

**CLÉIA SANTOS CABRAL**

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* DAS  
REGIÕES SUL E SUDESTE DO BRASIL E IDENTIFICAÇÃO DE ACESSOS  
RESISTENTES DE ALFACE**

**RECIFE-PE  
FEVEREIRO, 2012**

**CLÉIA SANTOS CABRAL**

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* DAS  
REGIÕES SUL E SUDESTE DO BRASIL E IDENTIFICAÇÃO DE ACESSOS  
RESISTENTES DE ALFACE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

**RECIFE-PE  
FEVEREIRO, 2012**

Ficha catalográfica

C117c Cabral, Cléia Santos

Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* das Regiões Sul e Sudeste do Brasil e identificação de acessos resistentes de alface / Cléia Santos Cabral. – Recife, 2012.

97 f. : il.

Orientador: Ailton Reis.

Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2012.

Inclui referências, apêndice e anexo.

1. *Lactuca sativa* 2. Resistência genética 3. Murcha de fusário 4. Análise filogenética I. Reis, Ailton, orientador  
II. Título

CDD 581.2

**CLÉIA SANTOS CABRAL**

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* DAS  
REGIÕES SUL E SUDESTE DO BRASIL E IDENTIFICAÇÃO DE ACESSOS  
RESISTENTES DE ALFACE**

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

**Prof. Dr. Ailton Reis (CNPQ) – Orientador**

**Dr. Maria Esther de Noronha Fonseca (CNPQ)- Co- orientadora**

**RECIFE – PE  
FEVEREIRO, 2012**

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* DAS  
REGIÕES SUL E SUDESTE DO BRASIL E IDENTIFICAÇÃO DE ACESSOS  
RESISTENTES DE ALFACE**

**CLÉIA SANTOS CABRAL**

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 17 de Fevereiro de 2012.

**ORIENTADOR(A):**

---

Prof. Dr. Ailton Reis (Embrapa Hortaliças)

**EXAMINADORES:**

---

Prof. Dr. Cristiano Souza Lima (UFRPE)

---

Dr. Leonardo Silva Boiteux (Embrapa Hortaliças)

---

Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE)

**RECIFE-PE  
FEVEREIRO, 2012**

*“Às vezes a vida te bate com um tijolo na cabeça. Não perca a fé. Estou convencido de que a única coisa que me fez continuar foi que eu amava o que eu fazia. Você precisa encontrar o que você ama. E isso vale para o seu trabalho e para seus amores. Seu trabalho irá tomar uma grande parte da sua vida e o único meio de ficar satisfeito é fazer o que você acredita ser um grande trabalho. E o único meio de se fazer um grande trabalho é amando o que você faz. Caso você ainda não tenha encontrado [o que gosta de fazer], continue procurando. Não pare. Do mesmo modo como todos os problemas do coração, você saberá quando encontrar. E, como em qualquer relacionamento longo, só fica melhor e melhor ao longo dos anos. Por isso, continue procurando até encontrar, não pare!”*

*Steve Jobs*

A minha amada avó Francisca Maria, mãe e  
Tia Aurora (*in memoriam*)  
pelo amor, compreensão, incentivo, dedicação,  
paciência e ajuda.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora, pelo dom da vida, pela força, saúde, coragem e inspiração para a realização desta dissertação.

A minha mãe, avós, irmãos, primos, sobrinha e madrinha Cláudia pelo apoio, pelo imenso amor e carinho concedido durante essa longa jornada. Ao meu padrasto Roberto pelos pequenos gestos de carinho e meu muito obrigado por ser o pai que eu nunca tive. Apesar de muitas dificuldades todos vocês sempre me apoiaram em minhas conquistas e vitórias.

Ao Dr. Ailton Reis minha eterna gratidão por sempre acreditar no meu potencial, pela sua valiosa orientação, paciência, compreensão e amizade.

Aos pesquisadores Maria Esther, Leonardo Boiteux e Kátia Brunelli pela valiosa colaboração na execução deste trabalho e por sempre estarem dispostos a me ajudar.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Fitopatologia e da Embrapa Hortaliças: Luana, Fabiana, Edivânio, Nadson, Maria, Higor, Chico, Melodi, Josineide, Rayane, Niday, Cecília, Fábio Suinaga e Jadir pela ajuda na execução dos experimentos, pelos momentos de alegria e pela convivência agradável.

Aos meus amados amigos Tatiane, Maurício, Arnaldo, Cristiana, Raissa, Alex, Sandra, Natália, Sirlei e Ivanildo pela eterna amizade, por sempre acreditarem na minha capacidade e auxiliar nos momentos pessoais mais difíceis, principalmente nos momentos de estresse.

Aos meus amigos vicentinos pelos bons momentos que passamos juntos e pelas orações.

Aos meus eternos amigos do programa de Pós-Graduação da UFRPE: Kátia, Erlen, Gustavo, Naldo, Maruzanete, Mariote, Janaína, Francisco, Edlene, Diene e Willie por tornarem meus dias em Recife mais felizes e inesquecíveis, pela generosidade e por sempre estarem ao meu lado nos momentos de superação durante este mestrado.

As minhas grandes amigas Elenice e Maíra pela amizade construída durante este período, pelo imenso apoio nos momentos em que eu mais precisava escutar uma palavra de conforto, pelo companheirismo, incentivo e carinho.

Ao Dr. Ossami Furumoto pela amizade e pela importante colaboração no meu aperfeiçoamento profissional.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) pelo apoio institucional; ao Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq) pela infraestrutura e serviços prestados e ao (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À todos professores da UFRPE pelos conhecimentos repassados durante o curso, em especial aos professores Marcos Câmara e Cristiano Lima pelas sugestões e contribuições na condução deste trabalho.

Aos funcionários da biblioteca, do transporte e das casas de vegetação da Embrapa Hortaliças, pela amizade, ajuda e atenção.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO GERAL .....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>viii</b>
<b>CAPÍTULO I – Introdução Geral.....</b>	<b>10</b>
INTRODUÇÃO .....	11
Cultura da alface .....	11
Doenças da alface .....	13
Resistência genética .....	18
O gênero <i>Fusarium</i> .....	19
Filogenia de espécies de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	21
Diagnóstico molecular para identificação de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
<b>CAPÍTULO II- Caracterização de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i> das Regiões Sul e Sudeste do Brasil .....</b>	<b>34</b>
RESUMO .....	35
ABSTRACT.....	37
INTRODUÇÃO.....	39
MATERIAL E MÉTODOS .....	42
Obtenção dos isolados e identificação .....	42
Teste de patogenicidade.....	43
Determinação da raça.....	44
Caracterização molecular.....	45
Análise das sequências.....	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
Determinação de raça.....	49
Caracterização molecular.....	50
Filogenia do gene <i>tef-1<math>\alpha</math></i> .....	51
REFERÊNCIAS .....	55
<b>CAPÍTULO III- Identificação de cultivares e linhagens de alface com resistência à <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i> raça 1 .....</b>	<b>67</b>
RESUMO .....	68
INTRODUÇÃO.....	71
MATERIAL E MÉTODOS .....	73
Produção de inóculo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i> .....	73
Seleção preliminar de acessos da alface resistentes à <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i> raça 1.....	73
Análise da estabilidade da resistência de acessos promissores da alface a sete isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i> raça 1 .....	75
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	76
REFERÊNCIAS .....	84
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>94</b>



## RESUMO GERAL

A murcha de fusário, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLac) é uma das doenças mais importantes da alface. Esta doença foi relatada recentemente no Brasil. Nos anos de 2008 a 2011 foram coletados isolados de FOLac nos Laboratórios de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças, Sakata Seed Sudamerica Ltda e do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper). Estes eram provenientes de todos os estados das Regiões Sul e Sudeste do Brasil. A identificação foi feita observando-se as características morfológicas de conídios e conidióforos. Os isolados foram inoculados em plantas das cultivares Elisa, Vera e Red Salad Bowl, em condições de casa de vegetação. Os mesmos também foram inoculados em plantas de outras espécies de Asteraceae (*Cichorium endivia*, *Cichorium intybus*, *Sonchus oleraceus*, *Emilia sonchifolia*, *Bidens pilosa* e *Tagetes erecta*) e de outras famílias (*Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, *Nicotiana tabacum*, *Gossypium hirsutum*, *Phaseolus vulgaris* e *Ocimum basilicum*). Os isolados foram identificados como *Fusarium oxysporum*. As cultivares Elisa e Vera foram suscetíveis a todos os isolados e a Red Salad Bowl foi resistente. Efetuou-se o re-isolamento do patógeno, completando-se assim os Postulados de Koch. Nenhuma outra espécie de planta foi suscetível ao patógeno, confirmando a identificação como *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*. Em seguida, os isolados foram avaliados quanto a sua virulência numa série de cultivares diferenciadoras de raças: Patriot (suscetível), Costa Rica No. 4 (resistente à raça 1) e Banchu Red Fire (resistente à raça 2). As cultivares Patriot e Banchu Red Fire comportaram-se como suscetíveis a todos os isolados, enquanto a cultivar Costa Rica No. 4 comportou-se como resistente. Concluiu-se que os isolados avaliados são da raça 1 de FOLac. Adicionalmente, foi feito um teste com *primers* específicos para a raça 1 de FOLac, utilizando como controles um isolado de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) raça 3 e um isolado não patogênico de *F. oxysporum*. O fragmento de DNA foi amplificado por PCR para os isolados de FOLac e não foi amplificado para o isolado de FOL e nem para o isolado não patogênico de *F. oxysporum*. Este resultado confirma a especificidade desse par de *primers* e a presença apenas da raça 1 de FOLac no Brasil.

Além disso, foi utilizada a região do fator de alongação da tradução (*tef-1 $\alpha$* ) para análise filogenética entre os isolados FOLac raças 1 e 2 e isolados de *F. oxysporum*. Comparação das seqüências obtidas com o *tef-1 $\alpha$*  confirmou a origem polifilética da *forma specialis lactucae* e também observou-se uma maior variabilidade genética entre os isolados brasileiros de FOLac raça 1 comparados com isolados da mesma raça disponíveis no Genbank. Posteriormente, 102 acessos (cultivares comerciais ou linhagens) foram avaliados, visando identificar fontes de resistência a FOLac e analisar a estabilidade da resistência de acessos promissores a diferentes isolados do patógeno. Inicialmente foi feita uma seleção preliminar, utilizando um isolado do patógeno (Fus-173). Em seguida, quarenta e sete acessos altamente resistentes mais uma testemunha suscetível (Regina), identificados na seleção preliminar, foram reavaliados para estabilidade da resistência ao FOLac raça 1, utilizando os isolados (Fus-202 e Fus-205) no mês de Outubro de 2011; isolados (Fus-219 e Fus-222) no mês de Novembro de 2011 e isolados (Fus-207, Fus-209 e Fus-220) no mês de Dezembro de 2011. A inoculação foi realizada em condições de casa de vegetação, pelo método de corte das raízes e imersão na suspensão de conídios do patógeno. A avaliação foi realizada após 30 dias, com auxílio de escala de notas variando de 0 (planta sadia) a 4 (planta morta). Os dados obtidos foram transformados em índice de doença (ID) e submetidos a uma análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey (5%). Foram identificados trinta e dois acessos apresentando amplo espectro de resistência aos diferentes isolados do patógeno nas quatro épocas de inoculação.

**Palavras-chaves:** *Lactuca sativa*, resistência genética, murcha de fusário, virulência e análise filogenética.

## ABSTRACT

### **Characterization of Brazilian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* and evaluation of lettuce accessions for resistance**

Fusarium wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLac), is an important disease of lettuce in the world. This disease was reported in Brazil, recently. From 2008 to 2011 the laboratories of Plant Pathology of Embrapa Hortaliças (Embrapa Vegetable Crops), Sakata Seeds Sudamerica and Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) collected some FOLac isolates in states from the Southern and the Southeastern regions of Brazil. The isolates were identified as *F. oxysporum* by the morphological characteristics of conidia and conidiophores. Isolates were inoculated on lettuce plants, cultivars Elisa, Vera, and Red Salad Bowl, conditions in a greenhouse. Isolates were also inoculated on plants of others Asteraceae species (*Cichorium endivia*, *Cichorium intybus*, *Sonchus oleraceus*, *Emilia sonchifolia*, *Bidens pilosa* e *Tagetes erecta*) and others botanical families as (*Solanum lycopersicum*, *Capsicum annum*, *Nicotiana tabacum*, *Gossypium hirsutum*, *Phaseolus vulgaris* e *Ocimum basilicum*). Lettuce cultivars Elisa and Vera were susceptible to all isolates while the cultivar Red Salad Bowl was resistant. All isolates were reisolated from diseased plants fulfilling the Koch's postulates. Others plant species were not susceptible to any isolate, proving that isolates belong to the species *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*. The isolates were also inoculated in a differential set of cultivars comprising: 'Patriot' (Susceptible to all races), 'Costa Rica No. 4' (resistant to race 1) and 'Banchu Red Fire' (resistant to race 2). Cultivars 'Patriot' and 'Banchu Red Fire' were susceptible while 'Costa Rica No. 4' was resistant, confirming that all the isolates were race 1. Molecular analysis using a primer specific to race 1 isolates was performed using *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) raça 3 and a non-pathogenic isolate as negative controls. DNAs of FOLac isolates were amplified by PCR and those of the negative controls were not, confirming the specificity of the primers and the presence of only the race 1 of FOLac in Brazil.

In addition, it was used the Translation elongation factor 1- $\alpha$  region (tef-1 $\alpha$ ) for phylogenetic analysis between FOLac isolates races 1 and 2 and isolates of *F. oxysporum*. Comparison of the sequences obtained with the tef-1 $\alpha$  confirmed the polyphyletic origin of the *forma specialis lactucae* and also showed a greater genetic variability among Brazilian isolates of FOLac race 1 compared with isolates of the same race available in GenBank. After the isolates characterization, it was made a screening of 102 accessions for resistance to the isolate Fus-173 and it was selected 47 as highly resistant. After this, the selected genotypes were evaluated for the stability of resistance in three additional assays, using different FOLac race 1 isolates. In all three assays it was used a highly susceptible cultivar (Regina) as susceptible control. In the first assay, carried out in October 2011, it were used the isolates Fus-202 and Fus-205. In the second assay, carried out in November 2011, it were used the isolates Fus-219 and Fus-222. In the third assay, carried out in December 2011, it were used the isolates (Fus-207, Fus-209 e Fus-220). Inoculation was performed on 25 days old seedlings on greenhouse conditions. Seedlings were inoculated by cutting their roots and emerging them in spore suspension of pathogen. Evaluation was carries out 30 days after inoculation, using a grade scale varying from 0 (heath plants) to 4 (dead plants). Data were transformed in Disease Index (DI) submitted to a variance analysis and the media were compared by the Tukey's test (5%). Thirty two accessions were identified as having broad spectrum of resistance to different pathogen isolates in the four inoculation seasons.

**KeyWords:** *Lactuca sativa*, genetic resistance, fusarium wilt, virulence and phylogenetic analysis.

## **CAPÍTULO I – Introdução Geral**



## INTRODUÇÃO

### Cultura da alface

A alface pertence a família Asteraceae, subfamília *Cichorioideae*, da tribo *Lactuceae* e espécie *Lactuca sativa* (Ryder, 1999). A família Asteraceae (sin. Compositae) é a maior das dicotiledôneas, contendo cerca de 23000 espécies distribuídas por mais de 1500 gêneros (ALMEIDA, 2006). É uma das mais importantes hortaliças folhosas cultivadas no mundo. Esta planta é originária do Sul da Europa e da Ásia Ocidental, sendo cultivada nessas regiões, desde 2500 a. C, chegando ao Brasil no século XVI, por meio dos portugueses (FILGUEIRA, 2008; RYDER, 1999).

Originalmente de clima temperado, a sua adaptação a regiões de temperaturas elevadas, tem gerado obstáculos ao seu crescimento e desenvolvimento, impedindo que a cultura expresse todo o seu potencial genético. Nestas condições, ocorre redução do ciclo da cultura, comprometendo sua produção, devido à aceleração do seu metabolismo e, conseqüentemente, a antecipação da fase reprodutiva (GRANGEIRO et al., 2006). Segundo Silva et al. (1999), as temperaturas ideais para a produção de folhas e formação da cabeça localizam-se entre os 12 a 22°C, sendo que temperaturas acima deste limite, favorecem o florescimento precoce das plantas. Ainda segundo estes autores o pendoamento precoce provoca o alongamento do caule, reduz o número de folhas, afeta a formação da cabeça comercial e estimula a produção de látex, o que confere sabor amargo às folhas.

Entretanto, ao longo dos anos, através de programas de melhoramento da alface, houve o desenvolvimento de cultivares adaptadas a diferentes condições climáticas, com isso é possível plantar e colher alface, de boa qualidade durante todo o ano em países tropicais e subtropicais, como o Brasil (FILGUEIRA, 2008).

A larga adaptação a diferentes condições climáticas, possibilidade de cultivos sucessivos no mesmo ano, boa preferência e demanda são fatores que fazem com que seja a hortaliça folhosa mais produzida no país e a preferida entre os olericultores que cultivam em condições de campo ou protegido, o que lhe confere grande importância econômica e social. Além disso, apresenta grande aceitação no mercado não só por suas qualidades organolépticas, mas também por possuir baixo valor calórico e ser rica em sais de cálcio e de ferro e em vitaminas A, B1, B2, B6 e C. O fato de ser consumida crua contribui para preservar as propriedades nutritivas desta hortaliça (CASALI et al., 1980; RICCI, 1993).

No Brasil, são mais de 66 mil estabelecimentos cultivando alface com a produção total de 525,6 mil toneladas, distribuindo-se entre os estados de São Paulo (31,3%), Rio de Janeiro (27,28%), Minas Gerais (6,8%), Paraná (5,4%), Ceará (3,6%), Santa Catarina (3,05), Distrito Federal (2,94%) e outros (13,8%). Os dados demonstram que mais da metade da produção concentra-se nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro. A produtividade média é de 15 t/ha e estima-se que a área plantada no Brasil seja de 35000 ha (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010).

A planta da alface é herbácea de caule carnoso e esverdeado, ao qual se predem as folhas. Estas podem ser lisas ou crespas, formando ou não “cabeça”, com coloração em vários tons de verdes, ou roxa, conforme a cultivar. Segundo Filgueira (2008) as cultivares comerciais podem ser agrupadas em seis diferentes tipos ou segmentos:

#### Tipo Repolhuda-Crespa (Americana):

As folhas são caracteristicamente crespas, bem consistentes e com nervuras destacadas, formando uma cabeça compacta. As folhas internas são mais crocantes que as externas, sendo preferidas para sanduíches. Exemplos: Tainá, Lucy Brown, Raider Plus e Rafaela.

#### Tipo Repolhuda-Manteiga

As folhas são bem mais lisas, muito delicadas, de coloração verde amarelada e aspecto amanteigado, formando uma típica cabeça compacta. Exemplos: White Boston, Carolina, Elisa e Lídia.

#### Tipo Solta - Lisa

As folhas mais macias, lisas e soltas, não havendo formação de cabeça. Exemplos: Babá de Verão, Regina, Luisa e Vitória de santo Antônio.

#### Tipo Solta - Crespa

As folhas são consistentes, crespas e soltas, não formando cabeça. Folhas com superfície inteiramente irregular, com destaque para as bordas que se apresentam inteiramente onduladas. Exemplos: Verônica, Vera, Mônica e Vanda.

#### Tipo Mimososa

As folhas são delicadas e com aspecto arrepiado. É um tipo recente que vem adquirindo certa relevância. Exemplo: Red Salad Bowl e mimososa.

#### Tipo Romana

As folhas são alongadas e consistentes, com nervuras bem protuberantes, formando cabeças fofas. É muita demandada em processamento e na produção de “mix” de folhas,

bastante utilizados por restaurantes. De todas as alfaces citadas é a menos consumida no Brasil, mas forte aceitação na Europa e EUA. Exemplo: Romana Paris, Donna e Sofia.

Até meados da década de 1980, o mercado consumidor no Brasil tinha preferência pela alface lisa do tipo White Boston. Posteriormente, houve uma migração para o segmento de alface do tipo crespa (Grand Rapids). A alface americana nos últimos anos tem mostrado o maior crescimento no mercado, inicialmente para atender às redes de *fast food*, entretanto a preferência pela mesma também tem aumentando pelos consumidores domiciliares. Este aumento no consumo de alface do tipo americana se deve principalmente à sua crocância e sabor diferenciados (COSTA; SALA, 2005).

Os tipos mimosa e romana apresenta um grupo específico de consumo que cresce bastante no Brasil, representado por restaurantes e processadores de vegetais. Outro grupo crescente são as variedades coloridas, como crespa roxa e vermelha, e mimosa roxa, que tem seu consumo associado à prevenção de doenças (SALA; COSTA, 2005; HENZ; SUINAGA, 2009).

No Brasil, no ano de 2010, a CEAGESP (entreposto de São Paulo) comercializou um volume de 43.630 toneladas de alface dos tipos crespa (52,5%); americana (36,6%) lisa (9,1%), romana (1,8%). Estima-se que, atualmente esta unidade da CEAGESP responde por aproximadamente 20% do total de alface comercializado no Brasil. Observa-se que, na CEAGESP o preço da alface americana, em média é aproximadamente 60% superior ao preço da alface crespa (comum e hidropônica).

A grande diversificação de alface contribui para o aumento de seu consumo, além de ser uma importante forma de agregar valor. Cultivares distintas permitem atender a diferentes tipos de mercados consumidores, com variadas exigências e diferentes níveis financeiros. Tudo isso acontecendo junto permite o aumento do consumo de alface (COSTA; SALA, 2005, 2008; SILVA, 2009).

### **Doenças da alface**

Doenças são um fator limitante para a produção de alface, quando as cultivares resistentes são indisponíveis. A natureza e a frequência dessas doenças dependem das condições locais. Mais de 75 doenças da alface já foram relatadas no mundo. São doenças transmissíveis causadas por fitopatógenos, tais como bactérias, fungos, nematóides e vírus. Além das doenças transmissíveis, a planta de alface pode apresentar doenças não



transmissíveis, geralmente associadas ao clima, nutrição da planta, déficit hídrico e fitotoxicidade por agroquímicos (DAVIS et al., 1997; LOPES et al., 2010).

Segundo Lopes et al. (2010) as doenças causadas por bactérias, nematoides, vírus e fungos da parte aérea que mais acometem danos a alface durante o seu ciclo produtivo são: Podridão-mole [*Pectobacterium* spp. ou *Dickeya* = *Erwinia* spp (Jones) Waldee ], Mancha bacteriana [*Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp], Míldio [*Bremia lactucae* Regel], Septoriose [*Septoria lactucae* Passerini], Mancha de cercospora [*Cercospora longissima* (Cugini.) Sacc.], Podridão de botritis [*Botrytis cinerea* Pers], Oídio [*Oidium* sp. Sawada], Mancha bacteriana [*Xanthomonas campestris* pv. *vitians* (Brown) Dye], Mosaico [*Lettuce mosaic virus*-LMV.], Vira-cabeça [várias espécies: *Tomato spotted wilt virus*-TSWV, *Tomato chlorotic spot virus*- TCSV], Mosqueado [*Lettuce mottle virus*= LeMoV] e Nematóide das galhas [*Meloidogyne* spp.].

As doenças, causadas por fungos habitantes do solo, são muito limitantes para o cultivo da alface. Essa limitação muitas vezes ocorre devido ao uso das áreas, através de cultivos sucessivos, sem rotação com outras culturas. *Pythium* spp. Paulitz & M. Mazzola, *Sclerotinia minor* Jagger, *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Rhizoctonia solani* Khun e *Thielaviopsis basicola* (Berk.& Broome) Ferraris são os patógenos radiculares que ocasionam os maiores prejuízos para a cultura no país (LOPES et al., 2010; PAVAN et al., 2005; SALA, 2006; TEIXEIRA-YANEZ, 2005).

Outro patógeno habitante de solo, importante em alface é *Fusarium oxysporum* Schlechtend. :Fr. f. sp. *lactucae* Matuo & Motohashi (FOLac), agente causal da murcha de fusário ou fusariose da alface. A fusariose da alface é uma doença vascular, altamente destrutiva e que recentemente tornou-se uma séria preocupação para os produtores em várias áreas de produção de alface no mundo (PASQUALI et al., 2005).

A murcha de fusário da alface foi relatada pela primeira vez em 1967, quando foi responsável por perdas significativas em cultivos de alface no Japão (MATUO; MOTOHASHI, 1967). Nos Estados Unidos a doença foi relatada pela primeira vez no vale de San Joaquin, Califórnia, onde provocou perdas significativas na produção em três campos de alface (HUBBARD; GERIK, 1993). Em 2001 a doença foi identificada em cinco campos perto da cidade de Yuma, no Arizona (MATHERON; KOIKE, 2003). A ocorrência da doença na Califórnia e no Arizona é extremamente grave devido à posição de destaque que a alface ocupa em ambas as economias agrícolas. O meio de dispersão do patógeno entre estes dois estados adjacentes levanta a hipótese de ser através do movimento de equipamentos agrícolas

infestados e de tubos de irrigação utilizados durante a estação de crescimento da alface (MATHERON, 2005).

