



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

Etiologia de podridões de raiz e colo e busca por fontes de resistência em germoplasma de pepino (*Cucumis sativus*).

Brendo Wilson da Silva Lima

**Recife - PE
2024**

BRENDO WILSON DA SILVA LIMA

**Etiologia de podridões de raiz e colo e busca por fontes de resistência em
germoplasma de pepino (*Cucumis sativus*).**

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.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Silva Boiteux (UFRPE)

Coorientador: Prof. Dr. Ailton Reis (UFRPE)

**RECIFE - PE
FEVEREIRO - 2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B837LIM LIMA, BRENDO
Ae Etiologia de podridões de raiz e colo e busca por fontes de resistência em germoplasma de pepino (*Cucumis sativus*). / BRENDO LIMA. - 2024.
92 f. : il.

Orientador: Leonardo Silva Boiteux.
Coorientador: Ailton Reis.
Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, 2024.

1. Damping-off. 2. *Phytophthora capsici*. 3. *Pythium* spp.. 4. melhoramento genético. I. Boiteux, Leonardo Silva, orient. II. Reis, Ailton, coorient. III. Título

**ETIOLOGIA DE PODRIDÕES DE RAIZ E COLO E BUSCA POR FONTES DE
RESISTÊNCIA EM GERMOPLASMA DE PEPINO (*Cucumis sativus*).**

BRENDO WILSON DA SILVA LIMA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 29/02/2024

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Leonardo S. Boiteux (UFRPE/Embrapa)

EXAMINADORES:

Dr. Jonas Alberto Rios (UFPE)

Prof. Dr. Willie Anderson dos Santos Vieira (UnB)

**RECIFE - PE
FEVEREIRO - 2024**

À minha amada mãe, Maria de Nazareth. À noiva Ingryd Luzia, e filha Maitê. À meus amigos e familiares.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao criador, pela oportunidade.

A minha amada mãe, Maria de Nazareth, a minha noiva Ingryd Luzia, a madrinha Maristela, pelo incentivo e apoio até aqui.

A meu orientador, Prof. Dr. Leonardo Boiteux, paciência, orientações, suporte na escrita e incentivo.

A meu coorientador, Prof. Dr. Ailton Reis, pelo suporte durante o processo de escrita, pelos ensinamentos práticos em campo. A Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco, pela concessão da bolsa de estudos e financiamento da minha pesquisa.

A Embrapa Hortaliças, por me receber, e me dar todo o suporte necessário para a conclusão desse trabalho.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças, Antônio Francisco, Fabiana Ribeiro, Luana Maria, Ellen Canedo, Maria Isabella, Tiago Torres, Ruthe Lima, por tornarem meus dias de laboratório mais divertidos, pelas conversas aleatórias e pelos inúmeros momentos de aprendizagem.

A Dr.^a Maria Esther, pelos ensinamentos, paciência, por toda assistência durante o processo de análise molecular.

Ao Dr. Tiago Jorge, pela assistência nas análises estatísticas.

A todas as amigas que Recife me trouxe, Nery, Keyla, Willie, Bruno, André, Larissa, Rose, Erasmo, Suzy, Amanda, Luciana, Diana, Edinalda.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho. Muito obrigado!

SUMÁRIO

	página
RESUMO GERAL	12
GENERAL ABSTRACT.....	13
CAPÍTULO I	14
INTRODUÇÃO GERAL	14
CAPÍTULO II	29
Diversidade de espécies de oomicetos associadas com podridão radicular e tombamento em pepino (<i>Cucumis sativus</i>) no Brasil.....	29
RESUMO	31
ABSTRACT	32
1.INTRODUÇÃO.....	33
2.MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.RESULTADOS	38
4.DISCUSSÃO.....	46
CAPÍTULO III	54
Busca por fontes de resistência à podridão de colo (<i>Phytophthora capsici</i>) em germoplasma de pepino	54
RESUMO	56
ABSTRACT	57
1 INTRODUÇÃO.....	58
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
CAPÍTULO IV	71
Patogenicidade e identificação molecular de espécies relacionadas aos complexos <i>Fusarium/Neocosmospora</i> causadoras de escurecimentos vasculares e podridões radiculares em pepino	71
RESUMO	73
ABSTRACT	74
1. INTRODUÇÃO.....	75
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	76
3. RESULTADOS	81
4. DISCUSSÃO.....	86

