

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Caracterização morfológica, filogenética e patogênica de isolados de  
*Neocosmospora* (complexo Solani de *Fusarium*) de raízes de soja do cerrado  
brasileiro**

**Victor Hugo Assis Hoff Brait**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba  
2023**



**Victor Hugo Assis Hoff Brait**  
**Engenheiro Agrônomo**

**Caracterização morfológica, filogenética e patogênica de isolados de *Neocosmospora*  
(complexo Solani de *Fusarium*) de raízes de soja do cerrado brasileiro**

Orientador:  
Prof. Dr. **NELSON SIDNEI MASSOLA JUNIOR**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba**  
**2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Brait, Victor Hugo Assis Hoff

Caracterização morfológica, filogenética e patogênica de isolados de *Neocosmospora* (complexo Solani de *Fusarium*) de raízes de soja do cerrado brasileiro / Victor Hugo Assis Hoff Brait. - - Piracicaba, 2023.

45 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. *Glycine max* 2. *Fusarium solani* 3. *Neocosmospora* 4. Fungo fitopatogênico 5. Podridão radicular 5. Cerrado I. Título

*“Lass uns die Wolke vier  
Bitte nie mehr verlassen  
Weil wir auf Wolke sieben  
Viel zu viel verpassen”  
 (“Wolke 4”,  
Phillip Dittberner)*

## SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>7</b>
<b>2. COLETA DE DADOS E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....</b>	<b>14</b>
2.1. INTRODUÇÃO .....	14
2.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	16
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
2.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	23
REFERÊNCIAS.....	23
<b>3. CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA.....</b>	<b>26</b>
3.1. INTRODUÇÃO .....	27
3.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	29
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
3.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	33
REFERÊNCIAS.....	33
<b>4. CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA.....</b>	<b>37</b>
4.1. INTRODUÇÃO .....	37
4.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	39
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	42
REFERÊNCIAS.....	42
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>45</b>

## RESUMO

### **Caracterização morfológica, filogenética e patogênica de isolados de *Neocosmospora* (complexo Solani de *Fusarium*) de raízes de soja do cerrado brasileiro**

A cultura da soja é de grande importância para a economia e segurança alimentar no Brasil. Entretanto, em várias lavouras, há relatos de problemas com podridões radiculares, principalmente as causadas por fungos fusarioides. O diagnóstico é dificultado por dois motivos principais: a sintomatologia é genérica e há constante mudança na classificação dos gêneros. O primeiro problema pode ser facilmente resolvido levando-se o material ao laboratório. Todavia, o segundo exige uma solução mais complexa, uma análise filogenética multilocus. Há atualmente duas escolas divergentes para a classificação de *Fusarium*. Resumidamente, uma substituiu o complexo Solani por um novo gênero (*Neocosmospora*) e outra o mantém dentro de *Fusarium*. De toda forma, em ambos os lados há concordância sobre os clados filogenéticos presentes na história evolutiva do gênero e a mudança ocorre apenas na nomenclatura. Há então a possibilidade de usar qualquer um dos dois sistemas de classificação para identificar os clados envolvidos no parasitismo de culturas agrícolas, pois os nomes das espécies são intercambiáveis. Dito isso, poucos trabalhos no Brasil buscaram fazer um levantamento das espécies de *Fusarium* em raízes de soja de acordo com esse novo sistema filogenético. O objetivo deste é preencher essa lacuna e caracterizar também a patogenicidade e a morfologia dos isolados selecionados. O cerrado brasileiro foi o cenário escolhido para a pesquisa, pois é a área de maior importância para a sojicultura no país. No total, 153 reboleiras de 10 cidades foram amostradas. Foram feitas câmaras úmidas com as raízes e 28 isolados de fungos com conídios típicos de *Fusarium* foram recuperados destas. Para os trabalhos de caracterização de morfologia, filogenia e patogenicidade, 12 isolados foram selecionados. A caracterização morfológica foi feita em microcultivo com BDA e em placas de Petri com meio cravina-ágar. Foram quantificados o comprimento de 50 macro e microconídios e a porcentagem de septação dos microconídios. Também foi analisada a presença de clamidósporos, o tipo de organização dos conídios nas fiálides e a presença de mono e polifiálides. Para a análise filogenética, foi extraído o DNA dos 12 isolados e algumas regiões foram amplificadas, uma parte da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB2) e o fator de alongamento da tradução eucariótica 1 alfa (EF-1 $\alpha$ ). Para o teste de patogenicidade, foram confeccionadas caixas gerbox com areia e água autoclavada e sementes de soja da cultivar TMG7067 IPRO. Após três dias, as sementes foram inoculadas com uma suspensão de esporos e acondicionadas a 25°C com fotoperíodo de 12/12h por quatro dias até a avaliação por pesagem. As características morfológicas dos isolados eram bem similares. Todos apresentavam clamidósporos, monofiálides, ausência de polifiálides e distribuição dos conídios nos conidióforos em falsas cabeças. O isolado LFN0475 apresentou a maior mediana do comprimento de macroconídios e o isolado LFN0471, a menor. Não foi possível amplificar a segunda parte da região RPB2 devido a dificuldades técnicas. Por isso, a análise genética foi conduzida com a primeira parte dessa região e a região EF-1 $\alpha$ , exceto para os isolados LFN0470 e LFN0471. Para estes foi feita a análise apenas com a região EF-1 $\alpha$ . Apesar disso, foi possível chegar à espécie para 11 dos 12 isolados. Dez foram identificados como *Neocosmospora falciformis* e um como *Neocosmospora suttoniana*. A análise de patogenicidade revelou que todos os isolados eram patogênicos à soja. Foi possível também perceber que alguns isolados eram mais agressivos que outros. Apesar disso, não foi possível estabelecer uma hierarquia de agressividade para todos os isolados. Em suma, foram encontradas espécies patogênicas pertencentes ao novo gênero *Neocosmospora* (complexo Solani de *Fusarium*), indicando alta frequência desse grupo em raízes de soja de reboleiras no cerrado brasileiro.

Palavras-chave: *Glycine max*, *Fusarium solani*, *Neocosmospora*, Fungo fitopatogênico, Podridão radicular, Cerrado

## ABSTRACT

### **Morphological, phylogenetic, and pathogenic characterization of *Neocosmospora* (*Fusarium solani* species complex) isolates from soybean roots from Brazilian tropical savanna**

Soybean production is important for Brazilian economy and food security. Unfortunately, *Fusarium* root rot is reported from many production fields. The diagnose is difficult for two reasons, the symptoms are not specific and there is constant change in *Fusarium* taxonomy. The first problem can be easily addressed by taking diseased plants to a laboratory. But the second one requires a complex solution, a multilocus phylogenetic analysis. There are currently two divergent views on *Fusarium* taxonomy. Abridgedly, one accepts FSSC (*Fusarium solani* species complex) as part of *Fusarium* genus and the other considers the complex as a different genus, namely *Neocosmospora*. In any case, both sides agree on the clades that form the evolutionary history of the genus, making the divergences only nomenclatural. As a result, there is the possibility of using either of the systems to identify the clades of *Fusarium* parasitising important crops, since species names are interchangeable. That said, few surveys have been conducted in Brazil using the new phylogenetic classification to check *Fusarium* species present in soybean roots. The objective of this project is to fill that gap in the understanding of soybean production. Brazilian tropical savanna was chosen as the sample space, since it is the largest area of soybean production in the country. Altogether, 153 patches from fields located in 10 cities were sampled. Humid chambers were made with the disinfected roots. It was possible to isolate 28 fungi with fusarium-like conidia. In the end, 12 isolates were selected for the following characterizations. Morphological analyses were performed in microculture with PDA (Potato dextrose agar) and CLA (Carnation leaf agar) in Petri dishes. Macro and microconidia length and number of septa in microconidia were quantified. The presence of chlamydospores, organisation of spores in phyalides and the presence of mono and polyphyalides were all observed. For phylogenetic analysis, fungal DNA was extracted, and two regions were amplified, RPB2 and TEF-1 $\alpha$ . For the pathogenicity test, humid chambers for seed germination were kept at 25°C with 12/12h light regime. After three days, the seed were inoculated and, after four days from inoculation, the plants were weighted. Morphological traits were similar for all isolates. All showed chlamydospores, monophylides, absence of polyphyalides and distribution of conidia in conidiophores as false heads. Regarding length, isolate LFN0475 presented the highest length and isolate LFN0471 presented the shortest. It was not possible to amplify the second part of RPB2 due to technicalities. Therefore, phylogenetic analysis was conducted with the first part of RPB2 and EF-1 $\alpha$ , except for isolates LFN0470 and LFN0471, which had their analysis done with only EF-1 $\alpha$ . Despite that, it was possible to identify the species for eleven of the twelve isolates. Ten were identified as *Neocosmospora falciformis* and one as *Neocosmospora suttoniana*. All isolates are pathogenic to soybean. The pathogenicity test also revealed some more aggressive isolates. Nevertheless, it was not possible to establish a hierarchy of aggressiveness. In conclusion, only pathogenic species belonging to the new genus *Neocosmospora* (FSSC) were found, suggesting a high frequency of those species in patches over soybean fields from Brazilian tropical savanna.

Keywords: *Glycine max*, *Fusarium solani*, *Neocosmospora*, Phytopathogenic fungus, Root rot, Brazilian tropical savanna



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da soja tem sido importante para o Brasil desde a década de 1960. Nesse período, a soja provou ser uma opção para a primavera na região Sul, onde o trigo de inverno era a cultura principal. Além disso, houve um crescimento na cadeia produtiva de suínos e aves, aumentando a demanda por rações. O farelo de soja veio a calhar nesse contexto, já que possui alto valor proteico e é mais barato que fontes de proteína animal. Na década de 1970, também pelo aumento da produção de carne, outros países aumentaram a demanda por proteína vegetal. Conseqüentemente, o preço dos grãos de soja subiu internacionalmente, possibilitando um maior aumento na produção brasileira. Esse quadro de alta demanda perdura até hoje, fazendo da soja uma das principais culturas de exportação do Brasil (EMBRAPA SOJA, 2021; CONAB, 2022).

A cadeia de produção da soja se divide em três: grãos, farelo e óleo. Esse “complexo soja”, como normalmente é chamado na economia, foi responsável por aproximadamente 40% das exportações brasileiras do agronegócio em 2022. Nesse ano, os maiores estados exportadores foram Mato Grosso, Goiás e Minas Gerais, que produziram 37,4%, 12,9% e 7,19% da safra brasileira em 2021/2022 (AGROSTAT, 2022). Dos três produtos, o mais exportado pelo Brasil é o grão, responsável por 84% da receita obtida pela exportação do complexo soja em 2022. O principal comprador do grão é a China, que consome cerca de 70% dos destinados à exportação (COMEX STAT, 2022). Os outros dois produtos, farelo e óleo, são menos exportados pelo Brasil, tendo a Argentina como principal país exportador (FAO, 2022).

A soja tem fatores ambientais limitantes para a produção. Os mais críticos para o Brasil são: fotoperíodo, temperatura e disponibilidade hídrica (GONÇALVES, 2019). A questão do fotoperíodo já está bem resolvida, pois existe uma caracterização de grupos de maturação para cada latitude. Assim, é possível encontrar relações de cultivares adaptadas à duração do dia de qualquer local do Brasil (BRASIL, 2021). Já problemas com os outros dois fatores, disponibilidade hídrica e temperatura, são mais comuns nas lavouras brasileiras.

Dessa forma, é importante conduzir a cultura de maneira que as fases mais susceptíveis não acabem encontrando suas épocas mais críticas. Para tal, há o zoneamento climático, estabelecendo as melhores janelas de semeadura para cada região. Além disso, no zoneamento é possível definir as variedades mais adaptadas a cada local (BRASIL, 2021). Adicionando-se a todos esses fatores a nutrição, a construção da produtividade estará praticamente projetada. A

partir deste ponto, os problemas adicionais estarão relacionados principalmente à proteção das plantas.

Os gêneros de fungos fusarioides são considerados um desses problemas. Eles chamam a atenção por apresentarem diversas espécies fitoparasitas e saprófitas (LESLIE & SUMMERELL, 2006). A taxonomia ainda é confusa, já que houve várias mudanças no conceito de espécie desde a criação do gênero *Fusarium*. Nos primeiros anos o hospedeiro praticamente definia a espécie, com mais de mil criadas. Com o passar do tempo, para organizar essa miscelânea, pesquisadores buscaram formas de classificação que levavam em conta caracteres micológicos (SUMMERELL, 2019). Esse foi um grande avanço, já que possibilitou maior rapidez e exatidão no diagnóstico. Atualmente, a filogenia multilocus também vem em auxílio da classificação dos fungos fusarioides, contribuindo para a identificação de espécies crípticas (COSTA et al., 2016; LAURENCE et al., 2014). Com isso, é possível que os usuários da taxonomia façam uma identificação satisfatória para a execução dos seus trabalhos.

O gênero *Fusarium* pode ser dividido em complexos de espécies. Algumas características morfológicas e filogenéticas se juntam para formar estes complexos (SUMMERELL, 2019). Vários já foram associados à soja, entre eles, *Tricinatum*, *Incaratum*, *Sambucinum*, *Redolens*, *Oxysporum*, *Fujikuroi* e *Graminearum*. Ainda não se sabe quantas espécies conseguem causar doença em soja, pois nem todas foram bem caracterizadas (LESTARI et al., 2016). Entretanto, na literatura é possível encontrar cerca de 20 espécies distintas que são patogênicas à soja (CHANG et al., 2018; ZHOU et al., 2017; CHIOTTA et al., 2015; DÍAZ ARIAS et al., 2013).

