2006; O'DONNELL et al., 2008; NALIM et al., 2011). Desta forma, atualmente, refere-se na literatura a esse grupo de organismos como *Fusarium solani* species complex – FSSC. O conhecimento gerado através da filogenia permitirá uma identificação do patógeno com segurança e confiabilidade, e estabelecer medidas preventivas e fitossanitárias. Procedimentos de melhoramento genético e o eventual desenvolvimento de técnicas moleculares de identificação também dependem dessa caracterização.

Outra alternativa importante no manejo desta doença, é a busca por fontes de resistência em plantas de meloeiro (MICHEREFF et al., 2005; MARTÍNEZ- MEDINA et al., 2014). Esta cultura possui grande diversidade morfológica, em especial em seus frutos, sendo a espécie mais polimórfica do gênero *Cucumis* (LUAN et al., 2010). O pesquisador francês Charles Naudin foi o primeiro a subdividir a grande variação observada em 16 variedades botânicas. O trabalho pioneiro de Naudin em 1859 foi a base para classificações subsequentes (COGNIAUX; HARMS, 1924; FILOV, 1960; WHITAKER; DAVIS, 1962; MUNGER; ROBINSON, 1991; PITRAT et al., 2000).

No patossistema *F. solani* X meloeiro, a diversidade de raças exige a busca contínua de fontes de resistência e há poucos relatos ou trabalhos de resistência genética com *F. solani*, pois os maiores problemas citados na literatura estão relacionados ao *F. oxysporum* f. sp. *melonis* W.C. Snyder & H.N. Hansen, que até o presente momento não foi relatado causando danos em meloeiros produzidos na região Semi-árida do Nordeste. Em um ensaio visando estudar a reação de 20 acessos de meloeiro e dois híbridos comerciais, Santos et al. (2015) verificaram a formação de três grupos de genótipos em função do tamanho das lesões no colo, avaliadas aos 14 dias após a inoculação. Os autores concluíram que acessos do primeiro grupo constituem fontes promissoras de resistência a *F. solani* f. sp. *cucurbitae* raça 1, podendo ser explorados em programas de melhoramento genético do meloeiro visando à resistência a esse patógeno. Considerando a limitação de fontes de resistência ao *F. solani* no Nordeste do Brasil, tornam-se primordiais ações que busquem fontes de resistência. Com a descoberta de fontes de resistência de plantas a patógenos, torna-se importante estudar a herança dessa resistência genética.

O presente trabalho teve como objetivos: (a) caracterizar uma coleção de 31 isolados obtidos de meloeiro com sintomas de podridão radicular por meio de análise

filogenética molecular das regiões EF-1 $\alpha$  + RPB2; (b) verificar a patogenicidade destes isolados em meloeiro e (c) avaliar a reação de diferentes genótipos de meloeiro a isolados de *F. solani* provenientes de cucurbitáceas (melão e abóbora), visando selecionar genótipos com potencial de utilização em programas de melhoramento e/ou manejo integrado da doença ocasionada pelo referido patógeno.

## REFERÊNCIAS

AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. 2020. Disponível em: [http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 10 jan. 2020.

AL-MAWAALI, Q. S.; AL-SADI, A. M.; AL-SAID, F. A.; DEADMAN, M. L. Etiology, development and reaction of muskmelon to vine decline under arid conditions of Oman. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 52, n. 3, p. 457-465, 2013.

ANDRADE, D. E. G. T.; MICHEREFF, S. J.; BIONDI, C. M.; NASCIMENTO, C. W. A.; SALES JÚNIOR, R. Frequência de fungos associados ao colapso do meloeiro e relação com características físicas, químicas e microbiológicas dos solos. **Summa Phytopathologica**, v. 31, n. 4, p. 327-333, 2005.

ANUÁRIO – **Anuário Brasileiro de Fruticultura 2019**. Disponível em: <https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/acessar/completo/anuario-2018-2019.aspx>. Acesso em 15/06/2019.

BEDENDO, I. P. Podridão de raiz e colo. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (org.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, p. 443-449, 2011.

BRUTON, B. D. Crater rot. In: ZITTER, T. A.; HOPKINS, D. L.; THOMAS, C. E. (Eds.). **Compendium of Cucurbit Diseases**. St. Paul: APS Press, p. 49-50, 1996.

BRUTON, B. D. Soilborn diseases in cucurbitaceae: pathogen virulence and host resistance. In: McCREIGHT, J. (Eds.). **Cucurbitaceae 98**. Alexandria: International Society of Horticultural Science, p. 143-166, 1998.

COGNIAUX, A.; HARMS, H. *Cucurbitaceae – Cucurbiteae – Cucumerineae*, p. 116-157. In **Das Pflanzenreich. Regni vegetabilis conspectus** (A. Engler ed.). Vol: 88 (IV.275.II). ilhelm Engelmann, Leipzig (DE). 1924.

COVERT, S.F., AOKI, T., O'DONNELL, K., STARKEY, D., HOLLIDAY, A., GEISER, D. M., et al. Sexual reproduction in soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium tucumaniae*. **Fungal genetics and biology**, v. 44, n. 8, p. 799-807, 2007.

FILOV, A.I. [**The problem of melon systematics**]. Vestnik sel'skochozjajstvennoj nauki, v.1, p. 126-132, 1960.

LUAN, F.; SHENG, Y.; WANG, Y.; STAUB, J.E. Performance of melon hybrids derived from parents of diverse geographic origins. **Euphytica**, v. 173, n. 1, p. 1–16, 2010.

MARTÍNEZ-MEDINA, A.; ALGUACIL, M. D. M.; PASCUAL, J. A.; VAN WEES, S. C. M. Phytohormone Profiles Induced by Trichoderma Isolates Correspond with Their Biocontrol and Plant Growth-Promoting Activity on Melon Plants. **Journal of Chemical Ecology**, v. 40, n. 7, p. 804–815, 2014.

MICHEREFF, S. J.; DOMINGOS, E. G. T.; ANDRADE, M. M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife, PE: UFRPE, 2005.

MUNGER, H. M.; ROBINSON, R. W. Nomenclature of Cucumis melo L. **Cucurbit Genetic Cooperative Report**, v. 14, n. 1, p. 43-44, 1991.

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. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, v. 92, n. 5, p. 919-938, 2000.

O'DONNELL, K.; SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A.; MCCARTHY, D.; RINALDI, M. G.; BRANDT, M. E.; et al. 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.

PITRAT, M.; HANELT, P.; HAMMER, K. Some comments on infraspecific classification of cultivars of melon. **Acta Horticulture**, v. 510, p. 29-36, 2000.

SANTOS, J. D. S.; ANTÔNIO, R. P.; NETO, J. L. S.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; DIAS, R. C. S. Reação de acessos de meloeiro a *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*. In: **X Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semiárido**. Resumo. Petrolina, PE: SOB (CD-ROM), 2015.

VIANA, F. M. P.; SANTOS, M. V. D.; SILVA, M. F. V. **Recomendações para o controle das principais doenças que afetam a cultura do melão na região Nordeste**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001, 6p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Circular Técnica, 12).

WHITAKER, T. W.; DAVIS, G. N. **Cucurbits: botany, cultivation, and utilization**. London: [s.n], 249, 1962.

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 II

### A PODRIDÃO DE *Fusarium* EM MELOEIRO É CAUSADA POR DUAS ESPÉCIES DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Fusarium solani* (FSSC)

Shamyra G.A. Silva<sup>(1)\*</sup>. Aceide M. S. Cardoso<sup>(2)</sup>. Nevenka M. Moura<sup>(2)</sup>. Luan V. Nascimento<sup>(1)</sup>. Glauber H. S. Nunes<sup>(1)</sup>. Ludwig H. Pfenning<sup>(2)</sup>. Márcia M. Q. Ambrósio<sup>(1)</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Agronômicas e Florestais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, 59.625-900 Mossoró, RN, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras – UFLA, 37200-000 Lavras – MG, Brazil.

\*Autor correspondente: Shamyra Georgia de Azevedo e Silva

E-mail: [shamyrageorgia@hotmail.com](mailto:shamyrageorgia@hotmail.com)

#### RESUMO

O estado do Rio Grande do Norte, situado no Nordeste do Semiárido brasileiro, é um dos mais importantes produtores de melão do mundo. No entanto, a produtividade e a qualidade dos frutos estão sendo reduzidos devido à problemas fitossanitários, entre eles, à ocorrência de podridão radicular causada por *Fusarium*. O objetivo deste estudo foi caracterizar uma coleção de 31 isolados fúngicos obtidos de plantas de melão com sintomas de podridão radicular, por marcadores morfológicos e análise filogenética molecular das regiões EF-1 $\alpha$  e RPB2, e verificar a patogenicidade destes isolados para plântulas de melão. Após a coleta dos isolados, procedeu-se a extração e sequenciamento do DNA. Os isolados monospóricos foram submetidos a análise filogenética molecular das regiões gênicas EF-1 $\alpha$  e RPB2 e a avaliação da patogenicidade em cultivar comercial ‘Goldex<sup>®</sup>’, utilizando dois diferentes métodos de inoculação (palito de dente e arroz). A análise filogenética da Máxima Parcimônia de EF-1 $\alpha$  + RPB2 mostrou que 29 isolados foram identificados como *F. falciforme* (FSSC 3 + 4), e dois como *Neocosmospora suttoniana* (FSSC 20). A análise das características morfológicas não evidenciou marcadores distintos para as duas espécies. Nenhum dos isolados estudados pertence às espécies conhecidas de agentes patogênicos associados à cucurbitáceas, *Fusarium petrophilium* (FSSC 1) e *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* “raça 1” (FSSC 10). A avaliação da patogenicidade mostrou que os isolados foram patogênicos em ambas as metodologias. As plantas de meloeiro expressaram os primeiros sintomas 15 dias após a inoculação, onde observou-se amarelecimento da parte aérea, murcha com posterior tombamento, podridão de colo e raízes. Estes isolados podem ser usados para apoiar programas de melhoramento genético, na busca por material vegetal com resistência à podridão de *Fusarium*.

**Palavras chave:** *Cucumis melo* (L.). Doença de plantas. Filogenia. Patogenicidade.

## ABSTRACT

The state of Rio Grande do Norte, located in the Northeast of the Brazilian Semi-Arid, is one of the most important melon producers in the world. However, fruit productivity and quality are being reduced due to phytosanitary problems, among them, the occurrence of root rot caused by *Fusarium*. The aim of this study was to characterize a collection of 31 fungal isolates obtained from melon plants with symptoms of root rot, by morphological markers and molecular phylogenetic analysis of the EF-1 $\alpha$  and RPB2 regions, and to verify the pathogenicity of these isolates for melon seedlings. After collecting the isolates, DNA extraction and sequencing was carried out. The monosporic isolates were submitted to molecular phylogenetic analysis of the EF-1 $\alpha$  and RPB2 gene regions and the pathogenicity assessment in a commercial cultivar 'Goldex ©', using two different inoculation methods (toothpick and rice). Phylogenetic analysis of the Maximum Parsimony of EF-1 $\alpha$  + RPB2 showed that 29 isolates were identified as *F. falciforme* (FSSC 3 + 4), and two as *Neocosmospora suttoniana* (FSSC 20). The analysis of the morphological characteristics did not show distinct markers for the two species. None of the studied isolates belong to the known species of pathogenic agents associated with cucurbits, *Fusarium petroliphium* (FSSC 1) and *Fusarium solani* f.sp. cucurbitae "race 1" (FSSC 10). The evaluation of pathogenicity showed that the isolates were pathogenic in both methodologies. The melon plants expressed the first symptoms 15 days after inoculation, where yellowing of the aerial part was observed, wilting with subsequent tipping, colon rot and roots. These isolates can be used to support genetic improvement programs, in the search for plant material with resistance to *Fusarium* rot.