Na Itália, o patógeno causou perdas de até 70% na produção de alface (GARIBALDI et al., 2002). Adicionalmente, a murcha de fusário também tem sido relatada em outros países, tais como: Taiwan (HUANG; LO, 1998), Irã (MILLANI et al., 1999) e Portugal (PASQUALI et al., 2007). No Brasil, a murcha de fusário foi recentemente detectada nos estados do Espírito Santo, Santa Catarina e Minas Gerais ocasionando grandes perdas na produção de alface (VENTURA; COSTA, 2008; CABRAL et al., 2009).

De 2001 a 2003, os isolados do Japão foram agrupados em raças fisiológicas (raça 1, 2 e 3), baseado na patogenicidade em cultivares de alface diferenciadoras de raças de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*. Todas essas raças foram relatadas pela primeira vez em áreas de produção de alface deste país (FUJINAGA et al., 2001, 2003). Por outro lado, em outros países como a Itália, Portugal, Taiwan, Irã e Estados Unidos foi relatada somente a presença da raça 1 (FUJINAGA et al., 2001; McCREIGHT et al., 2003, 2005; GARIBALDI et al., 2004b; PASQUALI et al., 2005, 2007). Recentemente, além da presença da raça 1 relatada anteriormente, também foi constatada a raça 3 em Taiwan (CHANG et al., 2011).

As cultivares Costa Rica No. 4 (resistente a raça 1, mas suscetível a raça 2 e 3), Banchu Red Fire (suscetível a raça 1 e 3, mas resistente a raça 2) e Patriot (suscetível a ambas as raças) são usadas para identificação das raças de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (FUJINAGA et al., 2001, 2003).

O patógeno é um habitante do solo e sobrevive neste ambiente decompondo restos culturais e também pode sobreviver, por longos períodos, como saprófita ou através dos clamidósporos. A proximidade dessas estruturas às raízes das hospedeiras induz a germinação desses propágulos sob estímulo de exsudatos produzidos pela planta. Após a germinação, os tubos germinativos desses esporos penetram nas extremidades das raízes diretamente ou de ferimentos presentes nas mesmas (Di PIETRO et al., 2001). O micélio do fungo avança intercelularmente, através do córtex da raiz, chegando aos vasos do xilema que passam a desenvolver no seu interior através da produção de microconídios. Promovendo a distribuição do fungo pela planta através da corrente ascendente da seiva. Os microconídios germinam e as hifas penetram as paredes superiores dos vasos e produzem mais microconídios. Uma combinação de atividades do patógeno, como o acúmulo de micélio, esporos e produção de toxinas e a resposta do hospedeiro pela produção de géis, de goma, tilose resultam em oclusão e escurecimento do sistema vascular causando o sintoma característico de murcha. (BECKMAN, 1987). O escurecimento dos vasos é atribuído ao transporte de substâncias

resultantes da oxidação e polimerização de compostos fenólicos, que são lançados no sistema vascular pelas células do parênquima. Os sintomas de murcha surgem em consequência do bloqueio dos vasos, impedindo que água seja absorvida pelo sistema radicular. Nos casos em que a planta consegue sobreviver ao ataque do patógeno, o fungo pode colonizar a planta, comprometendo seu desenvolvimento e infectando a semente (BEDENDO, 2011). O fungo é capaz de causar murcha tanto em mudas como em plantas adultas. Os primeiros sintomas da fusariose ocorrem a partir da 3-4 semanas quando as plantas jovens murcham e morrem (HUBBARD; GERIK, 1993).

O fungo permanece limitado aos vasos do xilema e algumas células circundantes, enquanto a planta está viva, mas invade o tecido parenquimatoso e esporula abundantemente sobre a superfície da planta após a sua morte. Os esporos podem, então, servir como inóculo secundário e iniciar infecções secundárias em outras plantas próximas. (Di PIETRO et al., 2003).

Segundo Fujinaga et al. (2001), plantas afetadas por esta doença aparecem inicialmente com um amarelecimento progressivo das folhas e/ou redução do crescimento. Com o progresso da doença, as folhas perdem a turgência e murcham, principalmente nas horas mais quentes do dia. Quando o caule é cortado no sentido vertical, observa-se uma coloração marrom intensa nos vasos condutores, que é um sintoma bem característico da doença e ajuda na sua identificação (GARIBALDI et al., 2004b).

A ocorrência da raça 1 de FOLac em vários países distantes em um período relativamente curto de tempo sugere a disseminação deste patógeno através de sementes infestadas (GARIBALDI et al., 2004a). De fato, esta forma de dispersão é bastante comum em outras espécies e *formae speciales* de *Fusarium*, tais como: *F. oxysporum* f. sp. *niveum* W. C. Snyder & H. N. Hansen e *F. moniliforme* J. Sheld. Além disso, o movimento de *Fusarium* spp. através do sistema vascular do pedúnculo e no embrião de sementes têm sido documentado para outras *formae speciales*, tais como: *matthiolae* K. F. Bake, *vasinfectum* (Atk.) W.C Snyder & H.N Hansen e *pisi* (J.C. Hall) W. C Snyder & H. N. Hansen, revelando que, em alguns casos, *Fusarium* spp. pode tanto infectar como infestar as sementes (SNYDER, 1932). Além disso, Garibaldi (2004a) utilizando o método do plaqueamento direto, foi capaz de recuperar *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* de amostras de vários lotes de sementes de alface utilizadas em campos na Itália nos quais a incidência da doença variou de 20% a 60%, indicando que o patógeno estava presente nas sementes.

Matheron et al. (2005 e 2010) avaliaram 89 cultivares de alface tipo americana, principal tipo de alface cultivada no Sudoeste do Arizona, em campos naturalmente infestados

com FOLac raça 1. Verificaram que 80 cultivares não apresentavam resistência ou tolerância ao patógeno. Entretanto no mesmo ensaio, duas de 16 cultivares romanas testadas apresentaram resistência ou tolerância. Estes mesmos autores indicam que temperaturas mais elevadas tendem a aumentar a severidade da fusariose da alface, por exemplo: cultivares de alface tipo americana sofreram perdas de 0 a 1,8%, quando as temperaturas se encontravam entre 11 a 14°C, enquanto as mesmas cultivares sofreram perdas de 51 a 100% quando variaram de 21 a 32°C. Além disso cultivares do tipo romana testadas foram mais tolerantes que as cultivares do tipo americana, sofrendo perdas de 0 a 2,3% quando as temperaturas do solo variaram de 10 a 20°C, comparadas com perdas de 5,2 a 100% quando variaram entre 21 a 32°C. Com isso fatores como tipo de cultivar, data de plantio e temperatura interferiram na incidência e severidade da doença.

O controle da murcha de fusário da alface através do uso de fungicidas ou da desinfestação dos solos com produtos químicos geralmente é inviável em termos econômicos e/ou ecológicos. Portanto, a maioria dos esforços é direcionada para a prevenção da doença. Em geral, meios eficazes de controle da doença antes da infecção incluem: fumigação do solo, uso de sementes isentas do patógeno, desinfestação de material vegetal e utilização de cultivares resistentes.

Adicionalmente, a presença de fungos no solo pode ser controlada pela manipulação do ambiente através da utilização da solarização, de tal forma que o crescimento, esporulação e virulência do patógeno diminuam, ou reduzir os níveis de inóculo do solo através da rotação de culturas com espécies não hospedeiras (DAVIS et al., 2006; LOPES et al., 2010; MATHERON et al., 2010). Entretanto, a medida de rotação de cultura seria de pouca eficiência, uma vez que o patógeno é um fungo de solo, podendo sobreviver no campo por 10 anos ou mais, mesmo na ausência do hospedeiro. Além disso, estratégias de controle biológico estão sendo desenvolvidas utilizando isolados não patogênicos de *F. oxysporum* ou de outros microrganismos antagônicos (FRAVEL et al., 2003).

Para o desenvolvimento de cultivares resistentes é importante conhecer a variabilidade do patógeno nas regiões onde o mesmo ocorre e a identificação de genes de virulência ou a habilidade de adaptação dos patógenos a novos genótipos, que podem tornar a resistência algo temporário. Além disso, novas raças podem surgir, superando a resistência do hospedeiro. A identificação de raças do patógeno é fundamental na seleção de linhagens avançadas adequadas e para o desenvolvimento de cultivares resistentes (FUJINAGA et al., 2003).

Apesar das dificuldades, elencadas acima, o uso de cultivares resistentes é o processo mais eficaz no controle de doenças das plantas, devido ao seu baixo custo, facilidade de uso e

por ser ecologicamente viável. Tsuchiya et al. (2004), avaliando 155 acessos de alface no Japão, para resistência a *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* verificou que as cultivares Batavia Tezier e Batavia Blonde de Paris foram resistentes as raças 1 e 2, enquanto Kikugawa 102 e Blizzard foram resistentes somente a raça 2 do patógeno. Posteriormente, experimentos realizados no Arizona demonstrou baixa incidência na cultivar Salinas 88 (0,8%), comparando com a cultivar suscetível Red Tide (88,2%) (MATHERON et al., 2005). Scott et al. (2009) avaliando duas cultivares tipo romana (Caesar e King Henry) e duas mimosas (Lolla Rossa e Red Rossa) demonstrou que estas cultivares são altamente resistentes à fusariose. Diante disso, a seleção de cultivares resistentes poderia ser útil para produtores, que cultivam alface onde a doença está presente. Além disso, a mesma também poderia servir como fonte de resistência para serem incorporadas em cultivares suscetíveis em programas de melhoramento.

### **Resistência genética**

Resistência é definida como a habilidade de alguns acessos de uma espécie de planta (sabidamente hospedeira de um patógeno) de suprimir, reduzir ou retardar as injúrias e danos causados por este patógeno. A resistência é caracterizada pela sua natureza dinâmica e coordenada, onde a efetividade depende da expressão dos seus mecanismos em uma sequência lógica, após o contato do patógeno em potencial com o hospedeiro. Mostra-se como um sistema multicomponente, onde o nível de resistência resulta da somatória das contribuições individuais de diferentes mecanismos de resistência (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

A obtenção de cultivares resistentes é uma tarefa de grande complexidade e estratégias de melhoramento devem ser traçadas. É necessário inicialmente que se identifiquem fontes de resistência e que posteriormente serão cruzadas com cultivares de interesse, para transferência da sua resistência. Na identificação de fontes de resistência, pode-se utilizar métodos de inoculações artificiais em condições controladas ou realizar experimentos em áreas que apresentem longo histórico de infecção, avaliando-se a resistência de diversos acessos com base na incidência e/ou severidade da doença no campo, comparando-se com o comportamento de cultivares suscetíveis. Outra etapa indispensável é verificar se essa resistência é durável, pois muitos agentes patogênicos apresentam raças fisiológicas que diferem em patogenicidade, em diferentes cultivares de uma cultura. Assim, a resistência depende tanto do genótipo do hospedeiro como da variante do patógeno, ambos afetados pelo

ambiente. Por isso, o conhecimento das raças fisiológicas é pré-requisito para um teste rigoso e inteligente na seleção de materiais resistentes (LIMA, 2005).

De acordo com Van der Plank (1968), há dois tipos de resistência de plantas aos patógenos: vertical e horizontal. A vertical ou específica caracteriza-se quando uma cultivar é resistente a alguma(s) raça (s) do patógeno. Neste caso ocorre interação diferencial entre cultivares do hospedeiro e raças do patógeno. É monogênica ou oligogênica, sendo conferida por um ou poucos genes e de fácil manipulação (BUENO, 2001; FERREIRA, 2006). A resistência horizontal é comumente denominada resistência de campo ou não específica, sendo controlada por muitos genes (poligênica), que se complementam, o que se admite como um fator de maior estabilidade. Não ocorre uma interação diferencial entre cultivares do hospedeiro e raças do patógeno. É usualmente efetiva contra todas as raças, não sendo facilmente “quebrada” por elas. A determinação de seu mecanismo de ação e a sua manipulação são difíceis, pois sua herança equivale a caracteres quantitativos, ou fatores múltiplos, que variam de forma contínua (BUENO, 2001; FERREIRA, 2006).

### **O gênero *Fusarium***

*Fusarium* foi descrito inicialmente por Link em 1809 (LINK, 1809) e atualmente pertence ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes e ordem Hypocreales (INDEX FUNGORUM, 2011). A primeira grande revisão das espécies de *Fusarium* foi realizada por Wollenweber e Reinking (1935), a qual descrevia em seu trabalho, *Die Fusarien*, 65 espécies, 55 variedades e 22 *formae speciales*, agrupadas em 16 seções. Desde então mais de 1000 espécies já foram descritas.

O gênero *Fusarium* tem ampla distribuição geográfica, inclui espécies habitantes do solo e de substratos orgânicos e que são amplamente distribuídas em todo o mundo (cosmopolitas). Este gênero possui ampla gama de hospedeiros com espécies que colonizam tanto a parte vegetativa como a reprodutiva dos vegetais. De 101 plantas economicamente mais importantes, pelo menos 81 são hospedeiros desse patógeno. Devido a isso, os sintomas nos hospedeiros são, em geral, caracterizados por podridões de raízes e sementes, morte de plântulas, murchas vasculares, amarelecimento, necrose foliar e eventual morte das plantas (NAYAKA et al., 2011).

A identificação das espécies do gênero *Fusarium* é tradicionalmente baseada em características culturais e morfológicas. Entre elas as principais são o crescimento rápido em cultura, colônias com coloração pálida ou colorida, de violeta à púrpura ou do creme à laranja,

com micélio aéreo e difuso, tipo e comprimento da fiálide, presença ou ausência de microconídios, forma do macroconídio, além da produção de clamidósporos (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Dentre as espécies fitopatogênicas distribuídas no gênero *Fusarium*, a espécie *F. oxysporum* se destaca por afetar um grande número de plantas, incluindo muitas espécies cultivadas (KURAMAE; DE SOUZA, 2008). Esta espécie possui sua fase teleomórfica ainda desconhecida, sendo considerada uma espécie grupo, composta de dezenas de espécies que ainda necessita ser claramente definidas e separadas de maneira adequada (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Como espécie, *F. oxysporum* inclui isolados patogênicos e não patogênicos que são indistinguíveis morfológicamente. Isolados não patogênicos são definidos como isolados para os quais plantas hospedeiras não foram identificadas e representam o maior componente da microflora de fungos de solos agrícolas. Isolados patogênicos podem causar murcha vascular ou podridão radicular em mais de cem espécies de plantas, entre várias culturas de importância econômica como banana, algodão, fumo, flores, tomate, melão e alface dentre outras culturas (GORDON et al., 1997).

*F. oxysporum* apresenta três tipos de esporos assexuais: microconídios, macroconídios e clamidósporos. Os microconídios são produzidos abundantemente em falsas cabeças em fiálides curtas sobre as hifas, apresentando formatos ovais a elipsóides, ligeiramente curvados e sem septos. Os macroconídios são esparsos a abundantes, produzidos em conidióforos ou na superfície de esporodóquios, apresentando formato fusóide e pontiagudos nas extremidades, com as paredes finas e três a cinco septos. Os clamidósporos apresentam paredes espessas, duplas e rugosas, formato globoso e podem ser formados isolados ou nas extremidades de conidióforos ou intercalados nas hifas. Estes são considerados esporos de resistência do patógeno e podem permanecer viáveis no solo na ausência do hospedeiro por anos. (NELSON; TOUSSOUN; MARASAS, 1983; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Isolados patogênicos de *F. oxysporum* são morfológicamente semelhantes a isolados saprofitos da mesma espécie, mas diferem em sua especificidade a hospedeiros distintos, resultando em *formae speciales* (f. spp.) (SNYDER; HANSEN, 1940). Isolados que possuem os mesmos ou similares hospedeiros são atribuídos a mesma forma especialis, que geralmente dar-se o nome da hospedeira para esta designação. Mais de 150 formas específicas ao hospedeiro já foram descritas. (O'DONNELL et al., 1999). Entretanto, apesar da alta especificidade da maioria das formas especializadas, deve-se ter bastante cuidado, pois vários isolados de *F. oxysporum* possuem uma gama mais ampla de hospedeiros (ARMOSTRONG; ARMOSTRONG, 1975). Por exemplo: *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* que causa a murcha

de fusário em algodoeiro, ataca também quiabeiro, soja, alfafa, fumo e girassol- mexicano (AGUIAR, 2011; CIA; SALGADO, 1997)

Das formas especializadas de *F. oxysporum*, as mais importantes para a produção agrícola no Brasil e no Mundo são: [*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* W. C. Snyder & H. N. Hansen] em tomateiro, [*F. oxysporum* f. sp. *cubense* (E. F. Smith) W. C. Snyder & H. N. Hansen] em bananeira, [*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*] em algodoeiro e quiabeiro, [*F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* J. B. Kendrick & W. C. Snyder] em feijoeiro, [*F. oxysporum* f. sp. *glycines* G. M. Armstr. & J. K. Armstr.] em soja, [*F. oxysporum* f. sp. *cepae* W. C. Snyder & H. N. Hansen] alho e cebola, [*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* J. H. Owen] em pepino, [*F. oxysporum* f. sp. *pisi*] em ervilha e [*F. oxysporum* f. sp. *lactucae* Matuo & Motohashi] em alface (SNYDER; HANSEN, 1940; MICHEREFF et al., 2005; SOUZA, 2009). Estas *formae speciales* são subdivididas em raças, de acordo com a especialização do patógeno ao nível de cultivares (hospedeiras diferenciais) dentro de uma mesma espécie botânica hospedeira (CAMARGO, 1995).

### **Filogenia de espécies de *Fusarium oxysporum***

*F. oxysporum* é uma unidade taxonômica muito grande e diversa, abrangendo isolados de grupos biológicos diferentes como endofíticos, saprófitas e patógenos de plantas com diferentes *formae speciales* e raças (KISTLER, 1999), mas que, no entanto, apresentam características morfológicas similares. Por esta razão tem sido difícil estabelecer sistemas de classificação baseados apenas em caracteres morfológicos para espécies de *Fusarium*, tornando-se importante a utilização de métodos moleculares para diferenciação de táxons.

Estes estudos moleculares têm utilizado: Polimorfismo no comprimento de fragmentos de Restrição (RFLPs) do DNA, Fragmentos de DNA polimórfico de amplificação ao acaso (RAPDs), Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), e análises de sequências de genes específicos para identificação e caracterização dos isolados. Muito desses trabalhos com diversidade genética têm discutido se *F. oxysporum* pode ser considerado como uma única espécie. No entanto, a resposta a esta pergunta não é simples, pois existem muitas definições para o conceito de espécie (AVISE; BALL, 1990).

Cracraft (1983) definiu uma espécie filogenética como o menor conjunto diagnosticável de indivíduos dentro do qual há um padrão parental de ancestralidade e descendência. Este tipo de conceito é aplicável tanto para organismos que se reproduzem sexualmente quanto assexuadamente. Na mesma linha, Nixon e Wheeler (1990) definem



espécies como a menor agregação de populações (sexuais) ou linhagens (assexuais) diagnosticáveis por uma única combinação de caracteres.

Para Taylor et al. (2000) o uso do conceito filogenético, através da análise de caracteres variáveis dos ácidos nucléicos, seria a melhor opção para a caracterização de espécies fúngicas, já que as espécies descendentes de um ancestral comum podem apresentar mudanças nas sequências dos genes que poderiam ser reconhecidas por esta metodologia antes que tivessem ocorrido mudanças no comportamento reprodutivo ou na morfologia. Apesar dos indivíduos serem agrupados muito bem, uma desvantagem neste sistema de classificação seria a decisão de onde colocar o limite nas espécies, o que acabaria sendo subjetivo. Uma forma de evitar essa subjetividade, na decisão dos limites de uma espécie, seria levar em conta a concordância de várias genealogias gênicas.

Todas as definições acima citadas correspondem ao conceito de espécies filogenéticas que incorpora características importantes da população, linhagens e fenótipos para definição de espécies viáveis. Em fungos, uma única espécie morfológica geralmente corresponde a muitas espécies biológicas ou filogenéticas (TAYLOR et al., 2000). Os principais conceitos de espécies são baseados na morfologia (espécies morfológicas), espécies biológicas e marcadores moleculares (espécies filogenéticas), ou na integração dessas características (YLI-MATTILA et al., 2002).

Apesar de o conceito de espécies filogenéticas ter aplicação relativamente recente em sistemática de *Fusarium*, isso pode ajudar a resolver as dificuldades taxonômicas. No entanto, se aplicada de forma inadequada ou mal interpretada, pode resultar em mais confusão. (NAYAKA et al., 2011). Em relação às características morfológicas, as características moleculares fornecem maior número de caracteres para comparação dos organismos. Segundo Baayen et al. (2002), isolados dentro de uma mesma *forma specialis* muitas vezes diferem significativamente com base em sequências de DNA e não precisam ser de origem monofilética. Assim, as características de patogenicidade de significativa importância econômica não precisam ter caracteres evolutivamente conservados e não podem fazer parte da descrição confiável de espécies. Com o advento do sequenciamento de DNA, similaridade de sequências em um ou mais loci tornou-se um importante critério para distinção de espécies (NAYAKA et al., 2011).

Para o gênero *Fusarium*, as sequências mais informativas do ponto de vista filogenético são: fator de alongação  $-1\alpha$  (*tef-1\alpha*) (WULFF et al., 2010) ,  $\beta$ -tubulina (*tub2*) (O'DONNELL et al., 1998a), regiões espaçadoras intergênicas (*Intergenic spacer* –IGS) (YLI-MATTILA; GAGKAEVA, 2010). Além destas, ainda podem ser usadas regiões do

genoma mitocondrial (mtSSU rDNA- *mitochondrial small subunit ribosomal DNA*) (MBOFUNG et al., 2007). Nem todas as sequências funcionam bem para todas as espécies, sendo que o gene *tef-1 $\alpha$*  é o mais amplamente aceito em todo o gênero. O'Donnell et al. (1998b) usando o *tef-1  $\alpha$*  e mtSSU rDNA mostraram que *F. oxysporum* compreende dezenas de espécies filogeneticamente distintas distribuídas entre três clados bem sustentados.

Na prática, a distinção de *F. oxysporum* de outras espécies próximas e identificação precisa baseada em métodos tradicionais são muito difíceis, devido à sua semelhança genética e alta variação morfológica. Em questões de quarentena e medidas fitossanitárias, uma ferramenta baseada nas sequências de DNA é necessária para a identificação rápida e precisa, e caracterização das espécies que fazem parte deste complexo gênero (NAYAKA et al., 2010).

Apesar de suas inúmeras vantagens, a identificação de espécies de *F. oxysporum* baseadas em relações filogenéticas apresentam algumas dificuldades. Estudos conduzidos por Baayen et al. (1999) mostraram que isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* foram classificadas em cinco linhagens, filogeneticamente distintas, distribuídas em dois dos três clados principais descritos por O'Donnell et al. (1998b). Da mesma forma, Baayen et al. (1999) utilizando AFLP, observou que *F. oxysporum* f. sp. *opuntiarum* W. L. Gordon consistia de um grupo monofilético de isolados, enquanto *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* W. C. Snyder & H. N. Hansen e *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* W. C. Snyder & H. N. Hansen tinham origens parafiléticas.

Mbofung et al. (2007) analisando sequências mtSSU rDNA não conseguiu diferenciar isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* de outros 13 isolados de *F. oxysporum*. Entretanto, ao utilizar análises de sequências *tef-1 $\alpha$*  os isolados da *forma specialis lactucae* ficaram agrupadas com sete *formae speciales* resultando em uma resolução filogenética limitada e moderada, respectivamente.

Em outros estudos Namiki et al. (1999) e Baayen et al. (2000) verificaram as múltiplas origens evolutivas das *formae speciales asparagi, cubense, melonis, dianthi, gladioli, lycopersici* e *lini*, enquanto as *formae speciales lilii* Imle, *tulipae* W. C. Snyder & H. N. Hansen, *cucumerinum, lagenariae* W. C. Snyder & H. N. Hansen e *niveum* têm revelando origem monofilética. Estes mesmos autores afirmam que várias mutações ou eventos de transposição podem ter levado à aquisição independente de fatores de patogenicidade para o mesmo hospedeiro em isolados com diferentes filogenias. Além disso, outros mecanismos podem estar envolvidos na aquisição da patogenicidade, como a parassexualidade que pode

ocorrer em *F. oxysporum* e pode ter contribuído para a transferência lateral de genes de patogenicidade para isolados distantemente relacionados.

### **Diagnóstico molecular para identificação de isolados de *Fusarium oxysporum***

Tradicionalmente, os métodos convencionais de identificação de fungos patogênicos às plantas são baseados na interpretação dos sintomas morfológicos, isolamento, cultivo e identificação no laboratório por microscopia óptica (preparações microscópicas). A precisão e confiabilidade desses métodos são dependentes da experiência e habilidade da pessoa que faz o diagnóstico. Geralmente estes métodos convencionais são demorados e pouco práticos quando resultados rápidos são necessários (MACCARTNEY et al., 2003). Além disso, diagnósticos baseados na morfologia de *Fusarium* spp. são extremamente desafiadores, devido principalmente ao uso de sistemas taxonômicos diferentes, a um número reduzido de micologistas com experiência adequada na identificação dos fungos e a falta de características morfológicas suficientemente informativas, pois esta caracterização depende de pequenas diferenças na morfologia (FRAVEL et al., 2003).