REFERÊNCIAS	88
CONCLUSÕES GERAIS	92

LISTA DE TABELAS

página

CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Isolados da coleção da Embrapa Hortaliças classificados (via morfologia) como *Phytophthora* e *Globisporangium (Pythium)* obtidos de pepino e berinjela, contendo o código, gênero, planta hospedeira, cidade/estado e ano de coleta..... 35
- Tabela 2.** Quantificação em NanoDrop® dos produtos de PCR das regiões gênicas ITS e *cox2* para isolados *Phytophthora* e *Globisporangium (Pythium)* obtidos de pepino e berinjela. 37
- Tabela 3.** Resultado das comparações no banco de dados do NCBI da **região ITS** para isolados *Phytophthora* e *Globisporangium (Pythium)* obtidos de pepino e berinjela..... 41

CAPÍTULO III

- Tabela 1.** Isolados de *Phytophthora capsici* obtidos da coleção do CNPH, contendo o código, gênero, hospedeiro, cidade e/ou estado, e ano de coleta. 61
- Tabela 2.** Acessos de pepino avaliados no experimento 01 obtidos do banco de germoplasma do CNPH. 62
- Tabela 3.** Acessos de pepino avaliados no segundo experimento, obtidos do banco de germoplasma do CNPH, contendo o código de identificação e/ou o nome comercial. 62

CAPÍTULO IV

- Tabela 1.** Isolados de *Fusarium/Neocosmospora* usados neste trabalho e mantidos na coleção de fungos e oomicetos da Embrapa Hortaliças (CNPH), contendo o código, gênero/espécie, hospedeiro, cidade/estado e ano de coleta. 77
- Tabela 2.** Resultado das comparações com o banco de dados do NCBI (via BLASTn) para as sequências correspondendo a uma região do gene codificador do fator de alongação de tradução 1 α (TEF-1) de 13 isolados de *Fusarium/Neocosmospora* associados com a cultura do pepino. 83
- Tabela 3.** Resultado das comparações com o banco de dados do NCBI (via BLASTn) para as sequências correspondendo a uma região do gene codificador da RNA polimerase II (RPB2) de oito isolados de *Fusarium/Neocosmospora* associados com a cultura do pepino. ND = sequência não disponível..... 83

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO I

Figura 1. Sintomas das principais doenças do pepino: mancha angular (a) (ZITTER, 2014); mosaico causado por *Cucumer mosaic virus* (CMV) (b) (DRAGICH, MELZER, NELSON, 2014); manchas amareladas na face adaxial das folhas, sintomas característicos de míldio na cultura do pepino (c) (CASTRO, et al., 2010); massa pulverulenta características de oídio, sinais do patógeno (d) (BAYER, 2021); Folha de pepino com antracnose causada por *Colletotrichum orbiculare* (e) (TÖFOLI, 2019); Raízes de pepineiro com podridão causada por *Pythium* (f) (REIS, 2023)..... 19

CAPÍTULO II

Figura 1. Plântulas de pepino, dois dias após a inoculação, apresentando sintomas de estrangulamento do colo e tombamento causado por *Phytophthora capsici* isolados PCPE17. (a) e PCBE 23 (b)..... 39

Figura 2. Amplificação da região ITS (5.8S) dos isolados de *Phytophthora* e *Globisporangium* (*Pythium*) obtidos de pepino e berinjela utilizando os primers ITS4 e ITS5 (WHITE et al., 1990). Utilizando o marcador 1Kb Ladder Plus®..... 39

Figura 3. Amplificação da região *cox2* dos isolados de *Phytophthora* e *Globisporangium* obtidos de pepino e berinjela, utilizando os primers ITS4 e ITS5. Utilizando o marcador 1Kb Ladder Plus®..... 40

Figura 4. Crescimento de *Phytophthora capsici* em placa de Petri em meio V8+ágar (a); Esporângios abundantes (ampliado 8x) após período de três dias (b); Zoosporângio liberando zoósporos após as placas serem submetidas à baixa temperatura (c)..... 40

Figura 5. Árvore de máxima verossimilhança inferida a partir dos alinhamentos do gene codificador da cytochrome-c oxidase subunit 2 (*cox2*) de isolados de pepino previamente alocados para o gênero *Phytophthora*. Valores de suporte de bootstrap (≥ 50) e valores de probabilidade posterior bayesiana ($\geq 0,50$) são indicados nos nós. Os isolados gerados neste estudo foram indicados em fonte vermelha. Os números dos acessos do GenBank são mostrados ao lado do binomial latino. A árvore está enraizada no ponto médio. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site. Os isolados estão codificados conforme Tabela 1. O isolado de referência de *Bremia lactucae* (NC_040179) foi utilizado como outgroup. 42

Figura 6. Árvore de máxima verossimilhança inferida a partir dos alinhamentos da região ITS de isolados de pepino previamente alocados para o gênero *Globisporangium* (= *Pythium*).