**Keywords:** *Cucumis melo* (L.). Plant disease. Phylogeny. Pathogenicity.

## 1 INTRODUÇÃO

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma olerícola de grande popularidade no mundo, e o Brasil desponta entre os maiores produtores mundiais. Os estados do Rio Grande do Norte e Ceará se destacam como os maiores produtores, tendo embarcado no ano de 2018, um total de 338,6 e 85,2 mil toneladas, respectivamente (IBGE 2019). Isto fez do melão a segunda fruta mais exportada pelo país em valor, e a primeira em volume, com valores de exportação de US\$ 136 milhões e 197,6 mil toneladas. No Brasil o cultivo concentra-se, sobretudo na região Nordeste, onde os estados do Rio Grande do Norte e Ceará são responsáveis por 95,5 % da produção, destacando-se respectivamente, como primeiro e segundo maiores produtores, embora também haja produção em Pernambuco e na Bahia

(Anuário Brasileiro de Fruticultura 2019). A expansão da área cultivada no Nordeste brasileiro, aliada ao cultivo intensivo e contínuo, sem rotação de culturas, tem contribuído fortemente para o aumento da incidência e severidade de doenças fúngicas, especialmente aquelas provocadas por fitopatógenos habitantes do solo, como por exemplo, o *Fusarium solani* (Mart.) Appel & Wollenw, que causa sintomas de podridão nas raízes, colo, murcha e amarelecimento dos ramos com posterior tombamento das plantas (Andrade et al. 2005). Este patógeno também vem causando prejuízos na pós-colheita, sendo comum à sua ocorrência na região peduncular, em frutos de cucurbitáceas (Mehl; Epstein 2007), inviabilizando a comercialização.

No entanto, embora a doença provocada por *F. solani* em meloeiro proporcione reduções quantitativas e qualitativas na produtividade, constituindo-se em alguns casos como fator limitante à produção (Lima; Costa 2001), não há relato de perdas ocasionadas por este patógeno nesta cultura no Brasil. O controle preventivo é o mais recomendado, visto que, uma vez introduzido no solo, tanto a convivência, quanto a sua erradicação apresentam problemas, pois este fungo pode permanecer ativo no solo durante longos períodos, mesmo na ausência de hospedeiro, utilizando estruturas de resistência chamadas de clamidósporos. Além disso, por se tratar de uma doença que ocorre nas raízes e colo da planta, a diagnose sempre é tardia e o controle com fungicidas nem sempre é viável, e tecnicamente torna-se difícil atingir o alvo biológico.

O *Fusarium solani* complex species (FSSC), trata-se de um complexo diversificado com mais de 60 espécies filogeneticamente distintas, distribuídas em três clados (Zhang et al. 2006; O'Donnell et al. 2008; Nalim et al. 2011). O Clado I é composto por isolados da Nova Zelândia; o Clado II é composto por isolados associados à síndrome da morte súbita da soja (SDS) e à podridão radicular do feijoeiro, provenientes da América do Sul e da Àsia, e o Clado III é formado por patógenos de outras plantas e espécies de importância clínica, encontrados na África, Àsia e América do Sul (O'Donnell 2000). Análises de filogenia molecular e os conceitos biológicos gerados nas últimas décadas permitiram uma definição mais acurada no sistema de identificação de espécies que anteriormente eram descritas apenas como *F. solani* (O'Donnell 2000), evidenciando que a identificação por marcadores morfológicos é insuficiente. O conhecimento gerado através da filogenia molecular permite a identificação do patógeno com maior segurança e confiabilidade. A correta identificação do patógeno é fundamental para o estudo e estabelecimento de medidas para o manejo da doença. É o microrganismo mais frequentemente isolado de solo e detritos vegetais (Zhang et al. 2006), e em plantas

de meloeiro que apresentam sintomas de podridão no sistema radicular, ocorrendo tanto isoladamente, quanto em associação com outros patógenos, como *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, *Monosporascus cannonballus* Pollack et Uecker, *Rhizoctonia solani* Kuhn e *Sclerotium rolfsii* Sacc. (Medeiros et al. 2015; Nascimento et al. 2018).

Desta forma, objetivou-se caracterizar uma coleção de 31 isolados obtidos de plantas de meloeiro com sintomas de podridão radicular por meio de análise filogenética molecular das regiões EF-1 $\alpha$  + RPB2, e verificar a patogenicidade destes isolados em meloeiro.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Isolamento e sequenciamento de DNA

Utilizou-se uma coleção de 31 isolados de *F. solani*, obtidos de meloeiros com sintomas de podridão no sistema radicular, coletadas de 15 fazendas localizadas na maior região produtora do semiárido do Nordeste Brasileiro (Tabela 1) (Figura 1a, 1b). Foram coletados dez isolados em cada fazenda, onde foi realizada uma triagem inicial utilizando caracteres morfológicos, até atingir o número final de 31 isolados.

**Tabela 1.** Isolados de *F. solani* obtidos de *C. melo* com sintomas de podridão radicular e sequências de referência incluídas neste estudo.

Código da Linhagem <sup>a</sup>	Nome da Linhagem <sup>b</sup>	Nome da Espécie	Origem Geográfica	Data de Coleta	Número de Acesso no GenBank	
					RPB2	EF-1 $\alpha$
CML 3916	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	MH709250	
CML 3917	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	MH709251	
CML 3918	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	MH709252	
CML 3919	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	MH709253	
CML 3920	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	MH709254	
CML 3926	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	MH709256	
CML 3927	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	MH709257	
CML 3928	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	MH709258	
CML 3929	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	MH709259	
CML 3938	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	MH709255	
CML 3940	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	MH709265	
CML 3941	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	MH709235	
CML 3943	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	MH709237	MK158920
CML 3944	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	MH709238	MK158926
CML 3950	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	MH709240	

<b>CML 3951</b>	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	<b>MH709241</b>	<b>MK158927</b>
<b>CML 3952</b>	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	<b>MH709242</b>	
<b>CML 3953</b>	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	<b>MH709243</b>	
<b>CML 3954</b>	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	<b>MH709244</b>	
<b>CML 3955</b>	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	<b>MH709245</b>	
<b>CML 3956</b>	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	<b>MH709246</b>	
<b>CML 3957</b>	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	<b>MH709247</b>	
<b>CML 3945</b>	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	<b>MH709260</b>	
<b>CML 3946</b>	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	<b>MH709261</b>	<b>MK158925</b>
<b>CML 3947</b>	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Mossoro RN	2016	<b>MH709262</b>	
<b>CML 3549</b>	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Icapui CE	2013	<b>MH709248</b>	<b>MK158923</b>
<b>CML 3550</b>	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Icapui CE	2013	<b>MH709249</b>	<b>MK158924</b>
<b>CML 3965</b>	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Ipanguacu RN	2016	<b>MH709264</b>	
<b>CML 3967</b>	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Barauna RN	2017	<b>MH709263</b>	<b>MK158928</b>
<b>CML 3942</b>	FSSC 20	<i>N. suttoniana</i>	Mossoro RN	2016	<b>MH709236</b>	<b>MK158921</b>
<b>CML 3958</b>	FSSC 20	<i>N. suttoniana</i>	Mossoro RN	2016	<b>MH709239</b>	<b>MK158922</b>
<b>NRRL 22090</b>	Clade 1	<i>F. illudens</i>	New Zealand	-	JX171601	AF178326
<b>NRRL 22632</b>	Clade 1	<i>F. plagianthi</i>	New Zealand	-	EU329519	AF178354
<b>NRRL 28546</b>	FSSC 1	<i>F. petroliphilum</i>	USA	-	EU329544	DQ246887
<b>FRC S-2477</b>	FSSC 2	<i>F. keratoplasticum</i>	USA	-	JN235897	JN235712
<b>CBS 475.67<sup>T</sup></b>	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	Puerto Rico	-	LT960558	LT906669
<b>NRRL 43441</b>	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	USA	-	DQ790566	DQ790478
<b>NRRL 66304<sup>ET</sup></b>	FSSC 5	<i>F. solani sensu stricto</i>	Slovenia	-	KT313623	KT313611
<b>NRRL 43467</b>	FSSC 8	<i>F. neocosmosporiellum</i>	USA	-	EF469979	EF452940
<b>NRRL 22153</b>	FSSC 10	<i>F. solani</i> f.sp. <i>cucurbitae</i>	Panama	-	EU329492	AF178346
<b>NRRL 22278</b>	FSSC 11	<i>F. solani</i> f.sp. <i>pisi</i>	USA	-	EU329501	AF178337
<b>NRRL 22161</b>	FSSC 13	<i>F. solani</i> f.sp. <i>robiniae</i>	Japan	-	EU329494	AF178330
<b>NRRL 32434</b>	FSSC 16	<i>F. lichenicola</i>	Germany	-	EF470161	DQ246977
<b>NRRL 22157</b>	FSSC 17	<i>F. solani</i> f. sp. <i>mori</i>	Japan	-	EU329493	AF178359
<b>NRRL 20438</b>	FSSC 19	<i>F. ambrosium</i>	India	-	JX171584	AF178332
<b>NRRL 32316</b>	FSSC 20	<i>N. suttoniana</i>	USA	-	EU329574	DQ246944
<b>NRRL 32858<sup>T</sup></b>	FSSC 20	<i>N. suttoniana</i>	USA	-	EU329630	DQ247163
<b>NRRL 20101</b>	FSSC 21	<i>F. striatum</i>	Panama	-	EU329490	AF178333
<b>NRRL 22163</b>	FSSC 22	<i>F. solani</i> f.sp. <i>xanthoxyli</i>	Japan	-	EU329492	AF178328
<b>NRRL 22400</b>	FSSC 23	<i>F. solani</i> f.sp. <i>batatas</i>	USA	-	EU329509	AF178343
<b>NRRL 22354</b>	FSSC 33	<i>F. pseudensiforme</i>	French Guiana	-	EU329504	AF178338
<b>NRRL 54722<sup>T</sup></b>	FSSC 36	<i>Fusarium euwallaceae</i>	Israel	-	JQ038028	JQ038007

<sup>a</sup>CML = Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil. CBS = Instituto de Biodiversidade Fúngica Westerdijk, Utrecht, Holanda. NRRL = Coleções do Serviço de Pesquisa Agrícola,

Peoria, IL, EUA. FRC = Centro de Pesquisa de *Fusarium*, localizado na Universidade Estadual da Pensilvânia, State College, PA, EUA. As estirpes do tipo Ex-type e do Ex-epitipo são indicadas com T e ET, respectivamente. <sup>b</sup>Seguindo a nomenclatura do clado por O'Donnell et al. (2008).

Após a coleta, as plantas foram levadas ao laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Universidade Federal Rural do Semi-árido – UFERSA, onde foram lavadas em água corrente para remover a sujeira do campo e subsequente isolamento do fungo. Esta etapa consiste em remover fragmentos das áreas de caule e raiz das amostras, seguidos de desinfecção em álcool a 70%, hipoclorito de sódio a 1% por 1 minuto e água destilada. O isolamento do patógeno foi realizado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), suplementado com tetraciclina (0,05g/L), sendo incubados em estufa incubadora tipo B.O.D (Biochemical oxygen demand) à  $28 \pm 2$  °C, sob luminosidade contínua. Os isolados que apresentaram características morfológicas de *F. solani* (Leslie; Summerell 2006) foram submetidos a cultivos monospóricos para posterior realização do sequenciamento.