Adicionalmente, a identificação de isolados patogênicos de *F. oxysporum* é baseada em testes de patogenicidade. A determinação de *forma specialis* é geralmente feito por meio de testes de patogenicidade em várias espécies de plantas, enquanto as raças são determinadas por ensaios de virulência em diferentes cultivares de uma única espécie de planta. Embora esses bioensaios sejam muito eficazes, são altamente demorados e trabalhosos. Além disso, por causa da abundância de *formae speciales*, para a correta identificação, os isolados devem ser inoculados em um vasto número de espécies de plantas (FRAVEL et al., 2003; RECORBERT et al., 2003; LIEVENS, 2008). Assim, devido a todas essas limitações específicas, estas técnicas estão sendo cada vez mais complementadas ou substituídas por métodos moleculares.

Assim, o desenvolvimento de métodos rápidos baseados em biologia molecular são desejáveis pela sua reprodutibilidade, facilidade de uso e interpretação. Métodos moleculares estão entre as ferramentas mais precisas para a diferenciação entre as espécies e identificação de novos isolados coletados em amostras infectadas. O desenvolvimento de diagnósticos baseados na análise de DNA requer três etapas básicas: 1. A seleção da região genômica a ser usado para reconhecer o patógeno; 2. Extração de DNA de fungos da amostra e 3. Em um método para identificar a presença do DNA-alvo na amostra (MACCARTNEY et al., 2003).

O desenvolvimento de técnicas moleculares de análise genética levou a um grande aumento do conhecimento da genética de fungos e na compreensão da estrutura e do comportamento de seu genoma. A biologia molecular trouxe mais uma nova ferramenta para os taxonomistas de fungos, incluindo uma ferramenta adicional para rápida identificação e determinação de virulência dos isolados. Outras aplicações destas técnicas se dão na distinção de espécies intimamente relacionadas, com nenhuma ou pouca diferença morfológica (WUFF et al., 2010), e na diferenciação de isolados dentro de uma mesma espécie (LIEVENS; THOMMA, 2005; CHANDRA et al., 2010). Essas técnicas, tem ainda permitido a análise da variabilidade do DNA, pois permite identificar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados marcadores moleculares. Entre os tipos mais comuns de marcadores moleculares destacam-se: AFLP, RAPD e RFLP.

O advento de técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) apresentou uma nova opção ao uso de marcadores moleculares. A técnica foi desenvolvida em meados da década de 80 e alcançou uso disseminado e extenso em diversas áreas da biologia e da agronomia quase que imediatamente (WHITE, 1989). A técnica envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase e de iniciadores específicos ou não. Tais iniciadores delimitam a sequência de DNA de fita dupla a ser amplificada, cujos resultados são milhões de cópias idênticas (WHITE, 1989).

Métodos de diagnóstico baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR) de amplificação de sequências específicas de ácidos nucléicos constituem o grande avanço no campo da taxonomia molecular e detecção (HENSON et al., 1993). A especificidade da PCR depende do desenho de primers adequados e específicos para o organismo alvo. Pasquali et al. (2007) utilizando primers específicos conseguiram identificar a raça 1 de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*, a partir da amplificação de fragmentos de DNA para 69 isolados de diferentes países como Itália, Estados Unidos (Arizona e Califórnia), Portugal, Taiwan e Japão.

Diante disso, a presente dissertação teve como objetivos: (a) identificar e caracterizar isolados de *Fusarium*, obtidos de plantas de alface murchas, coletadas nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil, ao nível de espécie, *formae speciales* e raça; (b) Avaliar a eficiência de um par de *primers* raça 1-específico, visando confirmar a presença de FOLac raça 1 no Brasil; (c) Avaliar a relação filogenética entre isolados de FOLac, isolados não patogênicos de *F. oxysporum* e de outras *formae speciales* baseando-se na análise da sequência da região *tef-1 $\alpha$* ; (d) Selecionar acessos de alface promissores como possíveis fontes de resistência a *F.*

*oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 e (e) avaliar a estabilidade da resistência dos acessos mais promissores a diferentes isolados da raça 1 de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* coletados no país.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, D. Asteráceas. In: **Manual de culturas hortícolas**. Lisboa, 2006. p. 156-158.
- AGUIAR, F. M. **Resistência de acessos de quiabeiro à murcha-de-fusário**. 2011. 53p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- ARMSTRONG, G. M.; ARMSTRONG, J. K. Reflections on the wilt fusaria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 13, p. 95-103, 1975.
- AVISE, J. C.; BALL, R. M. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. In: FUTUYMA, D.; ANTHONOVICS, J. (Eds.). **Oxford Surveys in Evolutionary Biology**. Oxford, Oxford University Press, v. 7, p. 45-47, 1990.
- BAAYEN, R. P.; O'DONNELL, K.; WAALWIJK, C.; BONANTS, P. J. M.; CIGELNIK, E.; ROEBROECK, E. J. A. Phylogeny of VCGs and *formae speciales* of *Fusarium oxysporum* and *F. redolens*. (Abstr). **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 27, p. 1, 1999.
- BAAYEN, R. P.; O'DONNELL, K.; BONANTS, P. J. M.; CIGELNIK, E.; KROON, L. P. M.; ROEBROECK, E. J. A.; WAALWIJK, C. Gene genealogies and AFLP analysis in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and non-monophyletic *formae* causing wilt and rot diseases. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, p. 891-900, 2000.
- BECKMAN, C. H. **The nature of wilt diseases of plants**. St. Paul: APS Press, 1987. 175p.
- BEDENDO, I. P. Murchas vasculares. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Org.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 2011, Cap. 24, v. 1, p. 451-466.
- BOOTH, C. **The genus *Fusarium***. Kew. Commonwealth Mycological Institute. 1971.
- BUENO, L. C. S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. In: BUENO, L. C. S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. (ed.). **Melhoramento de plantas**. Lavras: UFLA, 2001. p. 182-201.
- BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S.; GOTT, K. P.; BACKHOUSE, D. **Laboratory manual for *Fusarium* research**. 3rd ed. Sidney. University of Sidney. 1994.
- CABRAL, C. S.; BRUNELLI, K. R.; CARVALHO, M. R. M.; SANTOS JUNIOR, W. N.; REIS, A. Ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* em alface no Brasil. **Tropical Plant Pathology, Brasília**, v. 34 (supl.), p.174- p.174, 2009.

CASALI, V. W. D.; SILVA, R. F.; RODRIGUES, J. J. V.; SILVA, J. F.; CAMPOS, J. P. **Anotações sobre produção de alface**. Viçosa: UFV, 1980. 24p.

CASTELLANI, A. The “water cultivation” of pathogenic fungi. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 66, p. 283-286, 1963.

CAMARGO, L. E. A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. Cap. 24, p.470-492.

CEAGESP. **Normas de classificação de alface**. Disponível em: <<http://www.ceagesp.gov.br/produtos/alface>>. Acesso em: 20 de outubro de 2011.

CIA, E; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro (*Gossypium* spp.). In: Kimati, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (eds.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo, Agronômica Ceres, 1997, v. 2, p. 41-52.

CHANG, P.; LIN, Y.; LAI, P.; CHANG, T.; WAN, Y.; HUANG, J. Pathological and molecular race determinations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* from Taiwan. **Phytopathology**, Saint Paul, vol. 101(supl.), n. 6, p.s 31-p.s 31, 2011.

CHADRA, N. S.; UDAYA SHANNKAR, A. C.; NIRANJANA, S. R.; REDDY, M. S.; PRAKASH, H. S. Detection and quantification of fumonisins from *Fusarium verticillioides* in maize grown in southern India. **Word Journal Microbiology Biotechnology**, v.26, p.71-78, 2010.

CRACRAFT, J. **Species concepts and speciation analyses**. Current Ornithology, 1983.v.1, p.159-187.

COSTA, C. P.; SALA, F. C. A evolução da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, jan/mar. 2005 (artigo de capa).

DAVIS, R. M.; SUBBARAO, K. V.; RAID, R. N.; KURTZ, E. A. (Ed). **Compendium of lettuce diseases**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1997. 80p.

DAVIS, R. M.; COLYER, P. D., ROTHROCK, C. S.; KOCHMAN, J. R. Fusarium wilt of cotton: population diversity and implications for management. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 692-703, 2006.

Di PIETRO, A.; GARCIA-GONZALEZ, F. I.; MEGLECZ, E.; RONCERO, M. I. A MAP Kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 39, p. 1140-1152, 2001.

Di PIETRO, A.; MADRID, M. P.; CARACUEL, Z.; DELGADO-JARANA, J.; RONCERO, M. I. G. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of vascular wilt fungus. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 315-325, 2003.

FERREIRA, P.V. **Melhoramento de plantas**. In: Ferreira, P.V. (ed.). Resistência às doenças e aos insetos-praga. Maceió. EDUFAL, 2006. p. 482-483.

FILGUEIRA, F. A. R. Asteráceas. Alface e outras folhosas. In: FILGUEIRA, F. A. R. (ed.) **Novo manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna para produção de hortaliças**. 3ª ed. revista e ampliada. Viçosa. UFV, 2008. p. 300- 306.

FUJINAGA, M.; OGISO, H.; TSUCHIYA, N.; SAITO, H. Physiological specialization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, a causal organism of fusarium root of crisp head lettuce in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 67, p. 205-206, 2001.

FUJINAGA, M.; OGISO, H.; TUCHIYA, N.; SAITO, H.; YAMANAKA, S.; NOZUE, M.; KOJIMA, M. Race 3, a new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* determined by a differential system with commercial cultivars. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 69, p. 23-28, 2003.

FRAVEL, D; OLIVAIN, C; ALABOUVETTE, C. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. **New Phytology**, v. 157, p. 493-502, 2003.

GARIBALDI, A.; GILARDI, G.; GIULLINO, M. L. First report of *Fusarium oxysporum* on lettuce in Europe. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 1052, 2002.

GARIBALDI, A.; GILARDI, G.; GULLINO, M. L. Seed transmission of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 32, n. 23, p. 61-65, 2004a.

GARIBALDI, A.; GILARDI, G.; GULLINO, M. L. Varietal resistance of lettuce to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. **Crop Protection**, Guildford, v. 23, p.845-851, 2004b.

GORDON, T. R.; MARTYN, R. D. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 111-128, 1997.

GRANGEIRO, L. C.; COSTA, K. R.; MEDEIROS, M. A.; SALVIANO, A. M.; NEGREIROS, M. Z.; BEZERRA NETO, F.; OLIVEIRA, S. L. Acúmulo de nutrientes por três cultivares de alface cultivadas em condições do Semi-Árido. **Horticultura Brasileira**, v. 24, p. 190-194, 2006.

HENZ, G. P.; SUINAGA, F. **Tipos de alfaces cultivadas no Brasil**. Embrapa Hortaliças, 2009. 7p (Comunicado Técnico, 75)

HUANG, J. H.; LO, C. T. Wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* in Taiwan. **Plant Pathology Bulletin**, Taiwan, v. 7, p.150-153, 1998.

HUBBARD, J. C.; GERIK, J. S. A new disease of lettuce incited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucum forma specialis* nov. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, p.750-754, 1993.

INDEX FUNGORUM, 2011. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/>>. Acesso em: 14 de Janeiro de 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **SIDRA**: sistema IBGE de recuperação automática. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2006. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>>. Acesso em: 15 novembro de 2011.

KISTLER, H. C. Genetic diversity in plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. **Journal of Phytopathology**, Berlin , v. 87, p.474-479, 1999.

KURAMAE, E.; DE SOUZA, N. Variabilidade genética entre *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA. **Acta Scientiarum Agronomy**, Brasil, 2008. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/>>. Acesso em: 09 de janeiro de 2012.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Ames: Blackwell, 2006.388 p.

LIEVENS, B.; THOMMA, B. P. H. J. Recent developments in pathogen detection arrays : implications for fungal plant pathogens and use in practice. **Phytopathology**, Saint Paul , v. 95, p. 1374-1380, 2005.

LIEVENS, B.; REP, M; THOMMA, B. P. H. J. Recent developments in the molecular discrimination of *formae speciales* of *Fusarium oxysporum*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 64, p. 781-788, 2008.

LIMA, G. S. A.; ASSUNÇÃO, I. P.; VALLE, L. A. C. Controle genético de doenças radiculares. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (ed.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE. Imprensa Universitária, 2005, p. 247-278.

LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; REIS, A. **Doenças da alface**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2010. 68p.

MCCARTNEY, H. A., FOSTER, S. J.; FRAAIJE, B. A.; Ward, E. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. **Pest. Management Science**, Sussex , v. 59, p. 129-142, 2003.

MATUO, T.; MOTOHASHI, S. On *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* n.f. causing root of lettuce. **Transactions of Mycological Society of Japan**, Tokyo, v. 8, p.13-15, 1967.

MATHERON, M.E.; KOIKE, S.T. First report of fusarium wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* in Arizona. **Plant Disease**, Saint Paul, v.87, p.1265, 2003.

MATHERON, M.E.; McCREIGHT J.D.; TICKES B.R.; PORCHAS, M. Effect of planting date, cultivar, and stage of plant development on incidence of fusarium wilt of lettuce in desert production fields. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, 565–570, 2005.

MATHERON, M. E. PORCHAS, M. Evaluation of soil solarization and flooding as management tools for fusarium wilt of lettuce. **Plant Disease**, Saint Paul, v.94, p. 1323-1328, 2010.

MBOFUNG, G. Y.; HONG, S. G.; PRYOR, B. M. Phylogeny of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* inferred from mitochondrial small subunit, elongation factor 1- $\alpha$ , and nuclear ribosomal intergenic spacer sequence data. **Mycology**, New York, v. 97, p. 87-98, 2007.



MBOFUNG, G. C. Y.; PRYOR, B. M. A PCR-based assay for detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in lettuce seed. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n.7, p. 860- 866, 2010.

MCCREIGHT, J. D.; MATHERON, M. E, TICKES, B. R.; PLATTS, B. Occurrence of fusarium root rot race 1 on lettuce in Yuma, Arizona. **Hort Science**, Alexandria, v. 38, p. 664, 2003.

MCCREIGHT, J. D.; MATHERON, M. E, TICKES, B. R.; PLATTS, B. Fusarium wilt race 1 on lettuce. **Hort Science**, Alexandria, v. 40, p. 529-531, 2005.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; PERUCH, L. A. M; MENEZES, M. Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.). **Ecologia manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005, p. 1-18.

MILLANI, M. J.; EREBARIAN, H. R.; ALIZADEH, A. Occurrence of fusarium wilt of lettuce in Shahr- Ray, Varamim and Karaj areas. **Journal of Plant Pathology**, Via del Borghett, v. 35, p.121, 1999.

NAMIKI, F.; SHIOMI, T.; KAYAMURA, T.; TSUGE, T. Characterization of the *formae speciales* of *Fusarium* causing wilts of cucurbits by DNA fingerprinting with nuclear repetitive DNA sequences. *Applied Environ. Microbiology*, **Washington**, v. 60, p. 2684-2691, 1994.

NAYAKA, S. C.; WULFF, E. G.; UDAYASHANKAR, A. C.; NANDINI, B. P.; NIRANJANA, S. R.; MORTENSEN, C. N.; PRAKASH, H. S. Projects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 90, p. 1625-1639, 2011.

NIXON, K.C.; WHEELER, Q. D. **An amplification of the phylogenetic species concepts**. *Cladistics*, 1990. v. 6, p. 211-223.

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

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 7, p. 103-117, 1997.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York, v. 90, p. 465-493, 1998a.

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

OGISO, H.; FUJINAGA, M.; SAITO, H.; TAKEHARA, T.; YAMANAKA, S. Physiological races and vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* isolated from crisphead lettuce in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v.68, p. 292-299, 2002.

PASCHOLATTI, S. F., LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. Cap. 22, p.417-453.

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.

PASQUALI, M.; DEMATHEIS, F.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Identification of race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on lettuce by inter-retrotransposon sequence-characterized amplified region technique. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n.8, p. 987-996, 2007.

PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R.; KUROZAWA, C. Doenças da alface (*Lactuca sativa*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM, F. A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005, v.2, p. 27 – 33.

RECORBET, G; STEINBERG, C; OLIVAIN, C, EDER,V; TROUVELOT, S; DUMAS-GAUDOT, E. Walled: pathogenesis-related marker molecules for *Fusarium oxysporum*. **New Phytology**,v.159, p. 73-92, 2003.

RICCI, M. S. F. **Crescimento e teores de nutrientes em cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) adubados com vermicomposto**.1993. 101p. (Tese mestrado). Universidade Federal de viçosa, Viçosa, 1993.

RYDER E.J. **Lettuce, endive and chicory**. New York: CABI Publishing, 1999. 208p

SALA, F.C. **Reação de alface (*Lactuca sativa* L.) a *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferraris**. 2006. 103 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SALA, F. C. A; COSTA, C. P.; ‘PIRA ROXA’: cultivar de alface crespa de cor vermelha intensa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 158-159, jan/mar. 2005.

SALA, F. C. A; COSTA, C. P.; ‘GLORIOSA’: cultivar de alface crespa americana tropicalizada. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 409-410, jul/set. 2008.

SILVA, E. C. 2009. Anita: cultivar de alface de verão para cultivo protegido no solo e em hidroponia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 260-262. 2009.

SCOTT, J. C.; KIRKPATRICK, S. C.; GORDON, T. R. Variation in susceptibility of lettuce cultivars to fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. **Plant Pathology**, Broadway, v. 59, p. 139-146, 2010.

SNYDER, W.C.; HANSEN, H.N. **The species concept in *Fusarium***. Amer. J. Bot.1940. v.27, p.64-67.

SNYDER, W.C. Seed dissemination in *Fusarium* wilt of pea. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 22, p.253-257,1932.

SOUZA, L.T. **Reação de genótipos de tomateiro às raças 2 e 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici***. 2009. 48p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SILVA, E. C.; MALUF, W. R.; LEAL, N. R.; GOMES, L. A. A. Inheritance of bolting tendency in lettuce *Lactuca sativa* L. **Euphytica**, Wageningen, v. 109, p. 1–7, 1999.

SHIMAZU, J.; YAMAUCHI, N.; HIBI, T.; SATOU, M.; HORIUCHI, S.; SHIRAKAWA, T. Development of sequence tagged site markers to identify races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* . **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v.71, p.183-189, 2005.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; KROKEN, S.; KASUGA,T.; GEISER, D. M.; HIBBETT, D. S.; FISHER, M. C. Phylogenetic species recognition and concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v.31, p. 21-32, 2000.

TEIXEIRA-YANEZ, L. D. D. **Resistência genética, fungicidas e solarização para controle de *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferraris na cultura de alface (*Lactuca sativa* L.)**. 2005. 103 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

TSUCHIYA, N.; FUJINAGA, M.; OGISO, H.; USUI, T.; TSUKADA, M. Resistance tests and genetic resources for breeding fusarium root rot resistant lettuce. **Journal Japan Soc. Horticultural Science**, Tokyo, v. 73, p.105-113, 2004.

WAALWIJK, C.; KONING, J. R. A.; BAAYEN, R. P.; GAMS, W. Discordant groupings of *Fusarium* spp. from sections *Elegans*, *Liseola* and *Dlamina* based on ribosomal ITS1 e ITS2 sequences, **Mycologia**, New York, v.88, p.361-368, 1996.

WHITE, T. J.; ARNHEIM, N.; ERLICH, H. A. The polymerase chain reaction. **Trends in Genetics**, London, v. 5, p. 185-188, 1989.

WOLLENWEBER, H. W.; REINKING, O. A. **Die Fusarien- Ihre Beschreibung, Schwirkung und Bekämpfung**. Paul Parey, Berlin.1935.

WUFF, E. G.; SORENSEN, J. S.; LUBECK, M.; NIELSEN, K. F.; THARANE, U.; TORP, J. *Fusarium* spp. associated with rice Bakanae: ecology, genetic diversity, pathogenicity and toxigenicity. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, p.649-657, 2010.

YAMAUCHI, N.; SHIMAZU, J.; HORIUCHI, S.; SATOU, M.; SHIRAKAWA, T. Physiological races and vegetative compatibility groups of butterhead lettuce isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 67, p. 288- 290, 2001.

YLI-MATTILA, T.; PAAVANEN-HUHTALA, S.; BULAT, S. A.; ALEKHINA, I. A.; NIRENBERG, H. I. Molecular, morphological and phylogenetic analysis of the *Fusarium avenaceum* /*F. arthrosporioides*/*F. tricinctum* species complex a polyphasic approach. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 655-669, 2002.

YLI-MATTILA, T.; GAGKAEVA, T. Molecular chemotyping of *Fusarium gramineum*, *F. culmorum* and *F. cerealis* isolates from Finland and Russia. In: GHERBAWY, Y.; VOIGT, K (eds). **Molecular Identification of Fungi**. Springer, Berlin, 2010.

VAN DER PLANK, J. E. **Disease resistance in plants**. New York: Academic Press, 1968. 206p.

VENTURA, J. A.; COSTA, H. Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* on lettuce in Espirito Santo, Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, n. 6, p. 976, 2008.

**CAPÍTULO II-Characterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* das  
Regiões Sul e Sudeste do Brasil**

---

---

1 **Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* provenientes das**  
2 **Regiões Sul e Sudeste do Brasil**

3

4 Cléia Santos Cabral<sup>1</sup>, Kátia Regiane Brunelli<sup>2</sup>, Hércio Costa<sup>3</sup>, Maria Esther de Noronha  
5 Fonseca<sup>4</sup>, Leonardo Silva Boiteux<sup>4</sup> e Ailton Reis<sup>4</sup>

6

7 <sup>1</sup>UFRPE, Depto. Agronomia - Fitossanidade, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-  
8 900 Recife-PE, Brasil; <sup>2</sup>Sakata Seed Sudamerica Ltda, Bragança Paulista-SP; <sup>3</sup>Incaper,  
9 Venda Nova do Imigrante-ES; <sup>4</sup>Embrapa Hortaliças, 70359-970, Brasília-DF; E-mail:  
10 ailton@cnph.embrapa.br

11

12

**Resumo**

13

14 A murcha de fusário, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLac) , é  
15 uma das principais doenças da alface no mundo. Nos anos de 2008 a 2011 foram coletados  
16 isolados de FOLac nos Laboratórios de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças, da Sakata Seed  
17 Sudamerica Ltda e do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural  
18 (Incaper). Os isolados eram provenientes dos três Estados da Região Sul e dos quatro da  
19 Região Sudeste. A identificação foi feita observando-se as características morfológicas de  
20 conídios e conidióforos. Os isolados foram inoculados em plantas das cultivares Elisa, Vera e  
21 Red Salad Bowl. A inoculação foi realizada em casa de vegetação, utilizando-se mudas saudáveis  
22 com dois pares de folhas verdadeiras, pelo método de imersão das raízes em suspensão de  
23 esporos. Também foi feita a inoculação de plantas de outras espécies de Asteraceae  
24 (*Cichorium endivia*, *Cichorium intybus*, *Sonchus oleraceus*, *Emilia sonchifolia*, *Bidens pilosa*  
25 e *Tagetes erecta*) e de outras famílias (*Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, *Nicotiana*

26 *tabacum*, *Gossypium hirsutum*, *Phaseolus vulgaris* e *Ocimum basilicum*). Os isolados foram  
27 identificados como *Fusarium oxysporum*. As cultivares Elisa e Vera foram suscetíveis a todos  
28 os isolados e a Red Salad Bowl foi resistente. Efetuou-se o re-isolamento do patógeno,  
29 completando-se assim os Postulados de Koch. Nenhuma outra espécie de planta foi suscetível  
30 ao patógeno, confirmando a identificação como *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*. Em seguida, os  
31 isolados foram avaliados quanto a sua virulência numa série de cultivares diferenciadoras de  
32 raças: Patriot (suscetível), Costa Rica No. 4 (resistente à raça 1) e Banchu Red Fire (resistente  
33 à raça 2). As cultivares Patriot e Banchu Red Fire comportaram-se como suscetíveis a todos  
34 os isolados, enquanto a cultivar Costa Rica No. 4 comportou-se como resistente. Concluiu-se  
35 que os isolados avaliados são da raça 1 de FOLac. Adicionalmente, foi feito um teste com  
36 *primers* específicos para a raça 1 de FOLac. Como controles negativos, foram utilizados um  
37 isolado de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) raça 3 e um isolado não patogênico de *F.*  
38 *oxysporum*. O fragmento de DNA foi amplificado por PCR para os isolados de FOLac e não  
39 foi amplificado para o isolado de FOL e nem para o isolado não patogênico de *F. oxysporum*.  
40 Este resultado confirma a especificidade desse par de *primers* e a presença apenas da raça 1  
41 de FOLac no Brasil. Além disso, foi utilizado a região do fator de alongação da tradução  
42 (*tef-1α*) para análise filogenética entre os isolados FOLac raças 1 e 2 e isolados de *F.*  
43 *oxysporum*. Comparação das seqüências obtidas com o gene *tef-1α* confirmou a origem  
44 polifilética da *forma specialis lactucae* e também observou-se uma maior variabilidade  
45 genética entre os isolados brasileiros de FOLac raça 1 comparados com isolados da mesma  
46 raça disponíveis no GenBank.