Valores de suporte de bootstrap (≥ 50) e valores de probabilidade posterior bayesiana ($\geq 0,50$) são indicados nos nós. Os isolados gerados neste estudo foram indicados em fonte vermelha. Os números dos acessos do GenBank são mostrados ao lado do binomial latino. A árvore está enraizada no ponto médio. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site. Os isolados estão codificados conforme Tabela 1. O isolado de referência de *Phytophthora capsici* (NR_147863) foi utilizado como outgroup. 44

CAPÍTULO III

Figura 1. Crescimento com formato estelar de *Phytophthora capsici* em meio V8 (a); Massa de esporângios (b); Crescimento simpodial do esporangióforo (c); Esporângio papilado (d); Esporângio no momento de liberação de zoósporos após o período de stress luminoso e mudança de temperatura (e); Esporângio vazio após a liberação dos zoósporos (f). 61

Figura 2. Resultado do experimento 01, com mudas apresentando 2 pares de folhas verdadeiras, o gráfico mostra dos níveis de incidência em cada acesso. 64

Figura 3. Resultado do experimento 02, com mudas apresentando um e dois pares de folhas verdadeiras, o gráfico mostra dos níveis de incidência em ambos os estágios para cada acesso. 65

Figura 4. Mudas de pepino com um par de folhas verdadeiras apresentando sintomas de murcha de *Phytophthora capsici*. 66

Figura 5. Mudas de pepino com um par de folhas verdadeiras dois dias após a inoculação, apresentando o resultado severo de infecção por *Phytophthora capsici*. 66

Figura 6. Mudas de pepino com dois pares de folhas verdadeiras apresentando sintomas de murcha de *Phytophthora capsici*. 66

CAPÍTULO IV

Figura 1. Extração de DNA total de isolados de *Fusarium/Neocosmospora* associados com a cultura do pepino, empregando o método CTAB. 78

Figura 2. Produtos PCR (650~850 pb) obtidos do DNA extraído de doze isolados de *Fusarium/Neocosmospora* associados com a cultura do pepino com primers EF1 5'-ATG-GGT-TAA-GGA-RGA-CAA-GAC-3' e EF2 5'-GGA- RGT-ACC-AGT-SAT-CAT-G. 3' (O'DONNELL *et. al.*, 2008). Estes primers foram desenhados para anelar com um segmento do gene codificador do **fator de alongação de tradução 1 α (TEF-1)** de isolados de pepino. ... 79

Figura 3. Produtos PCR (650~850 pb) obtidos do DNA extraído de isolados de *Fusarium/Neocosmospora* associados com a cultura do pepino) utilizando os primers **RPB2-**

5F2 (5'-GAT-GAT-CGT-GAT-CAT-TTC-GG-3') e RPB2-7cr (5'-CCC-ATA-GCT-TGC-TTA-CCC-AT-3')(O'DONNELL <i>et. al.</i> , 2008). Estes primers foram desenhados para anelar com um segmento do gene codificador RNA polimerase II (RPB2) de isolados de pepino.....	80
Figura 4. Plantas de pepino com sintomas de murcha em campo (a, b). Raízes de pepino apresentando podridão (c); Teste de patogenicidade dos isolados (d); Plântulas com sintoma de tombamento e murcha em contraste com plântulas saudáveis (e, f).	82
Figura 5. Árvore de máxima verossimilhança inferida a partir dos alinhamentos do gene codificador RNA polimerase II (RPB2) de sete isolados de pepino previamente alocados para o gênero <i>Fusarium</i> . Valores de suporte de bootstrap (≥ 50) e valores de probabilidade posterior bayesiana ($\geq 0,50$) são indicados nos nós. Os isolados gerados neste estudo foram indicados em fonte vermelha. Os números dos acessos do GenBank são mostrados ao lado do binomial latino. A árvore está enraizada no ponto médio. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site. Os isolados estão codificados conforme Tabela 1 . <i>Neurospora crassa</i> (AF107789) foi utilizada como <i>outgroup</i>	84
Figura 6. Árvore de máxima verossimilhança inferida a partir dos alinhamentos do gene codificador RNA polimerase II (RPB2) do isolado de pepino previamente alocados para o gênero <i>Neocosmospora</i> (= complexo de espécies <i>Fusarium solani</i>). Valores de suporte de bootstrap (≥ 50) e valores de probabilidade posterior bayesiana ($\geq 0,50$) são indicados nos nós. Os isolados gerados neste estudo foram indicados em fonte vermelha. Os números dos acessos do GenBank são mostrados ao lado do binomial latino. A árvore está enraizada no ponto médio. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site. Os isolados estão codificados conforme Tabela 1 . <i>Neurospora crassa</i> (AF107789) foi utilizada como <i>outgroup</i>	84