Recentemente, *Fusarium* tem sido motivo de controvérsia. Devido à presença de vários clados monofiléticos dentro do gênero, taxonomistas tem tido dificuldade em entrar em acordo sobre qual deveria representar o táxon. Há hoje dois tipos de classificação, uma que divide *Fusarium* em vários gêneros e mantém o táxon apenas para poucos complexos e outra que aceita *Fusarium* como um gênero amplo, abarcando vários clados monofiléticos. O principal ponto de discórdia é o complexo *Solani*, pois é de grande importância médica e agrícola. Segundo Crous et al. (2021), o complexo passa a ser um novo gênero, *Neocosmospora*. Mas de acordo com O'Donnell (2020), continua dentro de *Fusarium*.

Apesar dessas divergências, há evidência filogenética de quais clados estão presentes no gênero. Por isso, mesmo que os sistemas de classificação sejam diferentes, sua topologia é a mesma e o nome das espécies acaba sendo intercambiável (CROUS et al., 2021).

De toda forma, para qualquer tipo de doença, fatores ambientais tem um papel importante no desenvolvimento. Um fator de grande importância é a temperatura. Nelson JR & Yan (2020) mostraram que as espécies fitoparasitas de fungos fusarioides possuem adaptações térmicas diferentes. Isolados de *Neocosmospora*, por exemplo, cresceram melhor a 30°C; já isolados do complexo Tricinctum de *Fusarium*, a 24°C. Em certos casos a maior severidade da doença coincide com a temperatura ótima de crescimento do fungo (CRUZ et al., 2019). Entretanto, em outros há diferença. Isso ocorre porque a resposta térmica da planta também é importante. Um exemplo é a germinação de soja sob baixas temperaturas. Há demora na emergência e os tecidos tenros ficam mais tempo em contato com o solo, facilitando a infecção (NELSON JR & YAN, 2020).

Outra característica de grande influência na severidade das fusarioses da soja é a umidade (SCHERM & YANG, 1996). Quando é excessiva, a severidade é exacerbada. Provavelmente devido a disponibilidade de água para a germinação do fungo e falta de oxigênio para as raízes (FARIAS et al., 2007). Há maior probabilidade da ocorrência desse problema em solos rasos, de textura grosseira e com pouca matéria orgânica, pois essas características diminuem a capacidade de retenção e percolação de água (BRADY & WEIL, 2013). É por isso que, em locais assim, há maior preocupação com a doença.

Existem dois tipos de manejo recomendados para as fusarioses da soja: genético e químico. Há algumas variedades disponíveis com resistência quantitativa ao fungo. Entretanto, o melhor resultado é obtido quando tratamento de semente também é utilizado. Um fungicida que se mostrou eficiente nessa integração é fluopyram (KANDEL et al., 2019). Ainda outros métodos de controle, por exemplo, rotação de culturas e aração e gradagem, também já foram estudados, mas os resultados não têm sido consistentes (HARTMAN et al., 2015).

Apesar de ser um fungo bem conhecido entre os técnicos, por causa das dimensões do organismo e da necessidade de técnicas e ferramentas especiais, é improvável que consigam diagnosticar o problema assertivamente no campo. Por isso, pesquisadores devem se dispor a buscar as respostas para as perguntas primordiais: Quais espécies estão presentes nas regiões produtoras de soja e qual o dano potencial de cada espécie?

## REFERÊNCIAS

- AGROSTAT. Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro. **Exportações Brasileiras do Agronegócio por Setores – 2021**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2021. Disponível em:<<http://indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm>>. Acesso em: 07 jun. 2021.
- BRADY, N.C. & WEIL, R.R. **Elementos da natureza e propriedades dos solos**. Tradução técnica: Igo Fernando Lepsch, 3. ed. Porto Alegre, RS: Bookman, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Gabinete do Ministro. **Portaria nº 111, de 11 de maio de 2021**. Brasília, 2021.
- CHANG, X.; DAI, H.; WANG, D.; ZHOU, H.; HE, W.; FU, Y.; IBRAHIM, F.; ZHOU, Y.; GONG, G.; SHANG, J.; YANG, J.; WU, X.; YONG, T.; SONG, C.; YANG, W. Identification of *Fusarium* species associated with soybean root rot in Sichuan Province, China. **European Journal of Plant Pathology**, v.151, n.3, p.563-577, 2018.
- CHIOTTA, M.L.; ZANON, M.S.A.; GIAJ-MERLERA, G.; TESSMANN, D.; BARROS, G.C.; CHULZE, S. Phylogenetic analyses of the *Fusarium graminearum* species complex isolated from soybean in Argentina and Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 10, 2015.
- COMEX STAT. Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços. **COMEX VIS – SOJA**. 2022. Disponível em:< <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/comex-vis>>. Acesso em 20 dez. 2022.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileiro – grãos: Oitavo levantamento, safra 2020/2021**.: Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento. 2022. Disponível em:< <https://portaldeinformacoes.conab.gov.br/produtos-360.html>> . Acesso em: 20 dez. 2023.
- COSTA, S.S.; MATOS, K.S.; TESSMAN, D.J.; SEIXAS, C.D.S.; PFENNING, L.H. *Fusarium paranaense* sp. nov., a member of the *Fusarium solani* species complex causes root rot on soybean in Brazil. **Fungal Biology**, v.120, n.1, p.51-60, 2016.
- CROUS, P. W.; LOMBARD, L.; SANDOVAL-DENIS, M.; SEIFERT, K.A.; SCHROERS, H.J.; CHAVERRI, P.; GENÉ, J.; GUARRO, J.; HIROOKA, Y.; BENSCH, K.; KEMA, G.H.J.; LAMPRECHT, S.C.; CAI, L.; ROSSMAN, A.Y.; STADLER, M.; SUMMERBELL, R.C.; RAYLOR, J.W.; PLOCH, S.; VISAGIE, C.M.; YILMAZ, N.; THINES, M. *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. **Studies in Mycology**, v. 98, p. 100116, mar. 2021
- CRUZ, D.R.; LEANDRO, L.F.S.; MUNKVOLD, G.P. Effects of temperature and pH on *Fusarium oxysporum* and soybean seedling disease. **Plant Disease**, v.103, n.12, pp. 3234-3243, 2019.
- DÍAZ ARIAS, M.M.D.; LEANDRO, L.F.; MUNKVOLD, G.P. Aggressiveness of *Fusarium* species and impact of root infection on growth and yield of soybeans. **Phytopathology**, v.103, n.8, p.822-832, 2013.

EMBRAPA SOJA. **História da Soja.** Disponível em:<<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/historia>>. Acesso em: 28 mai. 2021.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAO STAT – Rankings.** 2021. Disponível em:<[http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries\\_by\\_commodity\\_imports](http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity_imports)>. Acesso 07 jun. 2021.

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. **Ecofisiologia da soja.** Londrina: Embrapa Soja, 2007. 8 p. (Embrapa Soja. Circular técnica, 48).

GONÇALVES, R.C.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.M. (Eds). **Métodos em Fitopatologia.** Viçosa, MG. Editora UFV, 2016, p.94-106.

HARTMAN, G.L.; CHANG, H.X., LEANDRO, L.F. Research advances and management of soybean sudden death syndrome. **Crop Protection**, v.73, p.60-66, 2015.

KANDEL, Y R.; BRADLEY, C.A.; CHILVERS, M.I.; MATHEW, F.M.; TENUTA, A.U.; SMITH, D.L.; WISE, K.A.; MUELLER, D.S. Effect of Seed Treatment and Foliar Crop Protection Products on Sudden Death Syndrome and Yield of Soybean. **Plant Disease**, v. 103, n. 7, p. 1712–1720, jul. 2019.

LAURENCE, M.H.; SUMMERELL, B.A.; BURGESS, L.W.; LIEW, E.C.Y. Genealogical concordance phylogenetic species recognition in the *Fusarium oxysporum* species complex. **Fungal biology**, v. 118, n.4, p. 374-384, 2014.

LESLIE, J.F. & SUMMERELL, B.A. **The Fusarium Laboratory Manual.** Ames, Estados Unidos da América: Blackwell, 2006.

NELSON JR, B. & YAN, H. Effect of temperature on *Fusarium solani* and *F. tricinctum* growth and disease development in soybean. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.42, n.4, p.527-537, 2020.

O'DONNELL, K.; AL-HATMI, M.S.; AOKI, T.; BRANKOVICS, B.; CANO-LIRA, J.F.; COLEMAN, J.J.; SYBREN DE HOOG, G.; DI PIETRO, A.; FRANDSEN, R.J.N.; GEISER, D.M.; GIBAS, C.F.G.; GUARRO, J.; KIM, H.; KISTLER, H.C.; LARABA, I.; LESLIE, J.F.; LÓPEZ-BERGES, M.S.; LYSOE, E.; MEIS, J.F.; MANOD, M.; PROCTOR, R.H.; REP, M.; DIEPENINGEN, A.D.; VERWEIJ, P.E.; WAALWIJK, C.; WARD, T.J.; WICKES, B.L.; WIEDERHOLD, N.P.; WINGFIELD, ZHANG, N.; ZHANG, S.X. No to *Neocosmospora*: Phylogenomic and Practical Reasons for Continued Inclusion of the *Fusarium Solani* Species Complex in the Genus *Fusarium*. **MSphere**, v. 5, n. 5, p. e00810-20, 28 out. 2020.

SCHERM, H. & YANG, X.B. Development of Sudden Death Syndrome of soybean in relation to soil temperature and soil water matric potential. **Phytopathology**, v. 86, n. 6, p.642-649, 1996.

SUMMERELL, B.A. Resolving *Fusarium*: current status of the genus. **Annual review of phytopathology**, v. 57, p.323-339, 2019.

ZHOU, Q.; LI, N.; CHANG, K.; HWANG, S.; STRELKOV, S.E.; CONNER, R.L.; MCLAREN, D.L.; FU, H.; HARDING, M.W.; TURNBULL, G.D. Genetic diversity and aggressiveness of *Fusarium* species isolated from soybean in Alberta, Canada. **Crop Protection**, v.105, p.49-58, 2018.



## 2. COLETA DE DADOS E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

### RESUMO

A cultura da soja é de grande importância para o Brasil. É a cultura com maior área plantada no cerrado brasileiro. Há doenças que são comuns na soja, como as podridões de raiz causadas por fungos fusarioides. Uma delas, a morte súbita, é atualmente considerada um dos grandes problemas da sojicultura estadunidense. Há lacunas na literatura sobre as espécies de fungos fusarioides presentes em raízes de soja no Brasil. Para conhecer as espécies de fungos fusarioides presentes em soja no cerrado brasileiro, foi realizado um levantamento de isolados presentes nas raízes. Doze isolados foram coletados de diferentes cidades do cerrado. Uma análise de caracteres morfológicos foi realizada para amparar a identificação filogenética. Os isolados foram caracterizados de duas formas, por meio de microcultivo em ágar-água e BDA (Batata Dextrose Ágar) e plaqueamento em meio cravina-ágar. No microcultivo foi possível observar monofialides, clamidósporos e microconídios dispostos em falsas cabeças. No meio cravina-ágar foi possível observar e medir o comprimento dos macroconídios. As características morfológicas observadas correspondem às de *Neocosmospora* (complexo Solani de *Fusarium*).

Palavras-chave: *Glycine max*; *Fusarium*; *Neocosmospora*; *Fusarium solani*

### ABSTRACT

Soybean production is important for Brazilian economy. It is the main crop grown in Brazilian tropical savanna (cerrado). Fusarioid fungi cause some of the most common soybean diseases in cerrado. One of them, sudden death syndrome, is currently considered one of top 10 soybean diseases in the USA. There is not information in the scientific literature about the species present in soybean roots in Brazil. To fill this gap a survey was conducted across Brazilian cerrado soybean fields. Twelve isolates were collected from different cities. Morphological analysis was conducted to support the phylogenetic identification. Isolates were characterized in two types of media, in microculture with PDA and carnation leaf agar. In microculture it was possible to observe monophyalides, chlamydo spores and microconidia in false heads, as well as to measure the length of macroconidia. Those morphological characteristics were typical of the genus *Neocosmospora* (*Fusarium Solani Species Complex*).

Keywords: *Glycine max*; *Fusarium*; *Neocosmospora*; *Fusarium solani*

### 2.1. INTRODUÇÃO

No cerrado brasileiro, muitos produtores reportam problemas com podridões radiculares. Em várias áreas há reboleiras com plantas depauperadas, cloróticas e enfezadas. É também comum observar grande porção das radículas necrosadas, além de lesões de diversos



tamanhos nas raízes principal e secundárias<sup>1</sup>. Esses sintomas podem ser associados a diferentes patógenos e exacerbados por condições edafoclimáticas (YAN & NELSON, 2022).

Para resolver o problema, técnicos buscam primeiro identificá-lo e depois decidir sobre as medidas de controle. Há importantes gargalos na primeira etapa, a diagnose. Como vários patógenos podem estar presentes, não é simples saber quais são as causas da redução da produtividade (WESTPHAL et al., 2014). Além disso, pode ser que nem mesmo patógenos sejam a causa principal, mas que as condições físicas, químicas e/ou biológicas do solo predisponham a planta a doenças bióticas (GONGORA-CANUL & LEANDRO, 2011).