Na etapa de extração do DNA, os isolados foram cultivados em meio líquido à base de extrato de malte 2 % por três dias, em temperatura ambiente e agitação de 100 rpm (Leslie; Summerell 2006). O micélio foi filtrado, macerado em nitrogênio líquido e a extração de DNA foi realizada utilizando o kit Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA *purification* (Promega do Brasil), de acordo com as especificações do fabricante. As concentrações de DNA foram estimadas utilizando-se o aparelho Nanodrop 2000 e, visualmente, em gel de agarose 1,2 % por comparação da intensidade da banda com um marcador de tamanho de fragmentos de 1 Kb (Invitrogen).

Fragmentos da segunda maior subunidade da RNA polimerase (RPB2) foram geradas para 31 isolados, enquanto sequências de codificação do fator de alongação 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) foram geradas para um subconjunto de nove linhagens. Fragmentos da RPB2 foram amplificados utilizando-se os *primers* 5F2 (forward; 5' GGGGWGAYCAGAAGAAGGC-3') e 7cR (reverse; 5' CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT-3') (O'Donnell et al., 2008). As reações de PCR foram realizadas em termociclador My Cycler<sup>™</sup> (BIO-RAD). As condições do ciclo para amplificação da RPB2 foram: 95 °C, durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos: 95 °C por 1 minuto; 58 °C por 2 minutos; 72 °C por 2 minutos; e extensão final à 72 °C por 10 minutos (O'Donnell et al. 2008). Fragmentos de EF-1 $\alpha$  foram amplificados usando os

pares de primers Ef1 e Ef2 (O'Donnell; Cigelnik; Nirenberg 1998). As condições do ciclo para amplificação da EF-1<sup>a</sup> consistiram de desnaturação inicial a 94 °C por 1 minuto, seguido por 5 ciclos: 94 °C – 30 segundos, 55 °C – 45 segundos e 72 °C – 1 minuto, e 29 ciclos: 94 °C – 30 segundos, 62 °C – 45 segundos, 72 °C – 1 minuto e extensão final a 72 °C durante 5 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2 % corados com GelRed (Biotium<sup>®</sup>) e posterior visualização em transluminador. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o kit GenElute PCR Clean-up Kit (Sigma-Aldrich) para serem sequenciados posteriormente.

Os produtos da PCR da região gênica dos isolados do FSSC foram sequenciados e os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente com o auxílio do programa SeqAssem (Hepperle, 2004). Sequências de referência correspondentes ao gene RPB2 previamente depositadas no GenBank foram acrescentadas às análises (O'Donnell et al. 2008) e as sequências editadas foram comparadas com a base de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information – NCBI (2012), por meio da ferramenta BLAST.

Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos foram gerados utilizando a ferramenta CLUSTALW (Thompson; Higgins; Gibson 1994), implementada pelo programa MEGA 6 e os alinhamentos foram corrigidos manualmente. A análise de Máxima Parcimônia foi realizada usando o programa MEGA 6 com um suporte de clado inferido com base em 1000 replicações de *bootstrap* (Tamura et al. 2013). Para a inferência Bayesiana de reconstrução filogenética usou-se o Mr. Bayes 3.2 (Ronquist et al. 2012). Modelos de evolução de sequência para cada partição foram determinados usando MEGA 6 (Tamura et al. 2013). Os seguintes modelos foram implementados nas análises filogenéticas Bayesianas: TN93 + G para EF-1 $\alpha$  + RPB2, K2 + G para RPB2. Um algoritmo Markov Chain Monte Carlo de quatro cadeias foi executado por 2 x 10<sup>4</sup> gerações e amostradas a cada 10 gerações. A maioria das árvores de consenso foram construídas após o descarte de 25 % das árvores iniciais. As árvores filogenéticas foram visualizadas usando o FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Todos os isolados sequenciados estão mantidos na Coleção Micológica de Lavras (CML), no Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) (<http://www.dfp.ufla.br/cml>), pelo método de Castellani, armazenados a 10 °C no escuro e, criopreservados em suspensão de esporos a 15 % de glicerol a -80 °C.

## 2.2 Testes de Patogenicidade

Os experimentos para avaliação da patogenicidade foram realizados em casa de vegetação, localizada no Campus Leste da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), com duas metodologias (palito de dente e arroz infestado) para verificar a virulência de 32 tratamentos (31 isolados e um controle) com cinco repetições. Para verificar a patogenicidade dos isolados pelo método do palito de dente, palitos com 12 mm de comprimento foram inseridos com a ponta afiada voltada para cima, em orifícios feitos em papel de filtro de 90 mm de diâmetro. Os palitos foram colocados em placas de Petri e autoclavados por 30 minutos, por dois dias com intervalos de 24 horas, à 121 °C. Foram adicionados 20 mL de meio cultura BDA (batata-dextrose-ágar) acrescido de sulfato de estreptomicina a cada placa de Petri contendo os palitos. Após a solidificação do meio de cultura, foram repicados cinco discos de micélio (6 mm de diâmetro) dos isolados de *F. solani* e em seguida incubadas à  $28 \pm 2$  °C no escuro, por aproximadamente 15 dias (Ambrósio et al. 2015).

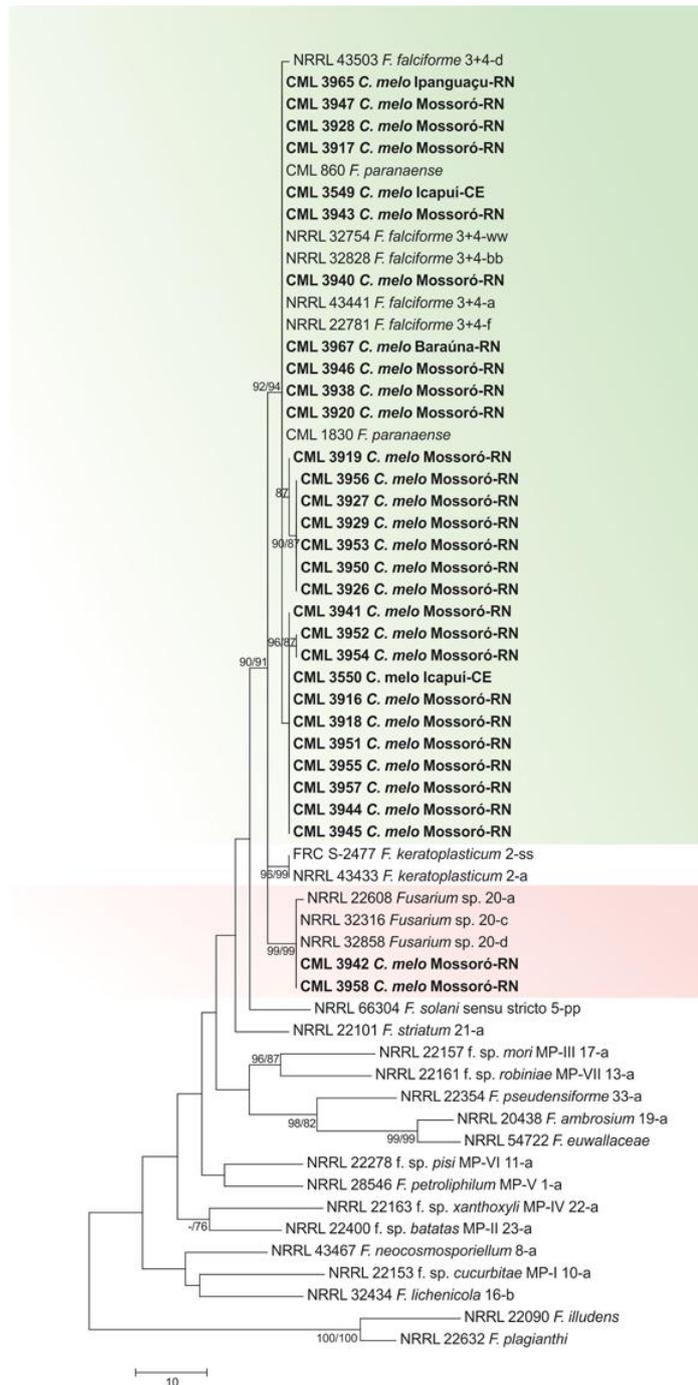
As plantas da cultivar ‘Goldex<sup>®</sup>’ foram inoculadas 15 dias após o plantio, inserindo o palito de dente colonizado com os referidos isolados na região do hipocótilo, 1 cm acima da superfície do substrato (Figuras 1c, 1d). Palitos de dentes não infestados e autoclavados foram utilizados como controle. A avaliação foi realizada 60 dias após a inoculação. Para o método do arroz, o inóculo foi preparado incubando o patógeno por 15 dias à  $28 \pm 2$  °C em sementes de arroz autoclavadas. Utilizou-se 9 g de inóculo por litro de substrato comercial Tropstrato HT hortaliças<sup>®</sup> (Sanchez; Gambardella 2013). Os experimentos de análise da patogenicidade dos isolados foram realizados em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 5 repetições. Aos 60 dias após a inoculação, a severidade da doença foi avaliada utilizando escala de notas descrita por Ambrósio et al. (2015), onde: 0 = assintomático; 1 = menos de 3% dos tecidos infectados; 2 = 3-10% dos tecidos infectados; 3 = 11-25% dos tecidos infectados; 4 = 26-50% dos tecidos infectados e 5 = mais de 50% dos tecidos infectados. Todas as plantas sintomáticas passaram pelo processo de reisolamento do patógeno em meio BDA concluindo os postulados de Koch. Foi realizada uma análise descritiva dos resultados.



**Fig. 1** Sintomas causados por *Fusarium solani* em plantas de melão. A = Sintomas de reboleiras na plantação de meloeiro; B = Podridão radicular no campo causada por *F. solani*; C = Teste de patogenicidade usando o método palito; D = Colo da planta começando a apodrecer após a inoculação do patógeno.

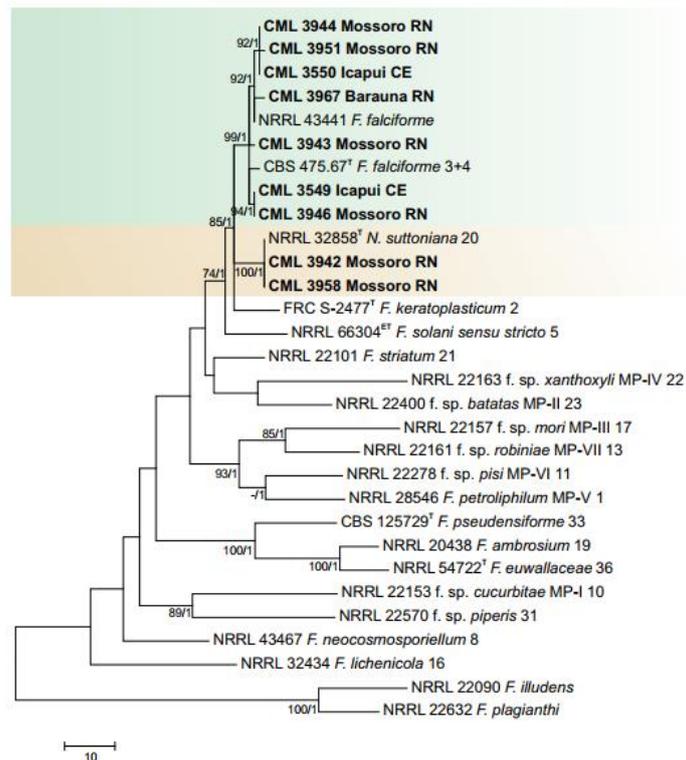
### 3 RESULTADOS

O alinhamento de 30 sequencias parciais da RPB2 de isolados do FSSC continham 1500 caracteres, sendo 1151 conservados, 1343 variáveis e 205 informativos. A análise filogenética pelo método de Máxima Parcimônia gerou uma árvore mais parcimoniosa, e a topologia revelou que os 31 isolados obtidos de meloeiros das principais áreas de produção do Brasil foram compostas por duas linhagens filogenéticas que agruparam no clado 3 do complexo de espécies *Fusarium solani* (Figura 2).