RESUMO GERAL

Aproximadamente 30 gêneros e 200 espécies de importância agrícola são membros dessa família, incluindo o pepino (*Cucumis sativus*). As doenças de plantas representam um grande desafio para plantios comerciais de pepino, resultando em perdas consideráveis na produção e na produtividade, com um destaque para a podridão radicular e o *damping-off*. Na literatura, essas doenças são atribuídas a um complexo de patógenos, os oomicetos dos gêneros *Globisporangium*, *Pythium* e *Phytophthora* e para o gênero fúngico *Fusarium*. Diante destes pressupostos, o presente trabalho teve como objetivos: (i) Caracterizar a diversidade dos patógenos associados com a podridão de raízes e colo do pepino no Brasil; (ii) Buscar fontes de resistência para *Phytophthora capsici* em germoplasma de pepino; (iii) Catalogar a variabilidade genética e molecular dentro grupo de agentes causais de podridão de raízes e colo do pepino. No presente trabalho, uma coleção de isolados de oomicetos foi obtida de plantas de pepino com sintomas de murcha, tombamento e podridão radicular. O DNA total foi extraído dos isolados patogênicos, utilizado como molde para a amplificação via PCR de duas regiões genômicas para isolados de *Globisporangium/Pythium*: o espaçador transcrito interno (ITS) e o gene codificador da subunidade da enzima citocromo oxidase (*cox2*). Para os isolados de *Phytophthora* foi usada apenas a informação de *cox2*. Para os isolados de *Fusarium* e *Neocosmospora* foram utilizadas as regiões da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*RPB2*) e do fator de alongamento da tradução 1-alfa (*TEF1*). O experimento por busca de fontes de resistência foi realizado em duas etapas, a primeira em mudas apresentando dois pares de folhas verdadeiras em 55 acessos do banco de germoplasma de pepino do CNPH, e a segunda etapa, foram inoculadas plântulas com 1 e 2 pares de folhas verdadeiras. A comparação das sequências de nucleotídeos e a análise filogenética dos oomicetos associados ao pepino indicou a presença de complexos de agentes causais, incluindo *Phytophthora capsici*, *Globisporangium spinosum*, *G. splendens* e *G. attrantheridium*. Foi possível identificar dois isolados foram relacionados com o complexo de espécies *Fusarium oxysporum*, um com a espécie *F. verticillioides*, quatro pertencentes ao complexo *Fusarium incarnatum-equiseti* (relacionados com as espécies *F. pernambucanum* e *F. coffearum*). Também foi detectado um isolado do complexo *Neocosmospora solani*. Este é o primeiro relato desses complexos de patógenos causando podridão radiculares e tombamentos em cultivares de pepino no Brasil. Ao final do experimento os acessos CNPH-008, CNPH-0104, CNPH-0154, CNPH-0160 e CNPH-0342L apresentaram respostas estáveis de resistência em plântula.

Palavras-chave: Damping-off, *Phytophthora capsici*, *Pythium* spp., melhoramento genético.

GENERAL ABSTRACT

Approximately 30 genera and 200 species of agricultural importance belong to this family, including cucumber (*Cucumis sativus*). Plant diseases pose a major challenge for commercial cucumber plantations, resulting in significant losses in production and productivity, with root rot and damping-off being prominent. In the literature, these diseases are attributed to a pathogen complex, including oomycetes of the genera *Globisporangium*, *Pythium*, and *Phytophthora*, as well as the fungal genus *Fusarium*. Given these assumptions, this study aimed to: (i) Characterize the diversity of pathogens associated with cucumber root and collar rot in Brazil; (ii) Seek sources of resistance to *Phytophthora capsici* in cucumber germplasm; (iii) Catalog the genetic and molecular variability within the group of causal agents of cucumber root and collar rot. In this study, a collection of oomycete isolates was obtained from cucumber plants showing symptoms of wilting, damping-off, and root rot. Total DNA was extracted from the pathogenic isolates and used as a template for PCR amplification of two genomic regions for *Globisporangium/Pythium* isolates: the internal transcribed spacer (ITS) and the cytochrome oxidase subunit enzyme (*cox2*) coding gene. For *Phytophthora* isolates, only *cox2* information was used. For *Fusarium* and *Neocosmospora* isolates, regions of the second largest subunit of RNA polymerase II (RPB2) and translation elongation factor 1-alpha (TEF1) were utilized. The resistance source search experiment was conducted in two stages, the first on seedlings with two pairs of true leaves in 55 accessions from the CNPH cucumber germplasm bank, and the second stage involved inoculating seedlings with 1 and 2 pairs of true leaves. Comparison of *nucleotide* sequences and phylogenetic analysis of oomycetes associated with cucumber indicated the presence of pathogen complexes, including *Phytophthora capsici*, *Globisporangium spinosum*, *G. splendens*, and *G. attrantheridium*. Two isolates were identified as related to the *Fusarium oxysporum* species complex, one to the species *F. verticillioides*, and four belonging to the *Fusarium incarnatum-equiseti* complex (related to the species *F. pernambucanum* and *F. coffearum*). An isolate of the *Neocosmospora solani* complex was also detected. This is the first report of these pathogen complexes causing root rot and damping-off in cucumber cultivars in Brazil. At the end of the experiment, accessions CNPH-008, CNPH-0104, CNPH-0154, CNPH-0160, and CNPH-0342L showed stable resistance responses in seedlings.