47

48 **Palavras-Chave:** *Lactuca sativa*, alface, murcha de fusário, virulência e análise filogenética.

49

50

**Abstract**

51

52

**53 Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* isolates from the Southern and  
54 Southeastern regions of Brazil**

55

56 *Fusarium* wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLac), is an  
57 important disease of lettuce in world. From 2008 to 2011 the laboratories of Plant Pathology  
58 of Embrapa Hortaliças (Embrapa Vegetable Crops), Sakata Seeds Sudamerica and Instituto  
59 Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) collected some  
60 FOLac isolates in the three states from the Southern and the four states from the Southeastern  
61 regions of Brazil. Isolates were identified as *F. oxysporum* by the morphological  
62 characteristics of conidia and conidiophores. Isolates were inoculated on lettuce plants,  
63 cultivars Elisa, Vera, and Red Salad Bowl. Inoculation was carried out in greenhouse on  
64 plantlets presenting two leaf pairs by the dipping method. Isolates were also inoculated on  
65 plants of others Asteraceae species (*Cichorium endivia*, *Cichorium intybus*, *Sonchus*  
66 *oleraceus*, *Emilia fosbergii*, *Bidens pilosa* e *Tagetes erecta*) and others botanical families as  
67 (*Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, *Nicotiana tabacum*, *Gossypium hirsutum*,  
68 *Phaseolus vulgaris* and *Ocimum basilicum*). Lettuce cultivars Elisa and Vera were susceptible  
69 to all isolates while the cultivar Red Salad Bowl was resistant. All isolates were reisolated  
70 from diseased plants fulfilling the Koch's postulates. Other plant species were not susceptible  
71 to any isolate, proving that isolates belong to the species *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* . The  
72 isolates were also inoculated in a differential set of cultivars comprising: 'Patriot'  
73 (Susceptible to all races), 'Costa Rica No. 4' (resistant to race 1) and 'Banchu 'Red Fire'  
74 (resistant to race 2). Cultivars 'Patriot' and 'Banchu Red Fire' were susceptible while 'Costa  
75 Rica No. 4' was resistant, confirming that all the isolates were race 1. Molecular analysis



76 using a primer specific to race 1 isolates was performed using *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*  
77 (FOL) raça 3 and a non-pathogenic isolate as negative controls. DNAs of FOLac isolates were  
78 amplified by PCR and those of the negative controls were not, confirming the specificity of  
79 the primers and the presence of only the race 1 of FOLac in Brazil. In addition, It was used  
80 the Translation elongation factor- 1 $\alpha$  (tef-1 $\alpha$ ) for phylogenetic analysis between FOLac  
81 isolates races 1 and 2 and isolates of *F. oxysporum*. Comparison of the sequences obtained  
82 with the tef-1 $\alpha$  gene confirmed the polyphyletic origin of the *forma specialis lactucae* and  
83 also showed a greater genetic variability among Brazilian isolates of FOLac race 1 compared  
84 with isolates of the same race available in GenBank.

85

86 **Additional Key-words:** *Lactuca sativa*, lettuce, fusarium wilt, virulence and phylogenetic  
87 analysis.

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124

## Introdução

A murcha de fusário da alface, causada por *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. foi relatada recentemente no Brasil, inicialmente no Estado do Espírito Santo (Ventura & Costa, 2008). Em seguida, a doença também foi relatada em Santa Catarina e Minas Gerais, sendo que desta vez o patógeno foi identificado como *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* Matuo & Motohashi (Cabral et al., 2009). Esta doença havia sido registrada em outros países como Japão (Matuo & Motohashi, 1967), Estados Unidos (Hubbard & Gerik, 1993), Taiwan (Huang & Lo, 1998), Irã (Millani et al., 1999), Itália (Garibaldi et al., 2002) e Portugal (Pasquali et al., 2007), causando significativas perdas em campos de produção de alface. Na Itália, a incidência de murcha em plantas de alface em diferentes campos variou de 20 a 60 % após dois anos de cultivos contínuos. Durante os últimos quatro anos neste mesmo país houve perdas de 70% em algumas lavouras (Pasquali et al., 2005, 2007).

Plantas afetadas por esta doença ficam inicialmente cloróticas e raquíticas. Com o progresso da doença, os sintomas se tornam mais graves e podem incluir a morte das folhas mais velhas ou colapso de toda a planta. Quando o caule é cortado no sentido vertical, observa-se uma coloração marrom intensa nos vasos condutores, provocado pela colonização do patógeno e por toxinas liberadas pelo mesmo. Este sintoma é característico da doença e facilita a sua identificação (Fujinaga et al., 2001; Garibaldi et al., 2004b; Scott et al., 2010).

Os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* têm sido agrupados em três raças (1, 2 e 3) de acordo com sua reação sobre cultivares de alface (Fujinaga et al., 2003). No Japão foi relatada a presença das três raças (Fujinaga et al., 2001, 2003; Yamauchi et al., 2004). Por outro lado, em outros países como a Itália, Portugal, Taiwan, Irã e Estados Unidos foi relatada a presença da raça 1 (Pasquali et al., 2003, 2005). Recentemente, também foi relatada a raça 3

125 em Taiwan (Chang et al., 2011). No Brasil, ainda não se tem informações sobre quais raças  
126 estão presentes e/ou predominando.

127 A detecção da raça 1 em vários países distantes num período relativamente curto de  
128 tempo sugere que a dispersão mundial deste patógeno foi feita através de sementes infestadas  
129 (Garibaldi et al., 2004a). Neste sentido, provavelmente a doença foi trazida para o Brasil com  
130 o uso de sementes importadas. Uma outra evidência deste fato é a presença da doença em  
131 diversos estados produtores do Brasil, apesar de a mesma ter sido relatada pela primeira vez  
132 no país recentemente. Este fato é preocupante e alerta para a necessidade de um melhor  
133 controle fitossanitário das sementes de importadas pelo Brasil. O uso destas sementes  
134 contaminadas pode causar grandes prejuízos aos produtores brasileiros, pois estas poderão  
135 introduzir o patógeno em outras regiões do país e tornar a produção insatisfatória e  
136 antieconômica.

137 O controle da murcha de fusário da alface através do uso de fungicidas ou da  
138 desinfestação dos solos com produtos químicos geralmente é inviável em termos econômicos  
139 e/ou ecológicos. Assim, o manejo da doença depende do uso de material propagativo sadio,  
140 rotação de cultura para reduzir os níveis de inóculo do solo e no uso de cultivares resistentes.  
141 (Davis et al., 2006; Lopes et al., 2010). Entretanto, para o desenvolvimento de cultivares  
142 resistentes é importante conhecer a variabilidade do patógeno nas regiões onde o mesmo  
143 ocorre.

144 A raça 1 de FOLac é identificada rotineiramente através de teste de virulência em  
145 cultivares diferenciadoras (Ogiso et al., 2002; Fujinaga et al., 2003). No entanto, esse teste é  
146 trabalhoso e demorado. O emprego de marcadores moleculares, principalmente aqueles  
147 baseados em reação de polimerase em cadeia (PCR), utilizando iniciadores (*primers*)  
148 específicos, podem ser menos trabalhosos e abreviar o tempo de obtenção dos resultados  
149 (Lievens et al., 2008). Além disso, essa ferramenta pode ser utilizada para detecção do

150 patógeno em sementes e plantas infectadas, diminuindo o tempo para uma diagnose correta da  
151 doença nas clínicas fitopatológicas (Mbofung et al., 2010).

152 Apesar de isolados dentro da mesma *forma specialis* estarem relacionadas com a  
153 patogenicidade para um determinado hospedeiro, a heterogeneidade genética dentro de certas  
154 *formae speciales* muitas vezes tem revelado uma origem polifilética. Esta heterogeneidade  
155 tem implicações importantes na evolução das formas patogênicas dentro da espécie sendo esta  
156 uma informação importante para subsidiar o desenvolvimento de cultivares resistentes  
157 (Bogale et al., 2006; Mbofung et al., 2007; Hirano & Arie, 2009). Portanto, é fundamental  
158 diferenciar com rapidez e precisão a diversidade genética dentro de *F. oxysporum* f. sp.  
159 *lactucae*. Muitos métodos moleculares têm sido utilizados para diferenciar e identificar  
160 *formae speciales* e raças de isolados patogênicos e isolados não patogênicos de *F. oxysporum*,  
161 incluindo a amplificação do DNA com marcadores do tipo *Sequence characterized amplified*  
162 *region* – SCAR (Lievens et al., 2008). Um destes marcadores (Pasquali et al., 2007) foi  
163 desenvolvido em regiões entre retrotransposons, os *long terminal repeats* (LTRs). Essa região  
164 denominada Han tem sido encontrada distribuída em todo o genoma de *Fusarium* (Huan-Van  
165 et al., 2000). Outros métodos utilizados são a amplificação de uma região codificante do fator  
166 de alongação  $-1\alpha$  (*tef-1\alpha*), de uma região da pequena subunidade mitocondrial (mtSSU  
167 rDNA) e a região intergênica do DNA ribossômico (IGS) (Mbofung et al., 2007). Neste  
168 contexto, os objetivos do presente trabalho foram identificar e caracterizar isolados de  
169 *Fusarium* obtidos de alface, provenientes das regiões Sul e Sudeste do Brasil, e avaliar a  
170 eficiência de um par de *primers* raça 1-específico, visando confirmar a presença de FOLac  
171 raça 1 no Brasil. Adicionalmente, objetivou-se avaliar a relação filogenética entre isolados de  
172 FOLac, isolados não patogênicos de *F. oxysporum* e de outras *formae speciales* baseando-se  
173 na análise da sequência da região *tef-1\alpha*.

174

## 175 **Material e Métodos**

176

### 177 **Obtenção dos isolados e identificação**

178

179 Nos anos de 2008 a 2011, plantas de alface com sintomas típicos de murcha de  
180 fusário, foram recebidas nos Laboratórios de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças, da Sakata  
181 Seed Sudamerica Ltda e do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão  
182 Rural (Incaper) para diagnose. Estas eram provenientes de estados produtores, das regiões Sul  
183 e Sudeste do Brasil (Tabela 1).

184 O isolamento do patógeno foi feito, em condições assépticas, recortando-se  
185 fragmentos do caule de plantas de alface apresentando sintomas de murcha e escurecimento  
186 vascular. Os mesmos foram lavados em água corrente por dois minutos, desinfestados com  
187 álcool por um minuto, lavados em água destilada e esterilizada por 30 segundos, secos ao ar e  
188 depositados em cinco pontos equidistantes nas placas de Petri que continham meio de cultura  
189 Batata, Dextrose e Ágar + o tetraciclina (BDA-t).

190 As placas foram mantidas em câmara de crescimento tipo BOD com 12 h de  
191 fotoperíodo e em temperatura de 25°C por três dias, quando então o fungo foi transferido para  
192 outra placa de Petri contendo BDA-t, visando obter-se uma cultura pura. A identificação foi  
193 feita observando-se as características morfológicas e culturais do fungo e comparando com  
194 descrições da literatura (Nelson et al., 1983; Leslie & Summerell et al., 2006). Os isolados  
195 foram preservados em placas de Petri com BDA e em tubos de penicilina com água destilada  
196 e esterilizada (Castellani, 1963).

197

198

## 199 **Teste de patogenicidade**

200  
201 Isolados do fungo foram cultivados em meio de cultura BDA-t, por cinco dias. Após  
202 este período, retirou-se 3 discos (5 mm de diâmetro cada), com crescimento abundante de  
203 micélio, e colocou-se em frascos Erlenmeyer contendo 100 mL do meio líquido BD (Batata +  
204 Dextrose). Esses frascos foram mantidos em agitador automático por 10 dias a 25°C e 12  
205 horas de fotoperíodo para a produção dos esporos (microconídios). Após este processo,  
206 filtrou-se a suspensão de esporos em gaze dupla e estimou-se sua concentração, utilizando um  
207 hemacitômetro. Posteriormente, a suspensão de esporos foi ajustada para a concentração de  
208  $2 \times 10^6$  microconídios/mL. Os vinte e sete isolados fúngicos foram utilizados para o teste de  
209 patogenicidade nas cultivares (Elisa, Vera e Red Salad Bowl).

210 Para produção das mudas, as sementes destas cultivares foram semeadas em bandejas  
211 de isopor, preenchidas com substrato (Plantmax®) esterilizado. Mudas com 25-30 dias após o  
212 semeio foram removidas das células e as raízes lavadas em água corrente para eliminar o  
213 substrato que se encontra aderida às raízes. A porção apical das raízes foi cortada  
214 (aproximadamente 2 cm), com auxílio de tesoura, e mergulhadas em 50 mL da suspensão de  
215 esporos, por três minutos. Em seguida foram transplantadas para vasos 2L contendo uma  
216 mistura de argila, esterco bovino, areia e palha de arroz carbonizada esterilizada.  
217 Posteriormente foram adicionadas no colo de cada plântula 3 mL da suspensão de conídios.  
218 Os vasos foram irrigados duas horas antes da inoculação, até o ponto de escorrimento (Santos,  
219 1999).

220 Os isolados também foram inoculados em outras espécies de plantas da família  
221 Asteraceae Chicória [(*Cichorium endivia* L.), radicchio (*Cichorium intybus* L.), serralha  
222 (*Sonchus oleraceus* L.), falsa serralha (*Emilia sonchifolia* L.), picão preto (*Bidens pilosa* L.) e  
223 cravo de defunto (*Tagetes erecta* L.)] e de outras famílias botânicas [tomate (*Solanum*

224 *lycopersicum* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.), fumo (*Nicotiana tabacum* L.), algodão  
225 (*Gossypium hirsutum* L.), Feijão vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) e Manjerição (*Ocimum*  
226 *basilicum* L.)], visando comprovar se os mesmos eram específicos à alface.

227 Como testemunha, foram utilizados dois vasos com plantas de cada espécie e cultivar,  
228 os quais tiveram seu sistema radicular cortado e imerso em água de torneira. A avaliação foi  
229 realizada aos 20 a 25 dias do plantio, observando-se sintomas de amarelecimento de folhas,  
230 murcha e escurecimento vascular nas plantas inoculadas.

231

### 232 **Determinação da raça**

233

234 Para identificação da raça, os isolados foram inoculados nas cultivares diferenciadoras  
235 Patriot (Suscetível a todas as raças), Costa Rica No. 4 (resistente à raça 1) e Banchu Red Fire  
236 (resistente à raça 2).

237 As sementes foram semeadas em bandejas de isopor com 128 células preenchidas com  
238 substrato (Plantmax®) esterelizado e, 25 dias após o semeio, as mesmas tiveram suas raízes  
239 lavadas, cortadas e mergulhadas em um Becker com uma suspensão ajustada para  $2 \times 10^6$   
240 microconídios/mL utilizando um hemacitômetro. A produção de inóculo e a inoculação das  
241 plantas foram feitas da mesma forma que no ensaio anterior. Como testemunhas foram  
242 utilizadas dois vasos plantados com mudas que tiveram seu sistema radicular cortado e imerso  
243 em água da torneira.

244 A avaliação foi feita 20 dias após a inoculação usando uma escala de notas variando  
245 de 1 a 5, adaptada de Santos (1999), sendo o 1= plantas sem sintomas; 2= plantas sem  
246 sintomas de murcha ou amarelecimento, mas com escurecimento vascular; 3= plantas com  
247 escurecimento vascular intenso e com início de murcha ou amarelecimento foliar; 4= plantas  
248 com murcha intensa, associada com amarelecimento e necrose foliar; 5= plantas mortas.

249 Foram considerados virulentos os isolados que provocarem doença nas plantas com  
250 severidade média acima de 2. Em seguida, os isolados foram posicionados em relação à raça,  
251 dependendo da reação das cultivares.

252 Na avaliação, os isolados que fossem virulentos sobre as cultivares Patriot e Banchu  
253 Red Fire seriam classificados como raça 1. Enquanto os isolados que fossem virulentos sobre  
254 as cultivares Patriot e Costa Rica No. 4 seriam classificados como raça 2. Aqueles isolados  
255 que fossem virulentos sobre as três cultivares seriam classificados como raça três. Os isolados  
256 que não causarem doença em nenhuma cultivar seriam considerados avirulentos.

257

### 258 **Caracterização molecular**

259

260 Foram utilizados 16 isolados, identificados como FOLac raça 1 através de sua  
261 virulência sobre cultivares diferenciadoras. Como controle negativo, foi utilizado um isolado  
262 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) raça 3 (Fus-191) e um isolado não patogênico de *F.*  
263 *oxysporum*, obtido de raízes de alface cultivada em hidroponia (Fus-237).

264 O DNA dos isolados foi extraído através do método do CTAB com algumas  
265 modificações (Boiteux et al.,1999). Na reação de PCR foi usado o par de *primers*  
266 Hani3' (5'CCCTCCAACATTCAACAACACTG-3') e Hanilatt3rev (5'ATTCACTGTAC  
267 ACCAACCTTTT-3') que são específicos para isolados de FOLac raça 1 (Lievens et al.,  
268 2008). Os isolados também foram submetidos a uma reação de PCR com os *primers* Ef-1 (5'-  
269 ATGGGTAAGGAAGAAGAC-3') e Ef-2 (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3')  
270 (Mbofung et al., 2007) que amplifica uma região do gene que codifica o fator de alongação e  
271 tradução (*tef- 1 $\alpha$* ).

272 A reação dos primers Hani3' e Hanilatt3rev foi composta de: 3  $\mu$ L de DNA genômico,  
273 2  $\mu$ L de tampão 10X(100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3) , 0,48  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 2



274  $\mu\text{L}$  de dNTPs (2,5M cada), 0,2  $\mu\text{L}$  *Taq* DNA polimerase(5u/l), 3,0  $\mu\text{L}$  do ‘primer’ Hani3’, 3,0  
275  $\mu\text{L}$  do ‘primer’ Hanilatt3rev, 6,32  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  água milliQ, com volume total de 20 $\mu\text{L}$ . As  
276 amostras foram amplificadas em termociclador My Cycler<sup>TM</sup> (BIO RAD). O programa  
277 utilizado para amplificação dos fragmentos consistiu-se de um ciclo inicial de 94°C por 1min,  
278 seguido de: 10 ciclos de 94°C por 15 s para a desnaturação, 66°C por 30 s para anelamento,  
279 sendo que a cada ciclo ocorreu um decréscimo de 0,5 °C na temperatura de anelamento, em  
280 seguida: 25 ciclos de 94°C por 15 s para a desnaturação, 61°C por 30 s para anelamento e  
281 72°C por 30 s para extensão. A extensão final foi realizada a 72 °C por 2 min. Nesta etapa foi  
282 feita uma modificação no protocolo descrito por Pasquali et al. (2007) em que foi adicionada  
283 a fase de extensão nos 25 ciclos finais. Os produtos de amplificação foram analisados em géis  
284 de agarose 1% (p/v), corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta.

285       Para os primers Ef-1 e Ef-2, o programa utilizado para amplificação constituiu-se em  
286 um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5 min; 35 ciclos de amplificação (desnaturação a  
287 94°C por 1min, anelamento a 62°C por 1 min e meio e extensão a 72°C por 1 min). A  
288 extensão final foi de 72°C por 5 min (Mbofung et al., 2007 com adaptações). Para reação foi  
289 usado um mix cujo volume total foi de 20 $\mu\text{L}$ , contendo 2 $\mu\text{L}$  de tampão 10x (100 mM Tris-  
290 HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 1 $\mu\text{L}$  de  $\text{MgSO}_4$  50mM, 1,6  $\mu\text{L}$  de DNTPs (2,5 $\mu\text{M}$  cada), 0,4  $\mu\text{L}$   
291 de *Taq* DNA polimerase (5u/ $\mu\text{L}$ ), 1,6  $\mu\text{L}$  do primer Ef-1, 1,6  $\mu\text{L}$  do primer Ef-2; todos da  
292 Invitrogen® Life Technologies, 8,8  $\mu\text{L}$  de água miliQ e 3 $\mu\text{L}$  de DNA. Nesta etapa foi feita  
293 uma modificação no protocolo descrito por Mbofung et al. (2007). Os produtos de  
294 amplificação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v), corados com brometo de etídeo e  
295 visualizados sob luz ultravioleta. Após a certificação da presença dos fragmentos esperados, o  
296 restante desta reação de PCR foi purificado com o Kit da Invitrogen® Life Technologies e  
297 novamente foi feita a verificação da banda em gel de agarose1% (p/v). Desta purificação, os

298 produtos de PCR foram diretamente sequenciados com cada um dos primers utilizados nesta  
299 PCR.

300

### 301 **Análise das sequências**

302

303 O sequenciamento foi realizado em um sequenciador ABI Prism (modelo 3100) da  
304 Embrapa Hortaliças, utilizando o kit ABI Prism BigDye version 3.1 da Applied Biosystems.  
305 A avaliação da qualidade das sequências foi feita com o programa SeqMan e o alinhamento  
306 com sequências disponíveis no GenBank foi realizado com o programa Megalign (Lasergene,  
307 Madison-WI).

308 Para os primers Ef-1e Ef-2 foram analisados 16 isolados de FOLac do Brasil, 18 de  
309 FOLac depositados no GenBank e 29 isolados de *F. oxysporum*, também depositados no  
310 GenBank (Tabela 2). A análise filogenética foi realizada utilizando o “Phylogenetic Analysis  
311 Using Parsimony Package” (PAUP, ver. 4.0b10; Sinauer Associates). A busca heurística por  
312 árvores com maior parcimônia foi realizada com o *random step addition* (1000 repetições) e o  
313 algoritmo *branch swapping* com *tree bisection-reconnection* (TBR). A estabilidade dos  
314 agrupamentos foi avaliado por *bootstrap* (1000 repetições). *Fusarium subglutinans* (Wollenw.  
315 & Reinking) P.E. Nelson e *Fusarium commune* K. Skovg, O'Donnell & Nirenberg foram  
316 empregados como grupos externos na análise filogenética. Os critérios utilizados nesta análise  
317 foram similares aos utilizados anteriormente para FOLac raça 1 (Mbofung et al., 2007).

318

319

## 319 **Resultados e Discussão**

320

321 Vinte e sete culturas puras de fungos foram obtidas a partir de plantas de alface com  
322 sintomas da murcha de fusário, oriundas de diferentes áreas de plantio das regiões Sul e

323 Sudeste do país (Tabela 1). Todos os isolados apresentaram características morfológicas  
324 típicas do gênero *Fusarium* que incluem: a produção de microconídios, macroconídios e  
325 clamidósporos (esporos assexuados). Os microconídios foram produzidos em falsas cabeças  
326 em fiálides curtas formadas sobre as hifas, apresentando formatos elípticos a ovais, hialinos e  
327 sem septos. Os macroconídios eram hialinos, fusiformes, com as extremidades curvadas e  
328 geralmente apresentando três septos. Nas colônias mais velhas (10 a 20 dias) eram formados  
329 clamidósporos globosos, hialinos, localizados nas extremidades ou intercaladamente nas hifas  
330 e com parede espessa. As colônias em meio BDA-t apresentavam micélio aéreo, flocoso e  
331 geralmente apresentando cor branca que, dependendo das condições ambientais, podiam  
332 apresentar coloração violeta claro, todas essas características estão de acordo com as de *F.*  
333 *oxysporum* (Leslie & Summerell, 2006).

334 Vinte e três isolados de *F. oxysporum* infectaram e causaram doença quando  
335 inoculados em plantas de alface das cultivares Elisa e Vera, enquanto a cultivar Red Salad  
336 Bowl foi resistente. A resistência da cultivar Red Salad Bowl foi confirmada, posteriormente,  
337 nos testes de reação de cultivares de alface a FOLac. Este resultados evidenciam que os  
338 isolados pertencem à *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*, pois isolados saprófitas de *F. oxysporum*  
339 não podem ser distinguidos de isolados patogênicos, baseado apenas em características  
340 culturais e morfológicas, sendo essencial a realização de testes de patogenicidade (Booth,  
341 1971; Burgess et al., 1994).

342 Outro dado, reforçando que os isolados pertencem à *forma specialis lactucae*, é o fato  
343 de que todos os isolados testados não foram patogênicos nas outras espécies de plantas da  
344 família Asteraceae (Chicória, radicchio, serralha, falsa serralha, picão preto e cravo de  
345 defunto) e nem em plantas de outras famílias botânicas (tomate, pimentão, fumo, algodão,  
346 feijão vagem e Manjeriçã), confirmando que os mesmos são específicos à alface. Assim,  
347 pode-se concluir que este é o primeiro relato oficial de *F. oxysporum* sobre alface no Brasil.