**Fig. 2** Árvore filogenética Máxima de Parcimônia das espécies do complexo *Fusarium solani*, usando sequências de RPB2. Probabilidades posteriores  $\geq 0,90$  e valores máximos de inicialização de parcimônia  $\geq 70\%$ , 1.000 repetições estão acima dos nós. IC = 0,621, IR = 0,661 na análise de parcimônia máxima. Esta árvore está suportada nas sequências *F. plagianthi* e *F. illudens*. Abreviações: MP-I a MP-VII – *mating populations*; Cepa do tipo T; ET – estirpe do tipo ex; CML – Coleção Micológica de Lavras; NRRL – Northern Regional Research Laboratory; FRC – Centro de Pesquisa *Fusarium*; GJS – Coleção de Gary J. Samuels mantida na coleção USDA-ARS Beltsville.

Com o objetivo de certificar a robustez da análise filogenética, foi incluída uma análise combinada das regiões EF-1 $\alpha$  + RPB2 para 9 isolados (selecionados com base em sua virulência). Esta análise, combinando mais de uma região gênica, apresentou resultados semelhantes aos da região RPB2 (Fig. 3).

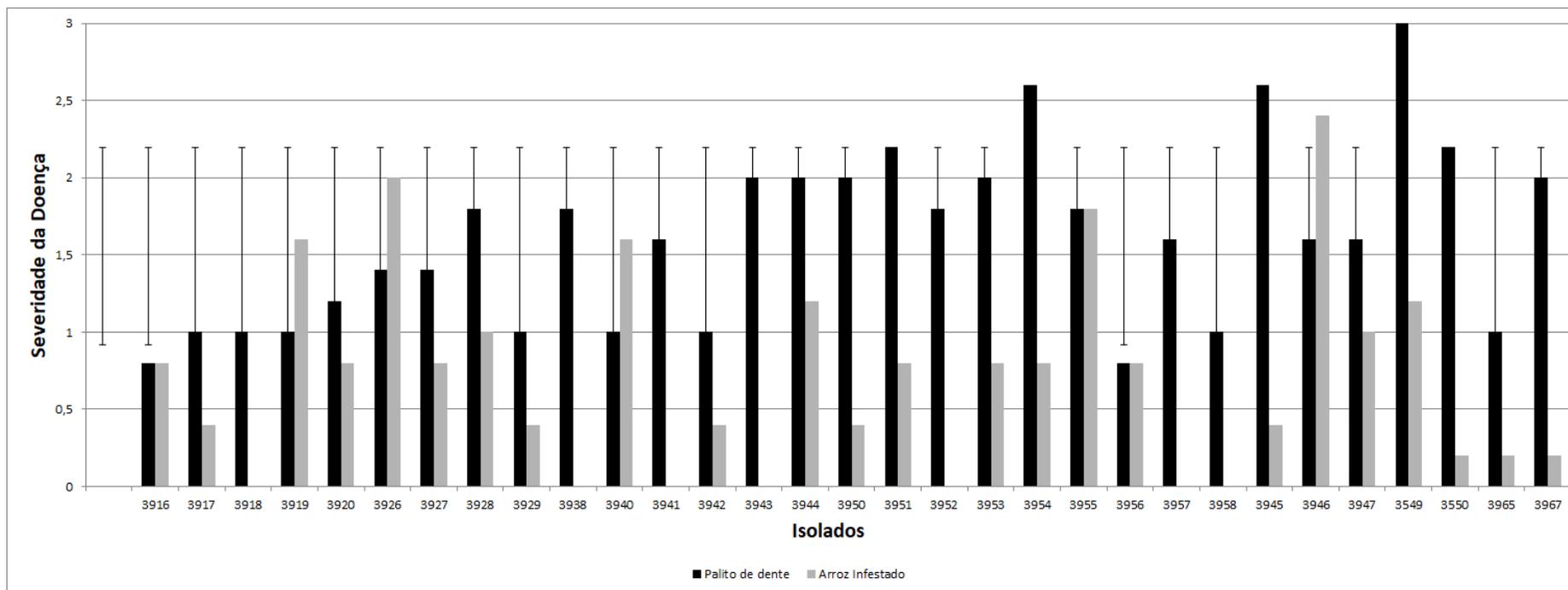


**Fig. 3** Árvore filogenética de Máxima Parcimônia de espécies do complexo de espécies *Fusarium solani*, usando sequências de EF1- $\alpha$  e RPB2. Esta árvore está suportada nas sequências *F. plagianthi* e *F. illudens*. Valores de *bootstrap* de máxima parcimônia  $\geq 70\%$  das 1000 réplicas e probabilidades posteriores  $\geq 0.90$  e estão acima dos nós. IC = 0,654 e IR = 0,660 na de análise máxima parcimônia. Abreviaturas: MP-I a MP-VII – *mating populations*; CML – Coleção Micológica de Lavras; NRRL – Northern Regional Research Laboratory; Centro de Pesquisa FRC – *Fusarium* Research Center; CBS – Centraalbureau voor Schimmelcultures, Academia Real Holandesa de Artes e Ciências, Holanda.

Os isolados obtidos de *C. melo* não agruparam com as linhagens conhecidas associadas a cucurbitáceas, *F. petroliphium* (FSSC 1) e *F. solani* f.sp. *cucurbitae* “raça 1” (FSSC 10). Estes isolados se distribuíram em duas linhagens filogeneticamente distintas, *Fusarium falciforme* (FSSC 3+4) e *Neocosmospora suttoniana* (FSSC 20), relatadas pela primeira vez como patógenos em meloeiro. A maioria dos isolados

agruparam com a espécie *F. falciforme* (FSSC 3+4) com 99% de *bootstrap* e 100 % de probabilidade posterior, e dois isolados, CML 3942 e CML 3958 agruparam com o tipo *N. suttoniana* (FSSC 20) com 100% de suporte e de probabilidade posterior. As análises individual e combinada das regiões gênicas EF-1 $\alpha$  + RPB2, mostraram que houve congruência nos resultados gerados, onde foi possível observar que todos os isolados formaram os mesmos clados, *Fusarium falciforme* (FSSC 3+4) e *Neocosmospora suttoniana* (FSSC 20), em ambas as análises.

A avaliação da patogenicidade mostrou que todos os isolados causaram doenças nas plantas, com graus variados de virulência, porém, a maioria dos isolados apresentou baixa virulência nos dois métodos de inoculação. O isolado mais virulento obteve um escore médio de gravidade 3 (Figura 4). Observou-se que houve divergência na virulência dos isolados relacionados aos métodos utilizados. Quando a metodologia palito foi utilizada, os isolados mais virulentos foram CML3954 e CML3945, coletados em diferentes fazendas localizadas na cidade de Mossoró / RN, e CML3549 coletados em Icapuí /CE. Com a metodologia do arroz infestado, os isolados que expressaram a maior virulência foram CML3926 e CML3946, ambos coletados em fazendas localizadas em Mossoró /RN (Figura 4). As plantas de meloeiro expressaram os primeiros sintomas 15 dias após a inoculação, onde foi observado amarelecimento da parte aérea, murcha, com posterior inclinação, podridão da copa e raízes e, em alguns casos, a morte da planta. O patógeno foi reisolado de plantas sintomáticas, cumprindo o postulado de Koch. As plantas do grupo controle permaneceram assintomáticas nas duas metodologias utilizadas.



**Fig. 4** Virulência dos isolados utilizando as metodologias de palito de dente e arroz infestado, com escala de pontuação de 0 (zero) a 5 (cinco). Onde 0 = nenhum sintoma, 1 = menos de 3% do tecido infectado, 2 = 3-10% do tecido infectado, 3 = 11-25% do tecido infectado, 4 = 26-50% do tecido infectado e 5 = mais de 50% do tecido infectado.

## 4 DISCUSSÃO

O clado 3 do FSSC é considerado o mais evolutivamente diversificado e rico em espécies, onde se encontra a maioria das espécies de *Fusarium* associados ao solo, plantas, animais, espécies saprófitas e algumas associadas a infecções micóticas em seres humanos (O'Donnell 2000; Zhang et al. 2006; O'Donnell et al. 2008). Os isolados deste clado tendem a ter taxas de crescimento mais rápidas que as do clado 2, e estes também podem produzir maior quantidade de microconídios (Aoki et al. 2003). Estes fatores podem favorecer a entrada e disseminação do patógeno, bem como, a severidade da doença (Zhang et al. 2006).

A linhagem FSSC 1 é conhecida por ser um fraco patógeno vegetal que causa podridão em frutos de cucurbitáceas, e é equivalente ao grupo conhecido historicamente como *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* raça 2, e também Mating Population V de “*Nectria haematococca*” (Tousson; Snyder 1961; O'Donnell 2000). A linhagem FSSC 10 é uma espécie patogênica a cucurbitáceas, capaz de infectar raízes, colo e frutos, porém, pertence ao grupo *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* raça 1 (Mehl; Epstein 2007). Os resultados obtidos a partir deste estudo mostraram que os isolados não agruparam em nenhuma das linhagens conhecidas associadas a cucurbitáceas (FSSC 1 e FSSC 10), mas, a outras duas linhagens distintas. Diante disto, podemos sugerir que a capacidade de espécies do FSSC em causar doenças nas cucurbitáceas evoluiu, indicando que outras espécies ou populações do complexo, presentes em diferentes culturas no Brasil começaram a causar doenças em meloeiro, visto a diversidade de espécies de plantas que existem no país, aliada a capacidade desses fungos de se adaptar em diferentes ambientes (Coleman et al. 2009).

A maioria dos isolados agrupou na linhagem 3+4 (*Fusarium falciforme*), que está comumente associada a infecções em humanos e doenças de plantas. É comprovado que espécies clinicamente importantes podem ser comuns em ambientes agrícolas (Chitrampalam; Nelson Junior 2016). O *F. falciforme* é considerado a espécie irmã do *Fusarium paranaense*, e esta, forma uma nova linhagem biológica e filogenética dentro do clado 3 do FSSC, associada à podridão radicular da soja em diferentes regiões produtoras do Brasil (Costa et al. 2016). *Neocosmospora suttoniana* (FSSC 20) está relacionada a espécies de *Fusarium* que vêm sendo amplamente estudadas, isoladas de diversas fontes, como infecções humanas, animais e solos (Nalim et al. 2011; Sandoval-Denis; Crous 2018), de diferentes regiões, possuindo um amplo espectro filogenético. Estas duas espécies, *Fusarium falciforme* (FSSC 3+4) e *Neocosmospora suttoniana*

(FSSC 20), são relatadas pela primeira vez em plantas de melão e demonstram a plasticidade deste complexo, que, ao serem introduzidos em uma área, podem causar sérios danos à cultura.

Estudos filogenéticos são importantes na diferenciação de linhagens estreitamente relacionadas, permitindo a separação clara de algumas espécies (Leslie; Summerell 2006; Chehri 2017), evitando a subjetividade de determinar os limites de uma espécie, conferindo apenas a caracterização morfológica para distinguir linhagens patogênicas, de outras dentro do FSSC que são morfológicamente semelhantes (Costa; Moreira; Pfenning 2017). O uso da filogenia molecular é uma ferramenta eficaz que auxilia estudos de taxonomia, principalmente em complexos de espécies que compartilham características morfológicas, como é o caso do complexo *F. solani*.