Keywords: Damping-off, *Phytophthora capsici*, *Pythium* spp., Breeding.

CAPÍTULO I

Introdução geral

ETIOLOGIA DE PODRIDÕES DE RAIZ E COLO E BUSCA POR FONTES DE RESISTÊNCIA EM GERMOPLASMA DE PEPINO (*Cucumis sativus*).

INTRODUÇÃO GERAL

1. A família Cucurbitaceae

A família Cucurbitaceae se encontra entre os grupamentos botânicos mais diversos, englobando mais de espécies 120 gêneros e 850 espécies. Espécies de cucurbitáceas estão amplamente distribuídas pelo mundo, sendo de ocorrência comum em regiões de clima tropical e subtropical, e menos expressivas em clima temperado (SCHAEFER; RENNER, 2011).

Aproximadamente 30 gêneros e 200 espécies de importância agrícola são membros dessa família, incluindo o pepino (*Cucumis sativus*), o melão (*Cucumis melo*), o maxixe (*Cucumis anguria*), a melancia (*Citrullus lanatus*), as abóboras (*Cucurbita pepo*, *C. moschata* e *C. maxima*) e o chuchu (*Sechium edule* Jacq.) (JEFFREY, 1980; COSTA, 2012).

Vários representantes desta família de hortaliças-fruto ainda são pouco cultivados, seja devido à ausência de cadeias estruturadas de produção e comercialização, por questões de culturais, ou até mesmo por falta de informações a respeito das qualidades e benefícios nutricionais e à saúde humana (HORA, CAMARGO, BUZZANINI, 2018)

1.1. A Cultura do pepino (*Cucumis sativus* L.)

O pepino (*Cucumis sativus* L.) tem seu centro de origem no continente asiático, e vem sendo cultivado na Índia e nas extensões do antigo império Persa há mais de 3000 anos. Por ser apreciado pelos europeus desde o século XVIII, chegou ao Brasil através dos portugueses (ALMEIDA, 2006).

Entre os dez principais países produtores de pepino estão China, Turquia, Irã, Rússia, Ucrânia, EUA, Espanha, México, Egito e Japão, mas a cultura é cultivada em mais de 180 países. Sua produção mundial é de cerca de 85 milhões de toneladas métricas em aproximadamente 2,23 milhões de hectares, o que confere seu 3º na produção dentre todas as hortaliças (FAOSTAT, 2019).

O pepino é uma espécie rasteira e/ou trepadeira. O caule, ao contrário de outras cucurbitáceas, são hirsutos e apresentam um declive acentuado, suas folhas são triangulares-ovais, com curvas rasas e agudas (BAILEY, 1969; FILGUEIRA, 2013). Centenas de cultivares de pepino estão disponíveis no mercado, e em sua maioria são híbridas. Atualmente existem 296 registros de cultivares de pepino no sistema nacional de cultivares (MAPA, 2024).

Quanto a classificação de frutos de pepino, no Brasil existem cinco tipos/grupos, dos quais o Caipira, Indústria/Conserva e Aodai/Comum são mais comumente conduzidos em condições de campo aberto, ao passo que os tipos Japonês e Holandês são preferencialmente cultivados em ambiente protegido. Na literatura é possível encontrar mais um grupo, denominado de Beite-alpha, apresentando plantas com somente flores femininas em cachos e que não necessitam de polinização, mas este, não foi bem aceito no mercado brasileiro (FONTES, 2019).

As plantas de pepino, apesar de serem predominantemente **monóicas** (uma única planta apresenta flores unissexuais masculinas e femininas), apresentam uma ampla variação na biologia floral, podendo ser também: **andromonóicas** – plantas com a presença simultânea de flores masculinas e hermafroditas; **andróicas ou estaminadas** – plantas portando apenas flores masculinas; **preferencialmente ginóicas** – plantas portando flores femininas, porém podem aparecer flores estaminadas; **essencialmente ginóicas** – todas as flores são pistiladas. Todas podem produzir frutos partenocárpicos, mas se polinizadas produzem sementes (ROBINSON et al., 1976; FONTES, PUIATTI, 2005).

