

Neilza Reis Castro

**Murcha de *Fusarium* em *Heliconia* spp.: ocorrência, variabilidade e resistência genética em espécies ornamentais cultivadas em Pernambuco, Alagoas e Sergipe.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia – Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Fitopatologia

RECIFE – PE  
FEVEREIRO, 2007

**Murcha de *Fusarium* em *Heliconia* spp.: ocorrência,  
variabilidade e resistência genética em espécies ornamentais  
cultivadas em Pernambuco, Alagoas e Sergipe.**

NEILZA REIS CASTRO

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO

Prof.º Dr. Delson Laranjeira – Orientador

Prof.º Dr. Rildo Sartori Barbosa Coêlho – Co-orientador

Prof.ª Dra. Edna Peixoto da Rocha Amorim – Co-orientadora

RECIFE – PE  
FEVEREIRO, 2007

**Murcha de *Fusarium* em *Heliconia* spp.: ocorrência,  
variabilidade e resistência genética em espécies ornamentais  
cultivadas em Pernambuco, Alagoas e Sergipe.**

NEILZA REIS CASTRO

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 22/02/2007

ORIENTADOR:

---

Prof.º Dr. Delson Laranjeira

EXAMINADORES:

---

Prof.º Dr. Rildo Sartori Barbosa Coêlho (UFRPE)

---

Prof.ª Dra. Luciana Cordeiro do Nascimento (UFPB)

---

Prof.ª Dra. Luciane Vilela Resende (UFRPE)

---

Prof.ª Dra. Rejane Magalhães de Mendonça Pimentel (UFRPE)

---

Prof.ª Dra. Sônia Maria de Oliveira (UFRPE)

Ao meu esposo Henrique  
Soares e ao meu filho Henrico,  
que estão sempre ao meu lado,

OFEREÇO COM AMOR

Aos meus pais Nelson Castro,  
Marly Castro, e irmãos,  
Neilson, Neilda, Nancy e  
Naylton, que me deram toda  
força,

DEDICO

Ao Professor Dr. Rildo  
Sartori,

AGRADEÇO EM ESPECIAL

## AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me cedido a vida e a capacidade de realizar sonhos;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pela formação oferecida através dos cursos de Mestrado e Doutorado em Fitossanidade/Fitopatologia;

À Universidade Federal de Alagoas, onde a trajetória de minha vida acadêmica começou;

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

Ao orientador Delson Laranjeira, pela confiança e pela amizade;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Fitossanidade pelos conhecimentos e amizade durante o decorrer dos quatro anos de curso, especialmente ao Prof. Dr. Rildo Sartori, que para mim é e sempre será exemplo de pessoa e profissional;

Ao meu esposo Henrique Soares e meu filho Henrico, que sempre tiveram uma palavra ou um sorriso nos momentos mais difíceis;

Aos meus pais e irmãos que são pessoas que mesmo longe fisicamente, estão presentes na minha vida todos os dias;

À Terezinha Soares, Aguinaldo, Ítalo e Átila, minha família pernambucana;

Aos amigos Janaína Cortez, Valéria Sandra, Albaneide, Lílian Guimarães, Sandra Maranhão, Andréa Chaves, Maria Fabíola, Marcelo, Marissônia, Erick, Denise, Manuela, Rinaldo, Paula, Giltemberg, Robson, Zilderlânia, Íris, Genira, pelos momentos acolhedores na dificuldade e pela partilha de sorrisos na alegria;

Aos professores do Departamento de Fitotecnia Dra. Luciane Vilela e Dr. Dimas e aos amigos da Fitotecnia Adriana Guedes, Júlio Mesquita, Conceição, Ana Verônica, Carlos, Alisson, Tatiane, pela colaboração e amizade;

Aos funcionários da Área de Fitossanidade Darci Martins, Luiz Coelho, Sr. Luis, Ivanise, Adelmo Adriana e Romildo pela ajuda na realização dos trabalhos;

Aos demais colegas do curso de Pós-graduação em Fitossanidade pelo companheirismo.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	
SUMÁRIO .....	
RESUMO .....	
ABSTRACT .....	
CAPÍTULO I – Introdução Geral .....	01
Referências Bibliográficas .....	13
CAPÍTULO II – Ocorrência da Murcha de fusário em <i>Heliconia</i> spp., Métodos de Inoculação, Caracterização Morfológica e Agressividade de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> .....	20
Resumo .....	20
Abstract .....	22
Material e Métodos .....	24
Resultados e Discussão .....	26
Referências Bibliográficas .....	32
CAPÍTULO III – Diversidade Genética de Isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> em Helicônia através de Compatibilidade Vegetativa e Análise Molecular ...	35
Resumo .....	36
Abstract .....	37
Material e Métodos .....	41
Resultados e Discussão .....	45
Referências Bibliográficas .....	54
CAPÍTULO 4 – Identificação de Fontes de Resistência à Murcha de Fusário, Eficiência do Uso do Filtrado em Folhas Destacadas de Helicônia na Distinção de Resistência e Suscetibilidade e Mecanismos Estruturais Envolvidos .....	59
Resumo .....	59
Abstract .....	61
Introdução .....	62
Material e Métodos .....	63
Resultados e Discussão .....	66
Referências Bibliográficas .....	72
CONCLUSÕES GERAIS .....	75

## RESUMO

As helicônias são as flores mais cultivadas dentro da floricultura tropical no Nordeste brasileiro, porém sua produção vem sendo afetada pela murcha de fusário, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. O presente estudo objetivou verificar a ocorrência da doença, avaliar métodos de inoculação, caracterizar os isolados quanto a morfologia, agressividade e diversidade genética, identificar fontes de resistência, verificar a eficiência do filtrado fúngico na distinção de resistência e suscetibilidade e, por fim, o envolvimento de mecanismos estruturais na interação patógeno-hospedeiro. A ocorrência da doença foi avaliada em vinte e oito propriedades nos estados de Pernambuco, Alagoas e Sergipe. Após a obtenção dos isolados, foram testados os métodos de inoculação de injeção na base do pseudocaule, método de “meia lua”, depositando-se o inóculo em torno da planta e “dipping”, onde as raízes das plantas são feridas, imersas na suspensão e depois replantadas. As plantas foram avaliadas pelos sintomas internos e externos, com base em escala de notas que variavam de 1 a 6. Para os caracteres morfológicos, os isolados foram incubados por cinco dias em microcultura e, em seguida, observados com auxílio de microscópio ótico. Os macroconídios e os microconídios foram medidos através da lente micrométrica com aumento de 40X. A agressividade dos isolados foi determinada por inoculação de discos de colônia em colmos de *Heliconia psittacorum* cv. Alan carle destacados e perfurados. Os colmos foram incubados sob condição de câmara úmida por cinco dias. A avaliação foi de acordo com o escurecimento vascular no diâmetro do colmo e baseou-se na escala de nota variando de 1 a 4. A diversidade genética foi verificada através da análise molecular e da técnica de grupamento de compatibilidade vegetativa (VCG). Para análise molecular, realizou-se a Polymerase Chain Reaction (PCR) utilizando-se trinta e sete oligonucleotídeos de Inter-simple Sequence Repeat (ISSR) e a corrida eletroforética em gel de agarose (2%). Os dados binários foram analisados pelo programa Genes 2.0. O VCG foi determinado através da obtenção de mutantes nit, pelas seqüências nos meios completo (MC), batata-dextrose-clorato (BDC) e meio mínimo (MM). Para a formação de grupamentos, os mutantes foram pareados para o teste de complementariedade através da observação da formação do heterocácion. Na identificação de fontes de resistência, doze espécies de helicônia foram inoculadas por injeção com o isolado considerado de maior agressividade e após quarenta dias foram feitas as avaliações baseada na escala de notas. O filtrado fúngico foi obtido após o cultivo do fungo por vinte e quatro dias em meio Czapek, sendo utilizadas as concentrações de 25, 50, 75 e 100%. Aliquotas de 1 mL foram depositadas sobre a superfície de folhas destacadas das plantas resistentes de *Heliconia psittacorum* cv.

Golden torch, e das suscetíveis *H. psittacorum* cv. Alan carle. As folhas inoculadas ficaram em condição de câmara úmida por 24, 48 e 72 horas. Os mecanismos estruturais envolvidos na interação foram observados por cortes histológicos nas raízes das espécies utilizadas no estudo de fontes de resistência e os tratamentos foram inoculados e não inoculados com *F. oxysporum* f.sp. *cubense*. Foi constatada a ocorrência da murcha de fusário em 88% das propriedades visitadas, de onde foram obtidos trinta e um isolados do fungo. O método de injeção mostrou ser o mais eficiente, apresentando os sintomas característicos da doença em menor intervalo de tempo, aos trinta e seis dias. Os macroconídios apresentaram variação de 25,56 µm x 3,7 µm a 33,92 µm x 3,39 µm e os microconídios a variação de 6,23 µm x 2,01 µm a 10,3 µm x 3,35 µm. Observou-se a distinção de três grupos quanto à agressividade, onde quinze isolados foram enquadrados com de agressividade intermediária, oito foram de maior agressividade e oito foram de menor agressividade. As técnicas utilizadas no estudo de diversidade genética apresentaram alta variabilidade genética. Na análise molecular formaram-se cinco grupos considerando uma distância genética de 70% e uma dissimilaridade genética variando de 0,51 a 0,94. No estudo de VCG observou-se a formação de três grupos, porém 71% dos isolados não fizeram parte de nenhum grupo. Ambas as técnicas determinaram uma alta diversidade genética e a não correlação geográfica entre os isolados pertencentes a uma mesma região. As espécies *Heliconia bihai*, *H. psittacorum* cv. Golden Torch, *H. psittacorum* cv. Golden Torch Adrian, *H. rostrata*, *H. stricta* cv. Capri, *H. psittacorum* cv. Sassy e *H. caribea* foram consideradas resistentes à murcha de fusário. As espécies moderadamente resistentes foram *H. latispatha* e *H. wagneriana*. *Heliconia psittacorum* cv. Alan Carle e *H. chartacea* cv. Sexy Pink foram as suscetíveis enquanto que a *H. stricta* cv. Fire Bird foi altamente suscetível. O filtrado fúngico concentrado em 50% foi o mais eficiente na distinção de resistência e suscetibilidade nas cultivares. Na avaliação dos mecanismos estruturais observou-se que não há relação entre a espessura e lignificação da parede celular com a resistência ao patógeno, pois em algumas espécies resistentes não constatou-se o aumento de espessura ou acúmulo de lignina.



## ABSTRACT

Heliconias are flowers most cultivated inside world floriculture tropical in Brazil northeast, but its yield has being affected by *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. The present study had as objective to verify disease occurrence, to evaluate inoculation methods, characterize isolates considering morphology, aggressivity and genetical diversity, identify resistance sources, to verify efficiency of fungical filtrate in distinction of resistance and susceptibility and, at the end, involvement of structural mechanisms in pathogen-host interaction. The disease occurrence was evaluated in 28 farms at Pernambuco, Alagoas and Sergipe, Brazil. After isolates obtaintion, were tested inoculation methods by injection on bottom of pseudo stem, “meia lua” method, depositing inoculants around plant and “dipping”, where roots are wounded, immersed in suspension and replanted after. The plants were evaluated by external and internal symptoms, considering disease index with variation of 1 to 6. For morphological characters, isolates were incubated for five days in microculture, after observed with optical microscopy. Micro and macroconidia were measured by micrometric lenses, with increase of 40X. The aggressivity of isolates was determined colony disks in stems of *H. psittacorum* cv. Alan carle detached and perfured. Stems were incubated in humid chamber during five days. The evaluation was according with vascular darking in stem diameter and was based in index disease with notes variation of 1 a 4. Genetical diversity was verified by molecular analysis and vegetative compatibility agroupment technique. For molecular analysis, it was realized Polymerase Chain Reaction (PCR) using 37 oligonucleotides of Inter-simple Sequence Repeat (ISSR) and eletrophoretical run in agarosis gel (2%). Binary data were analyzed by GENES 2.0 program. VCG was determined by nit mutants obtaintion, by complete medium (CM), potato-dextrose-clorate (PDC) and minimum medium (MM) sequence. For groupment formation Mutants were pared for complementary test by observation of heterocarion. For identification of resistance sources, 12 species of heliconia were inoculated by injection with isolate considering higher aggressivity and, after 40 days were done evaluations based on disease index. Fungical extract was obtained after fungus incubation during 24 days in Czapek medium, being used concentrations of 25, 50, 75 and 100%. Aliquots of 1mL were deposited on detached leaves of resistant plants of *Heliconia psittacorum* cv. Golden Torch, and of susceptible *H.psittacorum* cv. Alan Carle. Leaves inoculated were in humid chamber condition for 24, 48 and 72 hours. Structural mechanisms involved in interaction were observed by histological cuts on roots of used species at resistance sources studies and treatments were inoculated and no inoculated with *F.oxysporum* f.sp. *cubense*. It was observed *Fusarium* wilt

occurrence in 88% of farms of tropical flowers production, where were obtained 31 isolates of *F. oxysporum* f.sp. *cubense*. Injection method showed be more efficient, with characteristics disease symptoms in lower time interval, at 36 days. Macroconidia showed variation of 25,56  $\mu\text{m}$  x 3,7  $\mu\text{m}$  to 33,92  $\mu\text{m}$  x 3,39  $\mu\text{m}$  and microconidia variation of 6,23  $\mu\text{m}$  x 2,01  $\mu\text{m}$  to 10,3  $\mu\text{m}$  x 3,35  $\mu\text{m}$ , dimension obtained for conidia were with variation for specie. It was observed distinction of three groups for aggressivity, where 15 isolates were considered intermediary aggressivity, eight lower aggressivity isolates. Methods used for genetical diversity showed genetical variability. At molecular analysis was formed five groups considering a genetical distance of 70% and genetical similarity varying of 0,51 to 0,94. At VCG study was observed formation of three groups, but 71% of isolates did not belong none group. Both of techniques determined high genetical diversity and not geographical correlation among isolates of the same area. Species *H. bihai*, *H. psittacorum* cv. Golden Torch, *H. psittacorum* cv. Golden Torch Adrian, *H. rostrata*, *H. stricta* Capri, *H. psittacorum* cv. Sassy and *H. caribea* were considered resistant to Fusarium wilt. Species moderally resistant were *H. latispatha* and *H. wagneriana*. *Heliconia. psittacorum* cv. Alan Carle and *H. chartacea* cv. Sexy Pink were susceptible while *H. stricta* Fire Bird was highly susceptible. Fungal filtrate concentrate in 50 % was the most efficient of resistance distinction and susceptibility on cultivars. In structural mechanisms it was observed that there is not relation between diameter and lignification of celular wall with pathogen resistance, because in some resistant species did not show increase of diameter or lignin accumulation.

## **CAPÍTULO I**

---

---

### **INTRODUÇÃO GERAL**

## INTRODUÇÃO GERAL

### Floricultura

O interesse pela floricultura e plantas ornamentais no Brasil começou na década de 70 e desde esta época ocorreram mudanças bastante significativas no mercado nacional, com uma movimentação financeira em torno de US\$ 1,0 bilhão e crescimento geográfico anual de 6,26% (LAMAS, 2002). Mundialmente movimentam-se cerca de 49 bilhões de dólares correspondentes as fases de produção à entrega ao consumidor (FERREIRA et al., 2002). O consumo de flores de corte apresenta perspectivas de crescimento em torno de 14% nos próximos cinco anos (SEBRAE, 2005). As exportações brasileiras de ornamentais podem crescer de forma expressiva, com previsão de atingir 80 milhões em 2007 (IBRAFLOR, 2005), e os principais consumidores são a Holanda, Inglaterra, Estados Unidos, Itália, Alemanha, França, Japão e Argentina (SEBRAE, 2005).

Com o crescimento do comércio de ornamentais, a floricultura tropical tem destacado-se a nível mundial por possuir características que atraem a atenção dos consumidores. O fluxo internacional gira em torno de US\$ 6,7 bilhões e os principais países exportadores são a Holanda, Colômbia, Itália, Dinamarca, Bélgica, Quênia, Zinabawe, Costa Rica, Equador, Austrália, Tailândia, Israel, EUA (Havai), entre outros (SEBRAE, 2005).

A participação brasileira corresponde a 0,3% do mercado internacional e no contexto estão envolvidos 4 mil produtores de flores e plantas ornamentais produzindo em 6 mil hectares, gerando 120 mil empregos e rendendo cerca de US\$ 800 milhões/ano (SEBRAE, 2005).

No Brasil, a região Nordeste tem recebido atenção especial para esta atividade, principalmente para os estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Ceará que vêm se destacando como maiores produtores. Em levantamento realizado, Pernambuco tem área de produção de flores tropicais em torno de 54,03 ha, o que corresponde a 28,67% do total da floricultura do estado e têm apresentado nos últimos sete anos uma ampliação em torno de 1200% em área plantada, de 5 para 70 ha (SEBRAE, 2005).

Os principais municípios produtores de flores tropicais em Pernambuco são: Ribeirão, Primavera, Água Preta, Moreno, Barra de Guabiraba, Paulista, Camaragibe, Igarassu, Petrolina, Jaboatão dos Guararapes, Paudalho e São Lourenço da Mata. Estes municípios representam cerca de 30% da área cultivada com a atividade da floricultura. À nível nacional, Pernambuco comercializa 70% das flores tropicais. Os segmentos consumidores desta produção são as floriculturas, buffets, decoradores, funerárias, público em geral e feirantes (CASTRO, 1995).

## Espécies de Flores Tropicais Cultivadas

No cultivo comercial das flores tropicais, destacam-se cinco famílias de maior aceitação comercial: Musaceae (*Musa coccinia* Ander., *M. ornata* Ander. e *M. velutina* Ander.), Zingiberaceae (*Alpinia purpurata* Vieill. Schum., *Etilingera elatior* Jack. R.M.Smith e *Zingiber spectabiles* Griff.), Costaceae (*Costus spicatus* Susseng. e *Tapeinochilos ananassae* Hassk.), Marantaceae (*Calathea* spp.) e Heliconiaceae (*Heliconia* spp.).

Dentre as flores tropicais, as helicônias são as mais comercializadas, pois a aceitação pelo consumidor tem aumentado devido a características como a beleza, exotividade, apresentar cores exuberantes, rusticidade, boa resistência ao transporte e a longa durabilidade pós-colheita.

O gênero *Heliconia* atualmente encontra-se como único representante na família Heliconiaceae, existindo cerca de 250 espécies das quais 98% são nativas da América Tropical e 30 nativas do Brasil (LAMAS, 2002). São também conhecidas como bananeira-de-jardim, bico-de-guará, falsa ave do paraíso e paquevira. Existem mais de 450 nomes botânicos para as espécies (BERRY; KRESS, 1991). Algumas espécies têm maior aceitação e procura no mercado consumidor, como as *H. bihai* L., *H. wagneriana* Peters., *H. psittacorum* L., *H. stricta* Huber, *H. rostrata* Ruiz e Pavan, *H. chartacea* Lom. e os híbridos originados das *H. psittacorum* L. x *H. spathocircinata* Aristiguieta.