É importante ressaltar que, embora a maioria dos isolados tenha apresentado baixa virulência no melão quando avaliados sob condições controladas e isoladamente, ainda podem causar, quando associados a outros patógenos, inúmeros danos à cultura, levando a grandes perdas para os produtores. A podridão das raízes de *F. solani* ocorre frequentemente em associação com outros patógenos e com diferentes distúrbios causados pelo estresse. Algumas espécies de *Fusarium* podem ser vistas como patógenos oportunistas ou pouco virulentos, atacando apenas plantas anteriormente enfraquecidas por outros fatores estressantes (Chehri et al. 2011). Aegerter et al. (2000), ao avaliar a ocorrência e a patogenicidade de fungos associados à podridão das raízes no melão e ao declínio de ramas, na Califórnia, relataram uma associação de fungos como causa de tais doenças e, na maioria das vezes, foram encontrados na mesma lesão. Andrade et al. (2005), ao avaliar a frequência de fungos associados ao colapso do melão no Nordeste brasileiro, verificaram que 88,9 % das áreas analisadas apresentaram associação entre *F. solani* e outros patógenos habitantes do solo, e apenas em 11,1 % das infecções foram causadas exclusivamente por *F. solani*. A presença de *F. solani* associada a podridões radiculares provocadas por outros patógenos habitantes do solo pode aumentar a gravidade da doença em campo, conforme também foi relatado por Hanson (2010). Este pesquisador afirma que a infestação concomitante de microrganismos presentes no solo geralmente estimula a expressão de sintomas nas plantas.

Na avaliação da patogenicidade observou-se os primeiros sintomas da doença aos 15 dias após a inoculação, como também foi verificado por Gómez et al. (2014) ao avaliar a patogenicidade de 3 (três) isolados de *F. solani* em plantas de abobrinha e melão em casa de vegetação em Almería, Espanha. Em condição de campo, na maioria das vezes,

os sintomas de *F. solani* são observados no final do ciclo, o que provoca muitas perdas para o produtor. Fungos do gênero *Fusarium* possuem hábitos saprofíticos, e na ausência da planta hospedeira, formam estruturas de resistência (clamidósporos) que podem fazê-los sobreviver por longo período. Assim, as medidas de controle são ainda mais difíceis de serem adotadas, tornando-as ineficazes e onerosas (Oliveira; Santos; Santos 2018). A prevenção antes da semeadura, bem como o tratamento químico das sementes, é uma medida que auxilia na prevenção de doenças causadas por espécies de *Fusarium* sp. (Costa et al. 2003). Não existem produtos específicos registrados na cultura do meloeiro no Brasil com a finalidade de controlar este fitopatógeno (Agrofit 2020). O tratamento de solo com produtos químicos envolvia o uso de fumigantes, como o brometo de metila para o controle de patógenos, entretanto, este provocava diversos riscos para o ambiente e à saúde humana. Com a restrição no uso deste produto, aumentaram os riscos com patógenos habitantes do solo.

Em geral, o *Fusarium* pode infectar uma planta através de diferentes vias. A penetração do patógeno ocorre geralmente próximo das raízes, bem como através de ferimentos e aberturas de raízes (Bianchini et al. 1997). Fungos do gênero *Fusarium* também estão sendo associados a podridão peduncular em pós colheita de algumas espécies. Quando as frutas são colhidas os fungos penetram no tecido ferido pela quebra do pedúnculo ou, a partir de infecções quiescentes onde o desenvolvimento do patógeno é inibido por condições fisiológicas impostas pelo hospedeiro até o início da maturação do fruto (Nery-Silva et al. 2007). Os sintomas são observados apenas no destino final, resultando em uma perda extra aos produtores. O conhecimento da variabilidade fitopatogênica é fundamental, pois permite o correto diagnóstico de doenças, facilita práticas de manejo da cultura e auxilia nos programas de melhoramento genético.

## **REFERÊNCIAS**

- Aegerter, B. J., Gordon, T. R., Davis, R. M. (2000). Occurrence and pathogenicity of fungi associated with melon root rot and vine decline in California. *Plant Disease*, 84(3), 224-230.
- Agrofit. Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em 20/09/2018.

- Ambrósio, M. M. Q., Dantas, A. C. A., Martinez-Perez, E., Medeiros, A. C., Nunes, G. H. S., & Picó, M. B. (2015). Screening a variable germoplasm collection of *Cucumis melo* L. for seedling resistance to *Macrophomina phaseolina*. *Euphytica*, 206, 287-300.
- Andrade, D. E. G. T., Michereff, S. J., Biondi, C. M., Nascimento, C. W. A., & Sales Jr, R. (2005). Frequência de fungos associados ao colapso do meloeiro e relação com características físicas químicas e microbiológicas dos solos. *Summa Phytopathologica*, 31, 327- 333.
- Anuário Brasileiro de Fruticultura. (2019). Disponível em: <https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/acessar/completo/anuario-2018-2019.aspx>.
- Aoki T., O'Donnell K., Homma Y., & Lattanzi A. R. (2003). 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*, 95, 660-684.
- Bianchini, A., Maringoni, A. C., & Carneiro, S. M. T. P. G. (1997). Doenças do feijoeiro. In: Kimati, H., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A., Rezende, J. A. M. (Eds.) *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. Agrônômica Ceres*, 2, 376-399.
- Chehri, K., Salleh, B., Yli-Mattila, T., Reddy, K. R. N., Abbasi, S. (2011). Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(4), 341–351.
- Chitrampalam, P., & Nelson Jr, B. (2016). 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*, 109, 335-347.
- Coleman, J. J., Rounsley S. D., Rodriguez-Carres, M., Kuo, A., Wasmann, C. C., & Grimwood, J., et al. (2009) The Genome of *Nectria haematococca*: Contribution of Supernumerary Chromosomes to Gene Expansion. *PloS Genetics*, 5, 1-14.
- Costa S. S., Matos, K. S., Tessmann, D. J., Seixas, C. D. S., & Pfenning, L. H. (2016). *Fusarium paranaense* sp. Nov., a member of the *Fusarium solani* species complex causes root rot on soybean in Brazil. *Fungal Biology*, 120, 51-60.
- Costa, M. L. N., Machado, J. C., Guimarães, R. M., Pozza, E. A., & Oride, D. (2003). Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. *Ciência e Agrotecnologia*, 27, 1023-1030.

- Costa, S. S., Moreira, G. M., & Pfenning, L. H. (2017). Development of a PCR protocol for the identification and detection of *Fusarium solani* f. sp. *Piperis* from soil and roots of black pepper (*Piper nigrum*), 42, 55–59.
- Gómez, J., Serrano, Y., Pérez, A., Porcel, E., Gómez, R., & Aguilar, M. I. (2014). *Fusarium solani* f. sp. *Cucurbitae*, affecting melon in Almería Province, Spain. *Australasian Plant Disease Notes*, 9, 136.
- Hanson, L. E. (2010). Interaction of *Rhizoctonia solani* and *Rhizopus 37omplex37era* causing root rot of sugar beet. *Plant Disease*, 94(5), 504-509.
- Hepperle, D. (2004). SeqAssem<sup>®</sup>: A sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Win32-Version. Distributed by the author via <http://www.sequentix.de>.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). The *Fusarium* laboratory manual. Malden, USA: Blackwell Publishers. ISBN: 978-0-813-81919-8.388.
- Lima, M.F., & Costa, N.D. (2001). Doenças detectadas em cucurbitáceas no submédio do Vale São Francisco no período de 1998 a 2000. *Horticultura Brasileira*, 19, suplemento CD-ROM.
- Medeiros, A.C., Melo, D. R. M., Ambrósio, M. M. Q., Nunes, G. H. S., & Costa, J. M. (2015). Métodos de inoculação de *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina* em meloeiro (*Cucumis melo*). *Summa Phytopathologica*, 41, 281-286.
- Mehl, H. L., & Epstein, L. (2007). *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*, 9, 2189-2199.
- Nalim, F. A., Samuels, G. J., Wijesundera, R. L., & Geiser, D. M. (2011). New species from the *Fusarium solani* species complex derived from perithecia and soil in the Old World tropics. *Mycologia*, 103, 1302-1330.
- Nascimento, P. G. M. L., Ambrósio, M. M. Q., Freitas, F. C. L., Cruz, B. L. S., Dantas, A. M. M., Sales Júnior, R., & Silva, W. L. (2018). Incidence of root rot of muskmelon in different soil management practices. *European Journal of Plant Pathology*, 152, 433-446.
- Nery-Silva, F.A., Machado, J.C., Resende, M. L.V., & LIMA, L. C. O. (2007). Metodologia de inoculação de fungos causadores da podridão peduncular em mamão. *Ciência e Agrotecnologia*, 31, 1374-1379.

- O'Donnell, K. (2000). Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia*, 92, 919-938.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., & Nirenberg, H. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90, 465–493.
- O'Donnell, K., Sutton, D. A., Fothergill, A., Mccarthy, D., Rinaldi, M. G., & Brandt, M. E., et al. (2008). Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 2477-2490.
- Oliveira, E. F., Santos, P. R. R., & Santos, G. R. (2018). Seeds of weeds as an alternative host of phytopathogens. *Arquivos do Instituto Biológico*, 85, 1-7.
- Ronquist F, Teslenko M, & van der Mark P., et al., (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61, 539–42.
- Sánchez, S., & Gambardella, M. (2013). First Report of Crown Rot of Strawberry Caused by *Macrophomina phaseolina* in Chile. *Plant Disease*, 97, 996.
- Sandoval-Denis, M., & Crous, P.W. (2018). Removing chaos from confusion: assigning names to common human and animal pathogens in *Neocosmospora*. *Persoonia*, 41, 109-129.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725–2729.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.
- Tousson, T.A., & Snyder, W.C. (1961). The pathogenicity, distribution, and control of two races of *Fusarium* (Hypomyces) *solani* f. *cucurbitae*. *Phytopathology*, 51, 17–22.
- Zhang, N., O'Donnell, K., Sutton, D. A., Nalim, F. A., Summerbell, R. C., Padhye, A. A., & Geiser, D. M. (2006). Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 2186-2190.

## CAPÍTULO III

### AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE MELOEIRO A LINHAGENS DO COMPLEXO *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.

Shamyra G.A. Silva <sup>(1)\*</sup>. Aceide M. S. Cardoso <sup>(2)</sup>. Luan V. Nascimento <sup>(1)</sup>. Geovane de Almeida Nogueira <sup>(1)</sup>. Glauber H. S. Nunes <sup>(1)</sup>. Ludwig H. Pfenning <sup>(2)</sup>. Márcia M. Q. Ambrósio <sup>(1)</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Agronômicas e Florestais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, 59.625-900 Mossoró, RN, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras – UFLA, 37200-000 Lavras – MG, Brazil.