O pepino distingue-se das demais espécies do gênero *Cucumis*, por que possuem sete pares de cromossomos, enquanto as demais, possuem 12 pares, ou múltiplos de 12 (AJURU, OKOLI, 2013; DEAKIN, BOHN, WHITAKER, 1971). Embora cada programa de melhoramento genético seja único, quase todos têm objetivos em comum, como aumento de produtividade e resistências de plantas à patógenos. A última lista de genes de pepino foi publicada por Weng & Werhner (2017), na qual foram discriminados 199 fatores que definem um enorme número de características quantitativas e qualitativas, incluindo os de resistências à patógenos e insetos. É importante salientar que, por se tratar de uma hortaliça cujo o produto final terá que passar pela aprovação do consumidor, as características morfológicas, obrigatoriamente, têm de estar em harmonia com as características fisiológicas.

1.2. Resistência Genética

A genômica do pepino também avançou de maneira considerável nas últimas duas décadas. Atualmente estão disponíveis a montagem do genoma nuclear completo em escala cromossomal (HUANG et al., 2009; WÓYCICKI et al., 2011; PRZYBECKI, 2016; LI et al., 2019) e do genoma completo do cloroplasto (KIM et al., 2006; PLADER et al., 2007). Esta informação genômica já tem sido empregada como uma importante ferramenta na geração de marcadores moleculares para uso em seleção assistida dentro de programas de melhoramento

genético da cultura (DAS et al., 2022). Existem ainda técnicas baseadas na criação de design molecular e automação da tecnologia de fenotipagem com base fontes inexploradas de diversidade genética (PAWELKOWICZ, et al., 2016). A clonagem baseada em mapas e os estudos de mecanismos moleculares acerca de importantes características do pepino se deve aos resultados do sequenciamento do genoma completo e resequenciamento dos principais recursos de germoplasma (YANG et al, 2012; ZHANG et al, 2012).

1.3. Importância econômica

O pepino tem uma grande importância econômica e social dentro do agronegócio de hortaliças no Brasil. Essa hortaliça é muito plantada, apreciada e consumida em todas as regiões brasileiras, gerando emprego e renda para pequenas propriedades de base familiar, só no ano de 2023, segundo a CONAB (2024), foram comercializadas mais de 150 mil toneladas desta hortaliça, movimentando mais de 400 milhões de reais (CARVALHO et al., 2013).

Embora o mercado produtor de pepino em algumas regiões brasileiras seja dominado por grandes empresas, o beneficiamento desta hortaliça por pequenas agroindústrias também tem sido observado (Schallenber, 2010). Essa hortaliça é cultivada em todos os estados do Nordeste do Brasil, sendo que em Pernambuco, destaca-se a região Agreste como a maior produtora totalizando quase 21 mil toneladas/ano (CONAB, 2024).

A produtividade média do pepino chega a alcançar 240/ha-1 dependendo da variedade e o espaçamento adotado no plantio, aliado a um ciclo de cultivo que permite múltiplas colheitas a partir de 50 dias após a sementeira, torna-se cada vez mais atrativo para o produtor. As doenças de plantas representam um grande desafio para plantios comerciais, incluído o pepino, resultando em perdas consideráveis na produção e na produtividade. (PREVITAL et al., 2022; TRANI, PASSOS, ARAUJO, 2015).

1.4. Principais doenças bacterianas do pepino

A diagnose das doenças de etiologia bacteriana, envolvem vários fatores, tais como o postulado de Koch para definição correta do gênero que esteja atacando a cultura. Mas estratégias rápidas como o teste do copo, destaca-se por ser uma eficiente forma de detecção da presença destes patógenos (FONTES, NICK, 2018)

Murcha bacteriana – seu agente causal é a bactéria *Ralstonia solanacearum*, Quezado, Cruz e Lopes (1995) relatam a ocorrência desta doença em cultivo protegido no Distrito Federal. Os sintomas se caracterizam inicialmente pelo amarelecimento das folhas, seguido se

murchamento total da planta, os tecidos vasculares apresentam corrimento bacteriano quando submetidos ao teste do copo (BERIAM, OCCHIENA, 2018).

Mancha angular – Causada pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*, caracterizada por manchas necróticas vasculares e lesões irregulares limitadas pelas nervuras, adquirindo um aspecto angular (Figura 1A), daí o nome da doença. Em condições de alta temperatura e umidade, as lesões podem apresentar exsudação (BERIAM, OCCHIENA, 2018; CARVALHO, 2013; QUEZADO, SOUZA, TAKATSU, 1990).