As helicônias têm origem nas Américas Central e Sul e originalmente pertenciam à família Musaceae, mas em função de suas características peculiares e bem diferenciadas desta família, passou a constituir a família Heliconiaceae.

As helicônias pertencem à ordem Zingiberales, caracterizando-se como plantas herbáceas, rizomatosas, eretas, com porte variando de 0,5 a 10 m de altura, de acordo com a espécie, e apresentando folhas de diversos tamanhos. Possuem pseudocaule, brácteas spatiformes de variados tamanhos, texturas e cores, inflorescências eretas ou pendentes, com brácteas apresentando distribuição em eixos num mesmo plano ou em planos diferentes (CASTRO, 1995). São cultivadas em propriedades que apresentam como características gerais um relevo com topografia suavemente ondulada, solo areno-argiloso, clima tropical e úmido, precipitação pluviométrica em torno de 1700 mm/ano, umidade relativa de 70 a 95% e temperatura média anual em torno dos 25°C (CHAGAS, 2000).

A propagação das helicônias normalmente é feita através de rizomas, no entanto pesquisas vêm sendo desenvolvidas visando à propagação através da cultura de tecidos já está sendo utilizada. O manejo da cultura relaciona-se ao espaçamento que varia de acordo com a espécie e/ou cultivar utilizada, geralmente fica em torno de 1,0 a 1,5 m x 0,3 m e a densidade de plantio normalmente é de três plantas por metro linear. O plantio dos rizomas deve ocorrer, preferencialmente, após a época mais fria do ano em profundidade de 10 cm. A adubação deve seguir as recomendações de acordo com a exigência da cultura e análise química de solo e

geralmente a fórmula NPK usada é 18-6-12. A irrigação para a cultura deve ser abundante, porém evitando-se o encharcamento do solo e os principais métodos utilizados são o gotejamento e aspersão baixa. Os tratos culturais estão relacionados ao replantio após dois anos de plantio e uso de tutoramento às vezes é recomendado (CASTRO, 1995).

O ponto de colheita de cada espécie depende da preferência do mercado consumidor, que geralmente prefere quando a inflorescência apresenta de uma a cinco brácteas expandidas (CHAGAS, 2000).

#### Principais doenças nas helicônias

O desenvolvimento da floricultura tropical na região da mata úmida do Nordeste tem proporcionado maior ocorrência de problemas fitossanitários, devido aos fatores relacionados com precipitação, umidade, temperatura e densidade de plantio e, como conseqüência, há o comprometimento da qualidade do produto. As doenças em helicônias podem ser ocasionadas por diversas classes de fitopatógenos, destacando-se as de natureza fúngica, como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) (Sacc.), *Bipolaris incurvata* (Nisik.) Shoemaker, *Cercospora* sp., *Curvularia lunata* (P.Henn) Meyer, *Cladosporium herbarum* Link. causando manchas foliares, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (E.F.Smith) Sn. & Hansen causando murcha vascular; de natureza bacteriana, como a murcha causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Smith raça 2 e dos nematóides, envolvendo, principalmente, os gêneros *Meloidogyne*, *Helicotylenchus* e *Radopholus* (WARUMBY et al., 2002).

Como a cultura encontra-se em pleno desenvolvimento, existe a necessidade de pesquisas, tanto a nível técnico quanto científico. Ocorrem ainda alguns entraves que impedem que a atividade renda o seu verdadeiro potencial, como a instabilidade da demanda e perspectiva fora do estado, a inexistência de informações que auxiliem um plano estratégico para o desenvolvimento sustentável do setor, a falta de pesquisas tecnológicas que orientem os produtores, a ausência de pontos de vendas aliada ao desconhecimento da população em relação ao produto, o alto custo da implantação e a necessidade de investimento em capacitação para os produtores. Em relação às pesquisas, algumas instituições têm desenvolvido trabalhos que tem auxiliado a atividade, como no caso de ocorrência de doenças e pragas (WARUMBY et al, 2002).

Algumas recomendações de manejo e a utilização de cultivares resistentes podem minimizar os efeitos provocados pelas doenças, destacando-se o plantio em áreas livres da ocorrência da doença, uso de material propagativo sadio, limpeza dos rizomas com a eliminação dos que apresentarem sintomas, análise e correção de pH do solo, plantio em áreas com alto níveis de matéria orgânica, evitar solos mal-drenados, executar controle de nematóides que

possam agravar a doença e inspecionar periodicamente o plantio para erradicar as plantas infectadas (CORDEIRO et al., 2005).

#### A murcha de fusário e o agente causador

Ultimamente tem sido comum a ocorrência da murcha de fusário, o que vem preocupando os produtores, uma vez que esta doença é considerada grave e o controle depende basicamente de utilização de cultivares resistentes. É necessário o estudo da interação *F. oxysporum* f.sp. *cubense* em helicônias, uma vez que todas as estratégias utilizadas para o controle são baseadas em pesquisas realizadas para a cultura da bananeira.

A murcha de fusário é uma doença que possui um comportamento cosmopolita e apresenta ocorrência bastante considerável em várias culturas. Entre estas tem sido detectada em plantios de flores tropicais, afetando algumas espécies de helicônias. A doença é provocada pelo *F. oxysporum* f.sp. *cubense* (teleomorfo desconhecido). Existem duas hipóteses em relação à origem do fungo, a primeira é que teria surgido na Ásia e disperso para a África e Américas através do transporte de rizomas e/ou plantas infectadas, e a segunda hipótese refere-se a origem em várias regiões e que co-evoluíram independentemente. A ocorrência mundial do fungo por enquanto está localizada de 30° N a 30° S, não havendo ainda registros nas Ilhas do Pacífico Sul, Somália e Mediterrâneo (PÉREZ-VICENTE, 2004).

Morfologicamente o fungo apresenta microconídios abundantes, geralmente unicelulares, ovais a reniformes e hialinos. Os macroconídios também são abundantes, fusiformes, falcados, isolados e multicelulares. Os clamidósporos esféricos nas extremidades dos conidióforos ou intercalados nas hifas ou em macroconídios (MENEZES; OLIVEIRA, 1993).

O fungo pode permanecer imóvel no solo ou tecidos vegetais infectados em forma de clamidósporos e são estimulados a germinar por exsudatos de raízes do hospedeiro ou pelo contato com tecido sadio suscetível. Em condições ideais, micélio e conídios são produzidos de 6 a 8 horas após a germinação dos clamidósporos e a formação de novos clamidósporos depois de 2 a 3 dias. São registradas quatro raças diferentes deste fungo, e são caracterizadas através da patogenicidade em cultivares de bananeira. A raça 1 ataca apenas as cultivares Manzano e Gros Michel, a raça 2 a cultivar Bluggoe e a raça 4 infecta plantas da cultivar Cavendish (STOVER; WAITE, 1962). A raça 3 tem sido detectada em helicônias (CORDEIRO et al., 2005), esta classificação dentro da *formae specialis cubense* tem sido questionável, uma vez que ocorrem dissimilaridades entre a hospedeira desta raça, no caso as helicônias e as espécies de *Musa* (PÉREZ-VICENTE, 2004). Em Pernambuco este fungo foi primeiramente detectado em *H. chartacea* cv. Sex Pink, cultivar considerada bastante suscetível (LINS; COELHO, 2003). Em banana, apenas para as raças 1 e 2 tem sido obtido resultados satisfatórios em termo de

resistência, o que se tem observado é que ocorrem diferentes reações a depender da região, da população de *F.oxysporum* f.sp. *cubense*, da pressão de infecção, temperatura do solo e da natureza do material usado em testes artificiais de inoculação (PÉREZ-VICENTE, 2004).

Os sintomas em plantas atacadas iniciam-se de 2 a 5 meses após a infecção e podem ser observados externos e internamente. Como sintoma externo, ocorre o amarelecimento progressivo das folhas mais velhas para as mais novas, iniciando-se dos bordos para a nervura principal. Paralelo a estes sintomas, ocorre murcha com posterior quebra do pecíolo junto ao pseudocaule, observando-se um estreitamento de limbo nas folhas mais novas e engrossamento das nervuras secundárias, ocasionando necrose do cartucho e podendo ainda presenciar-se rachadura do feixe de bainhas próximo ao solo. Como sintomas internos observam-se pontuações pardo-avermelhadas e descoloração vascular ao realizar-se cortes transversais ou longitudinais do pseudocaule ou rizoma (CORDEIRO et al., 2005).

#### Variabilidade em *Fusarium oxysporum*

A resistência à doença vai depender diretamente dos mecanismos envolvidos no processo de defesa da planta e também da variabilidade do patógeno. Esta variabilidade torna-se uma característica importante a ser levada em consideração nos estudos de resistência, uma vez que alguns patógenos possuem uma grande capacidade de variação através de recombinações de genes dentro de uma população proporcionando uma vantagem dos mesmos contra o hospedeiro (LUCAS, 1998). O conhecimento do patógeno é um pré-requisito de extrema importância para o uso estratégico do controle genético, podendo a variabilidade ser estudada pela caracterização morfo-fisiológica, formação de heterocáion ou estudo de compatibilidade vegetativa, análise molécula por RAPD, RFLP, AFLP e ISSR, e agressividade/patogenicidade.

Diante do pouco conhecimento do patossistema *F. oxysporum* f.sp. *cubense* vs helicônia, a avaliação de métodos de inoculação constitui informação básica para estudos de variação no patógeno. Para *Fusarium oxysporum* Snyder & Hans. são conhecidos vários métodos de inoculação na determinação da patogenicidade e agressividade de isolados, como os utilizados nas espécies de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* (E.F.Smith) Snyder & Hansen, *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* Kendrick e Snyder, *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Hans. e *Fusarium oxysporum* Schlecht *cucumerinum* J.H. (BALMAS et al., 2005; QUERINO, 2004; RODRIGUES; COÊLHO, 2004; VAKALOUNAKIS; FRAGKIADAKIS, 1998; WANG et al., 1999; WAITE, 1963). Geralmente o método mais utilizado é o “dipping” ou imersão de raízes em suspensão de inóculo do fungo na concentração de  $1 \times 10^6$  conídios/mL.

Os caracteres morfo-fisiológicos são ferramentas úteis no conhecimento de certos patógenos, ao contrário de certas forma *specialis* de *Fusarium oxysporum*, uma vez que os



mesmos não podem ser distinguidos morforlogicamente devido a grande variação das dimensões das partes características do fungo que são caracterizados por apresentar macroconídios com dimensões variando de 23 – 54  $\mu\text{m}$  x 3 - 4,5  $\mu\text{m}$  e os microconídios de 5 – 12  $\mu\text{m}$  x 2,3 – 3,5  $\mu\text{m}$  (NELSON et al., 1983). Esta incerteza de distinção de *formae specialis* está relacionada a dificuldade de visualização das diferenças existentes nos caracteres morfológicos, e pela probabilidade dos mesmos serem afetados pelo ambiente, podendo ser passíveis de modificações de acordo com o meio de cultura, idade das colônias, condições de incubação, entre outros, o que pode gerar problemas na correta identificação e classificação dos isolados (CERQUEIRA et al., 1999).

Uma técnica bastante utilizada na caracterização de isolados de *F. oxysporum* é o estudo de grupamento por compatibilidade vegetativa (VCG), um método eficiente no estudo de relacionamento entre fungos assexuais, como no caso de *F. oxysporum* f.sp. *cubense*. Foi primeiramente desenvolvido por PUHALLA (1985) com o objetivo de distinguir por características genéticas e não morfológicas ou de patogenicidade as raças de *F. oxysporum*. Consiste no pareamento de mutantes incapazes de utilizarem nitrato como fonte de nitrogênio e a formação do heterocácion. A fusão de hifas de dois mutantes indica que os isolados pertencem a um mesmo grupo de compatibilidade. Cerca de vinte e um VCGs já foram determinados para *F. oxysporum* f.sp. *cubense* e são bastante utilizados em estudos de caracterização genética, são os VCGs 0120, 0121, 0122, 0123, 0124, 0125, 0126, 0127, 0128, 0129, 01210, 01211, 01212, 01213, 01214, 01215, 01216, 01217, 01218, 01219 e 01220. Alguns destes VCGs encontram-se exclusivamente em países ou regiões, como no caso do VCG 01210 presente somente na Flórida e Cuba, o VCG 01220 no oeste Australiano e o VCG 01214 encontrado somente na Malawi (PÉREZ-VICENTE, 2004). Estudos detalhados indicam que isolados de um mesmo grupo de compatibilidade vegetativa tipicamente possuem multilocus muito similares ou até idênticos e possivelmente pertencem a uma mesma linhagem clonal. Por essa razão os VCGs são bons indicadores de similaridade (KISTLER et al., 1998). BENTLEY et al. (1998) analisaram 208 isolados pertencentes a várias regiões e puderam verificar a ocorrência de 100% de similaridade entre os isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* pertencentes a um mesmo VCG. JONES (1995) verificou através de VCGs que isolados da raça 1 e 2 ocorrem em países asiáticos e que os da raça 4 concentram-se no sudoeste Asiático e no triângulo Malásia – Indonésia – Filipinas, onde pôde constatar uma maior diversidade na Malásia e Indonésia devido a ocorrência do grande número de VCGs. A ocorrência de determinadas raças também pode estar relacionada a VCGs. PLOETZ e CORRELL (1988) analisaram isolados oriundos da Austrália, Ilhas Canárias, Honduras, Jamaica, Malásia, Filipinas, África do Sul, EUA e Taiwan e constataram onze VCGs, dos quais seis foram compostos por isolados de uma única raça e cinco grupos possuíam isolados pertencentes a duas raças.

Outra ferramenta importante e que vem se tornando cada vez mais utilizadas é o uso de marcadores moleculares, e por atuarem em função do genoma, podem auxiliar na taxonomia e identificação. Espécies fitopatogênicas apresentando alta variabilidade torna a classificação difícil e muitas vezes o uso de chaves taxonômicas de identificação, tem sido insuficiente para a classificação, surgindo assim necessidade do uso de marcadores genéticos.

Os marcadores moleculares vêm sendo utilizados como ferramenta auxiliar, proporcionando o complemento do estudo de diversidade e ampliando o conhecimento de outros aspectos que não envolvam somente a variação genética. Um dos marcadores moleculares mais utilizados para esta finalidade é o RAPD, que permite a identificação de raças, elucidando alguns aspectos que permitam conhecer melhor a questão evolutiva das espécies, bem como a diferenciação e a caracterização de raças fisiológicas (ALZATE-MARIN et al., 1997).

No Brasil, JESUS et al.(1995) analisaram dez isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* de várias origens por vinte e quatro oligonucleotídeos de RAPD e verificaram um alto polimorfismo, permitindo a distinção de todos os isolados, porém através da análise de similaridade genética não foi possível a separação por região geográfica, além de não ter conseguido a separação dos isolados das raças 1 e 2.

À nível mundial, BENTLEY et al. (1995) conseguiram, por RAPD, a separação de 169 isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* em dois grandes grupos, em isolados oriundos da China, Índia, Tailândia, Filipinas, Malásia e Indonésia. Foram classificados em grupo I, os isolados da raça 4, e grupo II, os isolados das raças 1 e 2. Posterior a este trabalho, os mesmos autores (BENTLEY et al., 1998), com o auxílio de RAPD, verificaram similaridade genética de 100% entre os isolados de um mesmo VCG e que entre VCGs a similaridade apresentou variação de 53% a 99%. Ainda neste trabalho, os autores utilizaram alguns isolados da raça 3 e observaram a distinção dos mesmos em um grupo distinto dos demais.

Marcadores genéticos baseados em polimorfismo do DNA têm sido utilizados com sucesso na diferenciação de espécies de vários fitopatógenos e entre as vantagens apresentadas com o uso, destacam-se a rapidez e precisão na detecção, a confiabilidade e o fato de não serem influenciados pelas condições ambientais (FALEIRO et al., 2003). A utilização tem aumentado a cada ano, exercendo papel de ferramenta complementar para o estudo da diversidade em virulência e possibilitando o conhecimento dos outros aspectos da diversidade genética dos fitopatógenos.

Após o advento do RAPD e RFLP, o uso de primers de microssatélites “inter simple sequence repeat” (ISSR) é outra técnica que vem sendo utilizada. Em substituição aos outros métodos, apresentam vantagem de ser mais eficiente, oferecer um menor custo e determinar um alto grau de polimorfismo, além de ter alta reprodutibilidade. Esta técnica tem sido bastante aplicada em estudos de genética de populações e biologia evolucionária de muitos organismos, incluindo as espécies fúngicas (BALMAS et al., 2005; MISHRA et al., 2004; MISHRA et al.,

2003; ZHOU et al., 2001) e espécies vegetais como cultivares resistentes a diversos patógenos (AL-HUMAID et al., 2004; RUAS et al., 2003).

A agressividade do patógeno também é bastante utilizada na caracterização da diversidade de *F. oxysporum*, este método deve servir como mais uma alternativa, uma vez que a mesma também pode ser influenciada por variáveis como temperatura, idade do hospedeiro e até o método de inoculação empregado (KRAFT; HAGLUND, 1978).

Um dos trabalhos que constataram variação na agressividade de isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* foi realizado por WAITE (1977) que verificou após inoculação de doze isolados das raças 1 e 2 nas cultivares de banana ‘Gros Michel’ e ‘Bluggoe’, um espectro da severidade da doença variando de leve a severo.

O conhecimento da diversidade genética da população do patógeno é um importante elemento para os programas de melhoramento genético de plantas que visam resistência às doenças, pois gera informação sobre o nível e distribuição da variabilidade genética dos isolados existentes em uma população ou região. Populações de fungos com alto nível de diversidade genética são difíceis de controlar, uma vez que podem adaptar-se mais rapidamente a qualquer medida de controle, seja química ou através da introdução de hospedeiro resistente (CARLIER et al., 2003). Outros fatores, tais como a natureza de dispersão do patógeno e seleção imposta pelo hospedeiro resistente, também podem influenciar a variabilidade genética encontrada na população dos patógenos.

#### Fontes de resistência

A utilização em plantios comerciais de espécies ou cultivares resistentes é a medida mais eficiente e econômica para o controle da murcha de fusário. No estudo de caracterização de fontes, é necessário o conhecimento do patossistema para induzir a doença em simulações artificiais, utilizando-se métodos eficientes e confiáveis de inoculação para a reprodução dos sintomas. Sem a padronização da metodologia é possível a ocorrência de falhas referentes à reação da resistência de cultivares e espécies (CAVALCANTI et al., 2002). Ainda não há pesquisas envolvendo espécies de helicônia em relação à resistência a murcha de fusário, em compensação, o estudo da doença na cultura da bananeira apresenta mais resultados, inclusive com alguns órgãos de pesquisas trabalhando neste sentido. PÉREZ et al.(2003) constataram através de inoculação artificial de isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* de três diferentes VCGs que as cultivares de banana FHIA 02 e FHIA 04 apresentaram resistência, enquanto as cultivares Paka, Pisang awak, Pisang lilin e Yangambi foram altamente suscetíveis. Novas tecnologias têm sido geradas para acelerar as pesquisas no melhoramento genético das plantas, como seleção *in vitro* de materiais resistentes (PÉREZ, 1997), o uso de filtrados e toxinas de colônia fúngicas na caracterização da resistência e suscetibilidade de plantas (MATSUMOTO et

al., 1995; COMPANIONI et al., 2003) e as inoculações de discos de colônias fúngicas em partes destacadas de plantas (SILVA et al., 2002; CASTRO et al., 2006). Estas novas técnicas promovem a rapidez de resultados e redução de espaço e estrutura física utilizados nas pesquisas.