348 Ventura & Costa (2008) descreveram o agente causal da murcha da alface no Espírito Santo  
349 apenas como sendo *F. oxysporum* e Cabral et al. (2009) relataram a ocorrência de *F.*  
350 *oxysporum* f. sp. *lactucae* nos Estados de Santa Catarina, Espírito Santo e Minas Gerais,  
351 entretanto este relato foi feito apenas em resumo de congresso. Adicionalmente, neste  
352 trabalho relata-se a presença do patógeno em outros Estados das Regiões Sul (Paraná e Rio  
353 Grande do Sul) e Sudeste (São Paulo e Rio de Janeiro), ampliando a distribuição geográfica  
354 do patógeno no país. Um levantamento, com amostragem bem delineada, precisa ser feito em  
355 todos os Estados da Federação onde o patógeno ainda não foi detectado. Naqueles onde o  
356 mesmo não seja detectado, pode-se propor a sua inclusão na lista de pragas quarentenárias  
357 A2.

358

### 359 **Determinação de raça**

360

361 Dezesesseis dias após a inoculação as cultivares Patriot e Banchu Red Fire  
362 comportaram-se como suscetíveis a todos os isolados, enquanto a cultivar Costa Rica No. 4  
363 como resistente. Isto demonstra que todos os isolados avaliados pertencem à raça 1 de *F.*  
364 *oxysporum* f. sp. *lactucae*. A identificação de apenas uma raça do patógeno no Brasil é uma  
365 informação importante que facilita os trabalhos dos programas de melhoramento de alface.  
366 Estes podem concentrar seus esforços para o desenvolvimento e seleção de cultivares  
367 resistentes a esta raça. Esta informação também é importante para os produtores de alface e  
368 extensionistas das regiões Sul e Sudeste do Brasil ajudando-os na escolha ou recomendação  
369 de cultivares comerciais de alface que sejam resistentes a esta raça do patógeno. A raça 1  
370 deste patógeno até então tinha sido identificada somente em áreas de produção da alface nos  
371 EUA, Japão, Itália, Portugal, Taiwan e Irã (Fujinaga et al., 2001; McCreight et al., 2003,  
372 2005; Garibaldi et al., 2004b; Pasquali et al., 2007). A ocorrência da mesma em vários países

373 distantes em um período relativamente curto de tempo sugere a disseminação deste patógeno  
374 através de sementes infestadas. (Garibaldi et al., 2004a). As *formae speciales* de *F.*  
375 *oxysporum* geralmente são transmitidas, de maneira eficiente, pelas sementes de suas  
376 hospedeiras. Assim, *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* deve ter sido introduzido no Brasil via  
377 sementes de alface importadas.

378

### 379 **Caracterização molecular**

380

381 O fragmento de DNA correspondente à região entre retrotransposons Han (Huan-Van  
382 et al., 2000) foi amplificado por PCR para os dezesseis isolados de FOLac e não foi  
383 amplificado para o isolado de FOL raça 3 (Fus. 191) e nem para o isolado não patogênico de  
384 *Fusarium oxysporum* (Fus. 237) (Figura 1). O tamanho dos fragmentos amplificados foi de  
385 aproximadamente 183 pares de base. O mesmo par de *primers* foi utilizado por Pasquali et al.  
386 (2007), que conseguiram identificar a raça 1, a partir da amplificação de fragmentos de DNA  
387 para 69 isolados de diferentes países como Itália, Estados Unidos (Arizona e Califórnia),  
388 Portugal, Taiwan e Japão. Estes mesmos *primers* poderão ser usados para detecção e  
389 identificação rápidas, precisas e eficientes da raça 1 deste patógeno (Shimazu et al., 2005).

390 Este resultado é importante, pois esta técnica molecular pode ser usada com rotina em  
391 laboratórios de Fitopatologia. A mesma pode ser usada e interpretada por profissionais sem  
392 conhecimentos taxonômicos especializados. Outras aplicações desta técnica se dá na distinção  
393 de espécies intimamente relacionadas, com nenhuma ou pouca diferença morfológica (Wuff  
394 et al., 2010), e na diferenciação de isolados dentro de uma mesma espécie (Lievens &  
395 Thomma, 2005; Chandra et al., 2010). Além disso, diagnósticos baseados na morfologia de  
396 *Fusarium* spp. são extremamente desafiadores, devido principalmente ao uso de sistemas  
397 taxonômicos diferentes e a falta de características morfológicas suficientemente informativas,

398 pois esta caracterização depende de pequenas diferenças na morfologia, sendo que as  
399 características morfológicas de um isolado fúngico pode variar em função das suas condições  
400 de cultivo (Fravel et al., 2003). Com isso verificou-se que métodos moleculares podem  
401 apresentar vantagens sobre os métodos tradicionais pelo ganho de tempo para obtenção dos  
402 resultados.

403

#### 404 **Filogenia do gene *tef-1 $\alpha$***

405

406 Os primers Ef-1 e Ef-2 amplificaram fragmentos de 672 a 720 pares de bases em todos  
407 os isolados (Figura 2). A análise de parcimônia revelou que do total de 641 caracteres  
408 utilizados, 524 foram constantes, 85 foram variáveis e 32 foram informativos para a  
409 construção da árvore. Esta árvore apresentou 4 clados com elevado valor de suporte  
410 (comprimento da árvore = 138, CI = 0,6613, RI = 0,8521).

411

412 Todos os dezesseis isolados (Fus.171, 172, 173, 187, 202, 203, 206, 207, 208, 209,  
413 210, 219, 220, 222, 223 e 227) da raça 1 ficaram agrupados com outros isolados da mesma  
414 raça (BMP 1300, BMP 1301, BMP 1306, BMP 1307, BMP1308, BMP 1323, BMP 1324,  
415 BMP,1326, BMP 1331, BMP 1333, BMP 1363, BMP 1375, BMP1880, HL-1, HL-2 e S-1) e  
416 com outras sete *formae speciales* de *F. oxysporum* (*rhois* W. C. Snyder & Hepting, *cepa*,  
417 *phaseoli*, *albedinis* W. L. Gordon, *heliotropa* Netzer & Weintal, *matthiolae* e *fabae* T. F. Yu  
418 & C. T. Fang), formando o maior clado com suporte de bootstrap de 78%. Neste mesmo  
419 clado foi observado que todos os isolados da raça 1 de FOLac formam um grupo monofilético  
420 com essas sete *formae speciales* (Figura 3). Quatro isolados não-patogênicos de *F. oxysporum*  
421 (BMP 1385, BMP1388, BMP1389 e BMP1397) formaram o clado 2 com as *formae speciales*  
422 *callistephi* W. C. Snyder & H. N. Hansen, *batatas* W. C. Snyder & H. N. Hansen, *vasinfectum*  
e *asparagi* S. I. Cohen, com bootstrap de 76%. O clado 3 foi composto de isolados das *formae*

423 *speciales dianthi, vasinfectum, fragariae* W. C Snyder & H. N Hansen, *ciceris* Matuo & K.  
424 Sato, *spinaciae* W. C. Snyder & H. N. Hansen e *melonis* W. C. Snyder & H. N. Hansen com o  
425 bootstrap de 68%. O clado 4 foi composto de dois isolados da raça 2 de FOLac (F9501e  
426 FK09701), dois isolados da *forma specialis canariensis* W. C Snyder & H. N Hansen (1559B  
427 e NRRL26035) e de outras *formae speciales cucumerinum, perniciosum* Toole e *cubense* com  
428 o bootstrap de 72%. Três isolados das *formae speciales lycopersici, medicaginis* W. C.  
429 Snyder & H. N. Hansen e *opuntiarum* não se agruparam a nenhum clado.

430 Todos os isolados pertencentes a raça 1 de diferentes locais como Japão, Califórnia,  
431 Arizona e Brasil ficaram agrupados no mesmo clado (clado1), o que sugere uma origem  
432 comum. O alinhamento entre os isolados FOLac raça 1 do GenBank mostra que estes  
433 apresentam 100% de identidade entre eles nesta região do genoma (Figura 4). Já entre  
434 isolados brasileiros de FOLac foi observada uma maior variabilidade (17 regiões  
435 polimórficas, Figura 4).

436 Os isolados da raça 2, oriundos do Japão, ficaram agrupados em outro clado (Clado  
437 4). A análise filogenética usando o *tef-1 $\alpha$*  demonstra uma divergência significativa entre as  
438 sequências das raças 1 e 2, revelando que estas duas raças tem origens evolutivas divergentes.  
439 Estudos realizados por Mbofung et al. (2007), mostram resultados similares revelando que a  
440 patogenicidade de *F. oxysporum* em alface evoluiu em duas linhagens independentes. Por sua  
441 vez Fujinaga et al. (2005) analisando sequências das regiões espaçadoras intergênicas (IGS)  
442 revelaram que as raças 1, 2, 3 são geneticamente diferentes e devem tem uma origem  
443 diferente.

444 Atualmente todas as três raças f. sp. *lactucae* encontram-se juntas apenas no Japão,  
445 mostrando considerável diversidade de isolados de *F. oxysporum* neste país (Fujinaga et al.,  
446 2003). No GenBank não existe sequências de isolados da raça 3 de FOLac para o gene *tef- 1 $\alpha$* .  
447 Neste estudo, assim como em um estudos anteriores (Fujinaga et al., 2005; Mbofung et al.,

448 2007) os isolados das raças 1, 2 e 3 ficaram em clados diferentes, revelando uma origem  
449 diferente das três raças e demonstrando que a *forma specialis lactucae* é polifilética.

450 Embora o gene *tef-1 $\alpha$*  seja utilizado na maioria dos estudos filogenéticos para  
451 resolução dentro e entre algumas *formae speciales* de *F. oxysporum*, o mesmo não conseguiu  
452 diferenciar os isolados da *forma specialis lactucae* de outros sete isolados de *F. oxysporum*.  
453 Com isso é recomendável que outros marcadores moleculares sejam usados para ajudar a  
454 distinguir as *formae speciales* de *F. oxysporum* como, por exemplo:  $\beta$ -tubulina (*tub2*)  
455 (O'Donnel et al., 1998a), regiões espaçadoras intergênicas (IGS) (Yli- Mattila & Gagkaeva,  
456 2010) e genes de Poligalacturonase (Hirano, et al., 2009).

457 As *formae speciales* (*rhois*, *cepa*, *phaseoli*, *albedinis*, *heliotropa* e *fabae*, *matthiolae*)  
458 foram geneticamente similares aos isolados da raça 1 de FOLac. Estudos conduzidos por  
459 Bongale et al.(2006), empregando três técnicas moleculares, incluindo o (*tef-1 $\alpha$* ) verificaram  
460 que 18 *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* não separaram de acordo com o hospedeiro  
461 ou origem geográfica, afirmando que a patogenicidade dos isolados não necessariamente  
462 correlaciona com agrupamento filogenético. Correl (1991) sugeriu que grupos filogenéticos  
463 tem baixa correlação com grupos patogênicos, pois as *formae speciales* são baseadas em  
464 características fenotípicas (patogenicidade em plantas específicas) que são influenciados por  
465 fatores ambientais como temperatura, idade do hospedeiro e métodos de inoculação. Este  
466 ainda afirma que isolados de *F. oxysporum* adquiriram adaptabilidade a um hospedeiro  
467 específico de forma acidental e a partir daí se estabeleceu como um patógeno viável.

468 Estudos realizados por Bayen et al. (2000) afirmam que várias mutações ou eventos de  
469 transposição podem ter levado à aquisição independente de fatores de patogenicidade para o  
470 mesmo hospedeiro em isolados com diferentes filogenias. Além disso, outros mecanismos  
471 podem estar envolvidos na aquisição da patogenicidade, como a parassexualidade que pode  
472 ocorrer em *F. oxysporum* e pode ter contribuído para a transferência lateral de genes de



473 patogenicidade para isolados distantemente relacionados. Estes mesmo autores demonstram  
474 que as *formae speciales lilii, tulipae, cucumerinum, langenarie* W. C. Snyder & H. N. Hansen  
475 e *niveum* têm origens monofiléticas, enquanto as *formae speciales cubense, melonis,*  
476 *asparagi, dianthi, gladioli e lycopersici* tem múltiplas origens, ou seja, polifiléticas.

477 O conjunto de resultados, obtidos neste trabalho, confirmam a presença de apenas a  
478 raça 1 de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* no Brasil, sendo esta uma informação de grande valor,  
479 pois o controle da murcha de fusário da alface pode ser feito via a utilização de cultivares  
480 resistentes a esta raça. Além disso, foi comprovada a possibilidade da utilização de *primers*  
481 para uma identificação rápida e precisa de isolados de *Fusarium*, obtidos de plantas de alface.  
482 Estes iniciadores poderão ainda ser usados como uma ferramenta rápida e barata para  
483 detecção do patógeno em tecidos de plantas e sementes infestadas. A análise filogenética do  
484 gene *tef-1 $\alpha$*  demonstrou uma origem polifilética da *forma specialis lactucae*. Foi também  
485 observada uma maior variabilidade genética entre os isolados brasileiros de FOLac raça 1  
486 comparados com isolados da mesma raça disponíveis no GenBank.

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

## Referências

- 498  
499  
500 BOOTH, C. **The genus *Fusarium***. Kew. Commonwealth Mycological Institute. 1971  
501
- 502 BAAYEN, R. P.; O'DONNELL, K.; BONANTS, P. J. M, CIGELNIK, E.; KROON, L. P. M  
503 ROEBROECK, E. J. A.; WAALWIJK, C. Gene genealogies and AFLP analysis in the  
504 *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and no-monophyletic *formae* causing  
505 wilt and rot diseases. **Phytopathology**, v. 90, p. 891-900, 2000.  
506
- 507 BOITEUX, L. S.; FONSECA, M. E. N.; SIMON, P. W. Effects of plant tissue and DNA  
508 purification method on randomly amplified polymorphic DNA based genetic fingerprinting  
509 analyses in carrot. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 124, p.  
510 32-38, 1999.  
511
- 512 BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S.; GOTT, K. P.; BACKHOUSE, D.  
513 Laboratory manual for *Fusarium* research. 3rd ed. Sidney. University of Sidney. 1994.  
514
- 515 CABRAL, C. S.; BRUNELLI, K. R.; CARVALHO, M. R. M.; SANTOS JUNIOR, W. N.;  
516 REIS, A. Ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* em alface no Brasil. **Tropical**  
517 **Plant Pathology**, v. 34 (supl.), p.s174- p.s174, 2009.  
518
- 519 CASTELLANI, A. The “water cultivation” of pathogenic fungi. **Journal of Tropical**  
520 **Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 283-286, 1963.  
521
- 522 CHADRA, N.S.; UDAYA SHANNKAR, A.C.; NIRANJANA, S.R.; REDDY, M.S.;  
523 PRAKASH, H.S. Detection and quantification of fumonisins from *Fusarium verticillioides* in  
524 maize grown in southern India. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 26, p.71-78,  
525 2010.  
526
- 527 CHANG, P.; LIN, Y.; LAI, P.; CHANG, T.; WAN, Y.; HUANG, J.; HUANG, J. Pathological  
528 and molecular race determinations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* from Taiwan.  
529 **Phytopathology**, vol. 101(supl.), n. 6, p. s 31-p.s 31, 2011.  
530
- 531 BOGALE, M.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J.; STEENKAMP, E. T.  
532 Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from Ethiopia using AFLP, SSR and DNA  
533 sequence analyses. **Fungal Diversity**, v. 25, p.51-66, 2006.  
534
- 535 CORREL, J.C. The relationship between *formae speciales*, races and vegetative compatibility  
536 groups in *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, v.81, p.1061-1064, 1991.  
537
- 538 DAVIS, R.M.; COLYER, P.D., ROTHROCK, C.S.; KOCHMAN, J.R. Fusarium wilt of  
539 cotton: population diversity and implications for management. **Plant Disease**, v.90, p. 692-  
540 703, 2006.  
541
- 542 FRAVEL, D; OLIVAIN, C; ALABOUVETTE, C. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol.  
543 **New Phytology**, v.157, p.493-502, 2003.  
544

- 545 FUJINAGA, M.; OGISO, H.; TSUCHIYA, N.; SAITO, H. Physiological specialization of  
546 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, a causal organism of fusarium root of crisp head lettuce  
547 in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v. 667, p. 205-206, 2001.  
548
- 549 FUJINAGA, M.; OGISO, H.; TUCHIYA, N.; SAITO, H.; YAMANAKA, S.; NOZUE, M.;  
550 KOJIMA, M. Race 3, a new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* determined by a  
551 differential system with commercial cultivars. **Journal of General Plant Pathology**, v. 69, p.  
552 23-28, 2003.  
553
- 554 FUJINAGA, M.; OGISO, H.; SHINOHARA, H.; TSUSHINA, S.; NISHIMURA, N.;  
555 TOGAWA, M.; SAITO, H.; NOZUE, M. Phylogenetic relationships between the lettuce root  
556 rot pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* races 1, 2, and 3 based on the sequence of  
557 the intergenic spacer region of its ribosomal DNA. **Fungal Diseases**, v. 71, p. 402-407, 2005.  
558
- 559 GARIBALDI, A.; GILARDI, G.; GIULLINO, M. L. First report of *Fusarium oxysporum* on  
560 lettuce in Europe. **Plant Disease**, v. 86, p.1052, 2002.  
561
- 562 GARIBALDI, A.; GILARDI, G.; GULLINO, M. L. Seed transmission of *Fusarium*  
563 *oxysporum* f. sp. *lactucae*. **Phytoparasitica**, v.32, n. 23, p.61-65, 2004a.  
564
- 565 GARIBALDI, A.; GILARDI, G.; GULLINO, M. L. Varietal resistance of lettuce to *Fusarium*  
566 *oxysporum* f. sp. *lactucae*. **Crop Protection**, v.23, p.845-851, 2004b.  
567
- 568 HIRANO, Y.; ARIE, T. Variation and phylogeny of *Fusarium oxysporum* isolates based on  
569 nucleotide sequences of polygalacturonase genes. **Microbes and Environments**, v. 24,  
570 p.113-120, 2009.  
571
- 572 HUANG, J. H.; LO, C. T. Wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* in Taiwan. **Plant**  
573 **Pathology Bulletin**, v.7, p.150-153, 1998.  
574
- 575 Hua-Van, A., Davière, J. M., Kaper, F., Langin, T.; Daboussi, M. J. Genome organization in  
576 *Fusarium oxysporum*: Clusters of class II transposons. **Current Genetics**, v. 37, p. 339-  
577 347.29, 2000.  
578
- 579 HUBBARD, J. C.; GERIK, J. S. A new disease of lettuce incited by *Fusarium oxysporum* f.  
580 sp. *lactucum forma specialis* nov. **Plant Disease**, v.77, p.750-754, 1993.  
581
- 582 LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Ames: Blackwell,  
583 2006.388 p.  
584
- 585 LIEVENS, B.; REP, M; THOMMA, B. P. H. J. Recent developments in the molecular  
586 discrimination of *formae speciales* of *Fusarium oxysporum*. **Pest Management Science**, v.  
587 64, p. 781-788, 2008.  
588
- 589 LOPES, C.A.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; REIS, A. **Doenças da alface**. Brasília: Embrapa  
590 Hortaliças, 2010. 68p.  
591
- 592 McCREIGHT, J. D.; MATHERON, M. E, TICKES, B. R.; PLATTS, B. Occurrence of  
593 fusarium root rot race 1 on lettuce in Yuma, Arizona. **Hort Science**, v.38, p.664, 2003.

- 594 McCREIGHT, J.D.; MATHERON, M.E.; TICKES, B.R.; PLATTS, B. Fusarium wilt race 1  
595 on lettuce. **Hort Science**, v.40, p-529-531, 2005.  
596
- 597 MBOFUNG, G. Y.; HONG, S. G.; PRYOR, B. M. Phylogeny of *Fusarium oxysporum* f. sp.  
598 *lactucae* interred from mitochondrial small subunit, elongation factor 1- $\alpha$ , and nuclear  
599 ribosomal intergenic spacer sequence data. **Mycology**, v. 97, p.87-98, 2007.  
600
- 601 MBOFUNG, G. Y.; PRYOR, B. M. A PCR-based assay for detection of *Fusarium oxysporum*  
602 f. sp. *lactucae* in lettuce seed. **Plant Disease**, v.94, n.7, p.860- 866, 2010.  
603
- 604 MATUO, T.; MOTOHASHI, S. On *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* n. f. causing root of  
605 lettuce. **Transactions of Mycological Society of Japan**, v.8, p.13-15, 1967.  
606
- 607 MILLANI, M. J.; EREBARIAN, H. R.; ALIZADEH, A. Occurrence of fusarium wilt of  
608 lettuce in Shahr- Ray, Varamim and Karaj areas. **Journal of Plant Pathology**, v.35, p.121,  
609 1999.  
610
- 611 NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium* species: an  
612 illustrated manual for identification**. University Park: The Pennsylvania State University  
613 Press, 1983. 193p.  
614
- 615 O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a  
616 monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics  
617 and Evolution**, Orlando, v. 7, p. 103-117, 1997.  
618
- 619 O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematics and  
620 phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York , v. 90,  
621 p. 465-493,1998.  
622
- 623 OGISO, H.; FUJINAGA, M.; SAITO, H.; TAKEHARA, T.; YAMANAKA, S. Physiological  
624 races and vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp *lactucae* isolated from  
625 crisphead lettuce in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v.68, p. 292-299, 2002.  
626
- 627 PASQUALI, M.; GILARDI, G.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. *Fusarium oxysporum* f.  
628 sp. *lactucae* on lettuce: vegetative compatibility and RAPD analysis. Inf. **Phytopathology**,  
629 v.53, p.73-75, 2003. (In Italian)  
630
- 631 PASQUALI, M.; DEMATHEIS, F.; GILARDI, G.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A.  
632 Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* from lettuce. **Plant  
633 Disease**, v. 89, p. 237-240, 2005.  
634
- 635 PASQUALI, M.; DEMATHEIS, F.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Identification of  
636 race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on lettuce by inter-retrotransposon sequence-  
637 characterized amplified region technique. **Phytopathology**, v. 97, n.8, p. 987-996, 2007.  
638
- 639 SANTOS, J. R. M. **Protocolo de tecnologia: seleção para resistência a doenças em  
640 hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 1999. 4p. (Comunicado Técnico 11).  
641

- 642 SCOTT, J. C.; KIRKPATRICK, S. C.; GORDON, T. R. Variation in susceptibility of lettuce  
643 cultivars to fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. **Plant Pathology**, v.  
644 59, p. 139-146, 2010.
- 645  
646 SHIMAZU, J.; YAMAUCHI, N.; HIBI, TADAHARU. Development of sequence tagged site  
647 markers to identify races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. **Journal of General Plant**  
648 **Pathology**, v.71, p.183-189, 2005.
- 649  
650 WAALWIJK, C.; KONING, J.R.A.; BAAYEN, R.P.; GAMS, W. Discordant groupings of  
651 *Fusarium* spp. from sections *Elegan*, *Liseola* and *Dlamina* based on ribosomal ITS1 e ITS2  
652 sequences. **Mycologia**, v. 88, p.361-368, 1996.
- 653  
654 WUFF, E. G.; SORENSEN, J. S.; LUBECK, M.; NIELSEN, K. F.; THARANE, U.; TORP, J.  
655 *Fusarium* spp. associated with rice Bakanae: ecology, genetic diversity, pathogenicity and  
656 toxigenicity. **Environmental Microbiology**, Oxford , v.12, p.649-657, 2010.
- 657  
658 YAMAUCHI, N.; SHIMAZU, J.; HORIUCHI, S.; SATOU, M.; SHIRAKAWA, T.  
659 Physiological races and vegetative compatibility groups of butterhead lettuce isolates of  
660 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v. 70, p.  
661 308- 313, 2004.
- 662  
663 YLI-MATTILA, T.; GAGKAEVA, T. Molecular chemotyping of *Fusarium gramineaum*, *F.*  
664 *culmorum* and *F. cerealis* isolates from Finland and Russia. In: GHERBAWY, Y.; VOIGT, K  
665 (eds). **Molecular identification of fungi**. Springer, Berlin, 2010.
- 666  
667 VENTURA, J. A.; COSTA, H. Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* on lettuce in  
668 Espirito Santo, Brazil. **Plant Disease**, v. 92, n. 6, p. 976, 2008.
- 669  
670  
671  
672  
673  
674  
675  
676  
677  
678  
679  
680  
681

682 **Tabela 1.** Isolados de *Fusarium oxysporum* utilizados neste estudo e listados por código,  
 683 localização, ano de coleta, *formae speciales* e patogenicidade.  
 684

Isolado	Local de coleta	Ano da coleta	Formae speciales	Patogenicidade
Fus- 171	Alegre-ES	2008	<i>lactucae</i>	+
Fus-172	Alegre-ES	2008	<i>lactucae</i>	+
Fus-173	Antônio Carlos-SC	2008	<i>lactucae</i>	+
Fus-174	Antônio Carlos-SC	2008	<i>lactucae</i>	+
Fus-187	Caratinga-MG	2009	<i>lactucae</i>	+
Fus-191 <sup>a</sup>	Rio de Janeiro	2009	<i>lycopersici</i>	-
Fus-202	Muriaé-MG	2009	<i>lactucae</i>	+
Fus-203	Marechal Floriano- ES	2009	<i>lactucae</i>	+
Fus-205	Santa Cruz do Rio Pardo- SP	2009	<i>lactucae</i>	+
Fus-206	Paulínia -SP	2009	<i>lactucae</i>	+
Fus-207	Campinas-SP	2010	<i>lactucae</i>	+
Fus-208	Nova Friburgo-RJ	2009	<i>lactucae</i>	+
Fus-209	Nova Friburgo- RJ	2009	<i>lactucae</i>	+
Fus- 210	Sumidouro-RJ	2009	<i>lactucae</i>	+
Fus-219	Colombo-PR	2010	<i>lactucae</i>	+
Fus-220	Colombo-PR	2010	<i>lactucae</i>	+
Fus -221	Colombo-PR	2010	Não-patogênico	-
Fus- 222	Itajaí-SC	2010	<i>lactucae</i>	+
Fus-223	São José dos Pinhais- PR	2010	<i>lactucae</i>	+
Fus-224	São José dos Pinhais- PR	2010	Não-patogênico	-
Fus-225	São José dos Pinhais- PR	2010	Não-patogênico	-
Fus- 227	Itajaí-SC	2010	<i>lactucae</i>	+
Fus-237	Brasília-DF	2011	Não-patogênico	-
Fus-240	Pelotas-RS	2011	<i>lactucae</i>	+
Fus- 241	Santa Cruz do Rio Pardo-SP	2011	<i>lactucae</i>	+
Fus- 242	Santa Cruz do Rio Pardo-SP	2011	<i>lactucae</i>	+
Fus -243	Santa Cruz do Rio Pardo-SP	2011	<i>lactucae</i>	+
Fus-244	Marechal Floriano-ES	2011	<i>lactucae</i>	+

685 <sup>a</sup>Fus-191: Obtido de plantas de tomate  
 686  
 687  
 688  
 689  
 690  
 691  
 692  
 693

694 **Tabela 2.** Lista de táxons utilizados nos estudos de análises filogenéticas.