1.5. Principais doenças de etiologia viral do pepino

Das doenças que afetam o pepino, as causadas por vírus são de difícil controle, além de deterem um grande potencial destrutivo. O mosaico do pepino, causado pelo vírus *Cucumer mosaic virus* (CMV) (Figura 1B), tem baixa incidência em cucurbitáceas, caracteriza-se pelo encurtamento dos entrenós da planta, os frutos ficam retorcidos, mosqueados, verrugosos e pequenos. Em caso de uma infecção tardia, a planta pode não ser afetada, mas o fruto pode apresentar alguma deformação que reduza o seu valor comercial (PAVAN, et al., 2018).

1.6. Principais doenças do pepino induzidas por fungos e oomicetos

Algumas doenças podem ser limitantes ao cultivo do pepino, caso medidas adequadas de controle não sejam implementadas.

Míldio – É a principal doença de parte aérea que acomete os plantios de cucurbitáceas, incluindo o pepino, causada pelo oomiceto *Pseudoperonospora cubensis* (Berk, M.A. Curtis, 1903) Rostovzev. Se trata de uma doença muito problemática nos períodos de alta umidade e temperaturas amenas, cujo os sintomas iniciais se apresentam na forma de pequenas manchas amareladas na face adaxial das folhas, e sob condições de alta umidade é possível observar a produção abundante de esporangióforos e esporângios na face abaxial das folhas (Figura 1c) (REIS, 2007). Fonte de resistência do tipo não-raça específica condicionada pela “perda de fator de suscetibilidade” (gene STAYGREEN) já foi detectada em pepino (WANG et al. 2019) e tem se mantido estável por mais de 50 anos.

Oídio – Essa doença é causada por um complexo de espécies incluindo, *Podosphaera xanthii* são relatados como agentes causais. É uma doença comum em cultivos protegidos de cucurbitáceas, incluindo o pepino. Seus sintomas são caracterizados pelo crescimento de uma massa branca pulverulenta formada pelo micélio (Figura 1D). Seu controle consiste na aplicação de fungicidas logo no início do aparecimento dos sintomas (CARVALHO, et al.,

2013; TÖFOLI, DOMINGUES, 2018). Fontes de resistência do tipo “perda de fator de suscetibilidade” (gene CsMLO1) já foram identificadas em pepino (NIE et al., 2015).

Antracnose – Representa uma das doenças mais frequentes e destrutivas dentre as cucurbitáceas, causada pelo fungo *Colletotrichum orbiculare*, seus sintomas são caracterizados pelo aparecimento de lesões necróticas irregulares de cor castanha à marrom que coalescem (Imagem 1E), destruindo os tecidos, chegando até a romper o limbo foliar (TÖFOLI, DOMINGUES, 2018). Fonte de resistência a antracnose do tipo “perda de fator de suscetibilidade” (gene STAYGREEN) já foi detectada em pepino (WANG et al. 2019).

Podridão de raízes e colo – É uma importante doença do pepino no Brasil e no Agreste de Pernambuco (PE). As doenças radiculares causadas por fitopatógenos, refletem em graves perdas na produção. Embora fungos, oomicetos, nematoides e bactérias sejam organismos muito diversificados, possuindo importantes características básicas em comum tais como a sobrevivência no solo por pelo menos uma fase de seu ciclo (CORREIA; MICHEREFF, 2018).

Tombamento de mudas (*Damping-off*) – As podridões radiculares e de colo em cucurbitáceas são causadas por diversos patógenos, dentre estes, destacam-se os oomicetos *Pythium* e *Phytophthora* (Lima; Henz, 1997; Correa et al., 2011). A disseminação desses organismos se dá a partir do trânsito de material vegetal com estruturas do patógeno, água e solo contaminados, além da possibilidade de estar em ferramentas e calçados (Going, Sutton, Grodzinski, 2003). A etiologia complexa torna o manejo da doença difícil, pois não há fungicidas registrados no ministério da Agricultura para o controle destes potenciais agentes causais (AGROFIT, 2023).

Murcha de *Phytophthora* – É uma doença com alto potencial destrutivo em solanáceas e em cucurbitáceas, podendo evoluir para a morte das plantas em um curto espaço de tempo. Em cucurbitáceas, oomicetos causam a podridão de colo (Figura 1F), de hastes e de frutos. Em todos os hospedeiros, a doença induz falhas de germinação bem como o tombamento de plântulas durante a formação das mudas (TÖFOLI; DOMINGUES, 2018).