O controle genético é considerado o mais econômico e de fácil adoção, mas o seu sucesso está relacionado ao uso de fontes de resistência em programa de melhoramento de plantas, que devem ser regionalizados. Esta preocupação já tem sido constatada em estudos de fontes de resistência à *F. oxysporum* f.sp. *cubense* em bananeira, onde observa-se que ocorrem reações diferenciadas de acordo com a região, em dependência da população fúngica, da pressão de infecção, temperatura do solo e da natureza do material vegetal utilizado nos testes com inoculação artificial. Como exemplo SMITH et al.(1998) verificaram que quando o material é proveniente de cultura de tecidos apresentam uma maior suscetibilidade ao patógeno (PÉREZ-VICENTE, 2004). No melhoramento visando resistência genética é necessária a identificação de fontes de resistências e incorporação desta resistência identificada em cultivares comerciais com o auxílio dos métodos clássicos e/ou moleculares de melhoramento (BRIOSO et al., 2002) e por fim, a utilização de estratégias no uso de cultivares resistentes para que o objetivo do controle possa ser mais eficiente e duradouro.

#### Uso de filtrados fúngicos e toxinas na identificação de resistência

As micotoxinas são substâncias produzidas pelos patógenos que provocam distúrbios no metabolismo celular dos vegetais prejudicando o processo fisiológico. Agem diretamente sobre o protoplastos, matando as células vegetais. Apresentam diferentes famílias, podem afetar inúmeras espécies, possuem múltiplas formas e potenciais diferenciados. São eficientes quanto a toxicidade em baixas concentrações e seu modo de ação afetam a permeabilidade da membrana celular, inativação e/ou inibição enzimática (AGRIOS, 2005).

Dentre os compostos produzidos estão incluídos os polipeptídeos, glicoproteínas, derivados de aminoácidos, terpenóides, esteróis e quinonas. A atuação destes compostos ainda está sendo elucidada, mas é importante que a toxina possa ser detectada em plantas doentes, que induza sintomas típicos da doença e que a produção da toxina esteja correlacionada com a agressividade e patogenicidade do isolado (DUARTE; ARCHER, 2003).

Algumas toxinas podem afetar várias espécies de vegetais, sendo denominadas de não-específicas ou não-seletivas, independentes das espécies afetadas serem ou não hospedeiras do referido patógeno. Ao contrário das não-específicas, estão as específicas que possuem a exclusividade dos efeitos tóxicos a determinados hospedeiros. Em geral causam manchas, amarelecimentos, necroses e queimas foliares. As específicas estão relacionadas a patogenicidade dos microrganismos, enquanto as não-específicas estão relacionadas a

agressividade do patógeno, como é o caso do ácido fusárico produzido por *Fusarium oxysporum* (BLUM et al., 2006).

O maior objetivo na utilização de novas tecnologias, como o uso de extratos e ácidos produzidos por fungos tem sido a preconização de resultados. MATSUMOTO et al. (1995) cultivaram plântulas de bananeira das cultivares maçã e nanicão em meio de cultivo contendo determinada concentração de ácido fusárico produzido por *F. oxysporum* f.sp. *cubense* e puderam constatar o início dos sintomas após duas semanas de inoculação, onde verificaram a distinção das reações de suscetibilidade e resistência de acordo com os padrões utilizados. COMPANIONI et al.(2003) utilizaram três diferentes concentrações do filtrado derivado de colônias de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* na inoculação em folhas destacadas de bananeira das cultivares suscetível ‘Gros Michel’ e resistente FHIA 01 e após 48 horas de incubação foram verificados o surgimento de lesões na superfície das folhas da ‘Gros Michel’, ao contrário da cultivar resistente.

O uso de extratos e ácidos fúngicos pode proporcionar uma técnica mais rápida e não destrutiva, apresentando vantagens como desperdício menor de tempo, necessidade de menor espaço físico na condução dos experimentos e até economia de dinheiro, uma vez que durante alguns experimento conduzidos em campo e casa de vegetação, existem a necessidade de algumas práticas de manejo a depender do tempo de condução.

#### Mecanismos estruturais

Na defesa das plantas ao ataque de patógenos, após o processo de reconhecimento, ocorre uma série de eventos que trazem como consequência a resistência (AGRIOS, 2005). Além da atuação dos mecanismos bioquímicos, ocorrem os mecanismos estruturais que atuam como defesas físicas, evitando ou restringindo o desenvolvimento da doença. As estruturas podem fazer parte da planta ou ser produzida em resposta à infecção sendo resultantes de processos bioquímicos (LEITE; PASCHOLATI, 1995).

Os mecanismos estruturais envolvem formações e alterações ao nível de tecido vegetal e que podem ser divididas em pré-formados ou constitutivos, que são as cutículas, tricomas, estômatos e fibras, e os pós-formados ou induzidos, que são as papilas, halos, lignificação, camada de cortiça e tiloses (AGRIOS, 2005). A lignificação é uma das principais reações de defesa onde a formação da barreira física impede a atuação de enzimas e toxinas produzidas pelos patógenos (LEITE; PASCHOLATI, 1995). Este processo é iniciado a partir de uma longa rota, iniciando-se com a fenilalanina amônia liase (PAL) e também pela atuação das peroxidases que através da condensação também pode ser formadora de lignina (FERNANDES, 1998).

DE ASCENSÃO e DUBERY (2000) verificaram diferentes respostas quanto à lignificação na interação bananeira vs. *F.oxysporum* f.sp. *cubense*, onde a cultivar resistente

‘Goldfinger’ apresentou um grande acúmulo de lignina na parede celular após a ativação enzimática da peroxidase, reforçando a barreira física em resposta ao patógeno elicitador, enquanto na cultivar suscetível ‘Williams’ a ativação enzimática e a lignificação foram consideradas fracas.

Outros trabalhos envolvendo diferentes espécies de *F. oxysporum* também demonstraram a importância dos mecanismos estruturais na resistência, tanto em relação à interação patógeno-hospedeiro, quanto a utilização de produtos indutores de resistência. REDMAN et al. (1999) constataram um aumento considerável de lignina na interação *Cucumis melo* L. vs. *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* (E.F.Smith) Snyder & Hansen. SHI et al. (1991) verificaram a ocorrência de oclusão de vasos contribuindo na restrição do fungo, observado no patossistema algodão (*Gossypium hirsutum* L.) vs. *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder and Hansen. RODRIGUES (2003) observaram que o uso de quitosana como indutor de resistência no patossistema [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] vs. *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* proporcionou um maior acúmulo de lignina.

Atualmente, os mecanismos, tanto estruturais quanto bioquímicos, envolvidos na resistência do hospedeiro ao ataque de patógenos, vêm se destacando nas pesquisas em função das perspectivas no conhecimento da interação ocorrida e ampliando o entendimento da resistência genética, que para certas doenças tem sido a única alternativa de controle.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. Plant Pathology, 5<sup>th</sup> ed., Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 922p.
- AL-HUMAID, A. L. et al. Detection of genetic variation and *Fusarium* resistance in turfgrass genotypes using PCR-based markers (SIR and SCAR). Journal of Food, Agriculture & Environment, Heverlee, v. 2, p. 225-229, 2004.
- ALZATE-MARIN, A. L. et al. Análise da diversidade genética de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões do Brasil por marcadores RAPD. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 22, p. 85-88. 1997.
- BALMAS, V. et al. Molecular characterization of vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and f. sp. *lycopersici* by random amplification of polymorphic DNA and microsatellite-primed PCR. European Journal of Plant Pathology, Dordrecht, v. 111, p. 1-8, 2005.
- BENTLEY, S.; PEGG, K. G.; DALE, J. L. Optimization of RAPD-PCR fingerprinting to analyze genetic variation within populations of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. Journal of Phytopathology, Berlin, v. 142, p. 64-78, 1995.
- BENTLEY, S. et al. Genetic variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* analyzed by DNA fingerprinting. Phytopathology, Saint Paul, v. 88, p. 1283-1293. 1998.
- BERRY, F.; KRESS, W. J. Heliconia: an identification guide. Washington: Smithsonian Institution Press. 1991. 334 p.
- BLUM, L. E. B.; CARES, J. E.; UESUGI, C. H. Fitopatologia: o estudo das doenças de plantas. 1. ed. Brasília, 2006, 256 p.
- BRIOSO, P. S. T.; POZZER, L.; MONTANO, H. G. Uso atual e futuro da biologia molecular na fitopatologia. Parte II – Diversidade de aplicação. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, v. 10, p. 67-110, 2002.

COMPANIONI, B. et al. Use of culture-derived *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, race 1 filtrates for rapid and non destructive in vitro differentiation between resistant and susceptible clones of field-grown banana. *Euphytica*, Wageningen, v. 130, p. 341-347, 2003.

CARLIER, J. et al. Genetic differentiation in *Mycosphaerella* leaf spot pathogens. In: Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San Jose, 2002, Costa Rica. *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook, Montpellier, INIBAP, p. 123-129, 2003.

CASTRO, C. E. F. Helicônia para exportação: aspectos técnicos da produção. Brasília: EMBRAPA, 1995. 43 p.

CASTRO, N. R.; SERRA, I. M. R. S; COÊLHO, R. S. B.; LARANJEIRA, D. Patogenicidade de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* em *Heliconia* spp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 39., 2006, Salvador. Resumo...Salvador, 2006. p.S140.

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

CERQUEIRA, A. O.; LUZ, E. D. M. N.; ROCHA, C. S. S. Caracterização morfológica e biométrica de alguns isolados de *Phytophthora* spp. da micoteca do Centro de Pesquisas do Cacau. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 24, p. 114-119, 1999.

CHAGAS, A. J. C. Floricultura tropical na zona da mata de Pernambuco, Recife, SEBRAE, 2000.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. Doenças Da Bananeira. In: KIMATI, H. et al. Manual de Fitopatologia, 5. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005, v. 2, p. 99-117.

DE ASCENSÃO, A. R. D. C. F.; DUBERY, I. A. Panama disease: cell wall reinforcement in banana roots in response to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race four. *Biochemistry and Cell Biology*, v. 90, p. 1173-1180, 2000.

DUARTE, M. de L. R.; ARCHER, S. A. In vitro toxin production by *Fusarium solani* f.sp. *piperis*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 28, p. 229-235, 2003.



FERNANDES, C. F. Estudo da atividade peroxidásica em folhas primárias de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Vita 3. 1998, 65 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.

FERREIRA, A. et al. Diagnóstico da floricultura Pernambucana. In: FLORICULTURA PERNAMBUCANA, Recife: Sebrae, 2002. p. 21-59.

FALEIRO, F. G. et al. Uso de marcadores RAPD na classificação de isolados de *Phytophthora* spp. causadores da podridão parda do cacauzeiro no Brasil. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 28, p. 312-315, 2003.

IBRAFLO. Instituto Brasileiro de Floricultura. Disponível em:

< <http://www.ibraflor.com.br> > Acesso em: 14/10/2006.

JESUS, J. D. E. et al. Uso de marcadores RAPD no estudo de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. Magistra, Cruz das Almas, v. 7, 1995. (Resumo).

JONES, D. R. The characterization of isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* from Ásia. Infomusa, Montpellier, v. 4, p. 3-4, 1995.

KISTLER, H. C. et al. Systematic numbering of vegetative compatibility groups in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. Phytopathology, Saint Paul, v. 88, p. 30-32, 1998.

KRAFT, J. M.; HAGLUND, W. A. A reappraisal of the race classification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*, Phytopathology, Saint Paul, v. 68, p. 273-275, 1978.

LAMAS, A. da M. Floricultura Tropical – técnicas de cultivo. Recife: SEBRAE, 2002. 90 p.

LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F. Hospedeiro: alterações fisiológicas induzidas por fitopatógenos. In: KIMATI, H. et al. Manual de Fitopatologia, 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 417-453.

LINS, S. R. O.; COELHO, R. S. B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 29, p. 332-335, 2004.

LUCAS, J. A. Plant pathology and plant pathogens. 3. ed. London: Blackwell Science, 1998. 274 p.

MATSUMOTO, K. et al. Race 1 fusarium wilt tolerance on banana plants selected by fusaric acid. *Euphytica*, Wageningen, v. 84, p. 104-112, 1995.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. A. Fungos fitopatogênicos. Recife: Imprensa Universitária da UFRPE. 1993. 275 p.

MISHRA, P. K.; FOX, R. T. V.; CULHAM, A. Inter simple sequence repeat and aggressiveness analyses revealed high genetic diversity, recombination and long range dispersal in *Fusarium culmorum*. *Annals of Applied Biology*, Warwick, v. 143, p. 291-301, 2003.

MISHRA, P. K. et al. Molecular genetic variation and geographical structuring in *Fusarium graminearum*. *Annals of Applied Biology*, Warwick, v. 145, p. 299-307, 2004.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. *Fusarium* species an illustrated manual for identification, Pennsylvania: The Pennsylvania State University Press. 1983, 193 p.

PÉREZ, L. et al. *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* in Cuba: reaction of cultivars and biocontrol. In: International Symposium on Fusarium wilt on banana, 2., 2003, Salvador. Anais...Salvador, 2003. p. 22-26.

PÉREZ, J. Use of biotechnology in genus *Musa* spp. Simposio Internacional sobre platanera en los subtrópicos. Puerto de La Cruz, Islas Canárias, p. 99, 1997.

PÉREZ-VICENTE, L. Fusarium wilt (Panama disease) of bananas: an updating review of the current knowledge on the disease and its causal agent. In: REUNIÓN INTERNACIONAL ACORBAT, 16., 2004. p.1-15.

PLOETZ, R. C.; CORRELL, J. C. Vegetative compatibility among races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Plant Disease*. Saint Paul, v. 72, p. 325-328, 1988.

PUHALLA, J. E. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compability. *Canadian Journal of Botanic*, Ottawa, v. 63, p. 179-183, 1985.

QUERINO, C. M. B. Resistência induzida e interação entre indutores abióticos e *Gigaspora margarita* no controle do mal-do-Panamá em cultivares de bananeira. 2004, 78 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal Rural de Recife, Recife, 2004.

REDMAN, R. S. et al. Biochemical analysis of plant protection afforded by a nonpathogenic endophytic mutant of *Colletotrichum magna*. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 119, p. 795-804, 1999.

RODRIGUES, A. A. C.; COELHO, R. S. B. Murcha de fusário do caupi: métodos de inoculação, reação de germoplasma e controle genético da resistência. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 30, p. 23-30, 2004.

RODRIGUES, A. A. C. Resistência de caupi a *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*: avaliação de germoplasmas, indução de defesa e caracterização de mecanismos bioquímicos, estruturais a análise da capacidade funcional do xilema. 2003, Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2003.

RUAS, P. M. et al. Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (inter-simple sequence repeat) markers. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 26, p. 319-327, 2003.

SEBRAE AGRONEGÓCIOS. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Brasília: Gráfica Ipiranga, 2005.

SHI, J.; MUELLER, W. C.; BECKMAN, C. H. Ultrastructural responses of vessel contact cells in cotton plants resistant or susceptible to infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 38, p. 211-222, 1991.

SILVA, R. D. C.; MENDES, M. A. S.; TENENTE, R. C. V. Testes de virulência de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* em rizomas de bananeira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 35., 2002, Recife. Resumo...2002. p. S199.

SMITH, M. K. et al. Micropropagated banana are more susceptible to *Fusarium* wilt than plants grown from conventional material. *Australian Journal of Agriculture and Research*, Adelaide, v. 49, p. 1133-1139, 1998.

STOVER, R. H.; WAITE, B. H. Studies on *Fusarium* wilt of bananas. VI Variability and the cultivar concept in *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. Canadian Journal of Botany, Ottawa, v. 38, p. 985-994, 1962.

VAKALOUNAKIS, D. J.; FRAGKIADAKIS, G. A. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber: differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility, and RAPD fingerprinting. Phytopathology, Saint Paul, v. 89, p. 161-168, 1998.

WAITE, B. H. Inoculation studies and natural infection of banana varieties with races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. Plant Disease Report, Saint Paul, v. 61, p. 15-19, 1977.

WAITE, B. H. Wilt of *Heliconia* spp. caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 3. Tropical Agriculture, Trinidad, v. 40, p. 299-305, 1963.

WANG, B.; DALE, M. L.; KOCHMAN, J. K. Studies on a pathogenicity assay for screening cotton germplasms for resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* in the glasshouse. Australian Journal of Experimental Agriculture, Adelaide, v. 39, p. 967-974, 1999.

WARUMBY, J. F.; COÊLHO, R. S. B.; LINS, S. R. O. Principais doenças e pragas em flores tropicais no estado de Pernambuco, Recife: SEBRAE, 2004. 98 p.

ZHOU, S.; SMITH, D. R.; STANOSZ, G. R. Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using inter simple or short sequence repeat (ISSR) fingerprinting. Mycology Research, Cambridge, v. 105, p. 919-926, 2001.

## CAPÍTULO II

---

---

**Ocorrência da Murcha de Fusário em *Heliconia* spp., Métodos de Inoculação, Caracterização Morfológica e Agressividade de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense***

**Ocorrência da murcha de fusário em *Heliconia* spp., métodos de inoculação,  
caracterização morfológica e agressividade de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense***

Neilza Reis Castro<sup>1\*\*</sup>, Rildo Sartori Barbosa Coêlho<sup>2</sup>, Delson Laranjeira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Departamento de Agronomia/Fitossanidade, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil, e-mail: neilzacaastro@gmail.com

<sup>2</sup>Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA. Sede, CEP 50761-000, Recife, PE, Brasil

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco. Bolsista CNPq

Trabalho desenvolvido com apoio da FACEPE/PROMATA.