Táxon	Código GenBank	Isolado	Região Gene	Hospedeira	Região Geográfica
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	DQ837658	BMP 1300	Ef- 1 $\alpha$	<i>Lactuca sativa</i>	Arizona, E.U.A
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	DQ837659	BMP 1301	Ef- 1 $\alpha$	<i>Lactuca sativa</i>	Arizona, E.U.A
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	DQ837660	BMP 1306	Ef- 1 $\alpha$	<i>Lactuca sativa</i>	Arizona, E.U.A
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	DQ837661	BMP 1307	Ef- 1 $\alpha$	<i>Lactuca sativa</i>	Arizona, E.U.A
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	DQ 837662	BMP 1308	Ef- 1 $\alpha$	<i>Lactuca sativa</i>	Arizona, E.U.A
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i>	DQ8363	BMP 1323	Ef- 1 $\alpha$	<i>Lactuca sativa</i>	Arizona, E.U.A
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	DQ 837664	BMP 1324	Ef- 1 $\alpha$	<i>Lactuca sativa</i>	Arizona, E.U.A
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	DQ 837665	BMP1326	Ef- 1 $\alpha$	<i>Lactuca sativa</i>	Arizona, E.U.A
<i>F.oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	DQ837667	BMP1331	Ef- 1 $\alpha$	<i>Lactuca sativa</i>	Arizona, E.U.A
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	DQ 837667	BMP1333	Ef- 1 $\alpha$	<i>Lactuca sativa</i>	Arizona, E.U.A
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i>	DQ837668	HL-1	Ef- 1 $\alpha$	<i>Lactuca sativa</i>	Califórnia, E.U.A
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	DQ837669	HL-2	Ef- 1 $\alpha$	<i>Lactuca sativa</i>	Califórnia, E.U.A
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	DQ837670	BMP1880	Ef- 1 $\alpha$	<i>Lactuca sativa</i>	Arizona, E.U.A
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	DQ837671	BMP1363	Ef- 1 $\alpha$	<i>Lactuca sativa</i>	Arizona, E.U.A
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	DQ837673	BMP1375	Ef- 1 $\alpha$	<i>Lactuca sativa</i>	Arizona, E.U.A
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	DQ837657	S-1	Ef- 1 $\alpha$	<i>Lactuca sativa</i>	Japão
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	DQ837693	F9501	Ef- 1 $\alpha$	<i>Lactuca sativa</i>	Japão
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	DQ837694	FK09701	Ef- 1 $\alpha$	<i>Lactuca sativa</i>	Japão
<i>F.oxysporum</i>	DQ837676	BMP1389	Ef- 1 $\alpha$	Solo(nãopatogênico)	Arizona, E.U.A
<i>F. oxysporum</i>	DQ837674	BMP 1385	Ef- 1 $\alpha$	Solo(nãopatogênico)	Arizona, E.U.A
<i>F. oxysporum</i>	DQ837675	BMP 1388	Ef- 1 $\alpha$	Solo(nãopatogênico)	Arizona, E.U.A
<i>F.oxysporum</i>	DQ837677	BMP1397	Ef- 1 $\alpha$	Solo(nãopatogênico)	Arizona, E.U.A
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	DQ837681	NRRL22538	Ef- 1 $\alpha$	<i>Allium</i>	Alemanha
<i>F.oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	DQ837680	NRRL25231	Ef- 1 $\alpha$	<i>Gossypium</i>	Carolina do Norte, E.U.A
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>perniciosum</i>	AF008506	NRRL22550	Ef- 1 $\alpha$	<i>Albizia julibrissin</i>	Não informado
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	FJ538245	NRRL32158	Ef- 1 $\alpha$	<i>Cicer arietinum</i>	Não informado
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	AF008493	NRRL26029	Ef- 1 $\alpha$	<i>Musa spp.</i>	Não informado

695  
696  
697  
698  
699  
700  
701  
702  
703  
704  
705  
706  
707  
708

709 **Tabela 2.** Continuação.

<b>Táxon</b>	<b>Código GenBank</b>	<b>Isolado</b>	<b>Região Gene</b>	<b>Hospedeira</b>	<b>Região Geográfica</b>
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>canariensis</i>	AF008485	NRRL26035	Ef -1 $\alpha$	<i>Cactus</i>	Não informado
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>canariensis</i>	AJ895280	1559B	Ef-1 $\alpha$	<i>Cactus</i>	Não -informado
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>rhois</i>	DQ837683	NRRL26227	Ef -1 $\alpha$	<i>Rhus</i>	Israel
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>mathiolae</i>	DQ837682	NRRL22545	Ef- 1 $\alpha$	<i>Matthiola</i>	Alemanha
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fabae</i>	DQ837684	NRRL26411	Ef -1 $\alpha$	<i>Vicia</i>	Estados Unidos
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>heliotropa</i>	DQ837685	NRRL26411	Ef -1 $\alpha$	<i>Heliotropium</i>	Estados Unidos
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	DQ837686	NRRL26445	Ef -1 $\alpha$	<i>Phaseolus</i>	Carolina do sul, E.U.A
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	DQ837688	NRRL26622	Ef -1 $\alpha$	<i>Phoenix</i>	Não informado
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>opuntiarum</i>	DQ837689	NRRL28934	Ef -1 $\alpha$	<i>Opuntia</i>	Holanda
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>medicaginis</i>	DQ837690	NRRL22546	Ef-1 $\alpha$	<i>Medicago sativa</i>	Ásia
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	DQ452429	ATCC11939	Ef -1 $\alpha$	<i>Dianthus</i>	Não informado
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	DQ452425	MAFF74400	Ef -1 $\alpha$	<i>Fragaria</i>	Não informado
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	EF056759	9909-3	Ef -1 $\alpha$	<i>Cucumis sativus</i>	Não informado
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	DQ837695	FOV14	Ef -1 $\alpha$	<i>Gossypium</i>	Califórnia
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>asparagi</i>	DQ837691	FOA50	Ef -1 $\alpha$	<i>Asparagus</i>	Austrália
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	DQ837692	FOLR2	Ef -1 $\alpha$	<i>Solanum lycopersicum</i>	Califórnia
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>callistephi</i>	DQ837679	NRRL22536	Ef- 1 $\alpha$	<i>Rhus</i>	Alemanha
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>batatas</i>	DQ837678	NRRL22535	Ef- 1 $\alpha$	<i>Solanum tuberosum</i>	Alemanha
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>spinaciae</i>	DQ837687	NRRL26871	Ef-1 $\alpha$	<i>Spinacia oleracea</i>	Japão
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	DQ837696	TX388	Ef -1 $\alpha$	<i>Cucumis melo</i>	Texas, E.U.A
<i>F. commune</i>	AF246832	NRRL28378	Ef -1 $\alpha$	<i>Pisum sativum</i>	Holanda
<i>F. sublutinanans</i>	DQ837698	BMP1462	Ef -1 $\alpha$	<i>Ananas comosus</i>	Arizona, E.U.A

710

711

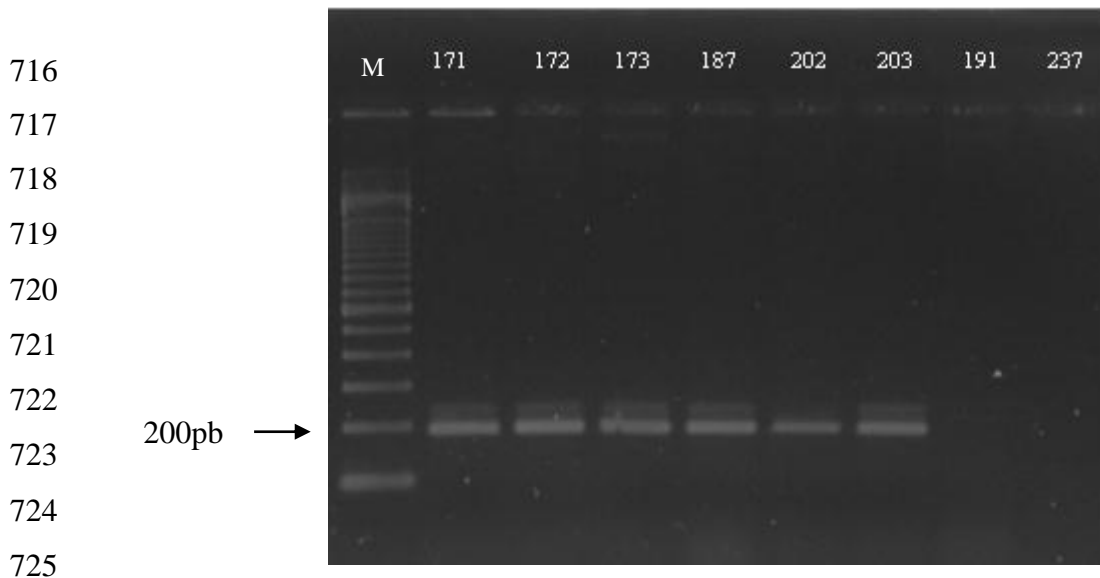
712

713

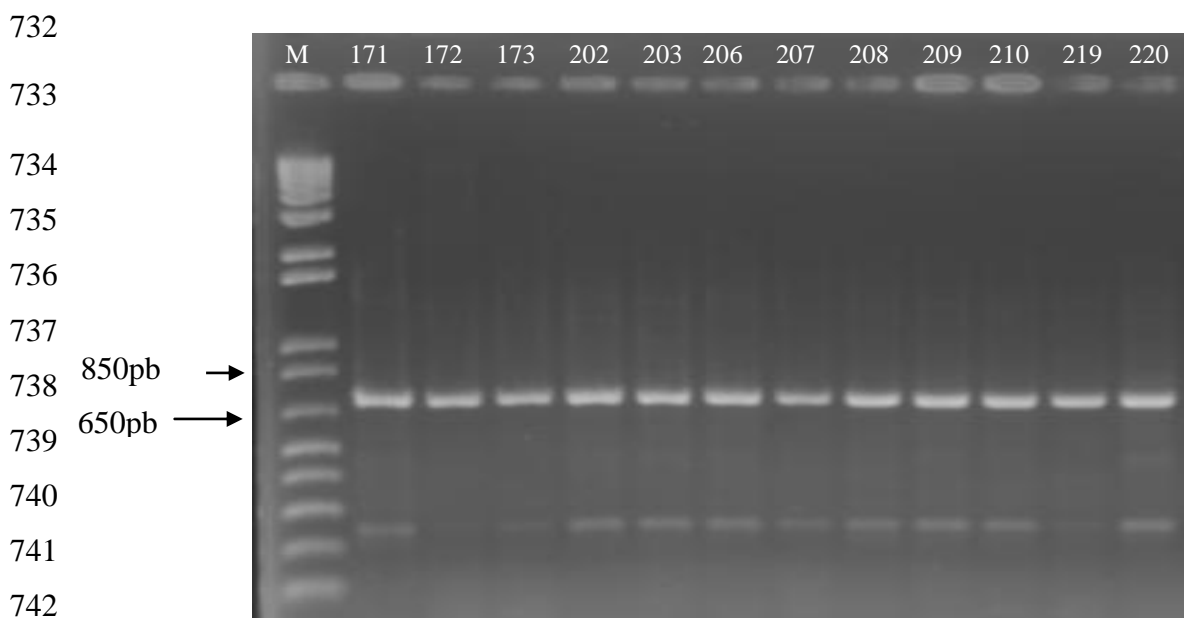
714

715



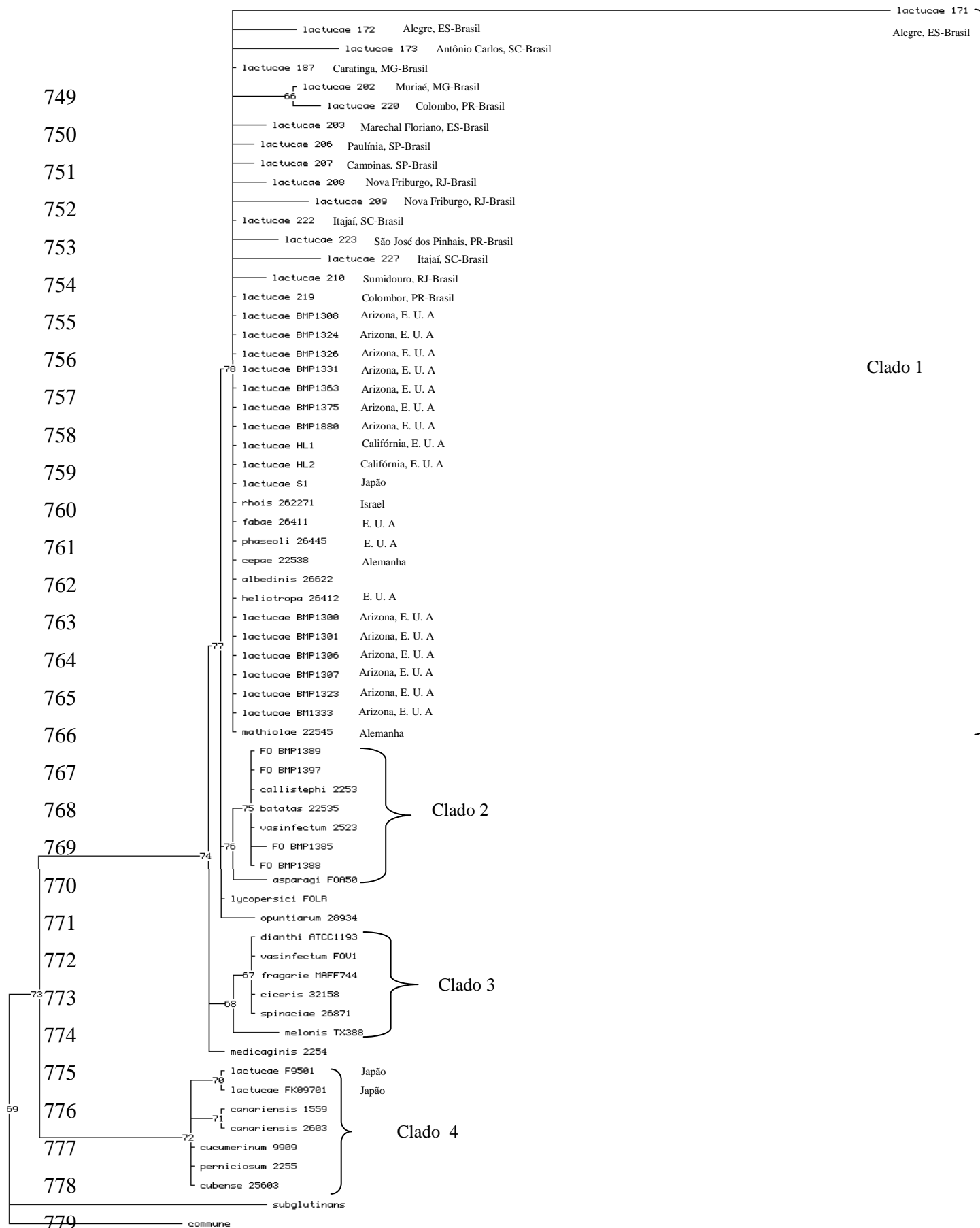


726 **Figura 1:** Alguns dos Amplicons obtidos com o par de *primers* FOLac raça 1 específico Hani  
 727 (5'-GAACCCTCCAACATTCAACA-3') e Hanilatt3rev (5'CCTCCAACATTCAACAAC  
 728 AATG-3). As colunas 171, 172, 173, 187, 201 e 203 são resultado de amplificação de DNA  
 729 de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1. A coluna 191 indica o isolado de  
 730 FOL raça 3 e a coluna 237 indica o isolado não patogênico de *Fusarium oxysporum*. M:  
 731 Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen.



743 **Figura 2.** Alguns dos Amplicons obtidos com o par de *primers* Ef-1 (5'-  
 744 ATGGGTAAGGAAGAAGAC-3') e Ef-2 (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3'). As  
 745 colunas 171, 172, 173, 187, 202, 203, 206, 207, 208, 209, 210, 219 e 220 são resultado de  
 746 amplificação de DNA de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1. M: Marcador  
 747 molecular 1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen.

748



**Figura 3.** Filograma mostrando a árvore mais parcimoniosa de 138 geradas com dados das sequências do gene (*tef-1α*). O índice de consistência foi 0,8591 e o comprimento 149. Os valores numéricos representam o índice Bootstrap após 1000 repetições. As sequências das espécies *F. commune* e *F. subglutinans* foram utilizadas como grupos externos.





	510	520	530	540	550	560	570	580
lactucae 171	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae 172	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae 173	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae 187	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae 202	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae 203	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae 206	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae 207	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae 208	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae 209	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae 220	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae 222	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae 223	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae 227	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae 210	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae 219	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
dianthi ATCC11939	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae BMP1308	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae BMP1324	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae BMP1326	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae BMP1331	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae BMP1363	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae BMP1375	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
FO BMP1389	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
FO BMP1397	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
subglutinans	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae BMP1880	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae F9501	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae FK09701	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
asparagi FOA50	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
canariensis 1559A	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
cucumerinum 9909	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lycopersici FOLR2	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
vasinfectum FOV14	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae HL1	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae HL2	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
fragariae MAFF744009	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
perniciosum 22550	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
cubense 25603	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
canariensis 26035	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
commune	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
opuntiarum 28934	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
ciceris 32158	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae S1	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
melonis TX388	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
rhois 262271	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
fabae 26411	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
phaseoli 26445	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
cepae 22538	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
albedinis 26622	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
heliotropia 26412	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae BMP1300	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae BMP1301	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae BMP1306	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae BMP1307	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae BMP1323	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
lactucae BM1333	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
mathiolae 22545	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
callistephi 22536	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
batatas 22535	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
medicaginis 22546	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
spinaciae 26871	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
vasinfectum 25231	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
FO BMP1385	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					
FO BMP1388	GTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTT	CGA-GACTCCTCGCTACTATGTCACCGT	CATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTT					

**Figura 4.** Alinhamento das sequências obtidas neste trabalho com sequências disponíveis no GenBank para o gene *tef-1α* utilizando o programa Megalign (Lasergene, Madison, WI). Em vermelho são destacados os nucleotídeos polimórficos.

**CAPÍTULO III-Identificação de cultivares e linhagens de alface com resistência à  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1**

---

1 **Identificação de cultivares e linhagens de alface com resistência à *Fusarium oxysporum* f.**  
2 ***sp. lactucae* raça 1**

3

4 **Cléia Santos Cabral <sup>(1)</sup> e Ailton Reis <sup>(2)</sup>**

5

6 <sup>1</sup>**Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento Agronomia - Fitossanidade, Av.**  
7 **Dom Manoel de Medeiros, s/n, 6 52171-900 Recife-PE, Brasil. E-mail: clea.86@gmail.com**

8 <sup>(2)</sup>**Embrapa Hortaliças, 70359-970, Brasília-DF, Brasil; E- mail: ailton@cnph.embrapa.br**

9

10

**Resumo**

11

12

13 A murcha de fusário, causada por *Fusarium oxysporum* f. *sp. lactucae* (FOLac), é um  
14 dos mais importantes problemas da cultura da alface por proporcionar grandes perdas na  
15 produção. Visando identificar acessos com potencial para a utilização no manejo da doença,  
16 foram avaliados 102 acessos quanto à resistência a diferentes isolados da raça 1 de FOLac.  
17 Inicialmente foi feita uma seleção preliminar, utilizando o isolado Fus-173. Em seguida,  
18 quarenta e sete acessos selecionados como altamente resistentes mais uma testemunha  
19 suscetível (Regina) foram avaliados para estabilidade da resistência ao FOLac raça 1,  
20 utilizando os isolados (Fus-202 e Fus-205), no mês de Outubro de 2011; isolados (Fus-219 e  
21 Fus-222) no mês de Novembro de 2011 e isolados (Fus-207, Fus-209 e Fus-220) no mês de  
22 Dezembro de 2011. A inoculação foi realizada em mudas com 25 dias após o semeio em  
23 condições de casa de vegetação, pelo método de corte das raízes e imersão na suspensão de  
24 conídios do patógeno. A avaliação foi realizada após 30 dias, usando uma escala de notas,  
25 variando de 0 (planta sadia) a 4 (planta morta). Os dados obtidos foram transformados em  
índice de doença e submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de

26 Tukey (5%). Foram identificados trinta e dois acessos apresentando amplo espectro de  
27 resistência aos diferentes isolados do patógeno nas quatro épocas de inoculação.

28

29 **Termos para indexação:** *Lactuca sativa*, murcha de fusário e resistência genética.

30

31

### Abstract

32

33 **Identification of cultivars and lines of lettuce with resistance to *Fusarium oxysporum* f.**  
34 ***sp. lactucae* race 1**

35

36 Fusarium wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f. *sp. lactucae* (FOLac) is one of the  
37 most important diseases of lettuce. This work aimed to select lettuce cultivars and study the  
38 resistance stability of lettuce accessions to the race 1 of FOLac. At first, It was made a  
39 screening of 102 accessions for resistance to the isolate Fus-173 and it was selected 47 as  
40 highly resistant. After this, the selected accessions were evaluated for the stability of  
41 resistance in three additional assays, using different FOLac race 1 isolates. In all three assays  
42 it was used a highly susceptible cultivar (Regina) as susceptible control. In the first assay,  
43 carried out in October 2011, it was used the isolates Fus-202 and Fus-205. In the second  
44 assay, carried out in November 2011, it was used the isolates Fus-219 and Fus-222. In the  
45 third assay, carried out in December 2011, it was used the isolates (Fus-207, Fus-209 e Fus-  
46 220). Inoculation was performed on 25 days old seedlings on greenhouse conditions.  
47 Seedlings were inoculated by cutting their roots and emerging them in a spore suspension of  
48 pathogen. Evaluation was carried out 30 days after inoculation, using a grade scale varying  
49 from 0 (health plants) to 4 (dead plants). Data were transformed in Disease Index (DI)  
50 submitted to a variance analyses and the media were compared by the Tukey's test (5%).



51 Thirty two accessions were identified as having broad spectrum of resistance to different  
52 pathogen isolates in the four inoculation seasons.

53

54 **Index terms:** *Lactuca sativa*, genetic resistance and fusarium wilt.

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

## Introdução

76

77

78

79

80

81

82

83

84

Dentre as hortaliças de maior consumo no Brasil, encontra-se a alface, *Lactuca sativa* L., sexta hortaliça em importância econômica e oitava em termos de volume produzido (Silva et al., 2010). É a folhosa mais importante na alimentação do brasileiro, que lhe confere expressiva importância social e econômica. No Brasil, o tipo mais importante, quanto à área cultivada e volume de produção, é a crespa, que corresponde a aproximadamente 60% do mercado. Em seguida, vem a americana com 25%, a lisa e as demais (mimososa, romana, roxa/vermelha entre outras) com 15% (Costa & Sala, 2005).