Num sistema tão complexo, todos os ângulos devem ser considerados, incluindo a contribuição de patógenos secundários, que normalmente são considerados “fracos”. Na maioria das vezes, estes são fungos parasitas facultativos. Vivem no solo e se alimentam de matéria orgânica quando acessível. Em escassez nutricional, sobrevivem por meio de estruturas de resistência (clamidósporos e escleródios) (MASSOLA JÚNIOR, 2018).

Para a cultura da soja, vários desses fungos são conhecidos. Um exemplo são os fungos fusarioides, presentes em praticamente todas as regiões onde há a cultura (CHANG et al., 2018; CHIOTTA et al., 2015; KANG et al., 2020; ZHOU et al., 2018). Para uma correta identificação, é importante primeiramente conhecer a morfologia e comparar com informações presentes na literatura atual.

Fungos fusarioides são fungos filamentosos de micélio característico. Se reproduzem principalmente de forma asexuada. Para tal podem formar três tipos diferentes de esporos: microconídios, macroconídios e clamidósporos (CROUS et al., 2021).

A formação de macro e microconídios (conidiogênese) é do tipo enteroblástica fialídica, portanto a formação dos conídios ocorre em uma célula (fiálide) com uma abertura por onde saem os esporos (MASSOLA JÚNIOR, 2018). Essas células podem ser mono ou polifialídicas, dependendo da quantidade de aberturas que possuem para formação dos conídios (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

Os microconídios são esporos pequenos, com zero, um ou dois septos, presentes em diferentes tamanhos (BARNETT & HUNTER, 1972). Em muitas espécies, são os esporos dominantes em meio BDA, mas para outras nunca foram observados. A disposição dos microconídios nos conidióforos é importante para a identificação (CROUS et al., 2021).

---

<sup>1</sup> Comunicação pessoal com Luís Antônio

Os macroconídios são esporos maiores, multisseptados e em forma de fuso (responsáveis pelo nome *Fusarium*). Os conidióforos que os formam podem estar livres ou agrupados em esporodóquios (CROUS et al., 2021). Normalmente o meio CLA (*carnation leaf agar*) é utilizado para estudá-los, pois estimula o fungo a produzi-los. Além disso, a morfologia e o tamanho são mais uniformes nesse meio (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

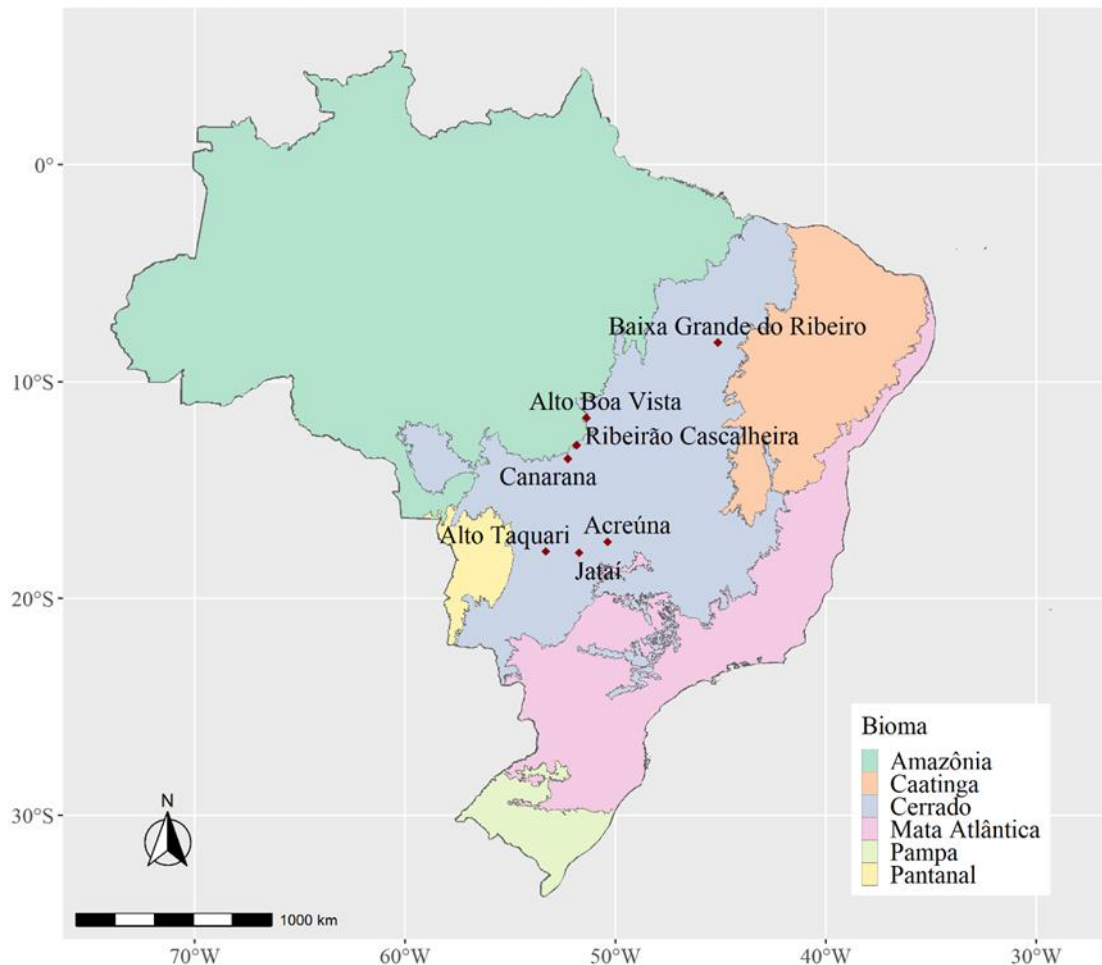
Os clamidósporos são produzidos diretamente nas hifas. Podem ser produzidos internamente ou no término das hifas e isoladamente ou em grupos. Possuem parede espessa e têm um papel importante na sobrevivência sem o hospedeiro (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Entre outubro de 2019 e março de 2021, foram amostradas 153 reboleiras em lavouras de soja de 7 cidades do cerrado brasileiro (Figura 1). Foram coletadas raízes de soja junto a aproximadamente 400g de solo da rizosfera. As reboleiras foram identificadas por meio do índice de vegetação NDVI (*Normalized Difference Vegetation Index*) ou por meio de observações de sintomas na parte aérea comumente relacionados a patógenos habitantes do solo.

As amostras foram enviadas ao Laboratório Exata Brasil em Jataí-GO, onde o solo e a maior parte das radículas foram usados para análise de nematoides. As raízes restantes passaram por um processo de lavagem e desinfestação para análise de crescimento fúngico. Para isso, as raízes foram lavadas e cortadas em seções de 0,5 a 2 cm de comprimento. Essas seções foram desinfestadas em álcool 70% por 40 segundos, hipoclorito 2% por 60 segundos e água destilada autoclavada por 30 segundos. As seções de raízes desinfestadas foram colocadas em placas de Petri com papel filtro úmido, ambos esterilizados, e ficaram armazenadas por uma semana a temperatura ambiente. Durante esse período, foram feitas observações diárias sob microscópio estereoscópio, buscando sinais de fungos fusarioides.

Cidades amostradas no cerrado brasileiro



**Figura 1.** Biomas brasileiros e cidades amostradas.

Das 153 amostras, 108 apresentaram raízes com crescimento micelial típico de fungos fusarioides. Foram então obtidos 33 isolados, cada um de uma amostra, repicados para BDA (Batata dextrose ágar) com sulfato de estreptomicina ( $1\text{g.L}^{-1}$ ) e penicilina ( $1\text{g.L}^{-1}$ ). Posteriormente, os isolados foram armazenados em papel filtro a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Todas as amostras que deram origem aos isolados apresentaram pelo menos uma espécie de nematoide fitopatogênico (Tabela 1).

Os 33 isolados foram observados em meio cravina-ágar e BDA. O meio BDA foi feito com o produto Potato Dextrose Agar for Microbiology da empresa Sigma Aldrich®. O meio cravina-ágar foi feito seguindo as instruções do meio CLA (*Carnation Leaf Agar*) de Leslie & Summerel (2006), exceto pela troca de folhas de *Dianthus caryophyllus* (cravo) por folhas de *Dianthus chinensis* (cravina). Foi necessário realizar essa substituição devido à indisponibilidade de folhas de cravo no momento da confecção do meio.

**Tabela 1. Caracterização morfológica, filogenética e patogênica de isolados de *Neocosmospora* (complexo *Solani* de *Fusarium*) do cerrado brasileiro. Nematóides presentes nas reboleiras de que foram recuperados os isolados de *Neocosmospora*.**

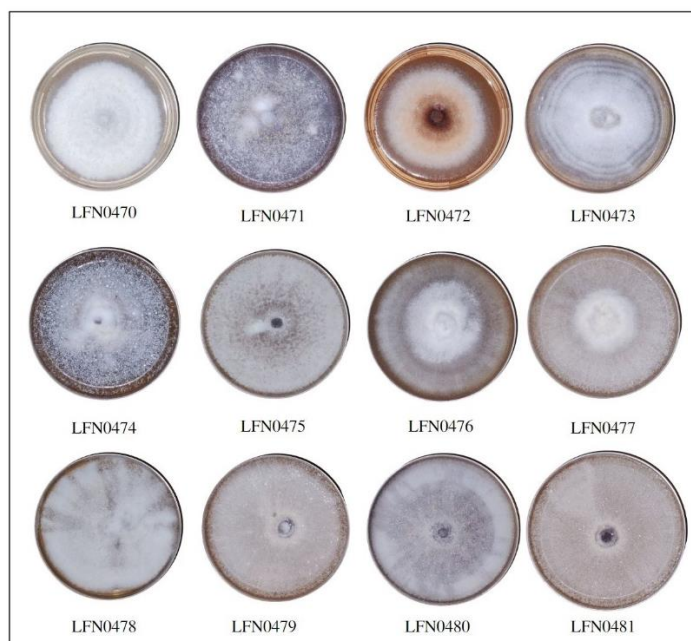
Amostra	<i>Helicotylenchus</i>		<i>Heterodera glycines</i>				<i>Pratylenchus</i>	
	Raiz	Solo	Raiz	Solo	Cistos viáveis	Cistos inviáveis	Raiz	Solo
1	102	715	-	-	-	-	456	60
2	62	576	2	-	2	-	576	10
3	44	290	-	-	-	-	190	15
4	6	150	118	550	50	15	260	35
5	14	320	-	-	-	-	476	105
6	30	610	15	-	-	2	440	50
7	24	475	-	10	-	-	82	4
8	72	1835	-	-	-	-	920	130
9	-	-	-	-	-	-	487	135
10	-	5	-	-	-	-	786	1395
11	-	5	-	-	-	-	168	190
12	-	-	-	-	-	-	204	60
13	-	-	-	-	-	-	310	110
14	-	-	240	105	25	-	268	45
15	-	-	-	-	-	-	76	55
16	-	-	-	-	-	-	278	170
17	8	255	24	210	11	8	74	5
18	36	300	50	90	5	30	106	15
19	-	-	-	-	-	-	85	-
20	-	-	-	-	-	-	240	5
21	-	-	-	-	-	-	400	5
22	-	-	42	65	16	10	132	10
23	-	-	-	-	-	-	244	100
24	-	-	-	-	-	-	200	10
25	1835	72	-	-	-	-	1562	450
26	-	-	-	-	-	-	1432	75
27	525	202	525	-	-	-	794	10
28	96	1440	-	-	-	-	1870	250

Por meio de observações do aspecto das colônias, tamanho dos conidióforos, tamanho e organização dos conídios e região de coleta, foram selecionados doze isolados para análises posteriores: três isolados de Ribeirão Cascalheira-MT (LFN0470, LFN0471, LFN0478), três isolados de Canarana-MT (LFN0472, LFN0473, LFN0474, LFN0479), um de Alto Taquari (LFN0475), um de Jataí-GO (LFN0476), um de Baixa Grande do Ribeiro-PI (LFN0477), um de Acreúna-GO (LFN0480) e um de Alto Boa Vista-MT (LFN0481). Os doze isolados vieram das amostras 1,3,5,12,13,15,17,19,25,26,27,28, respectivamente.

De cada um dos doze isolados selecionados, foi obtido um isolado monospórico. O método usado foi o plaqueamento com diluição (*dilution plating*) de Leslie & Summerel (2006) com algumas modificações. Foi feita uma suspensão de concentração  $2 \times 10^3$  esporos. $\text{ml}^{-1}$  e uma alíquota de 20, 50 e 100  $\mu\text{L}$  foram colocadas em placas de ágar-água sem repetição. As placas foram observadas por 24 a 48h. Quando foi possível observar, contra uma fonte de luz fluorescente, pequenos pontos de crescimento micelial circular, foi feita a repicagem de uma seção de aproximadamente  $25 \text{ mm}^2$  dos bordos de um desses pontos para meio BDA com sulfato de estreptomicina ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) e penicilina ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ).