\*Autor correspondente: Shamyra Georgia de Azevedo e Silva

E-mail: [shamyrageorgia@hotmail.com](mailto:shamyrageorgia@hotmail.com)

#### RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar a reação de diferentes genótipos de meloeiro à isolados de *Fusarium solani* provenientes das diferentes regiões produtoras de melão do Nordeste Brasileiro, visando selecionar genótipos com potencial de utilização em programas de melhoramento, através do uso de duas metodologias de análises estatística. Foram avaliados nove genótipos de meloeiro, quatro híbridos comerciais e cinco acessos. Utilizou-se sete isolados pertencentes ao Complexo de Espécies *Fusarium solani*, quatro obtidos de fazendas produtoras de melão da região semiárida Nordeste brasileiro, e três foram isolados de abóbora (*Cucurbita* spp.). Os experimentos para análise da resistência dos genótipos foram realizados utilizando a metodologia do palito de dente, e as avaliações ocorreram aos 60 dias após à inoculação. Os resultados de severidade foram avaliados pelos testes de Scott-Knott e a metodologia de modelos mistos REML/BLUP. Os híbridos comerciais dos tipos Pele de Sapo e Gália demonstraram maior resistência em relação aos demais híbridos. Os híbridos do tipo Amarelo e Harper foram classificados como suscetíveis para a maioria dos isolados. Entre os acessos, o AC-42 destacou-se como sendo o mais promissor para futuros estudos relacionados a melhoramento genético, e os acessos FOM-01 e C-14 foram os mais suscetíveis. As análises estatísticas apresentaram precisões elevadas e indicaram variabilidade genética entre isolados e genótipos. Foi possível observar que os híbridos comerciais do tipo Pele de Sapo e Gália, e o acesso AC-42 foram os materiais mais resistentes aos isolados avaliados. Sendo o acesso AC-42 o mais promissor para futuros estudos de melhoramento genético.

**Palavras chave:** *Cucumis melo* (L.). Patógeno radicular. Resistência genética. Inoculação.

## ABSTRACT

This work aimed to evaluate the reaction of different melon genotypes to *Fusarium solani* isolates from different melon producing regions of Northeast Brazil, aiming to select genotypes with potential for use in breeding programs, through the use of two statistical analysis methodologies. Nine melon genotypes, four commercial hybrids and five accessions were evaluated. Seven isolates belonging to the *Fusarium Solani* Species Complex were used, four obtained from melon producing farms in the semiarid region of Northeast Brazil, and three were isolated from pumpkin (*Cucurbita* spp.). The experiments to analyze the resistance of the genotypes were carried out using the toothpick methodology, and the evaluations occurred at 60 days after inoculation. The severity results were evaluated by the Scott-Knott tests and the mixed model methodology REML / BLUP. The commercial hybrids of the types Pele de Sapo and Gália showed greater resistance in relation to the other hybrids. Hybrids of the Yellow and Harper type were classified as susceptible to most isolates. Among the accessions, AC-42 stood out as being the most promising for future studies related to genetic improvement, and accessions FOM – 01 and C-14 were the most susceptible. Statistical analyzes showed high precision and indicated genetic variability between isolates and genotypes. It was possible to observe that the commercial hybrids of the Pele de Sapo and Gália type, and the AC-42 access were the most resistant materials to the evaluated isolates. AC-42 access being the most promising for future studies of genetic improvement.

**Keywords:** *Cucumis melo* (L.). Root pathogen. Genetic resistance. Inoculation.

## 1 INTRODUÇÃO

O melão (*Cucumis melo* L.) é uma olerícola apreciada em todo mundo e de grande importância para a região Nordeste do Brasil, que responde por 95,5 % da produção nacional, sendo uma cultura geradora de empregos e renda para a população. Os principais Estados produtores são Rio Grande Norte (RN) e Ceará (CE) com uma produção de melão no ano de 2018 de 338,6 e 85,2 mil toneladas, respectivamente (IBGE 2019). Atualmente o melão é a segunda fruta fresca mais exportada pelo Brasil com valores de exportação de US\$ 136 milhões e 197,6 mil toneladas. Sendo os principais mercados importadores do melão brasileiro os países da Comunidade Europeia (Espanha, Holanda e Reino Unido) (Anuário Brasileiro de Fruticultura 2019).

Os Estados do RN e CE apresentam no Brasil condições edafoclimáticas ideais para produzir esta cultura, tais como: altas temperaturas e baixa precipitação durante a maior parte do ano. Sendo assim, é possível a realização de até três ciclos de cultivo de melão em um mesmo ano na mesma área, sendo o monocultivo uma prática comum nas principais áreas produtoras (Figuerêdo et al. 2017; Nascimento et al. 2018). Segundo Bruton (1998), a associação do monocultivo com o uso de insumos de alto rendimento tais como: sementes híbridas, irrigação por gotejamento, fertilizantes de alta solubilidade

e utilização da cobertura plástica do solo “mulch” têm favorecido uma maior ocorrência e severidade de doenças radiculares.

Inúmeras doenças radiculares afetam a cultura do meloeiro nas principais áreas produtoras nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará (Sales Júnior et al. 2015), entre estas, a murcha de *Fusarium*, causada por *Fusarium solani* (Mart.) Appel & Wollenw está entre as mais relevantes pois provoca sintomas de podridão nas raízes, se desenvolvendo e atingindo o colo até chegar aos frutos (Mehl e Epstein 2007).

Membros do complexo de espécies *F. solani* (FSSC) (teleomorfo: *Haematonectria* ou *Neocosmospora*) são patógenos de difícil controle, pois possuem ampla gama de hospedeiros (Zhang et al. 2006; O’Donnell et al. 2008; Nalim et al. 2011), que são capazes de saprofitar resíduos de culturas e raízes da maioria das plantas cultivadas em rotação com melão, fazendo com que a rotação de culturas forneça uma “falsa proteção” contra a murcha de *Fusarium* em meloeiro (Oumouloud et al. 2013). Além disto, o *F. solani* possui estruturas de resistência (clamidósporos), que permite ao fungo permanecer viável no solo por longos períodos, mesmo na ausência do hospedeiro, tornando o controle cultural pouco eficiente. Medidas de controle químico também têm sido pouco efetivas, visto que, existem medidas rigorosas de restrição quanto ao uso de defensivos agrícolas relacionados à exportação no meloeiro, gerando carência de produtos e dificuldades nos registros dos mesmos. No Brasil não existem produtos registrados para o controle deste patógeno em meloeiro (Agrofit 2020).

O uso da resistência genética em meloeiro, é conceitualmente a melhor estratégia de controle deste patógeno, pois constitui uma medida estratégica no manejo integrado de doenças, por ser de fácil adoção por parte do produtor, compatível com outros métodos de controle, e conveniente do ponto de vista ecológico, visto que, não ocasiona danos ao homem e ao meio ambiente (Sales Júnior et al. 2015). No entanto, o sucesso de programas de melhoramento para resistência a patógenos habitantes do solo é influenciado por diversos fatores, como: a natureza do patógeno e diversidade de virulência na população; disponibilidade, diversidade e tipo de resistência genética; eficácia dos métodos e ferramentas utilizados para avaliar resistência de plantas (Oumouloud et al. 2013).

Neste sentido, a triagem de coleções de germoplasma para selecionar materiais resistentes a *F. solani* se faz necessário com o intuito de identificar fontes úteis para controlar esta doença ou servir de material para programas de melhoramento. A busca por fontes de resistência deve ser feita no germoplasma primário da cultura, uma vez que, *C. melo* é considerada a espécie mais polimórfica dentro do gênero *Cucumis* (Luan et al.

2010). Mesmo tendo seu centro de origem, domesticação primária e secundária em regiões distantes do Brasil, possui variedades tradicionais adaptadas às diferentes condições edafoclimáticas nacionais (Sales Júnior et al. 2015). Contudo, informações a respeito de fontes de resistência e diversidade genética em germoplasmas de meloeiro para o *F. solani* são escassas, embora acredite-se na disponibilidade de material resistente, pois trata-se da *Cucurbitacea* mais polimórfica do gênero *Cucumis* (Luan et al. 2010). Alguns trabalhos foram realizados para identificar fontes de resistência em meloeiro referentes a outros patógenos, como *Rhizoctonia solani* (Kuhn) (Michereff et al. 2008); *Macrophomina phaseolina* (Tassi), *Monosporascus cannonballus* (Pollack; Uecker) e *R. solani* no Iran (Salari et al. 2012) e *M. phaseolina* em mudas de meloeiro (Ambrósio et al. 2015).

Para haver sucesso nos programas de melhoramento genético se faz necessário o conhecimento da interação genótipo (G) X ambiente (E), sendo este passo, de extrema importância. É com base no conhecimento destas variáveis que se torna possível a seleção de genótipos com adaptação ampla ou específica, a escolha de locais de seleção e a determinação do número ideal de ambientes e de genótipos a serem avaliados durante a seleção (Fox et al. 1997).

Desta forma, metodologias de seleção que incorporam a estabilidade e a adaptabilidade em uma única estatística podem ser consideradas superiores, em comparação àquelas que usam apenas a produção como critério de seleção (Resende 2007). A análise realizada por meio da metodologia de modelos mistos, também chamada método REML/BLUP foi proposta para culturas perenes como o pinus (Resende et al. 1996) e sua aplicação tem se disseminado na análise de informações de diversas culturas, tanto perenes como anuais.

Tendo em vista a extrema importância de estudar fontes de resistência de plantas a espécies do complexo *Fusarium solani* (FSSC), este trabalho teve por objetivo avaliar a reação de diferentes genótipos de meloeiro à isolados de *F. solani* provenientes das diferentes regiões produtoras de melão do Nordeste Brasileiro, visando selecionar genótipos com potencial de utilização nos programas de melhoramento e/ou manejo integrado da podridão radicular através do uso de dois métodos de análises estatística.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Área Experimental**

O trabalho foi desenvolvido em duas partes, sendo uma em casa de vegetação e outra no laboratório de Fitopatologia e Microbiologia na Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), em Mossoró/RN.

## 2.2 Germoplasma

Foram avaliados um total de nove genótipos de meloeiro, compostos de quatro híbridos comerciais de diferentes empresas e variedades: o Pele de Sapo (OS) ‘Grand Prix’ (Sakata<sup>®</sup>), Gália (Ga) ‘DRG 3228’ (Seminis<sup>®</sup>), Cantaloupe (H) ‘Harper SV1044MF’ (Seminis<sup>®</sup>) e o Amarelo (Am) ‘Goldex’ (TopSeed Premium<sup>®</sup>), e cinco acessos de melão (AC-01, AC-42, MR-01, FOM-01 e C-14) provenientes da Coleção de Germoplasma da Universidade Federal Rural do Semi-árido – UFERSA, oriundos de diferentes origens geográficas e representando diferentes grupos botânicos da espécie.

## 2.3 Isolados e preparação do inóculo

Foram utilizados sete isolados pertencentes ao complexo de espécies *F. solani*, sendo quatro destes obtidos de meloeiros sintomáticos coletados em diferentes fazendas produtoras da região semiárida do Nordeste Brasileiro, e três foram isolados de abóbora (*Cucurbita* spp.) provenientes de diferentes localidades do Estado de Minas Gerais (Tabela 1). Todos os isolados foram sequenciados e se encontram mantidos na Coleção Micológica de Lavras (CML), no Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) (<http://www.dfp.ufla.br/cml>), pelo método de “Castellani”, armazenados a 10 °C e, criopreservados em suspensão de esporos a 15 % de glicerol a -80 °C.

**Tabela 1.** Isolados utilizados e suas respectivas linhagens dentro do complexo *Fusarium solani*.

Isolados <sup>a</sup>	Linhagem FSSC <sup>b</sup>	Hospedeiro	Origem
CML 3939	FSSC 46	Melão	Mossoró – RN
CML 3963	FSSC 46	Melão	Ipanguaçu – RN
CML 3937	FSSC 46	Melão	Mossoró – RN
CML 3946	FSSC 3 + 4	Melão	Mossoró – RN
CML 3906	FSSC 10	Abóbora	Nepomuceno – MG

CML 3909	FSSC 10	Abóbora	Nepomuceno – MG
CML 3983	FSSC 10	Abóbora	Contagem – MG

<sup>a</sup>CML = Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, MG, Brasil. <sup>b</sup>Após a nomenclatura do clado O'Donnell et al. (2008).