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

As doenças, causadas por fungos habitantes do solo, são muito limitantes para o cultivo da alface. Essa limitação geralmente se deve ao uso intensivo das áreas, através de cultivos sucessivos, sem rotações, o que tem provocado uma redução na área cultivada e produtividade (Lopes et al., 2010). Entre as principais doenças fúngicas da alface encontra-se a murcha de fusário ou fusariose, causada pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. Esta doença foi relatada recentemente no Brasil, inicialmente no Estado do Espírito Santo (Ventura & Costa, 2008), e em seguida em Santa Catarina e Minas Gerais (Cabral et al., 2009). A mesma já havia sido registrada em outros países como Japão (Matuo & Motohashi, 1967), Estados Unidos (Hubbard & Gerik, 1993), Taiwan (Huang & Lo, 1998), Irã (Millani et al., 1999), Portugal (Pasquali et al., 2007) e Itália (Pasquali et al., 2005, 2007).

95

96

97

98

99

Os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* são agrupados em três raças (1, 2 e 3) de acordo com sua reação em cultivares de alface (Fujinaga et al., 2003). No Japão, em plantios comerciais de alface foi relatada a presença das três raças (Fujinaga et al., 2001, 2003; Yamauchi et al., 2004). Por outro lado, em outros países como a Itália, Portugal, Taiwan, Irã e Estados Unidos e Brasil foi relatada apenas a presença da raça 1 (Pasquali et al., 2003, 2005;

100 McCreight et al., 2005; Brunelli et al., 2010). Portanto, a raça 1 do patógeno apresenta uma  
101 ampla distribuição geográfica.

102       Devido às dificuldades de controle de patógenos de solo, o manejo da murcha de  
103 fusário da alface pode ser feito por meio da adoção de várias medidas de controle, evitando-se  
104 a infestação de áreas novas de plantio, por meio do uso de sementes e mudas sadias ou  
105 tratadas e de boa qualidade. Também evitar o trânsito de equipamentos e pessoas de talhões  
106 infestados para áreas novas. Em áreas já infestadas pelo patógeno pode-se utilizar a rotação de  
107 culturas por pelo menos três anos, a solarização do solo, o uso de agentes de biocontrole e a  
108 incorporação de matéria orgânica (Davis et al., 2006; Lopes et al., 2010; Matheron et al.,  
109 2010).

110       Apesar de todas estas medidas preconizadas para o controle da murcha de fusário da  
111 alface, a medida de controle mais eficiente e viável para o produtor é o uso de cultivares com  
112 resistência genética. No entanto, nada se sabe sobre o nível de resistência das cultivares dos  
113 diferentes segmentos varientais de alface cultivadas no Brasil à murcha de fusário. Além  
114 disso, é constante a liberação de novas cultivares por programas de melhoramento genético, e  
115 com isso se faz necessário a avaliação e a caracterização de novos acessos resistentes a  
116 patógenos radiculares de relevância econômica para a cultura da alface, incluindo *F.*  
117 *oxysporum* f. sp. *lactucae*.

118       Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar um conjunto de cultivares de alface  
119 e linhagens do banco de germoplasma do programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças,  
120 quanto à reação à murcha de fusário, visando identificar fontes de resistência à raça 1 de *F.* f.  
121 *sp. lactucae* e analisar a estabilidade da resistência dos acessos mais promissores a diferentes  
122 isolados desta raça.

123

124

## Material e Métodos

125

126

127

Todas as atividades relacionadas aos experimentos foram conduzidas nas casas de vegetação e no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças, Brasília-DF.

128

129

### **Produção de inóculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae***

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

### **Seleção preliminar de acessos da alface resistentes à *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae***

144

#### **raça 1**

145

146

147

148

149

Em uma etapa preliminar, realizada no mês de Maio de 2011, 77 cultivares de várias empresas de sementes e 25 linhagens de alface do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças foram avaliados quanto à resistência ao isolado Fus-173. Os acessos que serviram como controles foram as cultivares de alfaces ‘Regina’ e ‘Elisa’ identificadas como

150 suscetíveis em testes preliminares. Os acessos foram semeados em bandejas de isopor com  
151 128 células, preenchidas com substrato (Plantmax®) esterilizado. As mudas foram inoculadas  
152 aos 25-30 dias após o semeio, ou seja, quando apresentavam quatro folhas verdadeiras  
153 completamente formadas.

154 A inoculação foi feita através da retirada das mudas das bandejas, lavagem das raízes  
155 em água corrente para eliminar o substrato que se encontra aderida às raízes e corte de suas  
156 pontas (aproximadamente 2 cm), utilizando uma tesoura esterilizada. Posteriormente, as raízes  
157 foram imersas por três minutos em frasco Becker contendo 50 ml da suspensão de conídios  
158 preparada anteriormente. Após isto, as mudas foram transplantadas para vasos plásticos de  
159 3L, contendo uma mistura de argila, esterco bovino, areia e palha de arroz carbonizada  
160 esterilizada. Estes vasos haviam sido previamente irrigados (uma hora antes do plantio). Em  
161 seguida, adicionou-se na região do colo de cada plântula 3 mL da suspensão de conídios. As  
162 plantas não foram mais irrigadas no dia da inoculação para evitar perda do inóculo através do  
163 escorrimento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 102 tratamentos  
164 e três repetições, representada por três vasos com quatro plantas. A avaliação foi feita 30 dias  
165 após a inoculação. Para isso, observou-se a presença dos sintomas externos (amarelecimento,  
166 necrose e murcha) e internos (escurecimento vascular), que foi verificado através do corte do  
167 caule no sentido vertical, utilizando um bisturi. Para quantificação da severidade da doença  
168 adotou-se uma escala de notas, adaptada de Santos (1999), variando de 0 a 4 sendo: 0=  
169 plantas sem sintomas; 1= plantas sem sintomas de murcha ou amarelecimento foliar, mas com  
170 escurecimento vascular; 2= plantas com escurecimento vascular intenso e com início de  
171 murcha ou amarelecimento foliar; 3= plantas com murcha intensa, associada com  
172 amarelecimento e necrose foliar; 4= plantas mortas.

173 Com as notas obtidas foram calculados os índices de doença (ID) através da fórmula  
174 de Mckinney (McKinney, 1923):  $ID (\%) = 100 \cdot \Sigma [(f.v)/(n.x)]$ , tal que f = número de plantas

175 com a mesma nota; v =nota observada; n = número total de plantas avaliadas e x =nota  
176 máxima da escala. Esses índices foram agrupados em classes de reação da doença, utilizando-  
177 se a média resultante para cada acesso: 0,00% = semelhante a uma resposta do tipo imune;  
178 (SI); 0,01-25,00% =altamente resistente (AR); 25,01-50,00% = medianamente resistente  
179 (MR); 50,01- 75,00% = medianamente suscetível (MS); 75,01-100,00% = altamente  
180 suscetível (AS), adaptada de (Reis et al., 2004). Os acessos que apresentaram resposta do tipo  
181 semelhante a imune ou altamente resistente seriam selecionados para serem avaliados quanto  
182 à resistência a outros sete isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1.

183

184 **Análise da estabilidade da resistência de acessos promissores da alface a sete isolados de**  
185 ***Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1**

186

187 Os acessos, selecionados anteriormente, foram avaliados quanto à resistência a outros  
188 sete isolados do patógeno. Para isso, foram realizados três ensaios. Nestes três ensaios a  
189 concentração do inóculo foi aumentada para  $2 \times 10^6$  microconídios/mL.

190 **Ensaio 1:**

191 No mês de Outubro de 2011 foi realizado o primeiro ensaio da estabilidade, 47  
192 acessos considerados como AR, mais a cultivar ‘Regina’ considerada AS utilizada como  
193 controle, foram reavaliados quanto à reação aos isolados Fus-202 e Fus-205, provenientes de  
194 (Muriae-MG e Santa Cruz do Rio Pardo-SP, respectivamente). A produção das mudas dos  
195 acessos, o preparo do inóculo e a inoculação seguiu a mesma metodologia anterior. O  
196 delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 47 (acessos) x  
197 dois (isolados do patógeno), com três repetições. Cada repetição foi constituída de um vaso  
198 com quatro plantas.

199 A avaliação foi realizada 30 após inoculação das plantas e com os dados de severidade  
200 também foram calculados os IDs. Os dados de ID foram submetidos à análise de variância e  
201 as médias comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade, através do programa  
202 SAS.

### 203 **Ensaio 2:**

204 No mês de Novembro de 2011 foi realizado o segundo ensaio da estabilidade da  
205 resistência, utilizando os mesmos acessos e a mesma metodologia do ensaio 1, entretanto  
206 utilizando outros dois isolados, Fus-219 e Fus-222, provenientes de (Colombo-PR e Itajaí-  
207 SC, respectivamente).

### 208 **Ensaio 3:**

209 No mês de Dezembro foi realizado o terceiro ensaio da estabilidade da resistência,  
210 utilizando os mesmos acessos e a mesma metodologia do ensaio 1, entretanto utilizando  
211 utilizando os isolados Fus, 207, Fus-209, e Fus-220; provenientes de (Campinas-SP, Nova  
212 Friburgo-RJ e Colombo-PR, respectivamente).

213

## 214 **Resultados e Discussão**

215

216 No ensaio preliminar nenhuma cultivar ou linhagem de alface apresentou reação do  
217 tipo imune, ou seja, zero de doença, ao isolado Fus-173 de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* raça  
218 1. Dos, 102 acessos avaliados, 30 (incluindo os controles suscetíveis ‘Regina’ e ‘Elisa’)  
219 apresentaram reação de suscetibilidade (alta ou média suscetibilidade) sendo que destes 19  
220 foram considerados altamente suscetíveis, com ID variando de 77,08 % a 100%. Vinte e cinco  
221 acessos foram classificados como medianamente resistentes com ID variando de 27,08% a  
222 47,91% e 47 acessos como altamente resistentes, com ID variando de 2,08% a 25% (Tabela  
223 1). Estes 47 acessos podem representar promissoras fontes de resistência ao patógeno e boas

224 opções de materiais para serem plantadas em regiões onde a doença esteja presente. No grupo  
225 dos acessos suscetíveis, 19 das 30 cultivares pertenciam ao tipo “Lisa”. Da mesma forma  
226 Garibaldi et al. (2004b) avaliando 32 cultivares de alface de diferentes segmentos varientais  
227 verificaram que sete cultivares (incluindo algumas dos tipos romana e mimosa) foram  
228 completamente resistentes à murcha de fusário, enquanto as cultivares do tipo lisa foram todas  
229 suscetíveis. Esses resultados confirmam a limitação do uso de cultivares do segmento lisa em  
230 áreas contaminadas pelo patógeno.

231 De acordo com os dados apresentados na seleção preliminar (Tabela 1) as cultivares  
232 tipo mimosa como: Mimosa, Green Salad Bowl, Oak leaf Saladin, Red Salad Bowl , Salad  
233 Bowl Roxo, Salad Bowl Ultra Rosso, Mimosa Vermelha e Roxane foram altamente  
234 resistentes ao patógeno. De fato, Scott et al. (2010) haviam verificado que duas cultivares  
235 mimosas (Lolla Rossa e Red Rossa) foram altamente resistentes a murcha de fusário raça 1.  
236 Estes resultados indicam uma baixa variabilidade genética dentro deste tipo alface e que todas  
237 devem ter uma origem comum. Por isso a resistência à raça 1 foi efetiva para isolados  
238 americanos e brasileiros.

239 No primeiro ensaio da estabilidade da resistência, realizado no mês de Outubro,  
240 quando foi utilizado o isolado Fus-202, 38 dos 47 acessos avaliados voltaram a expressar a  
241 reação de altamente resistentes, confirmando a reação observada no ensaio preliminar.  
242 Entretanto, sete foram classificados como medianamente resistentes e dois foram  
243 considerados como medianamente suscetíveis. Com relação ao isolado (Fus-205), um acesso  
244 apresentou reação do tipo imune, 41 acessos mostraram-se como altamente resistentes, três  
245 foram classificados como medianamente resistentes e dois foram considerados como  
246 medianamente suscetíveis.

247 Neste ensaio, para os dois isolados utilizados, percebeu-se que as classes de  
248 resistência, estabelecidas para diferenciar os acessos de alface na seleção preliminar, não se



249 ajustaram perfeitamente à separação dos acessos feita pelo teste de Tukey a 5% (Tabela 2).  
250 Neste caso, os acessos altamente resistentes não diferiram estatisticamente dos acessos  
251 medianamente resistentes e medianamente suscetíveis. Foi observado também que não  
252 ocorreu consistência dos resultados de nove acessos em relação aos dois isolados de *F.*  
253 *oxysporum* f. sp. *lactucae*. Os acessos Amélia, Crespa Repolhuda, Red Star e CNPH-54 foram  
254 considerados medianamente resistentes ao isolado Fus- 202 e altamente resistentes ao Fus-  
255 205, enquanto que a cultivares Scarlet e Kaiser foram medianamente suscetíveis ao Fus-202 e  
256 altamente resistentes ao Fus-205. A cultivar Mônica foi medianamente resistente ao Fus-202 e  
257 medianamente suscetível ao Fus-205. A cultivar Lavínia foi altamente resistente ao Fus-202 e  
258 medianamente suscetível ao Fus-205, Green Salad Bowl foi altamente resistente ao Fus-202 e  
259 medianamente resistente ao Fus-205. Os acessos Mimosa, Simpson, Red Salad Bowl Rosso,  
260 Mimosa Vermelha, AC-5009, Sabrina, Angelina, Vanda, AMX1-140, Hanson, Cinderela,  
261 Vanessa, Cubana, Donna, Grand, Red Salad Bowl, Itapuã, Salad Bowl Roxo, Lavínia,  
262 Maravilha das Quatro Estações, Green Salad Bowl, Romana Paris, Romana New, AMX1-133,  
263 Raider Plus pl.04, Irene, AMX1-99, Saia Veia, Lucy Brown, Sofia, AMX1-30, AMX1-96,  
264 Elba, Pira Roxa, AMX1-108, Roxane, Laurel pl.01 e Roxa 01 foram altamente resistentes aos  
265 dois isolados (Tabela. 2).

266 Estas diferenças de resistência para os dois isolados do patógeno provavelmente se  
267 devem ao fato de algumas cultivares e/ou linhagens apresentarem resistência do tipo  
268 horizontal (poligênica), sendo esta influenciada por fatores ambientais. Além disso, o inóculo  
269 mais concentrado deve ter influenciado no resultado diferente deste experimento, pois o maior  
270 nível de inóculo permitiu separar melhor os acessos altamente resistentes dos medianamente  
271 resistentes e medianamente suscetíveis neste ensaio. Estudos realizados por Scott et al.,  
272 (2010) verificaram que cultivares consideradas suscetíveis foram mais afetadas que as  
273 cultivares com resistência intermediária, quando havia alta concentração do inóculo ( $10^6$

274 microconídios/mL). Entretanto, quando a concentração do inóculo foi baixa ( $10^5$   
275 microconídios/mL) as plantas apresentaram baixa severidade da doença, não observando  
276 diferenças entre plantas suscetíveis e resistentes. Portanto, neste trabalho a maior  
277 concentração do inóculo permitiu uma melhor resolução nas diferenças de susceptibilidade  
278 entre algumas cultivares.

279 Outro fator que pode explicar as divergências entre os resultados deste ensaio para os  
280 resultados da seleção preliminar seria a diferença na agressividade dos isolados, por exemplo:  
281 o isolado Fus-202 foi mais agressivo em relação ao Fus-205 em seis acessos. Ou seja,  
282 isolados da mesma raça, oriundos de regiões geográficas distintas tem diferenças na  
283 capacidade de causar doença. Estas diferenças entre isolados também podem explicar a  
284 instabilidade da resposta de resistência observada em alguns acessos do presente ensaio.

285 No segundo ensaio da análise da estabilidade da resistência, realizado no mês de  
286 Novembro de 2011 com os isolados Fus-219 e 222, todos os 47 acessos foram classificados  
287 como altamente resistentes para estes dois isolados. Os acessos classificados como altamente  
288 resistentes diferiram significativamente (Tabela 2) da testemunha suscetível, de acordo teste  
289 de Tukey (5% probabilidade). Em uma observação, comparando os dois isolados, verificou-se  
290 que o isolado Fus-222 foi mais agressivo sobre 16 acessos. Apesar deste experimento ocorrer  
291 em outra época do ano e com a concentração maior do inóculo, observou-se que os acessos  
292 avaliados mantiveram a mesma resistência observada no ensaio preliminar. Os resultados  
293 deste experimento indicam que as diferenças de resistência, apresentadas pelos acessos da  
294 seleção preliminar para os ensaios 1 e 3 de estabilidade tem mais a ver com diferenças de  
295 agressividade dos isolados do patógeno do que com a concentração de inóculo.

296 Em relação ao terceiro ensaio realizado no mês de Dezembro de 2011, 46 acessos de  
297 alfaca foram classificados como altamente resistentes e um como medianamente resistente ao  
298 isolado Fus-207. Para o isolado Fus-209, 46 acessos apresentaram-se como altamente

299 resistentes e um genótipo como medianamente resistente. Com relação ao isolado Fus-220, 41  
300 acessos de alface foram classificados como altamente resistentes e seis como medianamente  
301 resistentes. Neste experimento plantas classificadas como medianamente resistentes e  
302 altamente resistentes diferiram significativamente (Tabela 3) da testemunha suscetível,  
303 conforme teste de Tukey (5% de probabilidade). As classes fenotípicas de resistência não  
304 apresentaram bom ajuste aos agrupamentos de acessos obtidos, utilizando-se o teste de Tukey  
305 a 5%, pois as plantas classificadas como medianamente resistentes não diferiam  
306 significativamente das plantas consideradas altamente resistentes.

307 Neste terceiro ensaio, observou-se também que não ocorreu consistência dos  
308 resultados de sete acessos em relação aos três isolados. A cultivar Maravilha das Quatro  
309 Estações foi altamente resistente para os isolados Fus-209 e 220 e medianamente resistente ao  
310 Fus-207, enquanto os acessos AMX1-99, Lucy Brown, Crespa Repolhuda, Donna e Amélia  
311 foram altamente resistentes aos isolados Fus-207 e 209 e medianamente resistente ao Fus-220.  
312 A cultivar Red Star foi considerada altamente resistente ao Fus-207 e medianamente  
313 resistente aos Fus- 209 e 220. Os acessos AMX1-133, CNPH-54, AMX1-30, Mimosa,  
314 Angelina, Green Salad Bowl, Red Salad Bowl, Isabela, Itapuã, Mimosa Vermelha, Lavínia,  
315 Sabrina, Sofia, Laurel pl.04, Romana Paris, Elba, Cinderela, AMX1-106, Scarlet, Simpson,  
316 Oak leaf Saladin, AMX1-140, Mônica, Hanson, Salad Bowl Roxo, Saia Veia, Raider Plus  
317 pl.04, Vanda, Irene, Cubana, Vanessa, Red Salad Bowl Ultra Rosso, Kaiser, Romana New,  
318 Roxane, Pira Roxa, Grand, AC-5009, AMX1-108, Amélia e Roxa 01 foram resistentes aos  
319 três isolados (Tabela 3).

320 Entre as cultivares altamente resistentes selecionadas em todos os experimentos  
321 encontram-se a cultivar ‘Pira roxa’, tipo de alface crespa de cor vermelho intenso. Esta  
322 cultivar, desenvolvida no Brasil, é resistente às principais doenças da alface como  
323 murchadeira (*Thielaviopsis basicola*), míldio (*Bremia lactucae*) e mosaico da alface (LMV,

324 patótipo II) (Sala & Costa, 2005). Essa informação é de grande importância uma vez que  
325 trata-se da primeira cultivar tropicalizada para o segmento de alface vermelha com resistência  
326 múltipla a doenças no Brasil (Sala & Costa, 2005), incluindo agora a murcha de fusário da  
327 alface. Neste sentido, esta cultivar representa uma boa opção para os produtores de alface e  
328 uma fonte de resistência a várias doenças, que pode ser utilizada pelos programas de  
329 melhoramento da alface no Brasil.

330 Outros dados importantes observados foram à resistência encontrada nas cultivares  
331 Lucy Brown, Raider e Vanda à murcha de fusário da alface. A cultivar Lucy Brown tem sido  
332 a alface americana mais plantada no Brasil por mais de uma década, graças à sua  
333 extraordinária adaptabilidade de cultivo no verão. Esta cultivar também apresenta tolerância à  
334 mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vitians*). Entretanto, seu cultivo em áreas  
335 com incidência de *T. basicola* e *Bremia lactucae* vem sendo limitado devido à sua  
336 suscetibilidade a estes patógenos (Costa & Sala, 2005; Sala, 2006). A cultivar Raider é  
337 melhor adaptada ao cultivo nas épocas de temperatura amenas, apresenta cabeça compacta o  
338 que possibilita seu processamento para atender as redes *fast food*, sendo uma das líderes de  
339 mercado deste segmento e apresentando resistência a *T. basicola* (Sala, 2006).

340 Outra cultivar, que foi resistente em todos os ensaios e que merece destaque é a  
341 Vanda. Esta é a cultivar do tipo crespa mais plantada no Brasil, por ser muito uniforme, com  
342 ótimo padrão comercial devido a sua resistência ao transporte e ao manuseio, além de ser  
343 resistente ao mosaico da alface, causada pelo vírus LMV (Costa & Sala, 2005).

344 Em observação comparativa de todos os ensaios conduzidos em diferentes meses do  
345 ano, foi possível verificar que as cultivares do tipo romana apresentaram bons níveis de  
346 resistência, uma vez que Sofia, Romana New e Romana Paris comportaram-se como  
347 altamente resistente a todos os isolados, enquanto Donna foi medianamente resistente ao Fus-  
348 220 e altamente resistente ao restante dos isolados. Os resultados obtidos foram similares aos

349 reportados por Matheron et al. (2005) em ensaios realizados em campos naturalmente  
350 infestados com *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* no Arizona os quais identificaram duas  
351 cultivares do tipo romana (Slungger e King Louie) de 16 cultivares testadas, apresentando  
352 baixos níveis da doença e por isso foram consideradas resistentes ou tolerantes ao patógeno.  
353 Resultado semelhante foi obtido por Scott et al. (2010, 2012) na Califórnia que identificaram  
354 três cultivares romanas resistentes (Caeser, Green Forest e King Henry) em ensaios de  
355 campo. Assim como observado para as cultivares do tipo mimosa, estes resultados também  
356 indicam uma baixa variabilidade genética dentro deste tipo alface e que todas devem ter uma  
357 origem comum.

358       Como visto, todas as cultivares do tipo romana e a maioria do tipo mimosa avaliadas  
359 apresentaram ótimos níveis de resistência no presente trabalho. Entretanto, isto não ocorre  
360 sempre, pois Scott et al. (2010, 2012) demonstraram que algumas cultivares tipo romana e  
361 mimosa foram severamente atacadas pelo patógeno, quando testadas em condições de casa de  
362 vegetação. Portanto, nem sempre há uma associação consistente entre tipo de cultivar e  
363 susceptibilidade. Isso pode ser verificado neste trabalho, pois apesar de ter sido anteriormente  
364 relatado a limitação do cultivo da alface tipo lisa em locais com histórico da doença, duas  
365 cultivares deste segmento se destacaram como resistentes em todos os ensaios: a cultivar Saia  
366 Veia e Maravilha das Quatro Estações foram altamente resistentes a todos isolados, com  
367 exceção da Maravilha das Quatro Estações que comportou-se como medianamente resistente  
368 para o isolado Fus-207.

369       Dos 47 acessos inoculados, 32 apresentaram amplo espectro de resistência aos  
370 diferentes isolados do patógeno nas quatro épocas de inoculação (Mimosa, Simpson, Red  
371 Salad Bowl Rosso, Mimosa Vermelha, AC-5009, Sabrina, Angelina, Vanda, AMX1-140,  
372 Hanson, Cinderela, Vanessa, Cubana, Grand, Red Salad Bowl, Itapuã, Salad Bowl Roxo,  
373 Romana Paris, Romana New, AMX1-133, Irene, Raider plus pl.04, Saia Veia, Sofia, AMX1-

374 30, AMX1-96, Elba, Pira Roxa, AMX1-108, Roxane, Laurel pl.04 e Roxa 01). Estas  
375 cultivares e linhagens de alface se apresentam como promissoras fontes de resistência estável  
376 e durável a fusariose da alface. Estes acessos podem futuramente serem utilizados em  
377 programas de melhoramento genético e também serem plantadas em áreas com histórico da  
378 doença. Uma outra vantagem foi a identificação de resistência em cultivares comerciais. Estas  
379 apresentam muitas características de interesse e poucas características indesejáveis presentes  
380 em acessos de espécies selvagens, as quais necessitariam ser eliminadas em longos processos  
381 de seleção dentro dos programas de melhoramento. Também o cultivo de diferentes  
382 segmentos varientais (mimosa, lisa, crespa, romana e americana) resistentes, numa sucessão  
383 de rotação de cultivo, poderá ser uma alternativa para promover a redução do inóculo, pois  
384 essa prática poderá minimizar a incidência/severidade da doença. Por outro lado, como a  
385 maioria das cultivares não apresentaram resistência do tipo imune (ausência de doença) ainda  
386 é necessária combinação da resistência genética com outras medidas de controle da doença.  
387 Além disso, é necessário um monitoramento constante da variabilidade do patógeno, pois  
388 pode haver o surgimento de novas raças do patógeno.