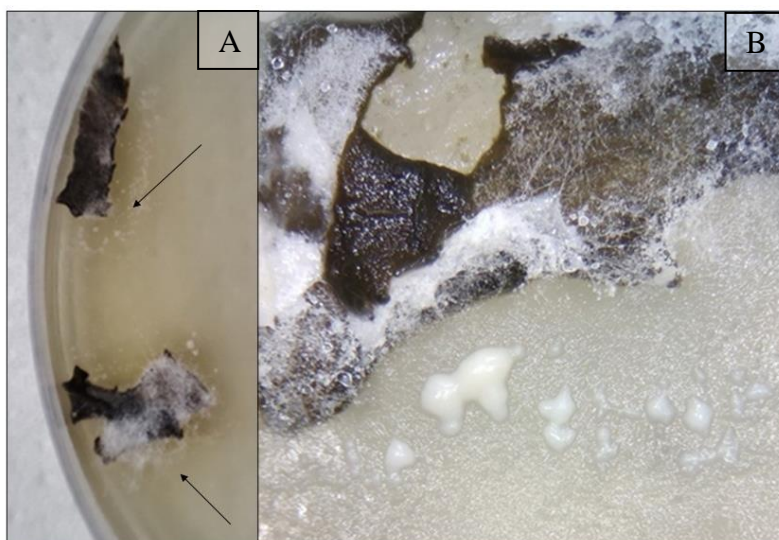
Após cerca de quatro dias, as colônias dos fungos fusarioides apareceram nas placas com antibiótico. Com uma agulha, um pouco de micélio com esporos foi transferido para placas com BDA e posteriormente os isolados foram armazenados em papel filtro a  $-20^\circ\text{C}$ .

Pedaços de papel filtro com os isolados foram repicados para placas de Petri com meio BDA (Figura 2). Após 7 dias, os isolados foram repicados novamente para placas com BDA e cravina-ágar. Para as placas com BDA, foram transferidos discos de micélio de 9 mm e para as placas com cravina-ágar, foram transferidos micélio e esporos próximos às folhas secas de cravina (Figura 3). As placas foram mantidas na bancada do laboratório à temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ .



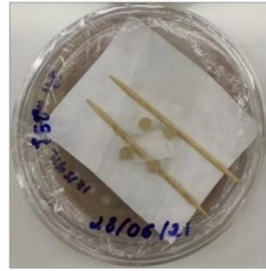
**Figura 2.** Isolados em BDA após uma semana em câmara de crescimento.

Após esse período foram feitas as avaliações. Para as colônias que cresceram em meio cravina-ágar, foram observados o comprimento das fiáldes, o tipo de agrupamento dos microconídios, a presença/ausência de clamidósporos e a forma e tamanho dos macroconídios. De acordo com Leslie e Summerel (2006), estes são mais uniformes em cravina-ágar. Foi medido o comprimento de 50 macroconídios de cada isolado. O mesmo procedimento foi realizado para os microconídios presentes no meio BDA.



**Figura 2.** Micélio do isolado LFN0478 crescendo sobre as folhas de cravina. As setas indicam os locais para que o isolado foi repicado (A). Observação sob microscópio estereoscópio do crescimento micelial em meio cravina-ágar, evidenciando o micélio aéreo crescendo sobre as folhas de cravina e os esporodóquios sobre o meio de cultura (B).

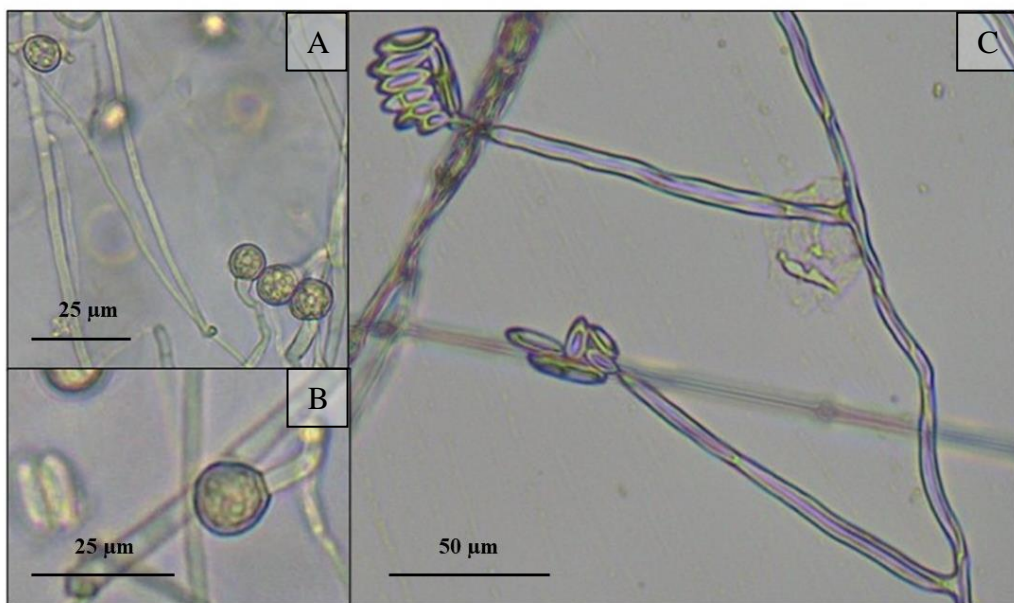
Foi realizada também a observação das estruturas esporulantes por uma técnica de microcultivo. Com o auxílio de uma agulha, discos de micélio de 9 mm dos isolados em BDA foram transferidos para as adjacências de blocos de ágar-água. Estes foram colocados em placas de Petri esterilizadas, sobre lâminas de microscopia, palitos de dente e papel filtro úmido (Figura 3). Todos os materiais foram previamente autoclavados. Por fim, foi colocada uma lamínula de microscopia flambada por cima dos blocos. As observações realizadas incluíram: presença/ausência de clamidósporos, disposição dos microconídios nas fiáldes e tamanho das fiáldes.



**Figura 3.** Confeção do microcultivo para o isolado LFN04781 com ágar-água e BDA.

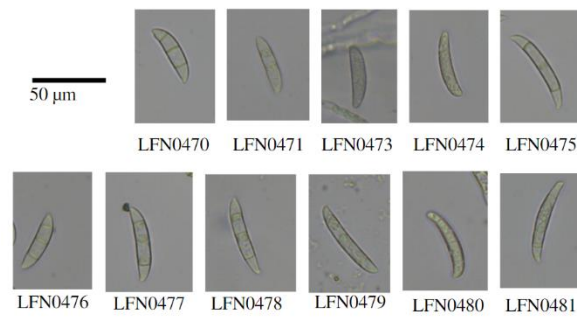
### 2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os isolados foi possível observar presença de clamidósporos, microconídios dispostos em falsas cabeças, monofiálides longas (aproximadamente 100 $\mu$ m) e ausência de polifiálides (Figura 4).



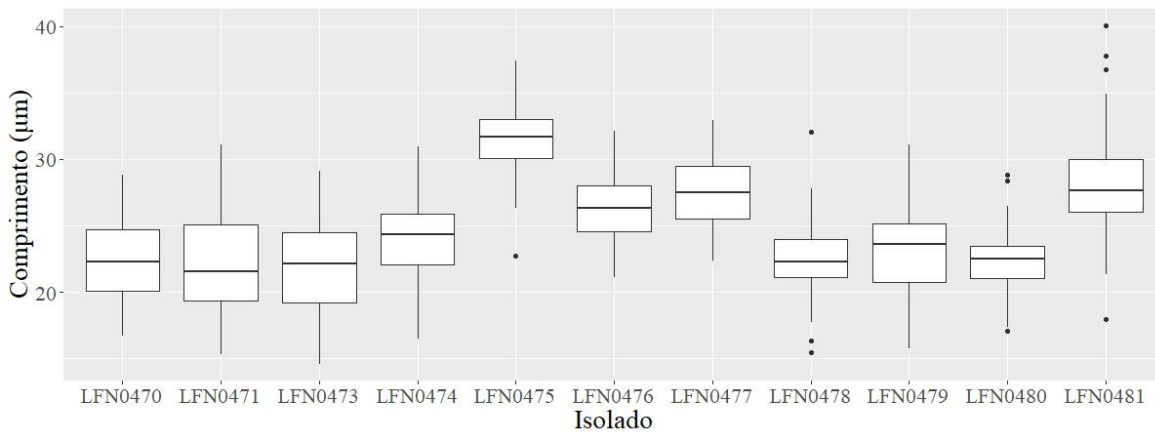
**Figura 4.** Clamidósporos terminais em hifas do isolado LFN0471 (A, B). Microconídios do isolado LFN0472 dispostos em falsas cabeças (C).

Foi possível observar macroconídios em quase todos os isolados, exceto no isolado LFN0472 (Figura 5). O isolado LFN0475 apresentou o maior valor máximo (37,44  $\mu$ m) e a maior mediana (31,71  $\mu$ m) para as distribuições de comprimento de macroconídios. Os outros isolados tiveram as medianas próximas da média (24,71  $\mu$ m) (Figura 6).



**Figura 5.** Fotomicrografias dos macroconídios de cada isolado coletado.

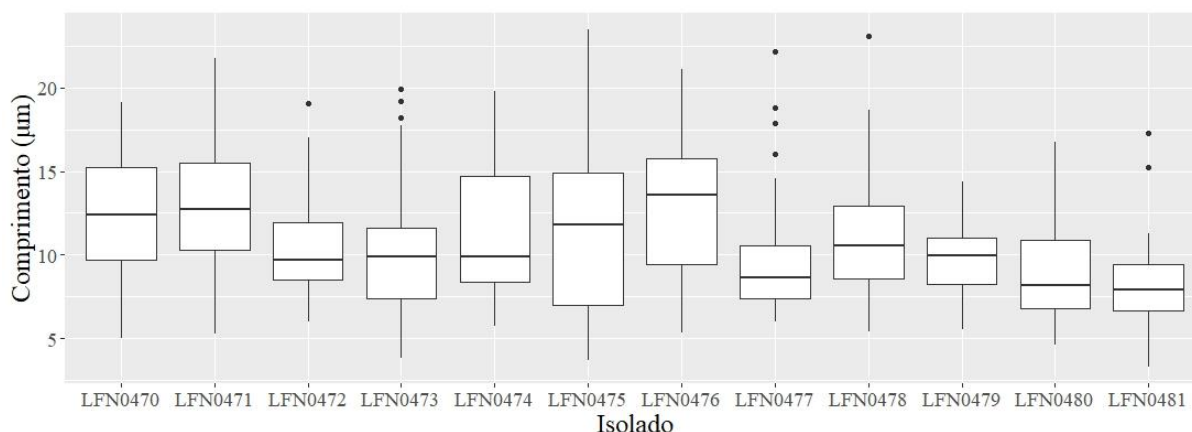
As distribuições de comprimento de microconídios tiveram as medianas e os valores máximos e mínimos mais homogêneos entre os isolados (Figura 7).



**Figura 6.** Distribuição do comprimento dos macroconídios dos isolados coletados.

As observações morfológicas foram suficientes para a identificação do gênero de fungo fusarioide. Segundo Leslie & Summerell (2006), as características discriminantes de *Neocosmospora* (*Fusarium solani*) são monofiáides de aproximadamente 100 µm e organização dos conídios em falsas cabeças. O único grupo de morfologia similar é o complexo *Oxysporum* de *Fusarium*, mas as fiáides desse grupo são menores, de aproximadamente 20 µm de comprimento.





**Figura 7.** Distribuição do comprimento dos microconídios dos isolados coletados.

## 2.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As características morfológicas dos isolados são típicas de *Neocosmospora* (complexo Solani de *Fusarium*). Não foram observadas polifiálides, os macroconídios são dispostos em falsas cabeças e as monofiálides tiveram comprimento aproximado de 100 µm.

## REFERÊNCIAS

- BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4. ed. 1972.
- CHANG, X.; DAI, H.; WANG, D.; ZHOU, H.; HE, W.; FU, Y.; IBRAHIM, F.; ZHOU, Y.; GONG, G.; SHANG, J.; YANG, J.; WU, X.; YONG, T.; SONG, C.; YANG, W. Identification of *Fusarium* species associated with soybean root rot in Sichuan Province, China. **European Journal of Plant Pathology**, v.151, n.3, p.563-577, 2018.
- CHIOTTA, M.L.; ZANON, M.S.A.; GIAJ-MERLERA, G.; TESSMANN, D.; BARROS, G.C.; CHULZE, S. Phylogenetic analyses of the *Fusarium graminearum* species complex isolated from soybean in Argentina and Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 10, 2015.
- CROUS, P. W.; LOMBARD, L.; SANDOVAL-DENIS, M.; SEIFERT, K.A.; SCHROERS, H.J.; CHAVERRI, P.; GENÉ, J.; GUARRO, J.; HIROOKA, Y.; BENSCH, K.; KEMA, G.H.J.; LAMPRECHT, S.C.; CAI, L.; ROSSMAN, A.Y.; STADLER, M.; SUMMERBELL, R.C.; RAYLOR, J.W.; PLOCH, S.; VISAGIE, C.M.; YILMAZ, N.; THINES, M. *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. *Studies in Mycology*, v. 98, p. 100116, mar. 2021.
- GONGORA-CANUL, C. C. & LEANDRO, L. F. S. Effect of Soil Temperature and Plant Age at Time of Inoculation on Progress of Root Rot and Foliar Symptoms of Soybean Sudden Death Syndrome. **Plant Disease**, v. 95, n. 4, p. 436–440, abr. 2011.
- KANG, I. J.; SHIM, H.K.; HEU, S.; KIM, K.S. First Report of Soybean Root and Stem Rot Caused by *Fusarium graminearum* in South Korea. **Plant Disease**, v. 104, n. 2, p. 568–568, fev. 2020.