Data de chegada:

Aceito para publicação em:

Autor para correspondência: Neilza Reis Castro

---

RESUMO

Castro, N.R.; Coelho, R.S.B; Laranjeira, D. Ocorrência da murcha de fusário em *Heliconia* spp., métodos de inoculação, caracterização morfológica e agressividade de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Summa Phytopathologica*

A murcha de fusário, causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, vem sendo diagnosticada em áreas produtoras de helicônias, uma das plantas mais apreciadas dentro da

floricultura tropical. Os objetivos deste trabalho foram verificar a ocorrência da doença nas propriedades produtoras de flores tropicais nos estados de Pernambuco, Alagoas e Sergipe, avaliar a eficiência de métodos de inoculação, caracterizar morfológicamente e quanto à agressividade os isolados obtidos. Foram realizadas visitas à vinte e oito propriedades, onde foram coletados materiais vegetais com sintomas característicos da doença, para obtenção dos isolados. Os métodos de inoculação testados foram o de injeção com 10 mL da suspensão fúngica no colo de plantas suscetíveis *Heliconia psittacorum* cv. Alan Carle, deposição de 20 mL da suspensão no solo pela técnica de “meia lua” e “dipping” utilizando-se dois períodos de tempo de imersão das raízes (30 e 60 minutos). A avaliação da agressividade dos isolados foi realizada pela inoculação de discos da colônia do fungo em colmos destacados da planta, que ficaram em condição de câmara úmida por cinco dias. Os resultados deste trabalho revelaram que em 88% das propriedades visitadas já apresentavam a ocorrência da murcha do fusário de onde se obtiveram trinta e um isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense*. Na metodologia de inoculação, o método de injeção foi o mais eficiente, reproduzindo os sintomas característicos da doença em menor espaço de tempo, aos trinta e seis dias após a inoculação. A caracterização morfológica indicou a variação dentro dos padrões de dimensões permitidos para a espécie e apresentaram variação de 25,56 x 3,37 µm a 33,92 x 3,39 µm para os macroconídios, enquanto que para os microconídios, as variações foram de 6,23 x 2,01 µm a 10,3 x 3,35 µm. Quanto a agressividade, oito isolados foram agrupados como os de maior agressividade, quinze apresentando agressividade intermediária e oito isolados como os de menor agressividade. Estudos como estes são importantes diante do pouco conhecimento do patossistema *F. oxysporum* f.sp. *cubense* vs. *Heliconia* spp.

Palavras-chave adicionais: ocorrência, morfologia, inoculação, agressividade

## ABSTRACT

Castro, N.R.; Coelho, R.S.B; Laranjeira, D. Occurrence of *Fusarium* wilt in *Heliconia* spp., inoculation methods, morphological characterization and aggressivity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Summa Phytopathologica*

*Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, have been observed in production fields of heliconias flower, one of the most appreciate plants in tropical flowers culture. The objectives of this work were verify disease occurrence in production fields of tropical flowers in states of Pernambuco, Alagoas and, Sergipe, Brazil, evaluate efficiency or inoculation methods, morphological and severity characterization for obtained isolates. It was realized periodic visits in eight fields production, and was collected parts of plants with diseases symptoms, for isolates obtention. Inoculation methods tested were injection with 10mL of fungi suspension on botton of susceptible *Heliconia psittacorum* cv. Alan Carle plants, deposition of 20Ml of suspension on soil by “meia lua” technique and “dipping” using two different times of roots immersion (90 and 60 min). Evaluation of isolates agressivity was realized by inoculation of mycelium disks on colms, detached of plant, incubated at humid chamber for five days. Results of this work showed that 88% of visited fields production have *Fusarium* wilt, being collected 31 isolates of *Foc*. At incubation methods, injection was more efficient, reproducing typical symptoms in lower time, 36 days after inoculation. Morphological characterization indicated variation among considering patterns of dimension available for species and showed variation of de 25,56 x 3,37  $\mu$ M until 33,92 x 3,39  $\mu$ M for macroco de 25,56 x 3,37  $\mu$ M a 33,92 x 3,39  $\mu$ M for macroconidias, while for microconidias, variation were of 6,23 x 2,01  $\mu$ M a 10,3 x 3,35  $\mu$ M. For agressivity, eight isolates were grouped with higher aggressivity, 15 with intermediary agressivity and eight isolates with lower agressivity. Studies like those are important because lower knowledge of *Foc* vs. *Heliconia* spp pathossystem.

Additional keywords: occurrence, morphology, inoculation, agressivity.

---



*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyd. & Hans., agente causal da murcha de fusário, é um patógeno habitante de solo, de ocorrência comum em regiões de cultivo da bananeira e detectados também nos cultivos de flores tropicais, mais precisamente em *Heliconia* spp. Provoca sintomas como amarelecimento progressivo nas folhas mais velhas, murcha com posterior quebra do pecíolo da folha e pontuações pardo-avermelhadas no pseudocaule e rizoma. A obstrução vascular evolui e pode causar a morte da planta (3).

Este patógeno apresenta uma grande capacidade de sobrevivência no solo dificultando o controle da murcha, que basicamente só é feito através do uso de cultivares resistentes, e para isso, o conhecimento da morfologia, agressividade do patógeno e metodologia de inoculação são de grande importância.

De acordo com Stover et al (13) são conhecidas quatro raças de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, distinguidas através de cultivares diferenciadoras. As raças 1, 2 e 4 atacam as cultivares de bananeira “Gros Michel”, “Bluggoe” e “Cavendish” e a raça 3 especificamente infecta espécies de helicônia. A raça 3 vem despertando questionamentos por ser considerada dentro da *formae specialis cubense* apesar da dissimilaridade genética entre as hospedeiras do gênero *Musa* e *Heliconia*. Nas helicônias, o fungo foi primeiramente reportado na Costa Rica em estudos realizados com a murcha bacteriana, subseqüentemente diagnosticado em plantas originadas em Honduras, Costa Rica, Panamá e Colômbia na década de 60 (18). Atualmente a murcha de fusário vem sendo detectada nas áreas produtoras de flores tropicais no Brasil, principalmente no Nordeste, uma vez que a atividade vem se tornando importante economicamente. Alguns levantamentos prévios já haviam detectado a ocorrência da doença em algumas propriedades em Pernambuco (6).

Diante do pouco conhecimento do patossistema, a avaliação de métodos de inoculação e o estudo de agressividade são itens importantes no processo, uma vez que para *Fusarium oxysporum* Snyd. & Hans. são conhecidos vários métodos de inoculação na determinação da patogenicidade e agressividade de isolados. A busca por uma metodologia eficiente e confiável visa promover o estabelecimento do patógeno e desenvolvimento da doença possibilitando identificação de fontes promissoras para o melhoramento genético das culturas, visando

resistência à doenças. Diferentes métodos de inoculação para *F. oxysporum* vêm sendo utilizados para avaliar a patogenicidade, como nas espécies de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* (E.F.Smith) Snyder & Hansen, *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* Kendrick e Snyder, *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyd. & Hans. e *Fusarium oxysporum* Schlecht *cucumerinum* J.H. (2, 10, 11, 16, 19, 20). Geralmente o método mais utilizado é o “dipping” ou imersão de raízes em suspensão de inóculo do fungo na concentração de  $1 \times 10^6$  conídios/mL.

O conhecimento morfológico de isolados fúngicos torna-se outra etapa importante no processo inicial das pesquisas de qualquer patossistema, onde é permitida a identificação ao nível de gênero ou espécie (8).

Diante do pouco conhecimento do patossistema *Heliconia* spp. x *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, o objetivo do trabalho foi determinar a ocorrência da murcha de fusário em propriedades produtoras de flores tropicais, avaliar métodos de inoculação, verificar os caracteres morfológicos e caracterizar quanto à agressividade dos isolados do patógeno.

## MATERIAL E MÉTODOS

Ocorrência da murcha de fusário em *Heliconia* spp e obtenção de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*

Foram realizadas coletas em vinte e oito propriedades produtoras de flores tropicais nos estados de Pernambuco, Alagoas e Sergipe no período de março a junho de 2004. Materiais vegetais apresentando sintomas característicos da doença foram coletados e levados ao laboratório para os procedimentos de isolamento. Fragmentos de rizomas e pseudocaule foram desinfestados, colocados em placas de Petri contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar) e incubados por 4 dias em alternância luminosa, sob condições ambientais até o surgimento das colônias características do fungo. Após a confirmação do agente causal, pela observação microscópica, os isolados foram transferidos para tubos de ensaio contendo BDA.

#### Estudo de métodos de inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*

Foram utilizadas neste estudo plantas de *Heliconia psittacorum* L. x *Heliconia spathocircinata* Aristigueta cv. Alan Carle com 45 dias de idade. A suspensão de conídios foi preparada a partir de colônias fúngicas aos sete dias de cultivo. A concentração usada foi de  $10^6$  con/ml, preparada após a raspagem das colônias e filtragem em gaze, sendo ajustada com auxílio de câmara de Newbauer. Foram utilizados os seguintes métodos de inoculação: a) injeção no volume de 10 mL de suspensão no colo da planta; b) imersão ou “dipping” de raízes em suspensão fúngica por 30 minutos; c) imersão ou “dipping” de raízes em suspensão fúngica por 60 minutos; d) deposição de suspensão em solo ou “meia lua” no volume de 20 mL de suspensão por planta; e, e) testemunha não inoculada. O experimento foi inteiramente casualizado com 4 repetições. A avaliação dos métodos foi realizada aos 40 dias após a inoculação, com base em escala de notas variando de 1 a 6, onde 1 = plantas saudáveis, sem sintomas externos ou internos observáveis no caule cortado; 2 = vasos com descoloração na região do primeiro internódio sem outros sintomas visíveis; 3 = vasos com descoloração até a altura da primeira folha, com pelo menos uma folha apresentando amarelecimento; 4 = vasos com descoloração até a metade do comprimento do pseudocaule, com 2 ou mais folhas apresentando amarelecimento; 5 = vasos com descoloração até próximo a folha “vela”, maioria das folhas murchas, com exceção do ponteiro; e, 6 = plantas mortas, ou com vasos com descoloração total e folhas murchas até o ponteiro (15). Os dados foram transformados em raiz ( $x+0,5$ ) e analisados estatisticamente através do programa Statistic e as diferenças estatísticas entre as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p=0,05$ ).

#### Caracterização morfológica dos isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*

Os isolados armazenados em tubos de ensaio foram transferidos para placas de Petri contendo BDA e cultivados por sete dias, sob alternância luminosa e em temperatura ambiente. Posteriormente foram cultivados por cinco dias em microcultura, que consistiu na incubação do

fungo em discos de ágar sobre lâminas cobertas por lamínulas e sob condições de câmara úmida. Ao final do período de incubação, as lamínulas foram retiradas, coradas com azul de Amann e observadas em microscópio óptico, com aumento de 40 x, utilizando-se a ocular micrométrica anteriormente calibrada. Foram realizadas medidas de comprimento e largura de 50 macroconídios e 50 microconídios por isolado de *F.oxysporum* f.sp. *cubense*.

#### Agressividade de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*

Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo BDA por sete dias sob alternância luminosa em condições ambientais. Colmos de plantas de helicônia da cultivar Alan Carle foram desinfestados em hipoclorito de sódio a 1,5%, perfurados e inoculados com discos de micélios (6 mm) retirados das colônias jovens do fungo. Os colmos foram incubados em bandejas sob condição de câmara úmida por cinco dias. Avaliação foi feita baseada na escala de nota proposta por Cordeiro et al. (3). O experimento foi inteiramente casualizado com nove repetições e analisado estatisticamente pelo teste de agrupamento de Scott-Knot ( $p=0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A murcha de fusário em helicônia foi constatada em 88% das propriedades visitadas, o que corresponde a vinte e quatro propriedades produtoras de flores tropicais. Foram obtidos trinta e um isolados, dos quais vinte e três isolados do estado de Pernambuco (propriedades localizadas nos municípios de Paulista, Camaragibe, Goiana, Paudalho, Cabo de Santo Agostinho e Ribeirão), sete isolados das Alagoas (municípios de Rio Largo, Paripueira e Marechal Deodoro) e um isolado de Sergipe (município de Boquim). As espécies de helicônias envolvidas no patossistema foram *H. psittacorum* L. cv. Alan Carle, *Heliconia stricta* Huber cv. Tagami, *Heliconia wagneriana* Peters, *Heliconia chartacea* Lom. cv. Sexy Pink e *Heliconia orthotricta* L. Andersson cv. Eclipse Total. Neste trabalho, a maioria das espécies de helicônia infectadas com *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, pertenciam a cultivar Alan Carle, já detectada como hospedeira por Lins et al.(6) quando relataram a ocorrência de doenças em plantas ornamentais

em Pernambuco nos anos de 2001 e 2002. No trabalho foi constatada a freqüência do patógeno em torno de 10% em 15 propriedades visitadas. O confronto deste resultado com o observado nesta pesquisa evidenciam aumento considerável na ocorrência da doença, provavelmente em consequência da ampliação da atividade e da comercialização de materiais propagativos contaminados. A nível mundial, há apenas relatos da ocorrência da murcha de fusário na Costa Rica, em espécies de *Heliconia caribaea* Lam. (18) e, também, na Austrália em *H. chartacea* (1).

#### Inserir Tabela 1

Sobre os métodos de inoculação testados, constatou-se que o de injeção foi o mais eficiente, apresentando sintomas característicos da doença em menor espaço de tempo, diferenciando estatisticamente dos demais. Este resultado sugere mais um método alternativo e eficiente de inoculação para o patógeno em questão, uma vez que a maioria dos trabalhos de inoculação com outras espécies de *Fusarium*, indicam a utilização do “dipping” de raízes, como exemplo, *F. oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*, *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli*, *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* e *F. oxysporum cucumerinum* (2, 11, 16, 20). A preferência do método de “dipping” pode estar relacionada à reduzida dimensão do caule das plantas, o que dificulta a aplicação com agulha hipodérmica. Divergindo do resultado obtido neste trabalho, o método de injeção não foi eficiente para outras espécies fúngicas como verificado em estudos de patogenicidade de *Fusarium subglutinans* (Wollen & Reinking) na base de folhas destacadas de abacaxizeiro e *Diaporthe phaseolorum meridionalis* Morgan-Jones em plantas de soja (5, 12).

#### Inserir Tabela 2

Referente a caracterização morfológica foi observada, em oito isolados, maior quantidade de microconídios que macroconídios. Todos os isolados apresentaram clamidósporos, e as dimensões dos macroconídios variaram de 25,56 µm x 3,7 µm a 33,92 µm x 3,39 µm, enquanto que os microconídios variaram de 6,23 µm x 2,01 µm a 10,3 µm x 3,35 µm. Os isolados apresentaram variações nas dimensões dos conídios, dentro da faixa citada por Nelson et al (9), que caracterizaram os macroconídios com 23 – 54 µm x 3 -4,5 µm e os microconídios com 5 – 12 µm x 2,3 – 3,5 µm. Pôde-se também observar as hifas septadas e

hialinas, conidióforos curtos e simples, macroconídios e microconídios abundantes. Os macroconídios com 3 a 5 septos e os microconídios normalmente não septados, com formatos variando de elipsoidal a cilíndrico e levemente curvados, como descrito por Menezes et al. (7).

A agressividade dos trinta e um isolados indicou a formação de três grupos denominados como de maior agressividade, agressividade intermediária e menor agressividade, como observado na tabela 1. Os isolados componentes do grupo de maior agressividade pertencem aos municípios de Goiana (dois isolados), Paudalho (um isolado), Camaragibe (dois isolados), Ribeirão (um isolado), Rio Largo (um isolado) e Marechal Deodoro (um isolado). Os isolados pertencentes aos municípios de Rio Largo (três isolados), Paulista (quatro isolados), Camaragibe (cinco isolados), Goiana (dois isolados) e Paripueira (um isolado) comportaram-se como de agressividade intermediária, representando o grupo com maior número de isolados, e por fim, os isolados de Goiana (dois isolados), Boquim (um isolado), Paulista (um isolado), Camaragibe (dois isolados), Cabo de Santo Agostinho (um isolado) e Rio Largo (um isolado) foram considerados menos agressivos. Com este resultado pôde-se verificar que não ocorreu correlação geográfica, onde isolados de uma mesma região apresentaram níveis de agressividade diferentes, fazendo parte de grupos distintos. O isolado que apresentou maior agressividade foi originado do município de Marechal Deodoro. Concordando com este resultado, Waite (19) observou a agressividade de doze isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* oriundos de *H. caribaea* apresentando variações quanto ao nível de agressividade em *Heliconia librata* Griggs e *Heliconia irassa* R.R. Smith e posteriormente em outro trabalho, Waite (17) verificou a variação de agressividade ocorrida em doze isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* provenientes de Honduras, Filipinas, Venezuela, Austrália, Jamaica, Costa Rica, Malásia e Tailândia quando inoculados nas cultivares de banana “Gros Michel” e “Bluggoe” e os sintomas observados variaram de leve a severo.

Estudos como estes, relacionados a ocorrência da doença, metodologia de inoculação, caracterização morfológica e agressividade de isolados, são importantes diante do pouco conhecimento do patossistema *F. oxysporum* f.sp. *cubense* vs. *Heliconia* spp.

Tabela 1. Isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*, origem, espécie hospedeira e agressividade

Isolado	Origem	Espécie hospedeira	Agressividade
F1	Rio Largo - AL	<i>H.psittacorum</i> cv. Alan Carle	1,767 b
F2	Paulista - PE	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	1,817 b
F3	Camaragibe - PE	<i>H. stricta</i> cv. Tagami	1,797 b
F4	Goiana - PE	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	1,996 a
F5	Goiana - PE	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	1,650 c
F6	Paulista - PE	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	1,845 b
F7	Goiana - PE	<i>H. wagneriana</i>	1,761 b
F8	Paudalho - PE	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	2,048 a
F9	Boquim - SE	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	1,585 c
F10	Paripueira - AL	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	1,738 b
F11	Camaragibe - PE	<i>H. stricta</i> cv. Tagami	1,933 a
F12	Camaragibe - PE	<i>H. chartacea</i> cv. Sexy Pink	1,851 b
F13	Paulista - PE	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	1,520 c
F14	Rio Largo - AL	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	1,996 a
F15	Camaragibe - PE	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	1,590 c
F16	Camaragibe - PE	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	1,756 b
F17	M. Deodoro - AL	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	2,078 a
F18	Paulista - PE	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	1,815 b
F19	Camaragibe - PE	<i>H. wagneriana</i>	1,910 a
F21	Rio Largo - AL	<i>H. chartacea</i> cv. Sexy Pink	1,791 b
F22	Paulista - PE	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	1,910 a
F24	Goiana - PE	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	1,484 c
F25	Camaragibe - PE	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	1,851 b
F26	Goiana - PE	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	1,821 b
F27	Goiana - PE	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	2,022 a
F28	C.de Sto. Agostinho - PE	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	1,590 c
F29	Rio Largo - AL	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	1,786 b
F30	Camaragibe - PE	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	1,414 c
F31	Rio Largo - AL	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	1,555 c
F32	Camaragibe - PE	<i>H. orthotricta</i> cv. Eclipse Total	2,026 a
F33	Ribeirão - PE	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	2,000 a

CV (%) = 9,98. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-knot ( $p=0,05$ ).