389

### **Agradecimentos**

390 Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio  
391 financeiro.

392

393

394

395

## Referências

396

397 BRUNELLI, K. R.; CABRAL, C. S.; GIORIA, R.; KOBORI, R. F.; COSTA, H.; REIS, A.  
398 Presença da raça 1. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* em alface no Brasil. **Tropical Plant**  
399 **Pathology**, v. 35 (supl.), p.s 222- p.s 222, 2010.

400

401 CABRAL, C. S.; BRUNELLI, K. R.; CARVALHO, M. R. M.; SANTOS JUNIOR, W. N.;  
402 REIS, A. Ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* em alface no Brasil. **Tropical**  
403 **Plant Pathology**, v. 34 (supl.), p.s 174- p.s 174, 2009.

404

405 CHANG, P.; LIN, Y.; LAI, P.; CHANG, T.; WAN, Y.; HUANG, J.; HUANG, J.  
406 Pathological and molecular race determinations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* from  
407 Taiwan. **Phytopathology**, vol. 101 (supl.), p.s 31-p.s 31, 2011.

408

409 COSTA, C. P.; SALA, F. C. A evolução da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**,  
410 v. 23, 2005. (artigo de capa).

411

412 DAVIS, R. M.; COLYER, P. D., ROTHROCK, C. S.; KOCHMAN, J. R. Fusarium wilt of  
413 cotton: population diversity and implications for management. **Plant Disease**,v. 90, p. 692-  
414 703, 2006.

415

416 FUJINAGA, M.; OGISO, H.; TSUCHIYA, N.; SAITO, H. Physiological specialization of  
417 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, a causal organism of fusarium root of crisphead lettuce  
418 in Japan. **Journal of General Plant Patholog**, v. 67, p. 205-206, 2001.

419

420 FUJINAGA, M.; OGISO, H.; TUCHIYA, N.; SAITO, H.; YAMANAKA, S.; NOZUE, M.;  
421 KOJIMA, M. Race 3, a new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* determined by a  
422 differential system with commercial cultivars. **Journal of General Plant Patholog**, v. 69, p.  
423 23-28, 2003.

424

425 GARIBALDI, A.; GILARDI, G.; GULLINO, M.L. Seed transmission of *Fusarium*  
426 *oxysporum* f. sp. *lactucae*. **Phytoparasitica**, v. 32, n. 23, p. 61-65, 2004a.

427

428 GARIBALDI, A.; GILARDI, G.; GULLINO, M. L. Varietal resistance of lettuce to *Fusarium*  
429 *oxysporum* f. sp. *lactucae*. **Crop Protection**, v. 23, p. 845-851, 2004b.

430

431 HUANG, J. H.; LO, C. T. Wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* in Taiwan. **Plant**  
432 **Pathology Bulletin**, v.7, p. 150-153, 1998.

433

434 HUBBARD, J. C.; GERIK, J. S. A new disease of lettuce incited by *Fusarium oxysporum* f.  
435 sp. *lactucum forma specialis* nov. **Plant Disease**, v.77, p. 750-754, 1993.

436

437 LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; REIS, A. **Doenças da alface**. Brasília: Embrapa  
438 Hortaliças, 2010. 68p.

439

440 MATHERON, M. E.; McCREIGHT, J. D.; TICKES, B. R.; PORCHAS, M. Effect of planting  
441 date, cultivar, and stage of plant development on incidence of fusarium wilt of lettuce in  
442 desert production fields. **Plant Disease**, v. 89, p. 565-570, 2005.

- 443 MATHERON, M. E.; PORCHAS, M. Evaluation of soil solarization and flooding as  
444 management tools for fusarium wilt of lettuce. **Plant Disease**, v. 94, p. 1323-1328, 2010.  
445
- 446 MATUO, T.; MOTOHASHI, S. On *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* n. f. causing root of  
447 lettuce. **Transactions of Mycological Society of Japan**, v. 8, p.13-15, 1967.  
448
- 449 McCREIGHT, J. D.; MATHERON, M. E.; TICKES, B. R.; PLATTS, B. Fusarium wilt race 1  
450 on lettuce. **Hort Science**, v. 40, n.3, p. 529-531, 2005.  
451
- 452 McKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat  
453 seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v. 26, p.195-  
454 218, 1923.  
455
- 456 MILLANI, M. J.; EREBARIAN, H. R.; ALIZADEH, A. Occurrence of fusarium wilt of  
457 lettuce in Shahr- Ray, Varamim and Karaj areas. **Journal of Plant Pathology**, v. 35, p. 44-45,  
458 1999.  
459
- 460 PASQUALI, M.; GILARDI, G.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. *Fusarium oxysporum* f.  
461 sp. *lactucae* on lettuce: vegetative compatibility and RAPD analysis. **Inf. Phytopathology**,  
462 v.53, p. 73-75, 2003. (In Italian)  
463
- 464 PASQUALI, M.; DEMATHEIS, F.; GILARDI, G.; GULLINO, M.L.; GARIBALDI, A.  
465 Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* from lettuce. **Plant**  
466 **Disease**, v. 89, p. 237-240, 2005.  
467
- 468 PASQUALI, M.; DEMATHEIS, F.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Identification of  
469 race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on lettuce by inter-retrotransposon sequence-  
470 characterized amplified region technique. **Phytopathology**, v. 97, n.8, p. 987-996, 2007.  
471
- 472 REIS, A; GIORDANO, L. B.; LOPES, C. A.; BOITEUX, L. S. Novel sources of multiple  
473 resistance to three races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in *Lycopersicon*  
474 germplasm. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 495-502, 2004.  
475
- 476 SALA, F. C. **Reação de alface (*Lactuca sativa* L.). a *Thielaviopsis basicola* (Berk. &  
477 Broome) Ferraris**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2006. 103 p. Tese  
478 (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.  
479
- 480 SALA, F. C.; COSTA, C. P.; ‘PIRA ROXA’: cultivar de alface crespa de cor vermelha  
481 intensa. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 158-159, jan/mar. 2005.  
482
- 483 SALA, F. C.; COSTA, C. P.; TEIXEIRA, L. D.; FABRI, E, G.; BLAT, S. F. Reação de  
484 cultivares de alface a *Thielaviopsis basicola*. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 398-400,  
485 2008.  
486
- 487 SANTOS, J. R. M. **Protocolo de tecnologia: seleção para resistência a doenças em**  
488 **hortaliças. n. 3.Tomateiro/Murcha-de-Fusario**. Embrapa Hortaliças, 1999. 4p.  
489 (Comunicado Técnico 11).  
490



- 491 SCOTT, J. C.; KIRKPATRICK, S. C.; GORDON, T. R. Variation in susceptibility of lettuce  
492 cultivars to fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. **Plant Pathology**, v.  
493 59, p. 139-146, 2010.  
494
- 495 SCOTT, J. C.; GORDON, T. R.; KIRKPATRICK, S. C.; KOIKE, S. T.; MATHERON, M.  
496 E.; OCHOA, O. E; TRUCO, M. J.; MICHELMORE, M. Crop rotation and genetic resistance  
497 reduce risk of damage from fusarium wilt in lettuce. **California Agriculture**, v. 66, n.1, p.  
498 20-24, 2012.  
499
- 500 SILVA, M. R. L.; RIBEIRO, P.; MARINELI, R. Programa nutricional para a cultura da  
501 alface. **Campos & Negócios HF**, v.5, n.60, p. 100-101, 2010.  
502
- 503 VENTURA, J. A.; COSTA, H. Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* on lettuce in  
504 Espirito Santo, Brazil. **Plant Disease**, v. 92, n. 6, p. 976, 2008.  
505
- 506 YAMAUCHI, N.; SHIMAZU, J.; HORIUCHI, S.; SATOU, M.; SHIRAKAWA, T.  
507 Physiological races and vegetative compatibility groups of butterhead lettuce isolates of  
508 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v. 70, p.  
509 308- 313, 2004.  
510  
511  
512  
513

514 **Tabela 1.** Avaliação preliminar de acessos de alface ao isolado Fus-173 de *Fusarium*  
 515 *oxysporum* f. sp. *lactucae* <sup>(1)</sup>.

<b>Acessos</b>	<b>ID (%)</b>	<b>Classe <sup>(1)</sup></b>	<b>Tipo</b>
Red Frizzily	100,00	AS	Crespa
Vitória de Santo Antão	95,83	AS	Lisa
Regina	93,75	AS	Lisa
Babá de Verão	93,75	AS	Lisa
AMX1-106 <sup>2</sup>	91,66	AS	Crespa
Uberlândia 10.000	91,66	AS	Lisa
AF-222 <sup>2</sup>	89,58	AS	Lisa
Regina c.v <sup>2</sup>	89,58	AS	Lisa
Lídia	89,33	AS	Lisa
Lisa c.v <sup>2</sup>	87,50	AS	Lisa
Regina 255	85,41	AS	Lisa
Regina 579	85,41	AS	Lisa
Banchu Red Fire c.v <sup>2</sup>	83,33	AS	Crespa
Regina de Verão	81,25	AS	Lisa
Karla	79,16	AS	Lisa
Vitória Verdinha	79,16	AS	Lisa
Roxa	79,16	AS	Crespa
Elisa	77,08	AS	Lisa
Vitória de Verão	77,08	AS	Lisa
Robinson	75,00	MS	Americana
Daniele	75,00	MS	Lisa
Vera	72,97	MS	Crespa
Maravilha de Verão	72,97	MS	Lisa
Regina 500	72,97	MS	Lisa
Lívia	66,66	MS	Lisa
Camila	64,58	MS	Crespa
Veneza roxa	62,50	MS	Crespa vermelha
Banchu Red Fire	60,41	MS	Crespa
Graciosa	58,33	MS	Crespa
AMX1-191 <sup>2</sup>	54,16	MS	Crespa
Hortência	47,91	MR	Crespa
AF-839 A <sup>2</sup>	47,91	MR	-
Amanda (33)	45,83	MR	Crespa
AMX1-127 <sup>2</sup>	45,83	MR	Crespa
AC-5025 <sup>2</sup>	43,75	MR	Americana
Green Frizzily	43,75	MR	Crespa

516

517

518

519 **Tabela 1.** Continuação

<b>Acessos</b>	<b>ID (%)</b>	<b>Classe <sup>1</sup></b>	<b>Tipo</b>
Rafaela	43,05	MR	Americana
Pira Verde	41,67	MR	Crespa
Marianne	41,66	MR	Crespa
Oak leaf Green	41,66	MR	Mimosa
Mimosa Salad Bowl	39,58	MR	Mimosa
AC-5028 <sup>2</sup>	37,50	MR	Americana
Americana S. José Pinhais <sup>2</sup>	37,50	MR	Americana
Raider Plus pl.01 <sup>2</sup>	35,41	MR	Americana
AMX1-12 <sup>2</sup>	35,41	MR	Crespa
Gisele	35,41	MR	Crespa
Grandes Lagos	33,33	MR	Americana
Grega	33,33	MR	Mimosa
Ceres	31,25	MR	Crespa
Verônica	29,16	MR	Crespa
Tainá	29,16	MR	Americana
AC-5001 <sup>2</sup>	29,16	MR	Americana
Cristina	29,16	MR	Crespa
Renata	29,16	MR	Crespa
AC-5026 <sup>2</sup>	27,08	MR	Americana
Angelina	25,00	AR	Americana
Cinderela	25,00	AR	Crespa
Mimosa	25,00	AR	Mimosa
Vanessa	25,00	AR	Crespa
Cubana	25,00	AR	Crespa
Laurel pl.04 <sup>2</sup>	25,00	AR	Americana
Hanson	25,00	AR	Americana
AMX1-108 <sup>2</sup>	25,00	AR	Crespa
AMX1-30 <sup>2</sup>	25,00	AR	Crespa
AMX1-96 <sup>2</sup>	25,00	AR	Crespa
AMX1-99 <sup>2</sup>	25,00	AR	Crespa
AMX1-133 <sup>2</sup>	25,00	AR	Crespa
Raider Plus pl.04 <sup>2</sup>	25,00	AR	Americana
Green Salad Bowl	25,00	AR	Mimosa
Maravilhas das 4 estações	25,00	AR	Lisa (manteiga)
Sabrina	25,00	AR	Crespa
Oak leaf Saladin	25,00	AR	Mimosa
Donna	25,00	AR	Romana
Isabela	25,00	AR	Crespa
Irene	25,00	AR	Americana
Mônica	25,00	AR	Crespa
Sophia	25,00	AR	Romana

521 **Tabela 1.** Continuação

<b>Acessos</b>	<b>ID (%)</b>	<b>Classe<sup>1</sup></b>	<b>Tipo</b>
AMX1-140 <sup>2</sup>	25,00	AR	Crespa
AC-5009 <sup>2</sup>	25,00	AR	Americana
Amélia	25,00	AR	Americana
Scarlet	22,92	AR	Crespa Roxa
Red Salad Bowl	22,91	AR	Mimosa
Salad Bowl Roxo	22,91	AR	Mimosa
Vanda	22,91	AR	Crespa
Red Salad Bowl Ultra Rosso	22,91	AR	Mimosa
Parecida c/Americana(CNPH-54) <sup>2</sup>	22,91	AR	Americana
Lucy Brown	20,83	AR	Americana
Lavínia	18,75	AR	Mimosa
Grand	18,75	AR	Crespa
Roxa 01 <sup>2</sup>	16,66	AR	Crespa Roxa
Red Star	16,66	AR	Crespa Roxa
Crespa Repolhuda	14,58	AR	Americana
Elba	14,58	AR	Crespa
Mimosa Vermelha	12,50	AR	Mimosa
Simpson	12,50	AR	Crespa
Saia Veia	12,50	AR	Lisa
Romana Paris	12,50	AR	Romana
Kaiser	8,33	AR	Americana
Romana New	8,33	AR	Romana
Pira Roxa	8,33	AR	Crespa Roxa
Itapuã	8,33	AR	Crespa
Roxane	2,08	AR	Mimosa

522 <sup>(1)</sup> Classes de reação da doença: 0,00% = semelhante à imune (SI); 0,01-25,00% = altamente  
523 resistente (AR); 25,01-50,00% = medianamente resistente (MR); 50,01-75,00% =  
524 medianamente suscetível (MS); 75,01-100,00% = altamente suscetível (AS), adaptada de  
525 (Reis et al., 2004). <sup>(2)</sup> Linhagens utilizadas nos ensaios.

526

527

528

529

530

531

532 **Tabela 2.** Estabilidade de acessos promissores de alface resistentes a quatro isolados de  
 533 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* realizado no mês Outubro e Novembro de 2011<sup>(1)</sup>.

Acessos	Outubro de 2011		Novembro de 2011	
	Isolado Fus- 202	Isolado Fus-205	Isolado Fu-219	Isolado Fus-222
Regina	89,58 aA	89,58 aA	89,58 aA	89,58 aA
Scarlet	66,66 abA	18,75 d-gA	4,16 bcA	18,75 bcA
Kaiser	58,75 bcA	6,250 fgB	6,25 bcA	6,25 bcA
Isabela	48,33 b-dA	45,83 b-eA	6,25 bcB	25,00 bA
Amélia	37,91 c-eA	4,167 fgB	2,08 cB	22,91 bcA
Crespa Repolhuda	35,83 c-eA	14,58 d-gB	12,50 bcA	8,33 bcA
Red Star	27,50 deA	18,75 d-gA	6,25 bcB	22,91 bcA
Oak leaf Saladin	27,08 deA	37,50 b-fA	6,25 bcB	25,00 bA
CNPH-54	27,08 deA	25,00 c-gA	18,75 bcA	18,75 bcA
Mônica	27,08 deA	54,16 bcA	20,83 bcA	22,91 bcA
Mimosa	25,00 deA	25,00 c-gA	18,75 bcA	25,00 bA
Simpson	25,00 deA	25,00 c-gA	16,66 bcA	20,83 bcA
Red Salad Bowl U. Rosso	25,00 deA	25,00 c-gA	14,58 bcA	6,25 bcA
Mimosa vermelha	25,00 deA	25,00 c-gA	4,16 bcA	16,66 bcA
AC-5009	25,00 deA	4,167 f-gB	4,16 bcA	6,25 bcA
Sabrina	25,00 deA	25,00 c-gA	16,66 bcA	25,00 bA
Angelina	25,00 deA	25,00 c-gA	6,25 bcB	25,00 bA
Vanda	25,00 deA	20,83 c-gA	12,50 bcB	25,00 bA
AMX1-140	25,00 deA	18,75 d-gA	6,25 bcB	25,00 bA
Hanson	25,00 deA	8,33 f-gB	4,16 bcA	4,16 cA
Cinderela	25,00 deA	25,00 c-gA	14,58 bcA	25,00 bA
Vanessa	25,00 deA	14,58 d-gA	6,25 bcA	14,58 bcA
Cubana	25,00 deA	25,00 c-gA	18,75 bcA	22,91 bcA
Donna	25,00 deA	22,91 c-gA	12,50 bcA	20,83 bcA
Grand	25,00 deA	0,000 gB	6,25 bcA	10,41 bcA
Red Salad Bowl	25,00 deA	14,58 d-gA	12,50 bcA	14,58 bcB
Itapuã	25,00 deA	20,83 c-gA	18,75 bcA	25,00 bA
Salad Bowl Roxo	25,00 deA	10,41 f-gA	8,33 bcB	25,00 bA
Lavínia	25,00 deA	70,83 abA	20,83 bcA	25,00 bA
Maravilha das 4 estações	25,00 deA	25,00 c-gA	14,58 bcB	25,00 bA
Green Salad Bowl	25,00 deB	47,91 b-dA	6,25 bcB	25,00 bA

534

535

536

537

538 **Tabela 2.** Continuação

<b>Acessos</b>	<b>Isolado Fus- 202</b>	<b>Isolado Fus-205</b>	<b>Isolado Fus-219</b>	<b>Isolado Fus-222</b>
Romana Paris	25,00 deA	22,91 c-gA	2,08 cA	8,33 bcA
Romana New	25,00 deA	25,00 c-gA	12,50 bcB	25,00 bA
AMX1-133	25,00 deA	25,00 c-gA	2,08 cB	25,00 bA
Raider Plus pl.04	12,50 eA	12,50 e-gA	12,50 bcA	12,50 bcA
Irene	25,00 deA	20,83 c-gA	6,66 bcA	6,66 bcA
AMX1-99	25,00 deA	18,75 d-gA	4,16 bcB	25,00 bA
Saia Veia	25,00 deA	20,83 c-gA	10,41 bcA	20,83 bcA
Lucy Brown	25,00 deA	22,91 c-gA	25,00 bA	25,00 bA
Sofia	25,00 deA	25,00 c-gA	16,66 bcB	25,00 bA
AMX1-30	22,91 deA	25,00 c-gA	8,33 bcB	25,00 bA
AMX1-96	22,91 deA	22,91 c-gA	8,33 bcB	25,00 bA
Elba	22,91 eA	22,91 c-gA	10,41 bcB	22,91 bcA
Pira Roxa	20,83 eA	2,08 gB	16,66 bcA	6,25 bcA
AMX1-108	20,83 eA	20,83 c-gA	12,50 bcA	20,83 bcA
Roxane	18,75 eA	18,75 d-gA	6,25 bcA	14,58 bcA
Laurel pl.04	16,66 eA	16,66 d-gA	2,083 cA	16,66 bcA
Roxa 01	14,58 eA	10,41 fgA	10,41 bcA	6,25 bcA

539 <sup>(1)</sup> Índices de doença (ID) seguidos pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na  
540 linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

551

552 **Tabela 3.** Estabilidade de acessos promissores de alface resistentes a três isolados de  
 553 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* realizado no mês de Dezembro de 2011<sup>(1)</sup>.  
 554

Acessos	Dezembro de 2011		
	Isolado Fus- 207	Isolado Fus-209	Isolado Fus-220
Regina	87,5 aA	79,16 aA	81,25 aA
Maravilha das 4 estações	29,16 bA	22,91 bA	25,00 c-eA
AMX1-133	25,00 bA	25,00 bA	25,00 c-eA
CNPH-54	25,00 bA	25,00 bA	25,00 c-eA
AMX1-30	25,00 bA	18,75 bA	25,00 c-eA
Mimosa	25,00 bA	25,00 bA	25,00 c-eA
AMX1-99	25,00 bA	25,00 bA	27,08 b-eA
Angelina	25,00 bA	18,75 bA	25,00 c-eA
Green Salad Bowl	25,00 bA	25,00 bA	25,00 c-eA
Red Salad Bowl	25,00 bA	20,83 bA	22,91 c-eA
Isabela	25,00 bA	25,00 bA	25,00 c-eA
Itapuã	25,00 bA	25,00 bA	25,00 c-eA
Mimosa Vermelha	25,00 bA	18,75 bA	25,00 c-eA
Lavínia	25,00 bA	25,00 bA	25,00 c-eA
Sabrina	25,00 bA	25,00 bA	25,00 c-eA
Sofia	25,00 bA	22,91 bA	25,00 c-eA
Laurel pl.04	25,00 bA	25,00 bA	25,00 c-eA
Romana Paris	25,00 bA	16,66 bA	25,00 c-eA
Elba	25,00 bA	25,00 bA	25,00 c-eA
Red Star	25,00 bA	29,16 bA	41,66 bA
Cinderela	25,00 bA	18,75 bA	25,00 c-eA
AMX1-96	25,00 bA	22,91 bA	25,00 c-eA
Scarlet	25,00 bA	12,50 bB	25,00 c-eA
Simpson	25,00 bA	20,83 bA	25,00 c-eA
Oak leaf Saladin	25,00 bA	25,00 bA	25,00 c-eA
AMX1-140	22,91 bcA	25,00 bA	25,00 c-eA
Mônica	22,91 bcA	25,00 bA	25,00 c-eA
Hanson	22,91 bcA	25,00 bA	25,00 c-eA
Salad Bowl Roxo	22,91 bcA	25,00 bA	20,83 c-eA
Saia veia	22,91 bcA	20,83 bA	25,00 c-eA
Crespa Repolhuda	22,91 bcA	25,00 bA	27,08 b-eA
Raider Plus pl.04	22,91 bcA	18,75 bA	25,00 c-eA
Vanda	22,91 bcA	20,83 bA	22,91 c-eA
Irene	22,91 bcA	22,91 bA	25,00 c-eA

555  
 556  
 557  
 558  
 559  
 560

561 **Tabela 3.** Continuação

<b>Acessos</b>	<b>Isolado Fus- 207</b>	<b>Isolado Fus -209</b>	<b>Isolado Fus-220</b>
Lucy Brown	22,91 bcA	25,00 bA	33,33 bcA
Cubana	22,91 bcA	25,00 bA	25,00 c-eA
Donna	22,91 bcA	25,00 bA	29,16 b-dA
Vanessa	20,84 bcA	25,00 bA	12,50 eA
Red Salad Bowl U. Rosso	20,83 bcAB	12,50 bB	25,00 c-eA
Kaiser	20,83 bcA	22,91 bA	25,00 c-eA
Romana New	20,83 bcA	25,00 bA	25,00 c-eA
Roxane	20,83 bcA	20,83 bA	25,00 c-eA
Pira Roxa	18,75 bcA	12,50 bA	25,00 c-eA
Grand	18,75 bcA	22,91 bA	25,00 c-eA
AC-5009	18,75 bcA	22,91 bA	16,66 deA
AMX-108	14,58 bcA	25,00 bA	22,91 c-eA
Amélia	14,58 bcA	16,66 bA	35,41 bcA
Roxa 01	8,33 cB	25,00 bA	25,00 c-eA

562 <sup>(1)</sup>Índices de doença (ID) seguidos pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha  
563 não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574



## CONCLUSÕES GERAIS

575  
576  
577

578 • Foi detectada a presença da raça 1 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* (FOLac) em  
579 todos os Estados das Regiões Sul e Sudeste do Brasil;

580

581 • O par de *primers* Hani3 e Hanilatt3rev apresentou especificidade para isolados  
582 brasileiros de FOLac raça1;

583

584 • O par de *primers* Hani3 e Hanilatt3rev poderá ser utilizado para uma identificação  
585 rápida e precisa de isolados de *Fusarium*, obtidos de plantas de alface com sintomas  
586 de murcha;

587

588 • Os *primers* Ef-1 e Ef-2 utilizados para a região Tef-1 $\alpha$  confirmou a alta similaridade  
589 genética entre isolados de FOLac raça1 e destes com outras *formae speciales* de *F.*  
590 *oxysporum*.

591

592 • Com o sequenciamento da região tef- 1  $\alpha$  foi possível confirmar a origem polifilética  
593 da *forma specialis lactucae* e também foi observada uma maior variabilidade genética  
594 entre os isolados brasileiros de FOLac raça 1 comparados com os isolados da mesma  
595 raça disponíveis no GenBank;

596

597 • Numa seleção preliminar, foi possível identificar 47 acessos de alface como fontes  
598 promissoras de resistência a raça 1 de FOLac;

599

600 • Trinta e dois dos 47 acessos de alface, selecionados preliminarmente, representaram  
601 promissoras fontes de resistência estável a isolados de FOLac raça 1.

602