- LESLIE, J.F. & SUMMERELL, B.A. **The Fusarium laboratory manual**. Iowa, EUA: Blackwell, 2006.
- MASSOLA JÚNIOR, N. S. Fungos fitopatogênicos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds). **Manual de Fitopatologia**. 5. ed. vol. 1. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres, 2018. p. 107 - 140.
- YAN, H. & NELSON, B. Effects of Soil Type, Temperature, and Moisture on Development of Fusarium Root Rot of Soybean by *Fusarium solani* (FSSC 11) and *Fusarium tricinctum*. **Plant Disease**, v. 106, n. 11, p. 2974–2983, nov. 2022.
- WESTPHAL, A.; LI, C.; XING, L.; MCKAY, A.; MALVICK, D. Contributions of *Fusarium* Virguliforme and Heterodera Glycines to the Disease Complex of Sudden Death Syndrome of Soybean. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99529, 16 jun. 2014.
- ZHOU, Q.; LI, N.; CHANG, K.; HWANG, S.; STRELKOV, S.E.; CONNER, R.L.; MCLAREN, D.L.; FU, H.; HARDING, M.W.; TURNBULL, G.D. Genetic diversity and aggressiveness of *Fusarium* species isolated from soybean in Alberta, Canada. **Crop Protection**, v.105, p.49-58, 2018.



### 3. CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA

#### RESUMO

A cultura da soja é de grande importância para o Brasil. É a cultura com maior área plantada no cerrado brasileiro. Há doenças que são comuns na soja, como as podridões de raiz causadas por fungos fusarioides. Uma delas, a morte súbita, é atualmente considerada um dos grandes problemas da sojicultura estadunidense. Há lacunas na literatura sobre as espécies de fungos fusarioides presentes em raízes de soja no Brasil. Para conhecer as espécies de fungos fusarioides presentes em soja no cerrado brasileiro, foi feito um levantamento de isolados presentes nas raízes. Doze isolados foram coletados de diferentes cidades do cerrado. Os isolados foram cultivados em BDA (Batata Dextrose Ágar), tiveram o DNA extraído pelo método CTAB (cetiltrimetilamônio) e tiveram as regiões EF-1 $\alpha$  e RPB2 amplificadas. A região EF-1 $\alpha$  foi amplificada para todos os isolados. A região RPB2 teve a primeira porção amplificada para apenas 10 dos doze isolados. Foi feito então o sequenciamento Sanger dos amplicons e posterior análise filogenética dos resultados. Para o alinhamento múltiplo, foi usado o algoritmo MAFFT e, para a confecção da árvore, o método de inferência bayesiana. Foi possível identificar a espécie de onze dos doze isolados. O isolado LFN0478 pertence à espécie *Neocosmospora suttoniana* e dez à espécie *N. falciformis*.

Palavras-chave: *Fusarium*; Complexo Solani; *Neocosmospora*; Fungo fitopatogênico; *Glycine max*

#### ABSTRACT

Soybean production is important for Brazilian economy. It is the main crop grown in Brazilian tropical savanna (cerrado). Fusarioid fungi cause some of the most common soybean diseases in cerrado. One of them, sudden death syndrome, is currently considered one of top 10 soybean diseases in the USA. There is not information in the scientific literature about the species present in soybean roots in Brazil. To fill this gap a survey was conducted across Brazilian cerrado soybean fields. Twelve isolates were collected from different cities. The isolates were cultivated in PDA (Potato Dextrose Ágar), had their DNA extracted following CTAB method and had the regions EF-1 $\alpha$  and RPB2 amplified. The region EF-1 $\alpha$  was amplified for all isolates. The region RPB2 was amplified only for 10 isolates. The phylogenetic analysis was performed following Sanger sequencing. For multiple alignment MAFFT algorithm was used. For phylogenetic tree construction Bayesian analysis was used. It was possible to identify eleven from the twelve isolates at the species level. Isolate LFN0478 belongs to *Neocosmospora suttoniana* and ten from the remained eleven belong to *N. falciformis*.

Keywords: *Fusarium*; FSSC; *Neocosmospora*; Plant pathogenic fungi; *Glycine max*

### 3.1. INTRODUÇÃO

A história da classificação de *Fusarium* começa em 1809, quando Link chamou a atenção para os conídios fusiformes. Naquela época a definição de espécie era dependente do hospedeiro. Por isso, cada vez que *Fusarium* era encontrado em um hospedeiro, uma nova espécie surgia. Consequentemente, mais de mil espécies foram descritas durante o século XIX (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

Para organizar tal miscelânea, Wollenweber & Reinking (1935) criaram parâmetros para a classificação do gênero. Utilizaram características micológicas (morfologia e morfometria) para reagrupar as espécies, mostrando um avanço no antigo critério de agrupamento por plantas hospedeiras. Com isso, eles reduziram as espécies do gênero, reuniram-nas em seções e criaram algumas formas que diferenciavam grupos intraespecíficos. Apesar de incluírem o uso de meios caros e complexos para a identificação das espécies, conseguiram facilitá-la (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

Com o passar das décadas, novos estudos morfológicos foram surgindo, levando a várias reorganizações do gênero. Um exemplo é a classificação de Snyder & Hansen (1940), que tornou a diagnose mais prática e rápida. Para isso os autores diminuíram o número de espécies de forma que não houvesse necessidade de meios complexos para a identificação. A desvantagem dessa classificação foi a artificialidade das espécies criadas, já que isolados de características evolutivas e ecológicas diferentes faziam parte do mesmo grupo.

Na década de 80 novas informações sobre a reprodução sexuada das espécies de *Fusarium* começaram a aparecer (TURGEON & YODER, 2000). Por meio de cruzamentos in vitro, foi possível estabelecer grupos de compatibilidade sexual (mating types). O uso dessa característica na taxonomia de *Fusarium* foi marcante, pois representou a inclusão de um parâmetro que está fortemente atrelado à história evolutiva do gênero (CROUS et al., 2021)

Nos anos 90 a importância da taxonomia evolutiva estava diminuindo devido à dominância da escola filogenética. Assim, começaram os estudos de filogenia com *Fusarium* para comprovar a monofilia do gênero (O'DONNEL, 1993).

Os primeiros trabalhos filogenéticos com *Fusarium* já mostraram que algumas espécies não tinham a mesma origem evolutiva. Usando as regiões ATP citrato liase (*ac11*) e segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*RPB2*), Gräfenhan et al. (2011) identificaram dois grandes clados, que na época foram chamados de clado basal e terminal de *Fusarium*. Ambos não apresentaram grande suporte filogenético, mas isso foi mais evidente para o primeiro. Em

razão disso, este foi logo convertido a diferentes gêneros, representando os vários grupos monofiléticos que o compunham. O clado terminal passou então a representar todo o gênero.

Usando 19 genes e mais espécies na análise, Schroers et al. (2011) identificaram mais três cladogramas dentro do recém reorganizado *Fusarium* (clado terminal). Esses cladogramas estão dispostos de forma aninhada, o clado F3 está dentro de F2 e F2 está dentro de F1. O clado F3 obteve suporte filogenético de todos os genes envolvidos na análise, mas F1 e F2 de apenas 14 e 12 genes respectivamente (GEISER et al., 2021).

Em uma carta ao editor publicada pela revista *Phytopathology*, Geiser et al. (2013) advogaram pela manutenção do gênero *Fusarium* no clado F1 ou F2 em vez de restringi-lo ao clado F3. F3 não inclui espécies do complexo Solani, tradicionalmente conhecidas como *Fusarium* e de grande importância para a agricultura e medicina. Segundo os autores, restringir o gênero ao clado F3 criaria uma confusão desnecessária, já que os outros também representam grupos monofiléticos, cumprindo com as regras da taxonomia moderna.

Em um levantamento feito com isolados obtidos de amostras clínicas, foram encontradas várias espécies novas do complexo Solani. Como eram muitas, os autores resolveram criar uma nomenclatura numérica temporária para organizá-las (O'DONNELL et al., 2008). Poucos anos depois, Sandoval-Denis et al. (2018) decidiram caracterizar e incluir algumas dessas espécies na nomenclatura binomial latina. Mas também restringiram o gênero *Fusarium* ao clado F3 e reergueram o gênero *Neocosmospora* para representar o complexo Solani (SANDOVAL-DENIS et al., 2019). Essa mudança não foi bem aceita por alguns grupos de pesquisa (O'DONNELL et al., 2020). Há hoje na literatura científica trabalhos que defendem um conceito mais amplo de *Fusarium*, baseado no clado F1 ou F2, e outros que defendem um conceito mais restrito, baseado no clado F3.

Dado que todos os cladogramas F1, F2 e F3 representam grupos monofiléticos, todos possuem potencial para representar um gênero. Portanto, a escolha de qual representará o gênero *Fusarium* não deixa de ter um teor de arbitrariedade (CROUS et al., 2021; O'DONNELL et al., 2020). Cada taxonomista possui uma visão diferente, talvez até prioridades diferentes, o que gera classificações diferentes. Assim, para entender o estado atual da taxonomia de *Fusarium*, é importante entender o ponto de vista dos dois grupos discordantes.

O argumento a favor de uma definição mais ampla de *Fusarium* baseia-se principalmente na importância do complexo Solani. Esse complexo, anteriormente conhecido como uma espécie, tem grande peso na literatura técnico-científica (O'DONNELL et al., 2020). Sua importância só tem aumentado desde sua primeira descrição, parasitando raízes de batata na Polônia (SANDOVAL-DENIS et al., 2019). Já foi descoberto que causa doenças de grande

impacto econômico em várias culturas atuais. Além disso, o gênero não é importante apenas para a agricultura. *Fusarium* também consegue parasitar animais, incluindo o ser-humano. Cerca de dois terços das fusariose humanas registradas nos Estados Unidos foram causadas por espécies do complexo. No mesmo país, de todas as espécies de *Fusarium* que foram encontradas em humanos, um terço pertence ao complexo (O'DONNELL et al., 2008). Ademais, *Fusarium* é conhecido por ser resistente à vários fungicidas, característica compartilhada por várias espécies do gênero e importante para o tratamento correto dos pacientes (O'DONNELL et al., 2020). Desse modo, é possível entender a ideia de que um grupo fúngico com tanta tradição e reconhecimento não deva ser reclassificado por razões desnecessárias. Pode ser que haja algum impacto na área médica ou na pesquisa científica.

Em contrapartida, o argumento a favor da delimitação de *Fusarium* pelo clado F3 prioriza o suporte filogenético e a naturalidade do táxon. Apesar de todos os cladogramas representarem grupos monofiléticos, há tecnicidades que dão melhor suporte ao clado F3 (SANDOVAL-DENIS et al., 2019). Dos 19 genes analisados por Geiser et al. (2021), todos deram suporte ao clado F3. Nenhum dos outros dois cladogramas tiveram valores similares. Mas há ainda outro motivo, além do suporte filogenético, que converge para a divisão de *Fusarium*, as características ecológicas e morfológicas de cada grupo. Apesar de não serem exigência da taxonomia atual, tais características são comumente utilizadas na tomada de decisão para evitar a arbitrariedade (CROUS et al., 2021). A priorização da representatividade natural auxilia também na pesquisa científica. Os nomes passam a ter mais significado, além da mera representação da história evolutiva. Exemplos são as diferenças morfológicas entre os peritécios e do tipo de parasitismo entre *Neocospora* e os outros fungos fusarioides (SANDOVAL-DENIS et al., 2019). Os próprios autores que advogam pela definição ampla admitem que tal grupo não tem sinapomorfias além das encontradas na análise filogenética. Portanto, também é possível entender os benefícios que a divisão de *Fusarium* traria para a comunidade técnica e científica.

### 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a extração de DNA fúngico, foi usado o método do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (DOYLE & DOYLE, 1990) com algumas modificações. Seções de papel filtro contendo os isolados foram colocadas em placas de Petri com BDA. Após uma semana a 25°C e regime de luz 12/12h, o fungo havia tomado a placa. O micélio foi raspado, colocado em um almofariz e macerado junto a 800 µL de solução de β- mercaptoetanol 0,2 % (v/v) em CTAB.

O material macerado foi misturado em vortex, transferido para tubos de microcentrífuga e deixado em banho-maria à 64°C por 30 a 60 minutos.

Após a incubação, foram adicionados 600 µL de solução de acetato de isoamila 4,17% (v/v) em clorofórmio. O material foi novamente misturado em vortex e centrifugado a velocidade máxima (15.000 rpm) por 10 minutos. O sobrenadante foi passado para outro tubo e 540 µL de isopropanol gelado (-20°C) foi adicionado. As suspensões foram acondicionadas em ultrafreezer a -80°C por uma hora e depois centrifugadas à velocidade máxima por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a amostra foi lavada com 1 mL de etanol 80%. Quando o pellet estava seco, foi ressuspendido em 100 µL de água mili-Q (ultrapura).

Os iniciadores utilizados para amplificação foram EF1 (*forward*) e EF2 (*reverse*) para o fator de alongação 1 alfa (EF-1 $\alpha$ ), 5f2 (*forward*) e 7cR (*reverse*) para a primeira parte da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB2) e 7cf (*forward*) e 11ar (*reverse*) para a segunda parte da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB2). As condições de amplificação foram as mesmas descritas por O'Donnell et al. (2008). Após as amplificações, o material foi enviado para sequenciamento.