Tabela 2. Avaliação dos métodos de inoculação em *Heliconia psittacorum* cv. Alan Carle

Métodos de inoculação	Grau de infecção
Injeção (10 ml)	2,375 a
“Dipping” – 30 minutos	0,875 b
“Meia lua” (20 ml)	0,875 b
“Dipping” – 60 minutos	0 c

CV (%) = 17,73. Letras iguais em sentido longitudinal não diferem estatisticamente ao nível de 5%, os dados foram transformados em raiz ( $x + 0,5$ ) e analisados pelo teste de Tukey.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bentley, S.; Pegg, K.G.; Moore, N.Y.; Davis, R.D.; Buddenhagen, I.W. Genetic variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* analyzed by DNA fingerprinting. *Phytopathology*, Saint Paul, v.88, p.1283-1293, 1998.
2. Cavalcanti, L.S.; Coêlho, R.S.B.; Perez, J.O. Utilização de dois métodos de inoculação na avaliação da resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.32, p.1-5, 2002.
3. Cordeiro, Z.J.M.; Dantas, J.L.L. Rating bananas reaction to fusarium wilt in Brazil. *Proceedings, International Symposium on recent developments in banana cultivation technology*, Taiwan, p.85-88, 1993.
4. Cordeiro, Z.J.M.; Matos, A.P.; Kimati, H. Doenças da bananeira. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A. *Manual de Fitopatologia*. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p.99-117.
5. Ito, M.F.; Mascarenhas, H.A.A.; Tanaka, M.A. De S.; Tanaka, R.T.; Ambrosano, G.M.B.; Muraoka, T. Métodos de inoculação de *Diaporthe phaseolorum* f.sp. *meridionalis* para avaliar o efeito de diferentes épocas de plantio e doses de potássio sobre o cancro da haste da soja. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.23, p.213-216, 1997.
6. Lins, S.R.O.; Coêlho, R.S.B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.29, p.332-335, 2004.
7. Menezes, M. *Fungos fitopatogênicos*. Recife: Imprensa Universitária. 1993, 275p.
8. Menezes, M.; Assis, S.M.P. *Guia prático para fungos fitopatogênicos*. Recife: Imprensa Universitária. 2004, 188p.

9. NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F.O. *Fusarium* species an illustrated manual for identification, Pennsylvania: The Pennsylvania State University Press. 1983, 193 p.
10. Querino, C.M.B. Resistência induzida e interação entre indutores abióticos e *Gigaspora margarita* no controle do mal-do-Panamá em cultivares de bananeira. 2004. 78f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
11. Rodrigues, A.A.C.; Coêlho, R.S.B. Murcha de fusário do caupi: métodos de inoculação, reação de germoplasma e controle genético da resistência. Summa Phytopathologica, Botucatu, v.30, p.23-30, 2004.
12. Santos, R.L.M.S.; Matos, A.P. De; Cabral, J.R.S. Avaliação da infecção com *Fusarium subglutinans* em diferentes tipos de folhas de abacaxizeiro. Cruz das Almas, v.13, n.1, p.1-6, 2001 Disponível em: <<http://www.magistra.ufba.br/publica/magist13/html>>. Acesso em 4 dez. 2006.
13. Stover, R.H.; Waite, B.H. Studies on *Fusarium* wilt of bananas. VI Variability and the cultivar concept in *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. Canadian Journal of Botany, Ottawa, v.38, p.985-994, 1960.
14. Sun, E-J.; Su, H-J. Rapid method for determining differential pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* using banana plantlets. Tropical Agriculture, Trinidad, v.61, p.7-8, 1984.
15. Tokeshi, H.; Galli, F. Variabilidade de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Wr.)Sny. & Hans. em São Paulo. In: Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, v.23, p.195-209, 1966.

16. Vakalounakis, D.J.; Fragkiadakis, G.A. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber: differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility, and RAPD fingerprinting. *Phytopathology*. Saint Paul, v.89, p.161-168, 1998.
17. Waite, B.H. Inoculation studies and natural infection of banana varieties with races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Plant Disease Report*, Saint Paul, v.61, p.15-19, 1977.
18. Waite, B.H. *Fusarium* wilt of *Heliconia* and its relation to Panama disease of bananas. *Phytopathology*, Saint Paul, v.52, p.287, 1962.
19. Waite, B.H. Wilt of *Heliconia* spp. caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 3. *Tropical Agriculture*, Trinidad, v.40, p.299-305, 1963.
20. Wang, B.; Dale, M.L.; Kochman, J.K. Studies on a pathogenicity assay for screening cotton germplasms for resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* in the glasshouse. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, Adelaide, v.39, p.967-974, 1999.

### CAPÍTULO III

---

---

**Diversidade Genética de Isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cupense*  
em Helicônia Através de Compatibilidade Vegetativa e Análise  
Molecular**

**Diversidade Genética de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* em helicônia  
através de compatibilidade vegetativa e análise molecular**

Neilza Reis Castro<sup>1\*\*</sup>, Rildo Sartori Barbosa Coêlho<sup>2</sup>, Luciane Vilela Resende<sup>3</sup>, Delson  
Laranjeira<sup>1</sup>, Denise Santana da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Departamento de Agronomia/  
Fitossanidade, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil. E-mail: neilzacastro@gmail.com

<sup>2</sup>Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, IPA. Sede, CEP 50761-000, Recife, PE,  
Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Departamento de Agronomia/Fitotecnia,  
CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil.

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor apresentada à Universidade Federal Rural de  
Pernambuco. Bolsista CNPq.

Trabalho desenvolvido com apoio da FACEPE/PROMATA.

Data de chegada: Aceito para publicação em:

Autor para correspondência: Neilza Reis Castro

---

RESUMO

Castro, N.R.; Coelho, R.S.B; Resende, L.V.; Laranjeira, D.; Silva, D.S. Diversidade Genética de  
isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* em helicônia através de compatibilidade  
vegetativa e análise molecular. *Summa Phytopathologica*

*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, agente causal da murcha de fusário em *Heliconia*  
spp. têm sido detectado em várias propriedades produtoras de flores e vêm causando prejuízos  
na floricultura tropical. O objetivo deste trabalho foi a caracterização dos isolados de *Fusarium*  
*oxysporum* f.sp. *cubense* coletados em *Heliconia* spp. através de grupos de compatibilidade

vegetativa (VCG) e análise molecular por ISSR. Foram obtidas colônias monospóricas para os estudos de caracterização. O DNA total de cada isolado foi extraído e realizado a Polymerase Chain Reaction (PCR) com trinta e sete oligonucleotídeos de Inter-simple sequence repeat (ISSR). No experimento de compatibilidade vegetativa, utilizaram-se os meios completo (MC), batata-dextrose-clorato (BDC) e meio mínimo (MM) na obtenção dos mutantes Nit. Estes foram caracterizados fenotipicamente, usando-se os meios de amônia, hipoxantina, nitrito e nitrato, e realizados os testes de complementariedade dos nits M obtidos, com os demais. Dos trinta e sete oligonucleotídeos testados, onze foram selecionados e através da análise molecular revelaram um alto polimorfismo (91,6%) e similaridade genética variando de indicando alta diversidade genética dos isolados. No estudo de VCG, observou-se a formação de três grupos envolvendo dez isolados. A maioria dos isolados não agruparam, sugerindo uma alta diversidade genética. As duas técnicas utilizadas mostraram alta variabilidade genética e a não correlação geográfica dos isolados, observada através da composição dos grupos por isolados de regiões distintas. Estes resultados reforçam a importância de medidas de controle que impeçam a disseminação do patógeno através de material vegetal infectado.

Palavras-chave: murcha de fusário, diversidade genética

#### ABSTRACT

Castro. N.R.; Coelho,R.S.B.; Resende, L.V.; Laranjeira, D.; Silva, D.S. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* isolates in heliconia by vegetative compatibility and molecular analysis. *Summa Phytopathologica*

*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, causal agent of *Fusarium* wilt in *Heliconia* spp. has been detected in many production fields of flowers causing damages on tropical floriculture. The objective of this work was characterization of *Foc* isolates using compatibility vegetative groups (CVG) and molecular analysis by microsatellite. It was obtained monosporic colonies for characterization studies. Total DNA of each isolate was obtained and realized Polymerase Chain Reaction (PCR) with 37 oligonucleotides of Inter-simple sequence repeat (ISSR). In

experiment of vegetative compatibility was used complete (CM), potato-dextrose-potato (PDP) and minimum medium (MM) for mutants obtention Nit. These were characterized fenotipically, using media of ammonia, hypoxantine, nitrit and nitrat media, and realized tests of nits M complementarity obtained with others. Of 37 oligonucleotides tested, 11 were selected and by molecular analysis showed high polymorphism (91.6%) and genetic similarity, varying, indicating high isolates genetic diversity. In study of CVG, it was observed formation of three groups involving ten isolates. The most of isolates did not grouped, suggesting high genetic diversity. Two techniques used showed high genetic variability and negative geographical correlation of isolates, observed by groups composition of different areas. These results are important for effort control manners that oppose pathogen dissemination by vegetative material infected.

Additional keywords: Fusarium wilt, genetic diversity

---

A murcha de fusário, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *cubense* (E. F. Smith) Snyd & Hans, é uma doença vascular que afeta espécies do gênero *Heliconia* e *Musa*. Seus isolados tem sido classificados dentro de quatro raças fisiológicas baseadas na patogenicidade a cultivares hospedeiras em campo (raça 1, cultivar “Gros Michel”; raça 2, “Bluggoe”; raça 3, *Heliconia* spp.; e raça 4, grupo “Cavendish” e todas as cultivares suscetíveis às raças 1 e 2) (21). A raça 1 de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* já foi detectada em todas as áreas produtoras de banana, enquanto que a raça 4 só foi confirmada na Indonésia, Taiwan, Malásia, China e norte da Austrália. Na década de 90, cerca de 5000 ha plantados com a cultivar “Cavendish” na Indonésia foram abandonadas por apresentarem a doença, causada pela raça 4, considerada a mais agressiva (11).

No gênero *Helicônia* vem causando perdas e prejuízos ao setor de floricultura tropical tornando-se importante economicamente em alguns estados do Nordeste do Brasil (7). Em *Helicônias* a doença foi primeiramente descrita por Waite (27) que detectou a ocorrência em *Heliconia caribaea* Lam em Honduras, América Central e mais recentemente foi detectado em



*H. chartacea* na Austrália (Bentley et al., 1998, Ploetz , 2006). No Brasil, foi primeiramente relatada em cultivos de helicônias, na região Nordeste em 2002 (Lins et al., 2004). A murcha de fusário apresenta como sintomas amarelecimento progressivo nas folhas mais velhas, murcha com posterior quebra do pecíolo da folha e pontuações pardo-avermelhadas no pseudocaule e rizoma. A obstrução vascular evolui e pode causar a morte da planta (8).

Atualmente existem duas hipóteses para a origem do *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, a primeira indicando que o patógeno coevoluiu com a cultura da bananeira na Ásia e que teria sido disseminado para outras partes do mundo através de rizomas contaminados ou aderidos ao solo no material propagativo (26), e a segunda hipótese indica uma coevolução independente de populações locais em diferentes regiões. Bentley et al. (4) sugerem que estas duas hipóteses podem ocorrer pela formação de grupos com isolamento genético e distribuição geográfica limitada e grupos que coevoluiram independentemente dentro e fora do centro de origem do hospedeiro.

Diversas técnicas têm sido utilizadas para caracterizar isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* é feita através de reações de cultivares a doença. Esta determinação, normalmente, é uma prática demorada, ainda podendo ocorrer falhas, uma vez que a expressão de sintomas nas diferenciadoras é influenciada pelas condições ambientais, local de instalação do experimento e material propagativo utilizado (22).

Para estudos de caracterização de isolados, vários métodos podem ser utilizados, incluindo-se o agrupamento de compatibilidade vegetativa (2, 22, 29), produção de substâncias voláteis (19), análises moleculares por RAPD (“random amplified polymorphic DNA”) e RFLP (“restriction fragment length polymorphism”) (3, 15).

A técnica de compatibilidade vegetativa (VGC) foi primeiramente desenvolvida por Puhalla (23) com o objetivo de distinguir por características genéticas e não morfológicas ou de patogenicidade as raças de *F. oxysporum*. Consiste no pareamento de mutantes incapazes de utilizarem nitrato como fonte de nitrogênio e a formação do heterocáion. A fusão de hifas de dois mutantes indica que os isolados pertencem a um mesmo grupo de compatibilidade. Cerca de vinte e um VCGs já foram determinados para *F. oxysporum* f.sp. *cubense* e são bastante

utilizados em estudos de caracterização genética. Estudos detalhados indicam que isolados de um mesmo grupo de compatibilidade vegetativa, tipicamente possuem multilocus muito similares ou até idênticos e possivelmente pertencem a uma mesma linhagem clonal. Por essa razão os VCGs são bons indicadores de similaridade (14).

Em relação ao uso das técnicas moleculares na caracterização genética de organismos, muitos trabalhos foram desenvolvidos com advento do RAPD e RFLP, mas, atualmente, vem sendo aplicado o uso de primers de microssatélites “inter simple sequence repeat” (ISSR) que, em substituição aos outros métodos, apresentam as vantagens de serem mais eficientes, oferecer um menor custo e determinar um alto grau de polimorfismo, além de ter alta reprodutibilidade. Esta técnica tem sido bastante aplicada em estudos de genética de populações e biologia evolucionária de muitos organismos, incluindo as espécies fúngicas (2, 17, 18, 30) e espécies vegetais como cultivares resistentes a diversos patógenos (1, 24).

O conhecimento da diversidade genética da população do patógeno é um importante elemento para os programas de melhoramento genético de plantas que visam resistência às doenças, pois gera informações sobre o nível e distribuição da variabilidade genética dos isolados existentes em uma população ou região. Populações de fungos com alto nível de diversidade genética são difíceis de controlar, uma vez que podem adaptar-se mais rapidamente a qualquer medida de controle, seja química ou através da introdução de hospedeiro resistente (6). Outros fatores, tais como a natureza de dispersão do patógeno e seleção imposta pelo hospedeiro resistente, também podem influenciar a variabilidade genética encontrada na população dos patógenos. Até então foram realizados inúmeros estudos em população de *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, nas raças que atacam especificamente a bananeira, não havendo portanto, nenhum relato de estudos dessa natureza com a suposta raça 3, que afeta espécies de helicônia e neste contexto o objetivo do trabalho foi avaliar a diversidade genética entre isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* obtidos de espécies de helicônias, utilizando-se os métodos de grupos de compatibilidade vegetativa e análise molecular por ISSR.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados 31 isolados em rizomas de helicônia com de sintomas de murcha de fusário em propriedades produtoras de três microrregiões do estado de Pernambuco (Zona da Mata Sul, Central e Norte), do estado de Alagoas (Zona da Mata Central e Sul) e Sergipe (Zona da Mata) (Tabela 1). Estas regiões se localizam aproximadamente a 40 Km uma da outra, exceto as microrregiões dos estados de Alagoas e Sergipe que se localizam a 300 e 700 Km respectivamente das microrregiões do estado de Pernambuco. Fragmentos dos rizomas ou pseudocaule, apresentando escurecimento vascular foram lavados por duas vezes em água destilada esterilizada e em seguida foram colocados sobre papel filtro esterilizado para retirar o excesso de água dos tecidos. Com auxílio de uma alça de platina flambada, os fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). As placas foram mantidas sob alternância luminosa em temperatura ambiente ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Após sete dias de incubação, fez-se a transferência dos isolados para tubos de ensaio contendo BDA.

Inserir Tabela 1

### Obtenção de culturas monospóricas

A partir de culturas fúngicas com sete dias de cultivo em BDA, foram transferidos fragmentos da colônia para tubos de ensaio contendo 10 mL de água destilada estéril e agitou-se a suspensão, em seguida colocou-se 0,1 mL da suspensão de cada isolado na superfície do meio agar-água (AA), contido em placas de Petri. Com auxílio de uma alça de Drigalsky, a suspensão foi uniformemente espalhada sobre a superfície do meio. As placas foram mantidas sob temperatura ambiente e alternância luminosa. Após 24 horas, com auxílio de lupa estereoscópica, os conídios germinados foram transferidos para placas de Petri contendo BDA por um período de sete dias e em seguida, foi realizada a transferência para tubos de ensaio com BDA com fins de preservação.

Análise de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* pela técnica de microssatélite (ISSR)

#### Extração do DNA total

A extração do DNA dos isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* foi realizada utilizando-se a metodologia descrita por Martinez-Zapter et al. (1982). Para a quantificação, pequenas alíquota de DNA (1 µL) foram submetidas a corrida eletroforética em mini gel de agarose a 0,9% contendo 2 µL de Syber Gold (Invitrogen) em cada poço e 5 µL do corante azul de bromofenol por 30 minutos na presença do lambda 50 ng (Invitrogen) e visualizado em transluminador UV (Vilber Loumart). Todos os géis foram fotodocumentados.

#### Reações de amplificação utilizando ISSR

Foram analisados trinta e sete primers de ISSR selecionados de um conjunto produzido pela University of British Columbia, Vancouver, Canadá.

Cada reação de amplificação foi realizada para um volume final de 25 µL por isolado contendo 1 U de taq polimerase, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 20 ng de DNA de cada isolado, 10 mM de tampão e 1,0 ou 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>.

As reações de amplificações foram realizadas em termociclador programado conforme o oligonucleotídeo para 30 ou 35 ciclos nas seguintes seqüências: 95°C por 15 minutos (desnaturação), 94°C por 30 segundos, 50 ou 55°C por 45 segundos (anelamento), 72°C por 2 minutos e 72°C por 7 minutos (extensão). O produto da amplificação foi submetido a eletroforese horizontal em gel de agarose a 2% contendo 5 µL do corante azul de bromofenol e 2 µL de Syber gold (Invitrogen). O marcador utilizado foi o ladder de 100 pb (Invitrogen). O gel foi imerso em tampão TBE 0,5X e a corrida eletroforética a 80 V. As amplificações de DNA foram visualizadas sob luz ultra violeta e fotografadas com o sistema de fotodocumentação Vilber Loumart.

#### Avaliação dos resultados

Os produtos das ampliações foram computados como ausência (0) e presença (1) para os 31 isolados testados. A similaridade entre todos os genótipos foi calculada pelo coeficiente de Jaccard. O cálculo da similaridade foi feito utilizando o programa NTSYS que gerou as matrizes de distância genética entre todos os isolados. A partir da matriz, foram gerados clusters pelo método da média aritmética não ponderada (UPGMA) com 1000 simulações expressos na forma de dendrograma com o auxílio do programa Winboot.

#### Testes de compatibilidade vegetativa

Para o estudo de agrupamento de compatibilidade vegetativa utilizou-se a metodologia descrita por Puhalla (1985), na qual foram utilizados diversos meios nos quais eram feitos cultivos em série. O meio basal (MB) foi preparado a partir de 30 g de sacarose, 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g de KCl, 10 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 20 g de agar, 1000 mL de água destilada e 0,2 mL de solução de micronutrientes. A solução de micronutrientes continha para cada 95 mL de água destilada, 5 g de ácido cítrico, 5 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,25 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 50 mg de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 50 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_4$  e 50 mg de  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . O meio completo (MC) foi feito a partir da adição de 2 g de  $\text{NaNO}_3$ , 2,5 g de N-zamina, 1 g de extrato de levedura e 10 mL da solução vitamínica em 1000 mL de meio basal (MB). A solução vitamínica foi preparada para 1 L de etanol 50%. Adicionou-se 100 mg de tiamina HCl, 30 mg de riboflavina, 75 mg de piridoxina HCl, 200 mg de de D-pantotenato de cálcio, 5 mg de p-ácido aminobenzóico, 75 mg de nicotinamida, 200 mg de choline.Cl, 5 mg de ácido fólico, 5 mg de D-biotina e 4 g de inositol. O meio mínimo (MM) foi feito a partir da adição de 2 g de  $\text{NaNO}_3$  em 1000 mL de meio basal (MB). O meio de indução da formação de setores (possíveis mutantes) utilizado foi o meio mínimo + clorato de potássio (MMC) que consistiu de 1000 mL de meio basal (MB), 15 g de  $\text{KClO}_3$ , 1,6 g de L-asparagina e 2 g de  $\text{NaNO}_3$  (23).