No preparo do inóculo utilizou-se a metodologia proposta por Ambrósio et al. (2015), no qual, palitos de dente com 12 mm de comprimento foram inseridos com a ponta afiada voltada para cima, em orifícios feitos em papel de filtro de 90 mm de diâmetro. Os palitos foram colocados em placas de Petri e autoclavados por 30 minutos, por dois dias com intervalos de 24 horas, à 120 °C. Foram adicionados 20 mL de meio cultura BDA (batata-dextrose-ágar) acrescido de sulfato de estreptomicina (0,05g/L) a cada placa de Petri contendo os palitos. Após a solidificação do meio de cultura, foram repicados cinco discos de micélio (6 mm de diâmetro) dos isolados de *F. solani* e, em seguida mantidos à 28° ± 2 °C por aproximadamente 15 dias. Também foram utilizados palitos de dentes autoclavados e não infestados como controle (Figura 1).



**Figura 1:** A = Isolado de *F. solani* colonizando palitos de dente. B = Controle (palitos de dente não infestados). UFERSA, Mossoró/RN, 2019.

## 2.4 Montagem dos experimentos e avaliações

Os materiais foram semeados em vasos de 1,0 L de capacidade, contendo substrato comercial Tropstrato HT Hortaliças<sup>®</sup>, autoclavados por 2 h a 121 °C, sendo uma hora por dia, com intervalo de 24 horas. Utilizou-se três sementes por vaso, sendo realizado o desbaste das plantas excedentes, deixando apenas uma única planta por vaso. As plantas

foram irrigadas diariamente de forma manual com regador, com uma lâmina de água média de 30 mL/ dia por vaso e foram inoculadas 15 dias após o plantio, inserindo o palito de dente colonizado com estruturas (micélio e esporos) dos referidos isolados na região do hipocótilo, 1 cm acima da superfície do substrato.

As avaliações foram realizadas aos 60 dias após a inoculação, utilizando escala de notas descrita por Ambrósio et al. (2015) para a severidade da doença, onde: 0 = assintomático; 1 = menos de 3% dos tecidos infectados; 2 = 3-10% dos tecidos infectados; 3 = 11-25% dos tecidos infectados; 4 = 26-50% dos tecidos infectados e 5 = mais de 50% dos tecidos infectados (Figura 2). A gravidade média da doença foi calculada para cada genótipo e foi utilizado para classificar os genótipos em cinco classes de reação: 0 = imune (I); 0,1-1,0 = altamente resistente (AR); 1,1-2,0 = moderadamente resistente (MR); 2,1-4,0 = suscetível (SU) e 4,1-5,0 = altamente suscetível (AS) (Salari et al. 2012). Todas as plantas sintomáticas passaram pelo processo de reisolamento do patógeno em meio BDA concluindo os postulados de Koch.



**Figura 2:** Genótipos de meloeiro inoculados e separados de acordo com a escala de notas descrita por Ambrósio et al. (2015). A = 0 – assintomático; B = 1 – menos de 3 % dos tecidos infectados; C = 2 – 3-10 % dos tecidos infectados; D = 3 – 11-25 % dos tecidos infectados; E = 4 – 26-50 % dos tecidos infectados; F = 5 – mais de 50 % dos tecidos infectados. UFERSA, Mossoró/RN, 2019.

## 2.5 Análises Estatísticas

Os experimentos de análise de reação dos genótipos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), e a unidade experimental foi constituída de cinco vasos, com uma planta por vaso para cada isolado e igual número para as plantas

que serviram como controle (Testemunha). Os dados de severidade da doença foram avaliados pelos testes de Scott-Knott a 1 % de probabilidade ( $\alpha = 0,01$ ) e a metodologia de modelos mistos REML/BLUP (Resende 2007).

### 3 RESULTADOS

Foram observadas diferenças entre os genótipos para a reação aos isolados inoculados (Tabela 2), onde os resultados obtidos foram significativos, indicando heterogeneidade genética tanto entre genótipos e isolados e na interação entre estes (Tabelas 2 e 3).

**Tabela 2.** Valor de F obtidos conforme análise de variância (ATS) não paramétrica para severidade da doença avaliada em acessos de meloeiro inoculados com *F. solani*. Mossoró-RN, 2019.

FV	GL	ANOVA
Genótipo	8	51286,29**
Isolado	6	133373,6**
G x I	48	11380,4**
Erro	252	

\*\* : F Significativo a ( $p < 0,01$ ) pelo Teste de Scott-Knott.

**Tabela 3.** Rank da severidade média da doença para cada genótipo e isolado do Complexo de Espécies *F. solani*.

Isolados	Genótipos																	
	Pele de Sapo		Gália		Amarelo		Harper		C-14		AC-01		FOM-01		MR-01		AC-42	
	Nota		Nota	Nota		Nota		Nota	Nota		Nota	Nota		Nota	Nota		Nota	
CML 3939	51,00	C	51,00	C	112,30	B	95,10	B	249,10	A	144,80	B	211,90	A	103,70	B	51,00	C
CML 3963	80,40	B	51,00	B	80,40	B	141,20	A	167,30	A	97,60	B	206,30	A	150,50	A	95,10	B
CML 3937	51,00	B	89,00	B	95,10	B	118,40	B	141,30	A	156,00	A	197,10	A	165,20	A	94,70	B
CML 3946	155,90	A	159,50	A	158,90	A	150,30	A	194,20	A	109,40	B	228,70	A	94,60	B	95,10	B
CML 3906	135,60	C	97,60	C	153,10	B	194,10	B	177,90	B	108,80	C	258,30	A	51,00	C	94,70	C
CML 3909	94,60	C	83,50	C	153,50	B	51,00	C	202,70	A	269,50	A	269,50	A	269,50	A	269,50	A
CML 3983	269,50	A	269,50	A	269,50	A	269,50	A	269,50	A	269,50	A	269,50	A	269,50	A	269,50	A

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal constituem grupo estatisticamente homogêneo

A interação dos genótipos em relação aos isolados foi analisada separando em dois grupos. O primeiro grupo constituído pelos híbridos comerciais, onde observou-se que, os melões ‘Gran Prix’ (OS) e ‘DRG 3228’ (Ga) apresentaram resultados estatisticamente semelhantes, demonstrando mais resistência em relação aos demais híbridos. Estes foram classificados como resistentes aos isolados CML 3939, CML 3909 e CML 3906. Vale salientar que destes, apenas o isolado CML 3939 foi obtido da região do Semi-árido.

Os híbridos ‘Goldex’ (Am) e ‘Harper SV1044MF’ apresentaram resultados inferiores, sendo classificados como susceptíveis para a maioria dos isolados. Para o isolado pertencente a nova linhagem recém descoberta e descrita temporariamente como FSSC 46, todos os híbridos foram altamente susceptíveis. Este mesmo resultado também foi encontrado para o isolado CML 3983, onde todos os híbridos foram altamente susceptíveis, porém, neste caso, é importante ressaltar que, este isolado foi obtido da cidade de Contagem /MG.

O segundo grupo foi constituído pelos acessos da Coleção de Germoplasma da UFERSA. Ao avaliar a resposta dos acessos de melão observou-se novamente que o isolado CML 3983 apresentou alta virulência, onde todos os acessos também foram classificados como altamente susceptíveis. Os acessos, de modo geral, deram respostas variadas aos diferentes isolados, porém o acesso AC-42 foi classificado como imune para o isolado CML 3939 e altamente resistente ao isolado CML 3906. Os acessos FOM – 01 e C-14 se apresentaram como altamente susceptíveis a todos os isolados.

Com relação à precisão experimental, observou-se que as análises estatísticas apresentaram precisões elevadas em razão dos valores de acurácia e indicaram variabilidade genética entre isolados e genótipos. A análise de modelos mistos evidenciou a presença de variabilidade genética entre os isolados avaliados e interação dos genótipos com cada isolado individualmente, corroborando com os resultados encontrados pelo teste de Scott-Knott (Tabela 4).

**Tabela 4.** Estimativa da capacidade geral de combinação (CGC) de acessos de meloeiro e isolados do Complexo de Espécies *F. solani*.

Genótipos	CGC	Isolados	CGC
Pele de Sapo	-0,75	CML 3939	-0,85
Gália	-0,77	CML 3963	-0,85
Amarelo	-0,36	CML 3937	-0,80
Harper	-0,36	CML 3946	-0,35
C-14	0,83	CML 3906	-0,33
AC-01	0,13	CML 3909	0,64
FOM-01	1,55	CML 3983	2,54
MR-01	0,04		
AC-42	-0,31		

#### 4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As espécies do gênero *Fusarium* já foram registradas em várias partes do mundo e são conhecidas por serem patogênicas a muitas culturas, sendo frequentemente encontradas em cucurbitáceas. São patógenos primariamente radiculares, porém, também se estabelecem no caule e frutos. São capazes de sobreviver no solo, em restos culturais como saprófitas, ou como patógenos oportunistas que aguardam condições predispostas, como estresse em seus hospedeiros (Chehri et al. 2011). Nos frutos, caracterizam-se como patógeno quiescente, e a reativação do crescimento do patógeno ocorre durante os processos de amadurecimento, quando mudanças fisiológicas ocorrem no tecido hospedeiro (Flaishman e Kolattukudy 1994; Prusky 1996).

São poucos os relatos de resistência genética do meloeiro a *F. solani* em todo mundo, visto que este, foi classificado ao longo dos anos como um patógeno secundário e quando ocorrem na literatura, os relatos se restringem normalmente apenas as linhagens FSSC 1 (*F. petroliphium*) e FSSC 10 (*F. solani* f.sp. *cucurbitae* “raça 1”) do complexo, pois estas são as linhagens comumente conhecidas associadas a cucurbitáceas. Porém, neste estudo, além de espécies do FSSC 10, foram avaliados isolados associados ao meloeiro pertencentes à duas linhagens filogeneticamente distintas dentro do clado 3 do complexo *F. solani*, sendo estas, *F. falciforme* (Carrio'n) (FSSC 3+4) e uma nova linhagem encontrada dentro complexo e denominada temporariamente de FSSC 46 (dados em fase de pré-publicação). Estas linhagens foram relatadas pela primeira vez como patógenos em meloeiro e foram detectadas em estudo anterior.

Galon (2013) avaliou a reação de 33 genótipos de cucurbitáceas em Jaboticabal, São Paulo, com dois isolados, sendo um isolado local e o outro proveniente de Mossoró-RN. Os dois isolados foram ineficientes em induzir sintomas de podridão de raiz e de

colo, nas condições ambientais ocorridas durante a execução dos ensaios. No Submédio do Vale do São Francisco, em Pernambuco, foi avaliada a reação de 20 acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Cucurbitáceas da Embrapa Semiárido (CPATSA) e dois híbridos comerciais, à podridão do colo causada por *F. solani* f. sp. *cucurbitae* raça 1 (atualmente descrita como FSSC 10). Todos os 20 acessos de meloeiro testados e os híbridos apresentaram lesões causadas pelo fungo, em diferentes níveis de resistência, porém, dez acessos foram promissores para futuros estudos, por apresentarem as menores lesões causadas pelo fungo em relação aos demais (Santos et al. 2015).