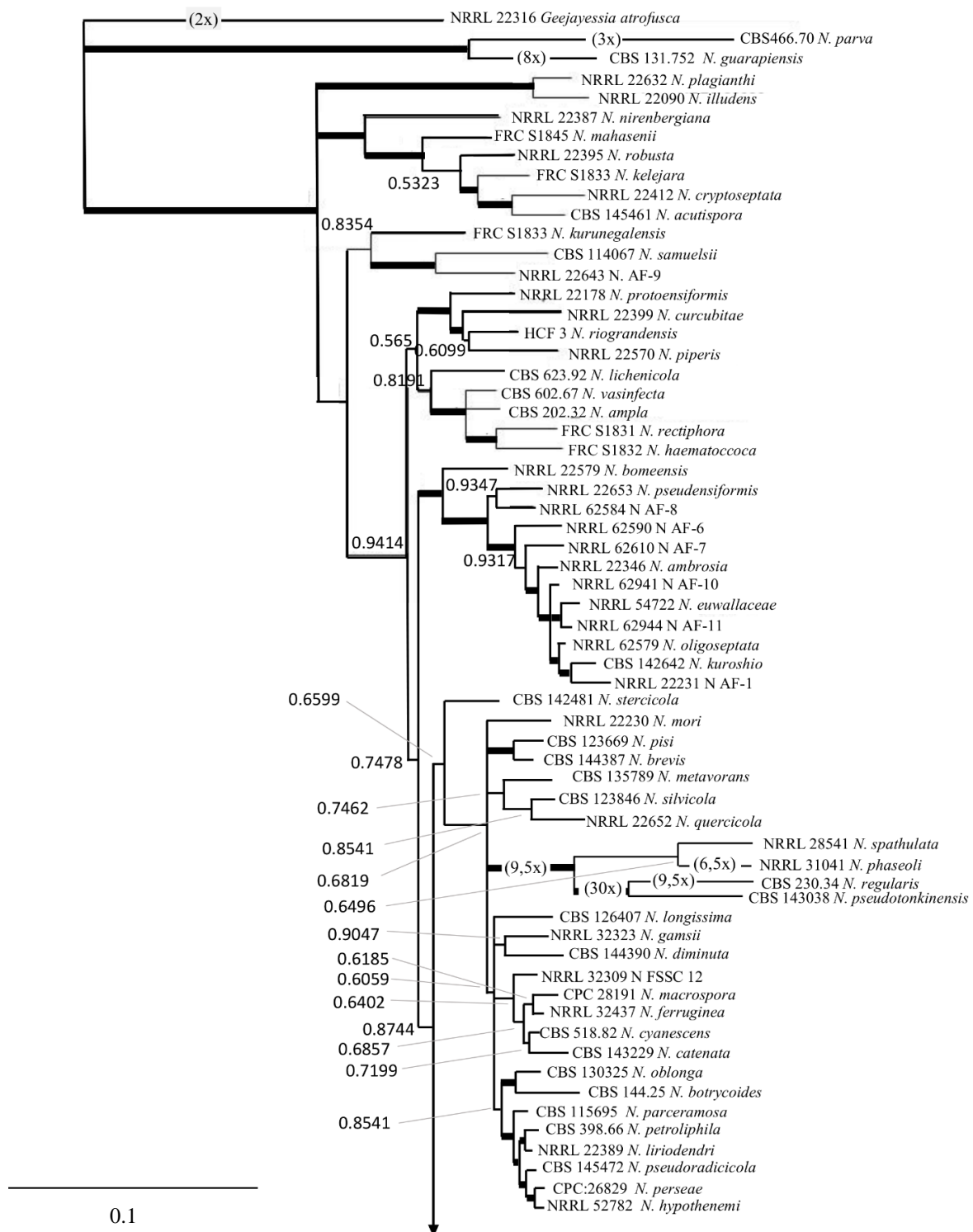
A segunda parte da região RPB2 não pôde ser amplificada em concentração suficiente para sequenciamento. Além disso, os isolados LFN0470 e LFN0471 não tiveram sequências da primeira parte da região RPB2 com qualidade suficiente para análise filogenética. Portanto, foram obtidas sequências das regiões EF-1 $\alpha$  e primeira parte da RPB2 para os isolados LFN0472, LFN0473, LFN0474, LFN0475, LFN0476, LFN0477, LFN0478, LFN0479, LFN0480, LFN04781 e apenas da região EF-1 $\alpha$  para os isolados LFN0470 e LFN0471.

As sequências obtidas foram editadas, assimiladas e alinhadas de acordo com o algoritmo MAFFT e especificações padrão (KATO et al., 2019). A filogenia foi realizada com Mr. Bayes (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003), modelo evolutivo GTR e distribuição gama. A árvore final e os resultados de probabilidade posterior foram calculados descartando-se as primeiras 100.000 árvores. O isolado NRRL 22316 de *Geejayessia atrofusca* foi usado como grupo externo.

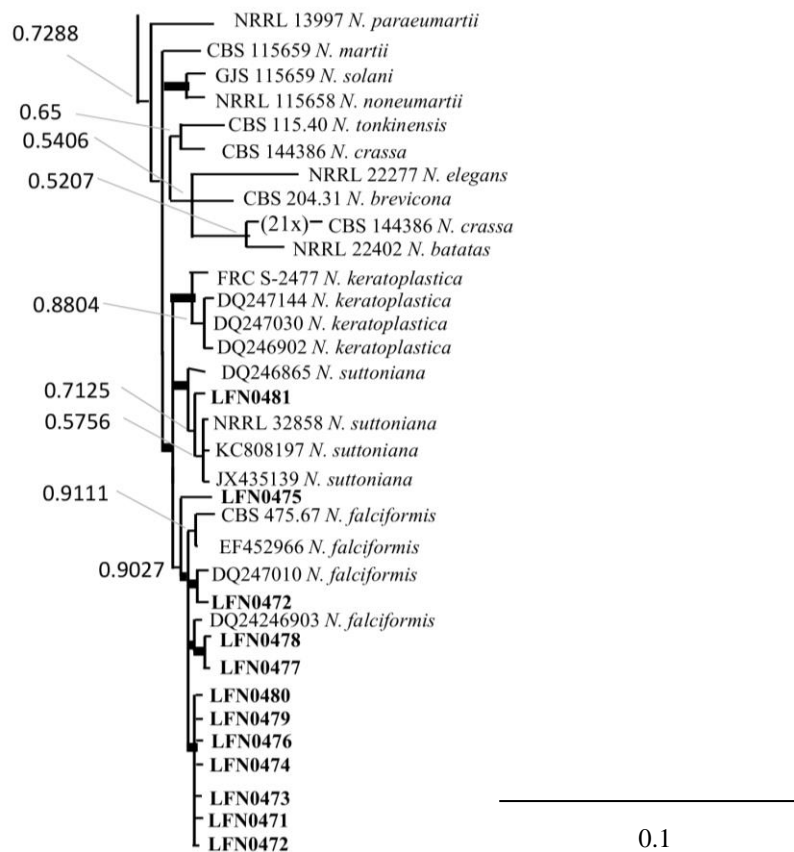
### 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível identificar a espécie de onze dos doze isolados. Há suporte filogenético para supor que dez isolados pertençam à espécie *Neocosmospora falciformis* (LFN0470, LFN0471, LFN0472, LFN0473, LFN0474, LFN0476, LFN0477, LFN0478, LFN0479 e LFN0480) e que um pertence à espécie *N. suttoniana* (LFN0481). O isolado LFN0475 se agrupou com *N. falciformis*, mas com pouco suporte filogenético (Figura 1.).





**Figura 1.** Árvore filogenética das espécies de *Neocosmospora* das regiões EF-1a e a primeira parte da RPB2 gerada por inferência bayesiana. As linhas espessas indicam probabilidade posterior maior que 0.95.



**Figura 1.** (cont.)

A espécie *Neocosmospora falciformis* é cosmopolita. Foi primeiramente encontrada parasitando tecido humano e depois em várias plantas hospedeiras, incluindo a soja (O'DONNELL et al., 2008). Essa espécie também engloba o clado de *Fusarium paranaense*, patógeno fraco encontrado em soja e considerado uma espécie do complexo Solani de *Fusarium* por alguns autores (COSTA et al., 2016).

*N. falciformis* é uma das espécies mais encontradas em clínicas hospitalares juntamente a *N. keratoplastica*. Também são considerados patógenos fracos de seres humanos, se aproveitando de pacientes imunossuprimidos (SANDOVAL-DENIS et al., 2019). Além de tecidos vivos, a espécie pode ser encontrada em substratos naturais, como solo e matéria orgânica em decomposição (CROUS et al., 2021).

Este é o primeiro relato de *N. suttoniana* em soja. A espécie é conhecida por ser um patógeno oportunista de seres humanos e animais (SANDOVAL-DENIS et al., 2019). Também é possível inferir que seja um patógeno fraco, pois é filogeneticamente próxima à *N. falciformis* (O'DONNELL et al., 2020).

As duas espécies encontradas foram caracterizadas por O'Donnell et al. (2008) em um estudo de fungos fusarioides obtidos de clínicas hospitalares. *N. falciformis* foi primeiramente relatado como FSSC 3+4 (clados 3 e 4 do complexo Solani) e *N. suttoniana* como FSSC 20 (clado 20 do complexo Solani).

Como o objetivo do trabalho não é estudar a história evolutiva dos fungos fusarioides, apenas dois genes foram usados para a construção da árvore filogenética. Por isso, a topologia não se mostra confiável para muitas espécies (GEISER et al., 2021; O'DONNELL et al., 2020; SANDOVAL-DENIS et al., 2019). Isso ocorre porque mais regiões são necessárias para estabelecer as corretas relações entre os isolados (CROUS et al., 2021). Entretanto, isso não impediu a identificação dos isolados coletados, já que pertencem a espécies para as quais o suporte filogenético é alto.

### 3.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível identificar a espécie de onze dos doze isolados. Dez pertencem à espécie *Neocosmospora falciformis* e um à espécie *N. suttoniana*. Este é o primeiro relato de *N. suttoniana* em soja.

### REFERÊNCIAS

- CROUS, P. W.; LOMBARD, L.; SANDOVAL-DENIS, M.; SEIFERT, K.A.; SCHROERS, H.J.; CHAVERRI, P.; GENÉ, J.; GUARRO, J.; HIROOKA, Y.; BENSCH, K.; KEMA, G.H.J.; LAMPRECHT, S.C.; CAI, L.; ROSSMAN, A.Y.; STADLER, M.; SUMMERBELL, R.C.; RAYLOR, J.W.; PLOCH, S.; VISAGIE, C.M.; YILMAZ, N.; THINES, M. Fusarium: more than a node or a foot-shaped basal cell. *Studies in Mycology*, v. 98, p. 100116, mar. 2021.
- DOYLE, J.J & DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- GEISER, D. M.; AL-HATMI, A.M.S.; AOKI, T.; ARIE, T.; BALMAS, V.; BARNES, I.; BERGSTROM, G.C.; BHATTACHARYYA, M.K.; BLOMQUIST, C.; BOWDEN, R.L.; BRANKIVICS, B.; BROWN, D.W.; BURGESS, L.W.; BUSHLEY, K.; MUSMAN, M.; CANO-LIRA, J.F.; CARRILLO, J.D.; CHANG, H.; CHEN, C.; CHEN, W.; CHILVERS, M.; CHULZE, S.; COLEMAN, J.J.; CUOMO, C.A.; BEER, Z.W.; HOOG, G.S.; CASTILLO-MÚNERA, J.; DEL PONTE, E.; DIÉGUEZ-URIBEONDO, J.; DI PIETRO, A.; EDEL-HERMANN, ELMER, H.W.; EPSEIN, L.; ESKALEN, A.; ESPOSTO, M.C.; EVERTS, K.L.; FERNÁNDEZ-PAVÍA, S.P.; SILVA, G.F.; FOROUD, N.A.; FOURIE, G.; FRANSEN, R.J.N.; FREEMAN, S.; FREITAG, M.; FRENKEL, O.; FULLER, K.K.; GAGKAEVA, T.; GERDINER, D.M.; GLENN, A.E.; GOLD, S.E.; GORDON, T.R.; GREGORY, N.F.; GRYZENHOUT, M.; GUARRO, J.; GUGINO, B.K.; GUTIERREZ, S.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; HARRIS, L.J.; HOMA, M.; HONG, C.; HORNOK, L.; HUANG, J.; ILKIT, M.; JACOBS, A.; JACOBS, K.; JIANG, C.; JIMÉNEZ-GASCO, M.M.; KENNEL, J.C.;

KIM, H.; KISTLER, H.C.; KULDAU, G.A.; KULIK, T.; KURZAI, O.; LARABA, I.; LAURENCE, M.H.; LEE, T.; LEE, Y.; LESLIE, J.F.; LIEW, E.C.Y.; LOFTON, L.W.; LYSOE, E.; MA, L.; MARRA, R.E.; MARGIN, F.N.; MAY, S.R.; MCCORMICK, S.P.; MCGEE, C.; MEIS, J.F.; MIGHELI, Q.; NOR, N.M.I.M.; MONOD, M.; MORETTI, A.; MOSTERT, D.; MULÈ, G.; MUNAUT, F.; MUNKVOLD, G.P.; NICHOLSON, P.; NUCCI, M.; O'DONNELL, K.; PASQUALI, M.; PFENNING, L.H.; PRIGITANO, A.; PROCTOR, R.H.; RANQUE, S.; REHNER, S.A.; REP, M.; RODRÍGUEZ-ALVARADO, G.; ROSE, L.J.; ROTH, M.G.; RUIZ-ROLDÁN, C.; SALEH, A.A.; SALLEH, B.; SANG, H.; SCANDIANI, M.M.; SCAUFLAIRE, J.; SHCMALE, D.G.; SHOCRT, D.P.G.; SISIC, A.; SMITH, J.A.; STEENKAMP, E.; STEINBERG, C.; RAJAGOPAL, S.; SUGA, H.; SUMMERELL, B.A.; SUSCA, A.; SWETT, C.L.; TOOMAJIAN, C.; TORRES-CRUZ, T.J.; TORTORANO, A.M.; URBAN, M.; VAILLANCOURT, L.J.; VALLAD, G.E.; VAN DER LEE, T.A.J.; VANDERPOOL, D.; DIEPENINGEN, A.D.; VAUGHAN, M.M.; VENTER, E.; VERMEULEN, M.; ILJOEN, A.; ZAKARIA, L.; HZHANG, H.; ZHANG, N.; ZHANG, S.X.; ZHANG, X. . Phylogenomic Analysis of a 55.1-kb 19-Gene Dataset Resolves a Monophyletic *Fusarium* that Includes the *Fusarium solani* Species Complex. *Phytopathology*, v. 111, n. 7, p. 1064–1079, jul. 2021.