#### Obtenção de mutantes nit

Discos de colônia fúngica (5 mm de diâmetro), removidos dos isolados monospóricos, crescidos em MC por sete dias em temperatura ambiente e alternância luminosa, foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo MMC e incubados por dez dias sob alternância luminosa. O cultivo foi observado diariamente para a detecção da formação de setores com crescimento rápido e restrito. Em seguida os setores foram transferidos para o meio MM. A formação de colônias com crescimento micelial ralo, sem micélio aéreo, caracterizava o surgimento de mutantes nit.

#### Estudo fenotípico de mutantes nit

Para a determinação das classes fenotípicas (Nit 1, Nit 2, Nit 3 e Nit M) foram utilizados os seguintes meios: meio de nitrato (MM), meio de nitrito (meio basal + 0,5 g/L de  $\text{NaNO}_2$ ), meio de hipoxantina (meio basal + 0,2 g/L de hipoxantina) e meio de amônia (meio basal + 1 g/L de tartarato de amônia). A determinação procedeu-se da seguinte forma: transferiu-se discos de micélio da colônia mutante (crescidos em meio MM por 10 dias) para cada um dos meios de classificação fenotípica. As placas foram incubadas por 10 dias sob escuro contínuo, observando o comportamento da colônia. O tipo de mutante foi determinado de acordo com o surgimento ou não de colônia do tipo selvagem.

#### Complementação de mutantes nit e determinação da compatibilidade vegetativa

Foram realizados pareamentos dos mutantes nit dois a dois em placas de Petri contendo meio MM, que foram cultivados por 20 a 30 dias sob escuro contínuo e em temperatura ambiente. Um mutante nit de cada tipo fenotípico, foi selecionado aleatoriamente para cada isolado e todos os mutantes foram pareados com os mutantes nit M. Foram considerados como complementação positiva a formação de denso micélio aéreo no ponto de contato das duas colônias, demonstrando a compatibilidade vegetativa, indicando pertencerem a um mesmo grupo de compatibilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Trinta e sete oligonucleotídeos ancorados foram testados, destes onze foram selecionados por exibirem padrões de amplificação definidos e alto polimorfismo (tabela 2). O maior polimorfismo foi verificado com os oligonucleotídeos (UBC 817, UBC 834, UBC 849, UBC 851, UBC 862, UBC 864, UBC 866, UBC 868, UBC 881, UBC 891 e UBC 887) utilizando diferentes amostras de DNA extraídas independentemente do mesmo material e amplificadas em reações de “Polymerase Chain Reaction” (PCR) independentes. Os onze oligonucleotídeos selecionados amplificaram um total de 949 fragmentos, dos quais 870 (91,6%) foram polimórficos. O alto nível de polimorfismo encontrado confirma a eficiência da técnica para detecção de variabilidade e apresenta como vantagem, quando comparada com o RAPD, a robustez e a alta reprodutibilidade (18). A técnica atualmente tem sido bastante utilizada nos estudos de diversidade genética em espécies vegetais (5, 24) e fúngicas (2, 17, 18, 28). Na literatura não foram encontrados trabalhos utilizando esta técnica para caracterizar *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, no entanto, em relação a outras espécies, Mishra et al (17, 18) estudaram a variação genética de *Fusarium culmorum* (W.G.Smith) Sacc. e *Fusarium graminearum* Schwabe. por meio da técnica de ISSR.

O oligonucleotídeo UBC 881 gerou o menor número de fragmentos, totalizando 35, enquanto o oligo UBC 866 gerou 155 fragmentos, totalizando 100% de polimorfismo. O tamanho destes fragmentos variou de 100 a 1200 pb. O padrão obtido utilizando o oligo 866 está na figura 1.

Inserir Figura 1 e Inserir Tabela 2

A técnica de ISSR vem sendo bastante utilizada principalmente para caracterização de germoplasma em espécies vegetais e cultivares empregadas em programa de melhoramento genético e que também vem demonstrando resultados promissores como método de caracterização molecular em espécies fúngicas, apresentando as vantagens como ampla cobertura ao genoma em estudo, alta reprodutibilidade, altos níveis de polimorfismo e a necessidade de poucas quantidades de DNA (5, 17, 18).

Os resultados obtidos utilizando-se o coeficiente de Jaccard são apresentados na figura 2. A similaridade variou de 0,05 (entre os isolados F13 e F18) a 0,47 (isolados F13 e F17). O agrupamento dos ISSR baseados na similaridade genética usando UPGMA formou um dendrograma cujo coeficiente de correlação cofenética de 0,69, mostrou uma boa confiabilidade da matriz de similaridade. Somente foram considerados os valores de Bootstrap superiores a 70%.

Considerando a similaridade média de 23,38% observou-se a formação de dez grupos, conforme figura 2, onde os isolados F1 oriundo da Zona da Mata Central de Alagoas e F19 oriundo da Zona da Mata Central de Pernambuco, se posicionaram isoladamente em grupos diferentes. O agrupamento observado não se correlaciona com as áreas geográficas de coleta dos isolados, visto que isolados da mesma microrregião se posicionaram em grupos diferentes, assim como isolados de regiões distintas se posicionaram dentro de um mesmo grupo. Isto pode ser atribuído à circulação de material de propagação contaminado, não se verificando portanto, nenhum possível efeito fundador ou correlação geográfica. A alta diversidade observada entre os isolados de regiões próximas comprova a alta complexidade deste patógeno. Trabalhos mostram que alguns isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* são mais similares a outras *formae speciales* do que a isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* (15, 22). Resultados semelhantes foram observados por Jesus et al.(12) quando analisaram dez isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* das raças 1 e 2 provenientes de várias regiões da Bahia, localizado no Nordeste do Brasil, e comprovaram alta dissimilaridade entre os isolados utilizando marcadores RAPD, corroborando os resultados obtidos neste trabalho.

Outro fator que pode ser usado para explicar a baixa similaridade entre os isolados estudados, pode estar ligado à hipótese de co-evolução, que considera a grande diversidade genética do patógeno no centro de origem do hospedeiro, uma vez que no Nordeste brasileiro são encontradas com frequência populações nativas de *Heliconia* spp. Não foi encontrado nos resultados um possível efeito fundador ou a correlação geográfica entre os isolados pertencentes



a microrregiões próximas, isto pode ser atribuído a complexidade do patógeno que apresenta como consequência uma alta diversidade.

Em relação a outras espécies de *Fusarium*, a técnica de ISSR tem possibilitado a caracterização de alta diversidade genética em *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (2), *F. graminearum* (17) e *F. culmorum* (18).

Inserir Figura 2

Como resultado do agrupamento vegetativo foram obtidos cinquenta e um mutantes dos quais trinta e oito mutantes do tipo nit 1 (74,5%), um mutante do tipo nit 2 (1,9%), nove mutantes do tipo nit 3 (17,6%) e três mutantes do tipo nit M (5,8%). Os isolados F11, F26 e F33 produziram os mutantes nit M. Alguns autores verificaram que a porcentagem da ocorrência de classes fenotípicas nos mutantes nit depende do meio em que foram obtidos. Correll et al (9) verificaram que a obtenção de maior quantidade de nit tipo 1 estava relacionada ao cultivo em batata-dextrose-clorato, enquanto que os nits tipo 3 e M estavam ligados ao cultivo em meio mínimo-clorato. Outros trabalhos confirmam a hipótese da obtenção de nits de acordo com o meio (20). Foi selecionado um representante dentro de cada isolado, quando os mesmos pertenciam à mesma classe fenotípica, para o pareamento com os mutantes nit M, que serviram como os testadores para a compatibilidade. Alguns isolados (F4, F6, F8, F18, F21 e F32) não formaram mutantes e outros isolados (F2, F3, F5, F7, F9, F10, F11, F15, F17, F19, F22, F24, F25, F26, F27 e F28) não foram compatíveis. Apenas dez isolados apresentaram compatibilidade, formando três agrupamentos de compatibilidade vegetativa denominados como desconhecidos, pois os mutantes obtidos não foram pareados com VCGs conhecidos de *F. oxysporum* f.sp. *cubense*. O maior grupo foi constituído por seis isolados (F10, F12, F13, F14, F25 e F28), todos oriundos da Mata Central dos estados de Alagoas e Pernambuco. O segundo grupo foi formado pelos isolados F13 e F14 e o terceiro grupo com os isolados F26 e F33. Estes resultados sugerem alta diversidade dos isolados, onde cerca de 71% dos isolados não agruparam. O estudo de grupos de compatibilidade é muito importante principalmente para o gênero *Fusarium* e tem tido bastante aplicabilidade, uma vez que isolados que pertencem a um mesmo VCG apresentam alta similaridade genética diferente de várias espécies de *F.*

*oxysporum*, nas quais isolados de determinada *formae speciales* são geneticamente uniformes e classificados em mesmo VCG. *F. oxysporum* f.sp. *cubense* tem se mostrado bastante complexo quanto a formação de VCGs (14). Esta complexidade foi observada neste trabalho com a ocorrência de três grupos de VCGs e vinte e um isolados que não apresentaram compatibilidade vegetativa. Resultados semelhantes foram observados por Jones (13) ao agrupar 169 isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* originados de vários países da Ásia. Em outras espécies de *Fusarium*, como por exemplo *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum*, isolados de origens distintas com China e Japão pertenciam a um mesmo VCG (25).

Não foi observada relação entre as duas técnicas utilizadas neste estudo pela não repetibilidade de grupamentos, tendo como sugestão o envolvimento da complexidade do fungo e a possibilidade de mutações em simples loci indicadores de VCGs, não sendo detectado através de marcadores de ISSR. No entanto a diversidade de isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* é sempre discutida a grandes distâncias, ao nível de países em diferentes continentes, ao contrário de nosso estudo, onde levou-se em consideração apenas uma região geográfica denominada de zona da mata. Estudos de diversidade genética de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* foram feitos, através da técnica de DAF por Bentley et al.(4) com 208 isolados de várias regiões, de raças distintas e pertencentes a vinte VCGs. Dentre os isolados, alguns foram identificados como VCGs desconhecidos dos quais dois isolados pertenciam a raça 3 de *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, os quais não foram agrupados com nenhum dos VCGs conhecidos. A similaridade entre os isolados dentro de um mesmo VCG variou de 96 a 100% e entre isolados representantes de cada VCG foi observada uma similaridade que variava de 53 a 100%. Estes resultados diferem daqueles obtidos no presente trabalho e, possivelmente, deve-se a técnica utilizada, número de isolados analisados e baixa variabilidade na região amostrada. Após diagnosticado a similaridade variando de 96 a 100% entre os isolados de um mesmo VCG, foi selecionado um representante para a análise entre VCGs e o resultado observado, através de RAPD, foi uma similaridade que variava de 53% a 99%.

Outros marcadores moleculares já demonstraram maior eficiência em relação a compatibilidade vegetativa como o caso do uso de RFLP em *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (30).

Estes resultados obtidos com VCGs da raça 3 de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* devem ser considerados preliminares, uma vez que seriam necessário outras tentativas na obtenção de mutantes nit.

Com a utilização das duas técnicas, a de grupos de compatibilidade vegetativa, que é bastante utilizada na caracterização do gênero, aliada à técnica molecular, que vem se tornando realidade em análise genômica, verificou-se neste trabalho uma alta diversidade genética, o que pode representar sérios riscos à cultura das helicônias, reforçando a importância de medidas de controle que impeçam a disseminação do patógeno através do trânsito de materiais vegetais infectados.

Tabela 1. Isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense*, microrregiões de origem e espécies hospedeiras

Microrregião	Isolados	Espécies hospedeiras
Zona da Mata Norte – Pernambuco	F2, F4, F5, F6, F7, F8, F13, F18, F22, F24, F26, F27	<i>Heliconia psittacorum</i> cv. Alan Carle e <i>Heliconia wagneriana</i>
Zona da Mata Central – Pernambuco	F28, F33	<i>Heliconia psittacorum</i> cv. Alan Carle
Zona da Mata Sul – Pernambuco	F3, F11, F12, F15, F16, F19, F25, F30, F320	<i>Heliconia psittacorum</i> cv. Alan Carle e <i>Heliconia wagneriana</i>
Zona da Mata Norte – Alagoas	F10	<i>Heliconia psittacorum</i> cv. Alan Carle
Zona da Mata Central – Alagoas	F1, F14, F21, F29, F31	<i>Heliconia psittacorum</i> cv. Alan Carle e <i>Heliconia chartacea</i> cv. Sexy Pink
Zona da Mata Sul - Alagoas	F17	<i>Heliconia psittacorum</i> cv. Alan Carle
Zona da Mata Sul - Sergipe	F9	<i>Heliconia psittacorum</i> cv. Alan Carle

Tabela 2. Oligonucleotídeos selecionados, seqüência, número total de fragmento por primer e porcentual de polimorfismo dos isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense*

Oligo	Seqüência (5' → 3')	Nº de fragmentos	Polimorfismo(%)
UBC 817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	60	75
UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	109	98,16
UBC 849	GTG TGT GTG TGT GTG TYA	91	91,2
UBC 851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG	49	85,71
UBC 862	(AGC) <sup>6</sup>	51	78,43
UBC 866	(CTC) <sup>6</sup>	155	100
UBC 868	(GAA) <sup>6</sup>	87	95,40
UBC 891	HVH TGT GTG TGT GTG TG	115	99,13
UBC 864	(ATG) <sup>6</sup>	118	96,61
UBC 881	GGG TGG GGT GGG GTG	35	45,71
UBC 887	DVD TCT CTC TCT CTC TC	79	89,87

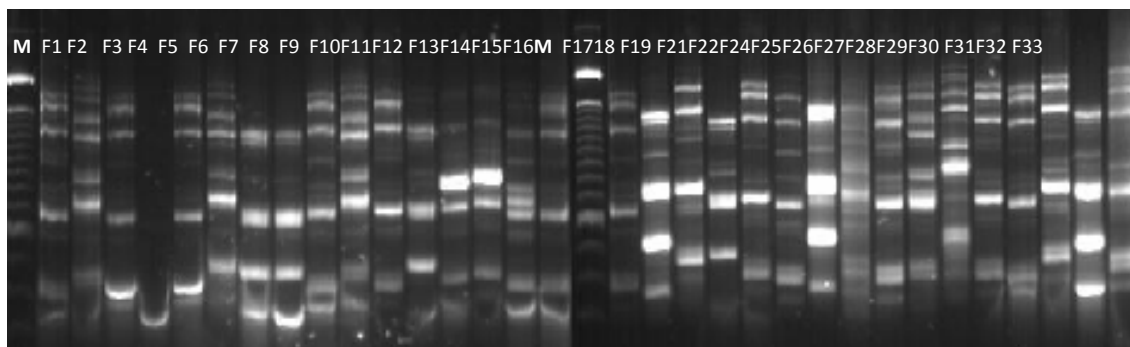


Figura 1. Produto da PCR com oligonucleotídeo UBC 866

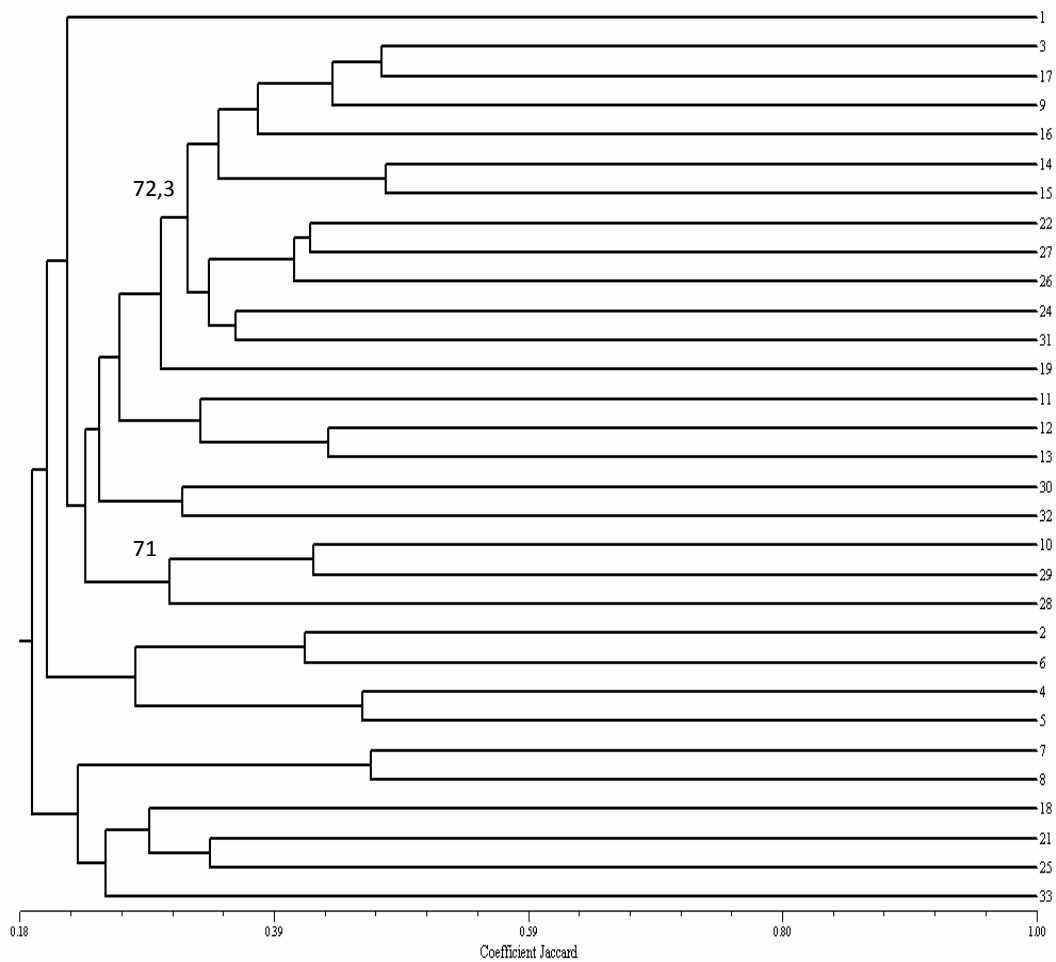


Figura 2. Similaridade genética entre os isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense raça 3. Dendrograma representado através da análise por UPGMA da média dos valores de similaridade determinados por onze primer de ISSR usando o coeficiente de similaridade de Jaccard.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al-Humaid, A.; Motawei, M.I.; Abadía, M.Y.; Mana, F. Detection of genetic variation and *Fusarium* resistance in turfgrass genotypes using PCR-based markers (SIR and SCAR). *Journal of Food, Agriculture & Environment*, Haverlee, v.2, p.225-229, 2004.
2. Balmas, V.; Scherm, B.; Di Primo, P.; Rau, D.; Marcello, A.; Migheli, Q. Molecular characterization of vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and f. sp. *lycopersici* by random amplification of polymorphic DNA and microsatellite-primed PCR. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v.111, p.1-8, 2005.
3. Bentley, S.; Pegg, K.G.; Dale, J.L. Optimization of RAPD-PCR fingerprinting to analyze genetic variation within populations of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v.142, p.64-78, 1994.
4. Bentley, S.; Pegg, K.G.; Moore, N.Y.; Davis, R.D.; Buddenhagen, I.W. Genetic variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* analyzed by DNA fingerprinting. *Phytopathology*, St. Paul, v.88, p.1283-1293, 1998.
5. Blair, M.W.; Panaud, O.; Mccouch, S.R. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oriza sativa* L.). *Theoretical Application Genetic*, v.98, p.780-792, 1999.
6. Carlier, J.; Hayden, H.; Rivas, G.; Zapater, M.-F.; Abadie, C.; Aitken, E. Genetic differentiation in *Mycosphaerella* leaf spot pathogens. In: Workshop on *Mucosphaerella* leaf spot diseases held in San Jose, 2002, Costa Rica. *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook, Montpellier, INIBAP, p.123-129, 2003.
7. Chagas, A.J.C. Floricultura tropical na zona da mata de Pernambuco. Recife: SEBRAE, 2000.