Alguns trabalhos foram realizados para identificar fontes de resistência em meloeiro referentes a outros patógenos habitantes do solo, Michereff et al. (2008) ao avaliar a reação de uma coleção de 20 genótipos de *Cucumis melo* L. para resistência de plântulas à *Rhizoctonia solan* (Kuhn), identificaram três fontes promissoras. Ao testar a resistência de 18 cultivares de meloeiro a *M. phaseolina* (Tassi), *M. cannonballus* (Pollack; Uecker) e *R. solani* no Iran em condição de casa de vegetação, Salari et al. (2012) detectaram duas cultivares que foram moderadamente resistentes aos três fungos. Ambrósio et al. (2015) quando avaliaram a resistência de mudas de meloeiro à *M. phaseolina* em 97 acessos de *C. melo* de diferentes origens geográficas e cinco gerações F1, derivadas de cruzamentos de cinco acessos selecionados para resistência, demonstraram que fontes de recursos naturais à resistência a este fungo é limitada. Contudo, mudas de sete acessos pertencentes à diferentes grupos botânicos apresentaram resposta de resistência quanto à inoculação no caule. Vale salientar que, neste trabalho foi verificado que o acesso C-14 apresentou resistência à *M. phaseolina* e acreditava-se que o mesmo fosse capaz de apresentar resistência a outros patógenos. Porém, o fato de um organismo conferir resistência a um determinado patógeno, não significa que apresentará o mesmo resultado em outros, pois pode se tratar de uma resistência monogênica, que poderá acionar apenas um mecanismo específico para determinado patógeno. Flor (1971) em sua teoria nomeada de gene-a-gene, afirma que para cada gene determinando resistência no hospedeiro, há um gene específico e relacionado determinando a patogenicidade no fungo. É importante salientar que todos os genótipos foram altamente susceptíveis a nova linhagem recém descoberta e descrita temporariamente como FSSC 46, isso é preocupante, pois não se conhece muito a respeito desta nova linhagem.

A resposta apresentada pelos híbridos comerciais no presente trabalho mostra que estes possuem, de modo geral, resistência a este patógeno, visto que, foram utilizados

isolados pertencentes a linhagens diferentes dentro do complexo *F. solani*, ou seja, há variabilidade genética para a patogenicidade entre isolados, e mesmo assim, eles apresentaram respostas relativamente positivas. Isso pode ser explicado porque estes materiais passam desde o início do seu processo de criação, por uma gama de combinações genéticas, na tentativa de melhorias para o consumidor final, tais como: aumento dos teores de açúcar, aumento da vida útil de prateleira e principalmente resposta de resistência a diferentes patógenos. O AC-42 se destacou como material com menor susceptibilidade. Este acesso pertence ao grupo botânico *momordica*. Melões dessa variedade botânica são originários da Índia e possuem como principais características, frutos com textura farinácea, com baixo teor de sacarose e que se rompem quando maduros (Dhillon et al. 2007). Muitos acessos de origem indiana têm sido utilizados como fontes de resistências aos principais patógenos fúngicos do meloeiro, como *Podospaera xanthii* (Castagne) U. Braun & N. Shishkoff, *Pseudoperonospora cubensis* (Berkeley & Curtis), *F. oxysporum* f. sp. *melonis* W.C. Snyder & H.N. Hansen, além de pragas e agentes de viroses (Dhillon et al. 2012).

Segundo Bruton (1998) a resposta de plantas de *cucurbitaceas* a doenças incitadas por patógenos radiculares pode ser influenciada pelo estágio de desenvolvimento da planta, nível e tipo de resistência envolvida, densidade do inóculo do patógeno no solo, variabilidade do patógeno e condições ambientais. Assim, a avaliação contínua da variabilidade do patógeno, monitorando possíveis mudanças na população, juntamente com a determinação dos níveis de inóculo adequados para causar doença, são necessárias para obtenção de cultivares resistentes.

A simples análise da interação G x E não proporciona informações completas e exatas sobre o comportamento de cada genótipo em várias condições ambientais. Faz-se necessário realizar análises de adaptabilidade e estabilidade fenotípica, pelas quais é possível a identificação de genótipos com comportamento previsível, que sejam responsivos às variações ambientais, em condições específicas ou amplas (Cruz et al. 2014). O procedimento REML (Restricted Maximum Likelihood), ou máxima verossimilhança restrita, estima componentes de variância necessários ao modelo e o BLUP (Best Linear Unbiased Prediction), melhor preditor linear não viesado, estima o valor genotípico (Resende 2007). A metodologia de modelos mistos permite considerar erros correlacionados dentro de locais, bem como a estabilidade e a adaptabilidade na seleção de genótipos superiores; fornece valores genéticos já descontados da instabilidade; e pode ser aplicado a qualquer número de ambientes. Além disso, ele gera

resultados na própria unidade ou escala do caráter avaliado, que podem ser interpretados diretamente como valores genéticos, o que os outros métodos não permitem. Esse modelo também possibilita inferências adicionais, como: seleção de genótipos específicos para cada local; seleção de genótipos estáveis através dos locais; seleção de genótipos responsivos (com alta adaptabilidade) à melhoria do ambiente; e seleção pelos três atributos (produtividade, estabilidade e adaptabilidade), simultaneamente (Rosado et al. 2012).

Através do presente estudo foi possível observar que, os híbridos comerciais ‘Gran Prix’ (PS) e ‘DRG 3228’ (Ga), e o acesso AC-42 foram os materiais mais resistentes as espécies de *F. solani* avaliadas. O acesso AC-42 se mostrou como o material mais promissor para futuros estudos de melhoramento genético, visando resistência as espécies do FSSC.

### **Agradecimentos**

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES (Brasil).

### **REFERÊNCIAS**

Agrofit. Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: [http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons) . Acesso em 25/01/2020.

Ambrósio MMQ, Dantas ACA, Martinez-Perez E, Medeiros AC, Nunes GHS, Picó MB (2015) Screening a variable germoplasm collection of *Cucumis melo* L. for seedling resistance to *Macrophomina phaseolina*. *Euphytica* 206: 287-300. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1452-x>

Anuário Brasileiro de Fruticultura. (2019). Disponível em: <https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/acessar/completo/anuario-2018-2019.aspx>. Acesso em 15/02/2019.

Bruton BD (1998) Soilborne diseases in cucurbitaceae: pathogen virulence and host resistance. Alexandria: International Society for Horticultural Science 143-166.

Chehri K, Salleh B, Yli-Mattila T, Reddy KRN, Abbasi, S (2011) Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from

- Kermanshah province, Iran. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18: 341–351.  
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.01.007>
- Cruz CD, Carneiro PCS, Regazzi AJ (2014) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético (3. ed.). Viçosa: Editora UFV 33: 668.
- Dhillon NPS, Monforte AJ, Pitrat M, Pandey S, Singhkumar P, Reitsma KR, GARCIA-MAS J, Sharma A, McCreight JD (2012) Melon landraces of India: contributions and importance. *Plant Breeding Reviews* 35: 85 - 150. <http://eu.wiley.com/.../id-321445.html>
- Dhillon NPS, Ranjana R, Singh K, Eduardo I, Monforte AJ, Pitrat M, Dhillon NL, Singh PP (2007) Diversity among landraces of Indian Snapmelon 69 (*Cucumis melo* var. *momordica*). *Genetics Resources Crop Evolution* 54: 1267-1283.  
<https://doi.org/10.1007/s10722-006-9108-2>
- Figueirêdo MCB, Gondim RS, Aragão, FAS (2017) (Eds.) Produção de melão e mudanças climáticas: sistemas conservacionistas de cultivo para redução das pegadas de carbono e hídrica. Brasília: Embrapa. 302.  
<http://www.infoteca.cntia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1074500>
- Flaishman MA, Kolattukudy PE (1994) Timing of fungal invasion using host's ripening hormone as signal. *Proc. Natl. Academic Science* 91: 6579-6593.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.14.6579>
- Flor HH (1971) *Current Status of the Gene-For-Gene Concept*. *Annual Review of Phytopathology* 9:275–296. [doi:10.1146/annurev.py.09.090171.001423](https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423)
- Fox PN, Crossa J, Romagosa I (1997) Multi-environment testing and genotype-environment interaction. *Statistical methods for plant variety evaluation* 117-138.  
[https://doi.org/10.1007/978-94-009-1503-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-94-009-1503-9_8)
- Galon LA (2013) Enxertia e podridão de raízes e colo em cucurbitáceas. 55f. (Dissertação Mestrado) UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária.
- Luan F, Sheng Y, Wang Y, Staub JE (2010) Performance of melon hybrids derived from parents of diverse geographic origins. *Euphytica* 173: 1–16.  
<https://doi.org/10.1007/s10681-009-0110-6>
- Mehl HL, Epstein L (2007) *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* 9:2189-2199.  
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01333.x>

- Michereff SJ, Andrade DEGT, Sales Junior R (2008) Reaction of melon genotypes to *Rhizoctonia solani*. *Horticultura Brasileira* 26: 401-404. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362008000300022>
- Nalim FA, Samuels GJ, Wijesundera RL, Geiser DM (2011) New species from the *Fusarium solani* species complex derived from perithecia and soil in the Old World tropics. *Mycologia* 103:1302-1330. <https://doi.org/10.3852/10-307>
- Nascimento PGML, Ambrósio MMQ, Freitas FCL, Cruz BLS, Dantas AMM, Sales Júnior R, Silva WL (2018) Incidence of root rot of muskmelon in different soil management practices. *European Journal of Plant Pathology* 152: 433-446. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1488-6>
- O'Donnell K, Sutton DA, Fothergill A, Mccarthy D, Rinaldi MG, Brandt ME, et al (2008) Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *Journal of Clinical Microbiology* 46:2477-2490. [DOI: 10.1128/JCM.02371-07](https://doi.org/10.1128/JCM.02371-07)
- Oumouloud A, El-Otmani M, Chikh-Rouhou H, Garcés Claver A, González Torres R, Perl-Treves R, Álvarez JM (2013) Breeding melon for resistance to Fusarium wilt: recent developments. *Euphytica* 192: 155-169. <https://doi.org/10.1007/s10681-013-0904-4>
- Prusky, D. Pathogen quiescence in postharvest disease. *Annual Review of Phytopathology* 34: 413-434, 1996. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.413>
- Resende MDV (2007) SELEGENREML/BLUP: sistema estatístico e seleção genética computadorizada via modelos lineares mistos. Colombo: Embrapa Florestas.
- Resende MDV, Prates DF, Yamada CK, Jesus A (1996) Estimación de componentes de variância e predição de valores genéticos pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML) e melhor predição linear não viciada (BLUP) em pinus. *Boletim de Pesquisa Florestal* 32-33:23-42.
- Rosado AM, Rosado TB, Alves AA, Laviola BG, Bhering LL (2012) Seleção simultânea de clones de eucalipto de acordo com produtividade, estabilidade e adaptabilidade. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 47: 964-971. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2012000700013>.
- Salari M, Panjehkeh N, Nasirpoor Z, Abkhoo J (2012) Reaction of melon (*Cucumis melo* L.) cultivars to soil-borne plant pathogenic fungi in Iran. *African Journal of Biotechnology* 11: 15324-15329. [DOI: 10.5897/AJB12.799](https://doi.org/10.5897/AJB12.799)

- Sales Júnior R, Nunes GHS, Silva KJP, Costa GG, Guimarães IM, Michereff SJ (2015) Caracterização morfológica de fontes de resistência de meloeiro a *Rhizoctonia solani*. Horticultura Brasileira 33: 196-202. DOI: <https://doi.org/10.1590/hb.v33i2.518>
- Santos JDS, Antônio RP, Neto JLS, RIBEIRO JÚNIOR PM, DIAS RCS (2015) Reação de acessos de meloeiro a *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*. In: X Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semiárido. Resumo. Petrolina, PE: SOB (CD-ROM).
- Zhang N, O'Donnell K, Sutton DA, Nalim FA, Summerbell RC, Padhye AA, Geiser DM (2006) Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. Journal of Clinical Microbiology 44: 2186-2190. DOI: [10.1128/JCM.00120-06](https://doi.org/10.1128/JCM.00120-06)