GRÄFENHAN, T.; SCHROERS, H.J.; NIRENBERG, H.I.; SEIFERT. An overview of the taxonomy, phylogeny, and typification of nectriaceous fungi in *Cosmospora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella*, and *Volutella*. *Studies in Mycology*, v. 68, p. 79–113, mar. 2011.

KATOH, K. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, v. 30, n. 14, p. 3059–3066, 15 jul. 2002.

LESLIE, J.F. & SUMMERELL, B.A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Iowa, EUA: Blackwell, 2006.

O'DONNELL, K. *Fusarium* and its near relatives. In: REYNOLDS, D.R. & TAYLOR, J.W. (Eds). *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. Reino Unido: CAB International, 1993, p. 919-938.

O'DONNELL, K.; SUTTON, D.; FOTHERGILL, A. Molecular Phylogenetic Diversity, Multilocus Haplotype Nomenclature, and In Vitro Antifungal Resistance within the *Fusarium solani* Species Complex. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 8, p. 2477–2490, ago. 2008.

O'DONNELL, K.; AL-HATMI, M.S.; AOKI, T.; BRANKOVICS, B.; CANO-LIRA, J.F.; COLEMAN, J.J.; SYBREN DE HOOG, G.; DI PIETRO, A.; FRANDSEN, R.J.N.; GEISER, D.M.; GIBAS, C.F.G.; GUARRO, J.; KIM, H.; KISTLER, H.C.; LARABA, I.; LESLIE, J.F.; LÓPEZ-BERGES, M.S.; LYSOE, E.; MEIS, J.F.; MANOD, M.; PROCTOR, R.H.; REP, M.; DIEPENINGEN, A.D.; VERWEIJ, P.E.; WAALWIJK, C.; WARD, T.J.; WICKES, B.L.; WIEDERHOLD, N.P.; WINGFIELD, ZHANG, N.; ZHANG, S.X. No to *Neocosmospora*: Phylogenomic and Practical Reasons for Continued Inclusion of the *Fusarium Solani* Species Complex in the Genus *Fusarium*. *MSphere*, v. 5, n. 5, p. e00810-20, 28 out. 2020.

- SANDOVAL-DENIS, M.; LOMBARD, L.; CROUS, P. W. Back to the roots: a reappraisal of *Neocosmospora*. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v. 43, n. 1, p. 90–185, 31 dez. 2019.
- SCHROERS, H.J.; GRÄFENHAN, T.; NIRENBERG, H.I.; SEIFERT, K.A. A revision of *Cyanonectria* and *Geejayessia* gen. nov., and related species with *Fusarium*-like anamorphs. *Studies in Mycology*, v. 68, p. 115–138, mar. 2011.
- SNYDER, W.C. & HANSEN, H.N. The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*, v. 27, p.64-67, 1940.
- TURGEON, B.G. & YODER, O.C. Proposed nomenclature for mating type genes of filamentous ascomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, v. 31, p.1-5, 2000.
- RONQUIST, F., & J.P. HUELSENBECK. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. ***Bioinformatics*** v. 19,1572-1574, 2003.
- WOLLENWEBER, H.W. & REINKING, O.A. *Die Fusarien: ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung*. Berlin, Alemanha: P. Parey, 1935.



## 4. CARACTERIZAÇÃO PATOGENICA

### RESUMO

A cultura da soja é de grande importância para o Brasil. É a cultura com maior área plantada no cerrado brasileiro. Há doenças que são comuns na soja, como as podridões de raiz causadas por fungos fusarioides. Uma delas, a morte súbita, é atualmente considerada um dos grandes problemas da sojicultura estadunidense. Há lacunas na literatura sobre as espécies de fungos fusarioides presentes em raízes de soja no Brasil. Para conhecer as espécies de fungos fusarioides presentes em soja no cerrado brasileiro, foi feito um levantamento de isolados presentes nas raízes. Doze isolados foram coletados de diferentes cidades do cerrado. Para confirmar que os isolados são patógenos da soja, foi feito um teste de patogenicidade em câmara de crescimento. Sementes de soja desinfestadas foram colocadas para germinar em areia úmida esterilizada. Após três dias, foi feita a inoculação com uma suspensão de  $10^5$  esp.ml<sup>-1</sup>. Após quatro dias, a porcentagem de plântulas mortas foi quantificada e as plântulas vivas foram pesadas. Não houve diferença estatística entre as porcentagens de plântulas mortas. Entretanto, foi possível perceber necrose e redução na massa de plântulas parasitadas por alguns isolados.

Palavras-chave: *Fusarium*; *Neocosmospora*; Solani; Fungo Fitopatogênico.

### ABSTRACT

Soybean production is important for Brazilian economy. It is the main crop grown in Brazilian tropical savanna (cerrado). Fusarioid fungi cause some of the most common soybean diseases in cerrado. One of them, sudden death syndrome, is currently considered one of top 10 soybean diseases in the USA. There is not information in the scientific literature about the species present in soybean roots in Brazil. To fill this gap a survey was conducted across Brazilian cerrado soybean fields. Twelve isolates were collected from different cities. A pathogenicity test was conducted to prove the isolates' capability of causing disease in soybean. Soybean seed from TMG 7067 IPRO variety were germinated in sterilized humid sand in a humid chamber. After three days, the inoculation was made with a  $10^5$  spores.mL<sup>-1</sup> suspension. After four days, the percentage of dead plantlets was quantified and the germinated ones were weighed. There was not statistical difference between the percentages of dead plants. However, it was possible to notice necrosis and reduction in plantlet weight for some isolates.

Keywords: *Fusarium*; *Neocosmospora*; Solani; Phytopathogenic fungus.

### 4.1. INTRODUÇÃO

Os gêneros fusarioides também são notáveis por terem representantes fitoparasitas em praticamente todas as regiões de cultivo de soja, desde a Ásia até as Américas (KANG et al., 2020; WANG et al., 2019; TEWOLDEMEHDHIN et al., 2017). Zhou et al. (2018) isolaram dez espécies de fungos fusarioides de raízes de plantas de soja com manchas necróticas no Canadá. Em testes de casa de vegetação todas mostraram-se fitopatogênicas. Entre as mais

agressivas estavam *Fusarium proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. commune* e *F. redolens*. As duas últimas estreitamente aparentadas com *F. oxysporum*. Na China, especificamente na província de Sichuan, foram encontradas nove espécies de fungos fusarioides associadas a manchas necróticas em raízes de soja (CHANG et al., 2018). Destas, sete conseguiram causar algum tipo de alteração no sistema radicular. Entre as mais agressivas estavam *F. equiseti*, *F. graminearum* e novamente *F. oxysporum*.

Díaz Arias et al. (2013) também fizeram um trabalho de coleta e avaliação da patogenicidade de isolados de fungos fusarioides em soja. Foram feitos diversos testes em casa de vegetação e campo, com duas cultivares. Nos testes em casa de vegetação, foi comprovada a patogenicidade de diferentes espécies de *Fusarium*; entre elas, as mais agressivas *F. oxysporum* e *F. proliferatum*. Já nos testes em campo, com alguns isolados foi possível perceber uma correlação linear positiva entre a severidade e a redução de produtividade. Todavia, não houve diferença de produtividade entre os isolados. Ao que tudo indica, isso ocorreu porque no campo o desenvolvimento da doença é altamente dependente de fatores externos, como a umidade, a temperatura e a microbiota (NELSON & YAN, 2020; CRUZ et al., 2019).

No Brasil, várias espécies de fungos fusarioides também já foram encontradas em soja. Chiotta et al. (2015) e Martinelli et al. (2004), trabalhando com espécies do complexo *Fusarium graminearum*, encontraram *F. graminearum sensu stricto*, *F. meridionale*, *F. cortaderiae* e *F. austroamericanum*. Espécies desse complexo já se mostraram fitopatogênicas à soja, causando lesões necróticas no tecido radicular (ELLIS et al. 2011).

Outro grupo, ainda mais conhecido por parasitar raízes de soja, é o gênero *Neocosmospora* (complexo *Solani* de *Fusarium*). O principal representante é *Neocosmospora phaseoli* (AOKI et al., 2003, 2005). Essa espécie tem grande potencial para causar danos, como mostrado por Aoki et al. (2005). Além desta, *Neocosmospora falciformis* também foi encontrado no Brasil. Uma espécie um pouco mais distante filogeneticamente de *N. phaseoli* e com menor potencial de dano (COSTA et al., 2016).

As espécies de *Neocosmospora* sempre estiveram associadas a lesões avermelhadas nas raízes. Por isso, no Brasil a doença em soja chegou a ser conhecida como Podridão Vermelha da Raiz (GÁSPERI et al., 2003). Nome encontrado apenas na literatura nacional. Entretanto, nem toda espécie de *Neocosmospora* causa esse tipo de lesão. É comum perceber manchas escuras e necróticas na raiz principal e nas radículas; quando a infecção ocorre cedo, e há condições ideais para o desenvolvimento da doença, pode haver diminuição da emergência de plântulas. Quando o desenvolvimento da doença ocorre um pouco mais tarde, formam-se reboleiras de plantas com enfezamento e clorose (ROY et al., 1997; DÍAZ ARIAS et al., 2013;



COSTA et al., 2015). Todos estes sintomas, ainda que sem o avermelhamento das raízes, podem indicar a presença de *Neocosmospora* ou outro fungo fusarioide. Todavia, é necessário ter cautela no diagnóstico, já que estes sintomas também podem ser causados por outros agentes etiológicos de podridões de raízes. (TECNOLOGIAS..., 2021).

## 4.2. MATERIAL E MÉTODOS

Uma seção de papel filtro de cada isolado foi colocada em uma placa de petri com BDA. As placas foram armazenadas a 25°C e fotoperíodo 12/12h. Após aproximadamente cinco dias, discos de micélio dos bordos das colônias foram repicados novamente para placas com BDA. Foram feitas quatro placas de cada isolado, que foram armazenadas nas condições citadas anteriormente. As colônias tomaram as placas em 10 dias, quando o inóculo foi usado para a montagem do experimento.

Sementes de soja da cultivar TMG 7067 IPRO foram desinfestadas com uma solução de hipoclorito 1% por 45 segundos. Essas sementes foram colocadas em caixas do tipo gerbox desinfestadas com álcool 70% e preenchidas com 200g de areia autoclavada e 40ml de água destilada esterilizada. A areia foi autoclavada três vezes.

No total 36 sementes de soja foram colocadas em cada caixa. As sementes foram dispostas com o hilo para cima para facilitar a inoculação.

Três dias depois, quando as sementes já estavam entumecidas e a maioria havia germinado, foi feita a inoculação. 15 mL de água destilada esterilizada foram vertidos nas placas e, com o auxílio de uma alça de Drigalski, foi feita a raspagem do micélio para retirar os conídios. Essa suspensão foi filtrada em gaze para retirar pedaços de micélio e vertida em um Erlenmeyer de 250 mL.

As suspensões foram quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas para  $10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup>. 50 µL dessa suspensão foram vertidos nas radículas de cada plântula. Caso houvesse pelos radiculares, estes eram priorizados. Cada caixa recebeu um tratamento (12 isolados + 1 controle) e cada plântula foi considerada uma repetição.

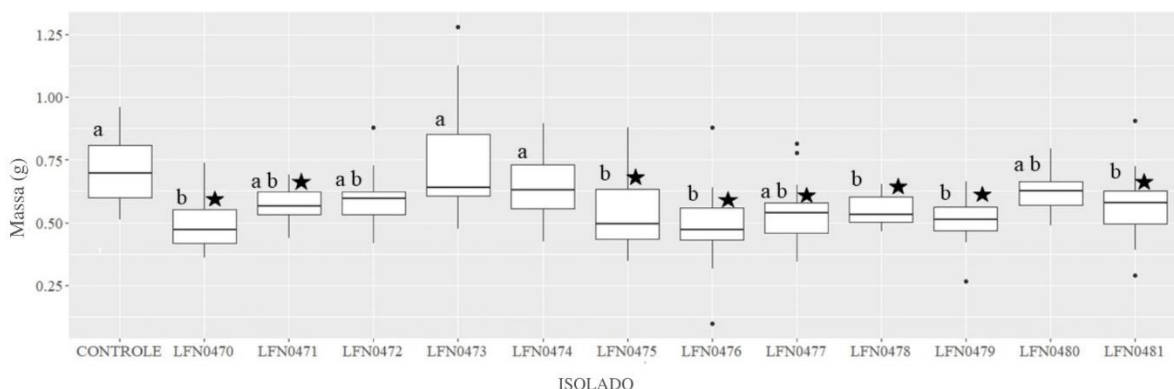
Após a inoculação, as caixas foram fechadas com tampa, papel alumínio e saco plástico e deixadas a 25°C por 4 dias até a avaliação.