8. Cordeiro, Z.J.M.; Matos, A.P.; Kimati, H. Doenças Da Bananeira. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A. Manual de Fitopatologia. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p.99-117.
9. Correll, J.C.; Klittich, C.J.; Leslie, J.F. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology*, Saint Paul, v.77, p.1640-1646, 1987.
10. Hantula, J.; Dusabenygasani, M.; Hamelin, R.C. Random amplified microsatellites (RAMS) – a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v.26, p.15-166, 1996.
11. International Network for the Improvement of banana and plantain. Mitigating the threat of banana Fusarium wilt. Montpellier, 2006 Disponível em: <<http://www.inibap.org/pdf/mitigating.pdf>>. Acesso em 21 dez. 2006.
12. Jesus, J. de; Cascardo, J.C. de M.; Figueira, A.; Souza Júnior, M.T.; Cordeiro, Z.J.M. Uso de marcadores RAPD no estudo de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Magistra*, Cruz das Almas, v.7, 1995. (Resumo)
13. Jones, D.R. The characterization of isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* from Ásia. *Infomusa*, Montpellier, v.4, n.2, p.3-4, 1995.
14. Kistler, H.C.; Alabouvette, C.; Baayen, R.P.; Bentley, S.; Brayford, D.; Coddington, A.; Correll, J.; Daboussi, M.-J.; Elias, K.; Fernandez, D.; Gordon, T.R.; Katan, T.; Kim, H.G.; Leslie, J.F.; Martyn, R.D.; Migheli, Q.; Moore, N.Y.; O'donnell, K.; Ploetz, R.C.; Rutherford, M.A.; Summerell, B.; Waalwijk, C.; Woo, S. Systematic numbering of vegetative compatibility groups in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, Saint Paul, v.88, p.30-32, 1998.

15. Koenig, R.L.; Ploetz, R.C.; Kistler, H.C. *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* consists of small number of divergent and globally distributed clonal lineages. *Phytopathology*, Saint Paul, v.87, p.915-923, 1997.
16. Martinez-Zapter, J.; Salinas, J. *Methods in molecular biology – Arabidopsis protocols*. New Jersey: Humana Press, 1982. v.82, 440p.
17. Mishra, P.K.; Tewari, J.P.; Clear, R.M.; Turkington, K. Molecular genetic variation and geographical structuring in *Fusarium graminearum*. *Annals of Applied Biology*, Cambridge, v.145, p. 299-307, 2004.
18. Mishra, P.K.; Fox, R.T.V.; Culham, A. Inter simple sequence repeat and aggressiveness analyses revealed high genetic diversity, recombination and long range dispersal in *Fusarium culmorum*. *Annals Applied Biology*, Cambridge, v.143, p.291-301, 2003.
19. Moore, N.Y. Hargreaves, P.A.; Pegg, K.; Irwin, J.A.G. Characterization of strains of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* by production of volatiles. *Australian Journal of Botany*, Adelaide, v.39, p.61-166, 1991.
20. Pasquali, M.; Dematheis, F.; Gilardi, G.; Gullino, M.L.; Garibaldi, A. Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* from lettuce. *Plant Disease*, Saint Paul, v.89, p.237-240, 2005.
21. Persley, G.J.; De Langhe, E.A. Summary Of Discussion And Recommendations. In: Bentley, S.; Pegg, K.G.; Moore, N.Y.; Davis, R.D.; Buddenhagen, I.W. Genetic variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* analyzed by DNA fingerprinting. *Phytopathology*, Saint Paul, v.88, p.1283-1293, 1997.
22. Ploetz, R.C. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense*. *Phytopathology*, Saint Paul, v.96, p. 653-656, 2006.
23. Ploetz, R.C.; Correll, J.C. Vegetative compatibility among races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. *Plant Disease*, Saint Paul, v.72, p.325-328, 1988.

24. Puhalla, J.E. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. Canadian Journal of Botanic, Ottawa, v.63, p.179-183, 1985.
25. Ruas, P.M.; Ruas, C.F.; Rampim, L.; Carvalho, V.P.; Ruas, E.A.; Sera, T. Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (inter-simple sequence repeat) markers. Genetics and Molecular Biology, Saint Paul, v.26, p.319-327, 2003.
26. Vakalounakis, D.J.; Wang, Z.; Fragkiadakis, G.A.; Skaracis G.N.; Li, D-B. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates obtained from cucumber in China by pathogenicity, VCG, and RAPD. Plant Disease, Saint Paul, v.88, p.645-649, 2004.
27. Vakili, N.G. Fusarium wilt resistance in seedlings and mature plants of *Musa* species. Phytopathology, Saint Paul, v.55, p.135-140, 1965.
28. Waite, B.H. Wilt of *Heliconia* spp. caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 3. Tropical Agriculture, Trinidad, v.40, p.299-305, 1963.
29. Wang, S.; Miao, X.; Zhao, W.; Huang, B.; Fan, M.; Li, Z.; Huang, Y. Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). Mycology Research, Cambridge, v.109, p.1364-1372, 2005.
30. Woo, S.L.; Zoina, A.; Del Sorbo, G.; Lorito, M.; Nanni, B.; Scala, F.; Noviello, C. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs and RAPD. Phytopathology, Saint Paul, v.86, p.966-973, 1996.
31. Zhou, S.; Smith, D.R.; Stanosz, G.R. Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using inter simple or short sequence repeat (ISSR) fingerprinting. Mycology Research, Cambridge, v.105, p.919-926, 2001.

## CAPÍTULO IV

---

---

**Identificação de Fontes de Resistência à Murcha de Fusário, Eficiência do Uso do Filtrado em Folhas Destacadas de Helicônia na Distinção de Resistência e Suscetibilidade e Mecanismos Estruturais de Resistência envolvidos**

**IDENTIFICAÇÃO DE FONTES DE RESISTÊNCIA À MURCHA DE FUSÁRIO,  
EFICIÊNCIA DO USO DE FILTRADO EM FOLHAS DESTACADAS DE HELICÔNIA  
NA DISTINÇÃO DE RESISTÊNCIA E SUSCETIBILIDADE E MECANISMOS  
ESTRUTURAIS DE RESISTÊNCIA ENVOLVIDOS**

Neilza Reis Castro<sup>1</sup>, Rildo Sartori Barbosa Coêlho<sup>2</sup>, Delson Laranjeira<sup>1</sup>, Rejane Magalhães de  
Mendonça Pimentel<sup>3</sup>, Clébio Pereira Ferreira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, CEP  
52171-900, Recife, PE, e-mail: neilzacastro@gmail.com; <sup>2</sup>Empresa Pernambucana de Pesquisa  
Agropecuária, IPA. Sede, CEP 50761-000, Recife, PE; <sup>3</sup>Departamento de Botânica,  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, PE, CEP 52171-900, Recife, PE

(Aceito para publicação em: / / )

Autor para correspondência: Neilza Reis Castro

---

CASTRO, N.R., COÊLHO, R.S.B., LARANJEIRA, D., PIMENTEL, R.M. de M FERREIRA,  
C.P. Identificação de fontes de resistência à murcha de fusário, eficiência do uso de filtrado em  
folhas destacadas de helicônia na distinção de resistência e suscetibilidade e mecanismos  
estruturais de resistência envolvidos. Fitopatologia Brasileira

#### RESUMO

A floricultura tropical vem ganhando destaque no cenário agrícola e econômico em alguns estados do Nordeste brasileiro, mas a atividade também mostra alguns problemas como a ocorrência de doenças. A murcha de fusário, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, tem ocasionado prejuízos sobretudo ao cultivo das helicônias. Este trabalho objetivou identificar de possíveis fontes de resistência, a eficiência do uso de filtrados fúngicos na

distinção de resistência e suscetibilidade e verificar a atuação de mecanismos estruturais na resistência do hospedeiro ao patógeno. As espécies de helicônia utilizadas na identificação de fontes foram *Heliconia bihai*, *H. psittacorum* cv. Golden Torch, *H. psittacorum* cv. Golden Torch Adrian, *H. rostrata*, *H. stricta* cv. Capri, *H. psittacorum* cv. Sassy, *H. caribea*, *H. latispatha*, *H. wagneriana*, *H. psittacorum* cv. Alan Carle, *H. stricta* cv. Fire Bird e *H. chartacea* cv. Sexy Pink que foram inoculadas com um isolado do *F. oxysporum* f.sp. *cubense*. A avaliação dos sintomas foi realizada aos 40 dias após a inoculação baseada em escala de notas variando de 1 a 6. O filtrado fúngico utilizado na distinção da resistência e suscetibilidade foi obtido através do cultivo do fungo por 24 dias em meio Czapek, de onde foi filtrado e concentrado à vácuo. Foram utilizadas as concentrações de 25, 50, 75 e 100% do filtrado que fora depositado (1 ml) na superfície de folhas destacadas das cultivares resistente *H. psittacorum* cv. Golden Torch e suscetível *H. psittacorum* cv. Alan Carle. As folhas foram incubadas por 24, 48 e 72 horas sob condição de câmara úmida, a avaliação foi feita aos 48 horas de incubação. Os mecanismos estruturais envolvidos na interação foram observados por cortes histológicos nas raízes das espécies utilizadas no estudo de fontes de resistência e os tratamentos foram inoculados e não inoculados com *F. oxysporum* f.sp. *cubense*. As espécies que mostraram resistência à murcha de fusário foram *H. bihai*, *H. psittacorum* cv. Golden Torch, *H. psittacorum* cv. Golden Torch Adrian, *H. rostrata*, *H. stricta* cv. Capri, *H. psittacorum* cv. Sassy e *H. caribea*. As moderadamente resistentes foram *H. latispatha*, *H. wagneriana*, *Heliconia psittacorum* cv. Alan Carle, *H. stricta* cv. Fire Bird e *H. chartacea* cv. Sexy Pink exibiram suscetibilidade à doença. A concentração do filtrado que melhor distinguiu a resistência da suscetibilidade diante dos padrões utilizados foi 50% quando avaliado 48 horas após a inoculação, onde pôde-se verificar a formação de lesões apenas na cultivar suscetível. Quanto aos mecanismos estruturais verificou-se a não relação entre a resistência, a espessura da parede celular e a lignificação, pois algumas espécies resistentes apresentaram o mesmo comportamento que espécies suscetíveis.

Palavras-chaves adicionais: murcha de fusário, fontes de resistência, filtrado fúngico, lignificação

## ABSTRACT

Identification of the resistance sources at Fusarium wilt, efficiency of the filtrate use in detached leaves of heliconia in distinction of the resistance and susceptibility and structural mechanisms of resistance involved. The tropical floriculture have been eminent in the agriculture and economic canary in Brazil northeast states, but the activity too show some problems as the diseases occurrence. The Fusarium wilt, caused for *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, has caused damage above all to heliconias cultivation. This work had as objective to identify resistance sources, to verify efficiency of fungical filtrates in distinction of resistance and susceptibility and to verify the actuation of structural mechanisms in pathogen-host interaction. The heliconias species utilized in sources identification studies were *Heliconia bihai*, *H. psittacorum* cv. Golden Torch, *H. psittacorum* cv. Golden Torch Adrian, *H. rostrata*, *H. stricta* Capri, *H. psittacorum* cv. Sassy, *H. caribea*, *H. latispatha*, *H. wagneriana*, *H. psittacorum* cv. Alan Carle, *H. stricta* cv. Fire Bird and *H. chartacea* cv. Sexy Pink that were inoculated with a *F. oxysporum* f.sp. *cubense* isolate. The symptoms were evaluated at 40 days after inoculation considering disease index with variation of 1 to 6. The fungical filtrate utilized in distinction of resistance and susceptibility was obtained after fungus incubation during 24 days in Czapek medium where was filtrated and concentrated in void. Were utilized the concentrations of 25, 50, 75 and 100% that was deposited (1 mL) in detached leaves surface of resistant cultivar *H. psittacorum* cv. Golden Torch and susceptible *H. psittacorum* cv. Alan Carle. The inoculated leaves were incubated for 24, 48 and 72 hours in humid chamber conditions, the evaluation was realized at 48 hours. The structural mechanisms involved in interaction were observed by histological cuts on roots used species at resistance sources studies and the treatments were inoculated and no inoculated with *F. oxysporum* f.sp. *cubense*.

Additional keywords: Fusarium wilt, resistance sources, fungical filtrate, lignification

---

## INTRODUÇÃO

A utilização da resistência genética na redução de perdas ocasionadas por doenças vem sendo ampliada, principalmente para as doenças onde o controle químico é ineficiente (Agrios, 2005). Esta alternativa de controle também é incentivada pela consciência ecológica e pela conscientização das conseqüências causadas por uso inadequado de agrotóxicos. A murcha de fusário, causada pelo *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense* (E.F. Smith) Snyder & Hans., fungo habitante do solo, de difícil controle, vem causando prejuízos ao setor da floricultura tropical, inclusive ao cultivo das helicônias (*Heliconias* spp)

O uso de espécies resistentes e a identificação de fontes promissoras de resistência para o emprego em programas de melhoramento vegetal tornam-se a medida mais eficiente e econômica no controle da murcha de fusário (Cavalcanti *et al.*, 2002). O sucesso do melhoramento de plantas requer técnicas eficientes levando-se em consideração as possíveis fontes, o conhecimento dos caracteres genéticos e fisiológicos envolvidos no processo e estratégias apropriadas (Foolad *et al.*, 2000).

Várias técnicas vêm sendo exploradas para a seleção de fontes de resistência. Avaliações de plantas cultivadas em campo e em casa-de-vegetação ainda são as mais usadas, mas consistem em técnicas que requerem longos períodos de tempo e os resultados podem ser influenciados por fatores ambientais e biológicos como temperatura, umidade, presença de pragas e/ou outros fitopatógenos (Foolad *et al.*, 2000). Ultimamente, novas técnicas vêm surgindo e permitindo resultados mais rápidos como os experimentos conduzidos em laboratório utilizando-se partes destacadas de plantas, como o uso de extratos fúngicos em folhas, caules e rizomas. Pesquisas têm revelado sucesso no emprego destas técnicas em relação a alguns patossistemas (Foolad *et al.*, 2000; Marchi *et al.*, 2006; Companioni *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2005).

O uso de filtrados em inoculação em partes destacadas de plantas vem se tornando realidade dentro das pesquisas de reação de resistência e suscetibilidade à doenças, caracterizando-se como um método rápido e menos destrutivo (Companioni *et al.*, 2003). Os



filtrados fúngicos contêm toxinas produzidas pelos fitopatógenos que afetam as plantas alterando a permeabilidade da membrana celular, inativando a ação enzimática, levando as células do tecido do hospedeiro ao colapso (Agrios, 2005).

Em relação à defesa de plantas ao ataque de patógenos, ocorrem mecanismos que contribuem para a resistência no hospedeiro, dentre esses mecanismos, destacam-se os estruturais que atuam como barreiras físicas, evitando ou restringindo o avanço do fitopatógeno e, como consequência, o desenvolvimento da doença (Leite & Pascholati, 1995). Os mecanismos estruturais, como os bioquímicos, podem ser pré-formados e pós-formados. As cutículas, tricomas, estômatos, fibras, papilas, halos, lignificação, camada de cortiça e tiloses fazem parte deste arsenal de defesa no hospedeiro (Agrios, 2005).

A lignina consiste em uma das substâncias mais importantes da parede celular, presente na lamela média, paredes primária e secundária, composta por unidades de fenilpropano e seu acúmulo é ativado enzimaticamente através da peroxidase (Shi *et al.*, 1991). A lignificação já foi constatada como mecanismo de defesa em alguns trabalhos referentes à resistência genética, muitos deles estão relacionados ao gênero *Fusarium oxysporum* Schlect. (Redman *et al.*, 1999; Rodrigues & Coelho, 2003), inclusive na interação *F. oxysporum* f.sp *cubense* vs. bananeira, onde constatou-se uma maior produção de lignina na cultivar resistente utilizada no experimento (De Ascensão & Dubery, 2000).

Em razão do pouco conhecimento sobre o patossistema *F. oxysporum* f.sp *cubense* vs. *Heliconia* spp, o presente trabalho objetivou a identificação de possíveis fontes de resistência à murcha de fusário, verificar a eficiência do uso de filtrados fúngicos na distinção de espécies resistentes e suscetíveis e verificar a influência da lignificação, como mecanismo estrutural, no processo de defesa à doença.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Caracterização de espécies de *Heliconia* spp como fontes de resistência

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, sendo realizadas inoculações em plantas de diversas espécies de helicônia. As espécies inoculadas foram *Heliconia wagneriana* Peters, *H. chartacea* Lom. cv. Sexy Pink, *H. caribaea* Lam. cv. Yellow Sun, *H. bihai* L., *H. latispatha* Benth., *H. rostrata* Ruiz & Pavan, *H. stricta* Huber cv. Fire Bird, *H. stricta* Huber, *H. psittacorum* L. cv. Sassy, *H. psittacorum* L. cvs. Alan Carle, Golden Torch e Golden Torch Adrian. As inoculações foram feitas através do método de injeção de 20 mL de suspensão fúngica (concentração de  $10^6$  conídios/mL) no colo das plantas com 90 dias de idade. O isolado (F17 – Marechal Deodoro-AL) utilizado foi caracterizado como o de maior agressividade em experimentos anteriormente testado quanto à patogenicidade. As avaliações foram feitas aos 40 dias após a inoculação e foram utilizadas três escalas de nota: escala variando de 1 a 4, onde 1 = rizoma sem descoloração, 2 = descoloração até 1/3 do tecido, 3 = descoloração de 1/3 a 2/3 do tecido vascular e 4 = descoloração acima de 2/3 do tecido (Cordeiro *et al.*, 1993), a segunda e a terceira escalas baseadas em sintomas internos (escurecimento longitudinal vascular) e em sintomas externos (amarelecimento das folhas e murchas), variando de 1 a 6, onde 1 = plantas saudáveis, sem sintomas externos ou internos observáveis no caule cortado na altura do primeiro internódio logo acima dos cotilédones; 2 = vasos coloridos na região do primeiro internódio sem outros sintomas visíveis; 3 = vasos coloridos até a altura da primeira folha, com pelo menos um folíolo com amarelecimento; 4 = vasos coloridos até a metade do comprimento do caule, com 2 ou mais folhas com amarelecimento; 5 = vasos coloridos até próximo ao ponteiro, maioria das folhas murchas, com exceção do ponteiro; e 6 = plantas mortas, ou com vasos coloridos e folhas murchas até o ponteiro (Tokeshi *et al.*, 1966). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 12 repetições e os dados foram analisados através do teste de Scott-knot ( $p=0,05$ ) no programa SAEG 9.0.

#### Efeito do filtrado fúngico em folhas destacadas de espécies de Helicônia

O experimento foi conduzido em condições de laboratório. Foi utilizado um isolado de *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, cultivado por sete dias em meio BDA (batata-dextrose-água).

Discos de micélio foram transferidos para erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio Czapek. O fungo foi incubado no meio por vinte e quatro dias sob alternância luminosa e em temperatura ambiente. As colônias fúngicas foram agitadas manualmente duas vezes por dia. Ao final do cultivo, as colônias foram filtradas em papel de filtro estéril e o volume obtido foi concentrado de 400 mL para 80 mL em evaporador à vácuo. O volume líquido obtido após a evaporação foi concentrado em 100% e diluído para 75, 50 e 25%. Folhas destacadas das *H. psittacorum* cv. Alan Carle e Golden Torch foram utilizadas como padrões de suscetibilidade e resistência respectivamente. A inoculação deu-se através da deposição de 1 mL de cada filtrado na superfície das folhas previamente lavadas e secadas. Antes da deposição do líquido, realizaram-se perfurações em pequenos círculos com auxílio de agulha hipodérmica. As folhas inoculadas foram incubadas por quatro dias, em alternância luminosa e sob condição de câmara úmida. Após o período de incubação, foram observados e medidos os diâmetros das lesões. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco repetições e os dados obtidos foram analisados através do teste de Tukey ( $p=0,05$ ) pelo programa SAEG 9.0.

#### Avaliação dos mecanismos estruturais envolvidos no patossistema

A coleta das raízes para a avaliação da lignificação foi realizada aos 40 dias após a inoculação. Os tratamentos foram: inoculado com um isolado de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* e não inoculado ou testemunha. As raízes coletadas foram fixadas em FAA 95% (50 mL de etanol a 95%, 5 mL de ácido acético, 10 mL de formol e 35 mL de água destilada). Em seguida, todo o material foi conduzido ao laboratório e tratado seguindo a metodologia de Johansen (1940). As secções histológicas foram coradas com safranina, azul de astra e floroglucina para identificação da lignina, segundo Krauter (1997).

Imagens digitais das secções histológicas, dos diferentes órgãos vegetativos da espécie em estudo, foram produzidas sob microscopia óptica (Olympus) com câmera digital (Sony W5) acoplada. As escalas e numerações foram inseridas utilizando-se imagens de lâmina micrométrica, obtidas sob condições idênticas àquelas utilizadas para a confecção das imagens das secções histológicas e programa Photoshop, versão 7.0 (Adobe Systems).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As espécies utilizadas na identificação de fontes de resistência formaram quatro grupos caracterizados como resistente, medianamente resistente, suscetível e altamente suscetível (Tabela 1) baseando-se na escala de notas de Tokeshi *et al* (1966) e analisado estatisticamente pelo teste de Duncan ( $p=0,05$ ). Os dados obtidos pela avaliação dos sintomas internos e externos apresentaram alta correlação ( $r = 0,89$ ) quando analisados através da correlação de Pearson.

As espécies consideradas resistentes foram *H. bihai*, *H. psittacorum* cv. Golden Torch e Golden Torch Adrian, *H. rostrata*, *H. stricta* cv. Capri, *H. psittacorum* cv. Sassy e *H. caribea*. As espécies moderadamente resistentes foram *H. latispatha* e *H. wagneriana*. *Heliconia psittacorum* cv. Alan Carle e *H. chartacea* cv. Sexy Pink foram identificadas como suscetíveis. A única espécie do estudo que foi considerada como altamente suscetível foi a *H. stricta* cv. Fire Bird. A *H. bihai* apresentou um comportamento diferenciado das demais espécies consideradas resistentes, exibindo leve descoloração vascular sem, no entanto, apresentar nenhum sintoma externo.

Das espécies estudadas, apenas *H. caribea* e *H. latispatha* já haviam sido avaliadas anteriormente (Waite, 1963), apresentando comportamento variado em relação a três isolados obtidos de diferentes espécies de helicônias. *Heliconia caribea* foi suscetível a um isolado e resistente aos demais e *H. latispatha* exibiu reação de resistência a todos os isolados, concordando com os resultados obtidos neste trabalho. Os resultados referentes a espécie *H. caribea* comprovam a variabilidade patogênica dos isolados. Isto também pode ser observado em experimento de fontes de resistência na cultura da bananeira onde as reações apresentada pelas cultivares do grupo FHIA variaram de resistente a moderadamente resistente, de acordo com o grupo de compatibilidade vegetativa (VCG) do qual os isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* pertencem (Pérez, 2004).

A concentração do filtrado fúngico em 50% foi a que indicou maior eficiência na distinção das espécies resistente e suscetível. Após 48 horas de incubação das folhas inoculadas,

foi observada a formação de lesões apenas na cultivar Alan Carle, considerada padrão de suscetibilidade, ao contrário da cultivar Golden Torch que não apresentou lesões. Estas reações distintas também foram observadas em experimentos conduzidos por Companioni *et al* (2003) em inoculações de filtrado de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* em folhas de bananeira dos padrões de resistência e suscetibilidade, onde somente na cultivar suscetível “Gros Michel” formaram-se lesões. Este método utilizando filtrado fúngico em partes destacadas do hospedeiro pode ser uma alternativa na identificação de fontes apresentando como vantagens a rapidez dos resultados, a não destruição de plantas inteiras e o uso reduzido de espaço físico, uma vez que pode ser conduzido em laboratório. Estes resultados também foram obtidos por Silva *et al* (2002), os quais conseguiram a distinção de suscetibilidade, suscetibilidade moderada e resistência nas cultivares de bananeira “maçã”, “nanicão” e “prata anã”, em relação a um isolado de *F.oxysporum* f.sp. *cubense*, utilizando a técnica do rizoma inoculado e incubado sob condição de câmara úmida. Outra técnica semelhante e eficiente foi a utilizada por Matsumoto *et al* (1995), os quais cultivaram, *in vitro*, plântulas de bananeira em meio com ácido fusárico e onde observaram a distinção das reações de resistência e suscetibilidade. Em outro patossistema, Foolad *et al* (2003) descartaram esta técnica para seleção de genótipos de tomate resistentes a mancha de alternaria. No entanto, os autores utilizaram suspensões fúngicas ao invés de filtrados concentrados.

Considerando que a avaliação da qualidade funcional da raiz está relacionada ao conteúdo de lignina nas células da endoderme (Gaspar & Coumans, 1987), as espécies em estudo diferiram quanto à presença e ausência do espessamento em “U” e o grau de lignificação deste espessamento.

De modo geral, as espécies variaram quanto ao grau de espessamento e presença/ausência de lignificação nas células da endoderme nas diferentes espécies estudadas (Tabela 2). Três espécies, *H. caribaea*, *H. psittacorum* Golden Torch Adrian e *H. wagneriana* não apresentaram espessamento nem lignificação nos dois tratamentos testados. Três espécies, *H. stricta* cv. Capri, *H. chartacea* cv. Sexy Pink e *H. psittacorum* cv. Sassy, não apresentaram espessamento em “U”, nem lignificação no material inoculado. Entretanto, o material controle

apresentou este espessamento com lignificação e variados valores de espessura (Tabela 2). Quatro espécies, *H. bihai*, *H. psittacorum* cv. Golden Torch, *H. latispatha* e *H. rostrata*, mostraram variação quanto ao grau de espessamento em “U” e intensidade de lignificação (Tabela 2).

Os resultados obtidos mostram que as espécies respondem de modo particular à ação do patógeno. A maior quantidade de deposição de lignina na endoderme, determinada pela intensidade de coloração, foi observada nas espécies *H. psittacorum* cv. Golden Torch e *H. latispatha*. *Heliconia bihai*, apesar de não ter mostrado alteração no grau de espessamento no material inoculado e controle, reduziu a quantidade de lignina (Figura 1). *H. psittacorum* cv. Golden Torch e *H. rostrata* reduziram o espessamento quase pela metade, enquanto *H. latispatha* mostrou comportamento contrário, isto é, aumentou o espessamento em quase o dobro (Tabela 2). Estes resultados mostram que a espessura da parede celular e a lignificação não estão envolvidas na resistência ao *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, uma vez que algumas espécies resistentes apresentaram o mesmo comportamento que a espécie suscetível, podendo-se sugerir a possibilidade da atuação de outros mecanismos no processo da resistência. Resultados semelhantes foram constatados por Rodrigues (2003) que observou a não detecção do aumento de lignina na parede celular, mesmo após a utilização de indutores de resistência, em cultivares resistente e suscetível de caupi na interação com *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*. O acúmulo de lignina pode estar relacionado ao período após contato com o patógeno. Por exemplo, De Ascensão e Dubery (2000) puderam verificar o aumento no acúmulo de lignina em resposta a infecção de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* nas raízes da cultivar de bananeira “Goldfinger”, considerada resistente, entre 4 a 16 horas após a elicitação com o patógeno. Após este período observou-se um ligeiro decréscimo da lignina, enquanto que na cultivar “Williams” o acréscimo de lignina começou apenas de 12 a 16 horas após a interação.

TABELA 1. Reação de espécies de helicônia avaliados em casa de vegetação para a resistência à murcha de fusário, avaliado de acordo com escala de notas

Espécie	Grau de infecção	Reação
<i>H. stricta</i> cv. Fire Bird	6,0 a	AS
<i>H. chartacea</i> cv. Sexy Pink	4,0 b	S
<i>H. psittacorum</i> cv. Alan Carle	3,6 b	S
<i>H. wagneriana</i>	2,0 c	MR
<i>H. latispatha</i>	1,6 d	MR
<i>H. psittacorum</i> cv. Sassy	1,0 d	R
<i>H. stricta</i> cv. Capri	1,0 d	R
<i>H. rostrata</i>	1,0 d	R
<i>H. caribea</i>	1,0 d	R
<i>H. psittacorum</i> cv. Golden Torch	1,0 d	R
<i>H. psittacorum</i> cv. Golden Torch Adrian	1,0 d	R
<i>H. bihai</i>	1,0 d	R

CV (%) = 11,08. Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Reação: R = resistente, MR = moderadamente resistente, S = suscetível e AS = altamente suscetível.

TABELA 2. Valores médios do espessamento em “U” e presença/ausência da endoderme radicular de espécies de helicônia, em material inoculado com *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* e não inoculado

Espécies	Inoculado	Não inoculado
<i>Heliconia bihai</i>	2,24	2,27
<i>H. caribaea</i>	E (-) L (-)	E (-) L (-)
<i>H. chartacea</i>	E (-) L (-)	2,02
<i>H. latispatha</i>	3,19	1,80
<i>H. psittacorum</i> Golden Torch	3,0	5,80
<i>H. psittacorum</i> Golden Torch Adrian	E (-) L (-)	E (-) L (-)
<i>H. psittacorum</i> Sassy	E (-) L (-)	3,89
<i>H. rostrata</i>	1,80	2,83
<i>H. stricta</i>	E (-) L (-)	3,56
<i>H. wagneriana</i>	E (-) L (-)	E (-) L (-)

E (-) indica a ausência de endoderme radicular e L (-) indica a ausência de lignina



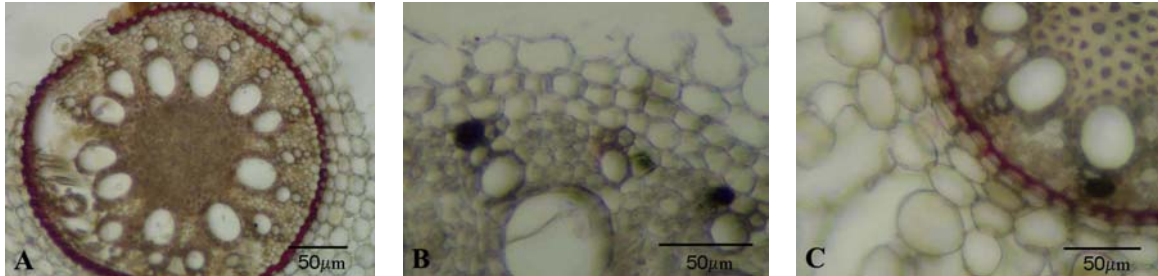


FIGURA 1. Secção transversal das raízes de *H. psittacorum* Golden Torch (A), *Heliconia bihai* (B) e *H. latispatha* (C) mostrando variado conteúdo de lignina no espessamento em “U” na endoderme.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G.N. Plant Pathology, 5 ed., Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005, 922p.
- Castro, N.R.; Serra, I.M.R.S; Coêlho, R.S.B.; Laranjeira, D. Patogenicidade de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* em *Heliconia* spp. Resumos, 39º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Salvador, BA. 2006. pp.S140.
- Cavalcanti, L.S.; Coêlho, R.S.B.; Perez, J.O. Utilização de dois métodos de inoculação na avaliação da resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. Ciência Rural 32:1-5. 2002.
- Companioni, B.; Arbola, M.; Rodrigues, Y.; Mosqueada, M.; Pérez, M.C. Borrás, O.; Lorenzo, J.C.; Santos, R. Use of culture-derived *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, race 1 filtrates for rapid and non destructive in vitro differentiation between resistant and susceptible clones of field-grown banana. Euphytica 130:341-347. 2003.
- Cordeiro, Z.J.M.; Dantas, J.L.L Rating bananas reaction to fusarium wilt in Brazil. Proceedings. Anais. International Symposium on recent developments in banana cultivation technology, Taiwan, 1983. p.85-88.
- De Ascensão, A.R.D.C.F.; Dubery, I.A. Panama disease: cell wall reinforcement in banana roots in response to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race four. Biochemistry and Cell Biology 90:1173-1180. 2000.
- Duarte, M. de L.R.; Archer, S.A. In vitro toxin production by *Fusarium solani* f.sp. *piperis*. Fitopatologia Brasileira 28:229-235. 2003.
- Euclides, R.F. Manual de utilização do programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas). Viçosa: UFV. 1983.

Foolad, M.R.; Ntahimpera, N.; Christ, B.J.; Lin, G.Y. Comparison of field, greenhouse, and detached-leaflet evaluations of tomato germ plasm for early blight resistance. *Plant Disease* 84: 967-972. 2000.

Johansen, D.A. *Plant microtechnique*. New York. McGraw-Hill Book Co. Inc. 1940.

Krauter, D. Erfahrungen mit Etzolds FSA-Färbung für pflanzenschnitte. *Mikroskoposmos* 74:231-233. 1985.

Leite, B.; Pascholati, S.F. Hospedeiro: alterações fisiológicas induzidas por fitopatógenos. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A (Eds.). *Manual de Fitopatologia*. São Paulo. Agronômica Ceres. 1995. 1. pp.417-453.

Marchi, C.E.; Borges, M.F.; Mizubuti, E.S.G. Atividades amilolítica de *Alternaria solani* e a relação com a agressividade em tomateiro. *Summa Phytopathologica* 32: 345-352. 2006.

Matsumoto, K.; Barbosa, M.L.; Souza, L.A.C.; Teixeira, J.B. Race 1 fusarium wilt tolerance on banana plants selected by fusaric acid. *Euphytica* 84:104-112. 1995.

Pérez-Vicente, L. Fusarium wilt (Panama disease) of bananas: an updating review of the current knowledge on the disease and its causal agent. *Anais. 16ª Reunión Internacional Acobat, México, 2004*. p.1-15.

Redman, R.S.; Freeman, S.; Clifton, D.R.; Morrel, J.; Brow, G.; Rodrigues, R.J. Biochemical analysis of plant protection afforded by a nonpathogenic endophytic mutant of *Colletotrichum magna*. *Plant Physiology* 119:795-804. 1999.

Rodrigues, A.A.C. Resistência de caupi a *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*: avaliação de germoplasmas, indução de defesa e caracterização de mecanismos bioquímicos, estruturais a análise da capacidade funcional do xilema. (Tese de Doutorado). Recife. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2003.

Shi, J.; Mueller, W.C.; Beckman, C.H. Ultrastructural responses of vessel contact cells in cotton plants resistant or susceptible to infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*.

Physiological and Molecular Plant Pathology 38:211-222. 1991.

Silva, R.D.C.; Mendes, M.A.S.; Tenente, R.C.V. Testes de virulência de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* em rizomas de bananeira. Resumos, 35º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Recife, PE. 2002. p. S199.

Tokeshi, H.; Galli, F. Variabilidade de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Wr.)Sny. & Hans. em São Paulo. Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz 23: 195-209. 1966.

Waite, B.H. Wilt of *Heliconia* spp. caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 3. Tropical Agriculture 40: 299-305. 1963.

## **CONCLUSÕES GERAIS**



## CONCLUSÕES GERAIS

Considerando o pouco conhecimento do patossistema *Heliconia* spp. vs. *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, foram realizadas pesquisas sobre a ocorrência da murcha de fusário, metodologia de inoculação, caracterização morfológica, quanto à agressividade e diversidade genética dos isolados, identificação de fontes de resistência, eficiência no uso de filtrado fúngico em folhas destacadas na distinção de resistência e suscetibilidade e mecanismos estruturais envolvidos na resistência ao patógeno, das quais pôde-se concluir que:

- Foi observado um aumento considerável na ocorrência da murcha de fusário nas propriedades produtoras de flores tropicais;
- O método de injeção foi o mais eficiente em menor intervalo de tempo na reprodução dos sintomas característicos da murcha de fusário;
- Os caracteres morfológicos dos macro e microconídios encontraram-se dentro das dimensões permitidas para a espécie;
- Entre os isolados analisados, detectou-se três grupos de agressividade, onde a maioria apresentaram-se como de agressividade intermediária;
- O estudo de diversidade genética por análise molecular indicou alta variabilidade genética dos isolados e a não correlação geográfica dentro de cada grupo formado;
- O estudo de grupamento de compatibilidade vegetativa (VCG) indicou alta diversidade genética, onde a maioria dos isolados não pertenceram a nenhum grupo observado;
- As espécies *Heliconia bihai*, *H. psittacorum* cv. Golden Torch, *H. psittacorum* cv. Golden Torch Adrian, *H. psittacorum* cv. Sassy, *H. rostrata*, *H. stricta* cv. Capri e *H. caribea* foram resistentes, sugerindo-se o uso destas espécies em programas de melhoramento e também o cultivo em áreas com ocorrência da doença;

- A distinção das reações de resistência e suscetibilidade em folhas destacadas de helicônia pôde ser observada com a inoculação do filtrado fúngico na concentração de 50%;
- O espessamento em “U” e a presença ou ausência da lignina na endoderme das raízes não apresentaram relação com a reação de resistência ao patógeno, indicando que este tipo de mecanismo não está envolvido no processo.