A avaliação do experimento foi feita por meio da quantificação da proporção de plântulas mortas e pesagem das plântulas vivas.

Os dados de massa das plântulas foram analisados por meio dos testes de Kurskal-Wallist e dois testes de Dunn post-hoc. O primeiro teste compara os tratamentos com a testemunha e o segundo faz uma comparação dois a dois. O objetivo do primeiro teste foi a análise da patogenicidade e do segundo a agressividade. Também foi realizado um teste de comparação de proporções de plântulas mortas em pares. A correção utilizada para os testes de Dunn post-hoc e o teste das proporções foi a de Bonferroni.

### 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados mostraram diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis. Portanto, foram realizados dois testes post-hoc. De acordo com o teste de Dunn para comparação com controle, a maioria dos isolados mostrou-se patogênica, apresentando mediana significativamente menor. Apenas os isolados LFN0472, LFN0473, LFN0474 e LFN0480 não diferiram do controle. De acordo com o teste de Dunn para comparação em pares, os isolados LFN0470, LFN0475, LFN0476, LFN0478, LFN0479, LFN0481 foram mais agressivos que os isolados LFN0473 e LFN0474. Os outros isolados não diferiram de nenhum outro.

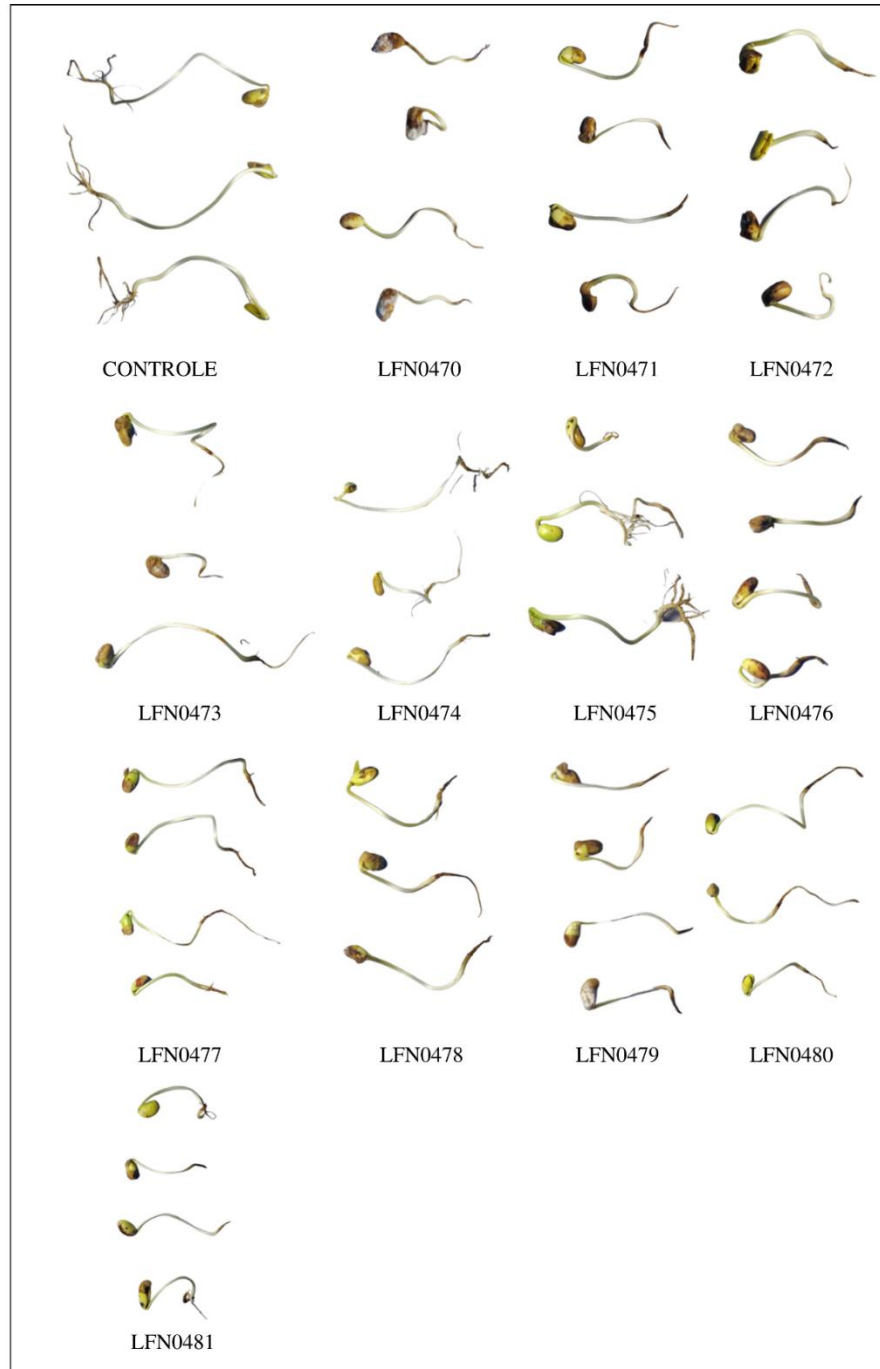


**Figura 1.** Gráfico de caixas das distribuições de massa de plântulas. As estrelas representam diferença significativa do controle e as letras representam diferença significativa pelo teste de comparação em pares (Dunn post-hoc).

O teste para as proporções de plântulas mortas não mostrou diferença significativa entre os tratamentos.

Apesar de alguns isolados não se mostrarem patogênicos de acordo com os dados de massa e proporção de plântulas mortas, todos causaram necrose nas plântulas. A necrose distribuiu-se por toda a plântula, dos pelos radiculares aos cotilédones. Portanto, todos os isolados têm capacidade de causar doença em soja.

Visualmente as plântulas do isolado LFN0479 não cresceram como as outras. Os outros tratamentos tiveram plântulas de tamanho aparentemente igual ao tratamento controle. As plântulas controle não apresentaram necrose, entretanto, devido à falta de luz houve oxidação dos tecidos radiculares mais tenros e escurecimento destes. Ainda assim, foi possível diferenciar os sintomas de oxidação dos sintomas de necrose.



**Figura 1.** Reação de plântulas aos diferentes isolados de *Neocosmospora*.

Outros testes de patogenicidade de fungos fusarioides em soja, mostraram que a maioria das espécies obtidas de raízes conseguem causar doença nessa cultura (CHANG et al., 2018; COSTA et al., 2016; DÍAZ ARIAS et al., 2019). Esses testes normalmente são feitos em casa de vegetação, com solo esterilizado e condições edafoclimáticas controladas. Entretanto, as condições de campo são diferentes. Provavelmente seja por isso que problemas com espécies diferentes de fungos fusarioides sejam incomuns. Apenas uma, *N. phaseoli*, tem sido considerada um problema sério na cultura da soja nos últimos anos, devido à doença peculiar que causa, a morte súbita (AOKI et al., 2005).

O teste utilizado não havia sido ainda relatado na literatura. É vantajoso pela praticidade e rapidez na obtenção dos resultados. Da montagem do teste até a avaliação são apenas dez dias. Entretanto, mostra-se limitado no que se refere a artificialidade e ao momento de inoculação e avaliação. O teste não representa as condições de campo, pois a quantidade de esporos e o local de inoculação não são os mesmos. Além disso, o momento de inoculação e avaliação deve ser exato. A diferença de algumas horas pode levar a resultados errôneos devido à alta taxa de crescimento da plântula germinada e a deterioração desta por falta de luz.

#### 4.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os isolados mostraram-se patogênicos à soja, causando necrose no hipocótilo, cotilédones e radículas. Entretanto, nem todos mostraram diminuição da massa das plântulas parasitadas.

#### REFERÊNCIAS

- AOKI, T.; O'DONNELL, K.; HOMMA, Y.; LATTANZI, A.R. Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex – *F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. **Mycologia**, v.95, n.4, p.660-684, 2003.
- AOKI, T.; O'DONNELL, K.; SCANDIANI, M.M. Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. **Mycoscience**, v.46, n.3, p.162-183, 2005.
- CHANG, X.; DAI, H.; WANG, D.; ZHOU, H.; HE, W.; FU, Y.; IBRAHIM, F.; ZHOU, Y.; GONG, G.; SHANG, J.; YANG, J.; WU, X.; YONG, T.; SONG, C.; YANG, W. Identification of *Fusarium* species associated with soybean root rot in Sichuan Province, China. **European Journal of Plant Pathology**, v.151, n.3, p.563-577, 2018.

- CHIOTTA, M.L.; ZANON, M.S.A.; GIAJ-MERLERA, G.; TESSMANN, D.; BARROS, G.C.; CHULZE, S. Phylogenetic analyses of the *Fusarium graminearum* species complex isolated from soybean in Argentina and Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 10, 2015.
- COSTA, S.S.; MATOS, K.S.; TESSMAN, D.J.; SEIXAS, C.D.S.; PFENNING, L.H. *Fusarium paranaense* sp. nov., a member of the *Fusarium solani* species complex causes root rot on soybean in Brazil. **Fungal Biology**, v.120, n.1, p.51-60, 2016.
- CRUZ, D.R.; LEANDRO, L.F.S.; MUNKVOLD, G.P. Effects of temperature and pH on *Fusarium oxysporum* and soybean seedling disease. **Plant Disease**, v.103, n.12, pp. 3234-3243, 2019.
- DÍAZ ARIAS, M.M.D.; LEANDRO, L.F.; MUNKVOLD, G.P. Aggressiveness of *Fusarium* species and impact of root infection on growth and yield of soybeans. **Phytopathology**, v.103, n.8, p.822-832, 2013.
- ELLIS, M.L.; BRODERS, K.D.; PAUL, P.A.; DORRANCE, A.E. Infection of soybean seed by *Fusarium graminearum* and effect of seed treatments on disease under controlled conditions. **Plant Disease**, v.95, n.4, p. 401-407, 2011.
- GÁSPERI, A.C.; PRESTES, A.M.; COSTAMILAN, L.M. Reação de cultivares de soja à Podridão Vermelha da Raiz causada por *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 5, p.544-547, 2003.
- KANG, I.J.; SHIM, H.K.; HEU, S.; KIM, K.S. First report of soybean root and stem rot caused by *Fusarium graminearum* in South Korea. **Plant Disease**, v.104, n.2, 568p, 2020.
- MARTINELLI, J.A.; BOCCHESI, C.A.C.; XIE, W.; O'DONNELL, K.; KISTLER, H.C. Soybean pod blight and root rot caused by lineages of the *Fusarium graminearum* and the production of mycotoxins. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.5, p.492-498, 2004.
- NELSON JR, B. & YAN, H. Effect of temperature on *Fusarium solani* and *F. tricinctum* growth and disease development in soybean. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.42, n.4, p.527-537, 2020.
- ROY, K.W.; RUPE, J.C.; HERSHMAN, D.E.; ABNEY, T.S. Sudden Death Syndrome of soybean. **Plant Disease**, v.81, n.10, p.1100-1111, 1997.
- TECNOLOGIAS de produção de soja. Londrina: Embrapa Soja, 2021. 346 p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 17).
- TEWOLDEMEHDHIN, Y.T.; LAMPRECHT, S.C.; VAUGHAN, M.M.; DOEHRING, G.; O'DONNELL, K. Soybean SDS in South Africa is Caused by *Fusarium brasiliense* and a Novel Undescribed *Fusarium* sp. **Plant Disease**, v. 101, n.1, p.150-157, 2017.
- WANG, G.; SANG, H.; JACOBS, J.L.; OUDMAN, K.A.; HANSON, L.E.; CHILVERS, M.I. Soybean Sudden Death Syndrome causal agent *Fusarium brasiliense* present in Michigan. **Plant Disease**, v. 103, n.6, p. 1234-1243, 2019.

ZHOU, Q.; LI, N.; CHANG, K.; HWANG, S.; STRELKOV, S.E.; CONNER, R.L.; MCLAREN, D.L.; FU, H.; HARDING, M.W.; TURNBULL, G.D. Genetic diversity and aggressiveness of *Fusarium* species isolated from soybean in Alberta, Canada. **Crop Protection**, v.105, p.49-58, 2018.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os isolados de fungos fusarioides obtidos no trabalho apresentavam características morfológicas similares. Presença de clamidósporos, disposição dos microconídios em falsas cabeças nos conidióforos e monofiálides de aproximadamente 100µm. Essas características são típicas do gênero *Neocosmospora*.

O estudo filogenético permitiu a identificação da espécie de onze dos doze isolados. Os isolados LFN0470, LFN0471, LFN0472, LFN0473, LFN0474, LFN0476, LFN0477, LFN0478, LFN0479 e LFN0480 pertencem à espécie *Neocosmospora falciformis*. O isolado LFN0481 pertence à espécie *N. suttoniana*. Este foi o primeiro relato de *N. suttoniana* em soja.

O teste de patogenicidade mostrou que todos os isolados foram patogênicos à soja, pois todos causaram necrose nas plântulas. Os isolados LFN0470, LFN0471, LFN0475, LFN0476, LFN0477, LFN0478, LFN0480 e LFN0481 foram os mais agressivos.

Diante disso, é possível sugerir que *Neocosmospora* seja o gênero de maior frequência entre os fungos fusarioides em raízes de soja de reboleiras do cerrado brasileiro.