Figura 1. Sintomas das principais doenças do pepino: mancha angular (a) (ZITTER, 2014); mosaico causado por *Cucumer mosaic virus* (CMV) (b) (DRAGICH, MELZER, NELSON, 2014); manchas amareladas na face adaxial das folhas, sintomas característicos de míldio na cultura do pepino (c) (CASTRO, et al., 2010); massa pulverulenta características de oídio, sinais do patógeno (d) (BAYER, 2021); Folha de pepino com antracnose causada por *Colletotrichum orbiculare* (e) (TÖFOLI, 2019); Raízes de pepineiro com podridão causada por *Pythium* (f) (REIS, 2023).



1.7. Taxonomia e diversidade dos gêneros *Phytophthora* e *Pythium*

O gênero *Phytophthora* é composto por mais de 200 espécies e está dividido em em 12 clados, derivados da diversidade genética e adaptação aos diferentes hospedeiros, partes deles habitats e zonas climáticas (BRAISER et al., 2022; KRONMILER et al., 2022). As cucurbitáceas, principalmente a cultura do pepino, são muito suscetíveis ao ataque de *Pythium* spp. enfatizando que segundo Kucharek (2000) é favorecida sob condições de temperatura e umidade elevadas. Tradicionalmente o controle de espécies de *Pythium* indutoras de tombamento de plântulas era realizado através da fumigação de substrato com brometo de metila. Todavia, após a proibição do uso deste composto, o alto custo de práticas de desinfestação química, associados ao surgimento de variedades resistentes do patógeno a esses compostos, levou à busca pela utilização de outras estratégias de suprimir os danos por este grupo de oomicetos (LUCON; AKAMATSU; HARA KAVA, 2008).

Há vários estudos da utilização do DNA mitocondrial para diferenciação de oomicetos. Diante este pressuposto, Choi et al. (2015) diz que a região gênica da subunidade 2 da enzima citocromo oxidase 'c' subunidade II (*cox2*) presente no DNA mitocondrial, é a que oferece informações para acusar as diferenças intraespecíficas significativas, sendo um dos mais recomendados para identificação a nível de espécie. Segundo Chen et al. (2022) e Crous et al. (2021), as análises de oomicetos usando a combinação de diferentes regiões gênicas, para gênero: ITS, LSU e *cox1*, combinadas às análises das regiões *cox2*, *nad9*, *Tub2*, *TigA* para nível de espécies, que a combinação de duas ou mais destas regiões, é suficiente para uma

identificação de confiabilidade (PEREIRA, 2023).

1.8. Taxonomia e diversidade do gênero *Fusarium*

Na década de 1990, a filogenia molecular passou a ser uma ferramenta crucial para caracterizações mais precisa de espécies dentro do gênero *Fusarium* (O'DONNELL et al. 2020). Estudos sobre a diversidade molecular do gênero *Fusarium* mostraram uma divergência evolutiva dentro de algumas espécies. Neste contexto, foi sugerida a separação do gênero em dois grandes clados, denominados de “clado basal” e “clado terminal” (GRÄFENHAN et al., 2011). Esses clados foram inicialmente estabelecidos com base nas sequências de duas regiões gênicas: ATP citrato liase (ACL-1) e a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB-2). No entanto, esses clados apresentaram baixo suporte filogenético, principalmente o clado basal (que foi desmembrado em diferentes gêneros em grupos monofiléticos). A análise de espécies dos novos gêneros concatenando informações dessas duas regiões gênicas aliadas ao fator de alongação de tradução 1 α (TEF-1), encontraram a estrita relação entre espécies anamorfas anteriormente classificadas de forma errônea (SCHOERS et al., 2011). Essas espécies foram reposicionadas em três clados (F1, F2 e F3), sendo que o clado F3 estava contido parcialmente dentro do clado F2, e F2 dentro de F1. O clado F3 chegou em níveis satisfatórios de aparato filogenético, porém F1 e F2 obtiveram sustentação em \cong 86% dos genes analisados (GEISER et al., 2021). Estes autores defendiam a manutenção dos clados F1 e F2, ao invés de restringi-los do clado F3, e salientando que este clado não incluiria espécies do tradicionalmente chamado *Fusarium solani*, pois a restrição ao clado F3 faria uma confusão desnecessária dentro deste grupo. Esta confusão é bem exemplificada pela espécie *F. moniliforme*, que até a década de 1990 continha espécies de vários anamorfos reclassificados como *F. proliferatum*, *F. verticillioides* e *F. subglutinans*, dentre outras. (MELO, 2011; SEIFERT et al., 2003).

O avanço nos estudos envolvendo este complexo culminou no estabelecimento de muitas novas espécies (DENIS et al., 2019). No entanto, uma controvérsia vigorou na taxonomia desse grupo de patógenos sendo que uma vertente se baseia na consolidação apenas dos clados F1 e F2 e outra que defende a existência do clado F3. A consolidação do clado F3 veio após a designação do gênero *Neocosmospora* para representar alguns importantes complexos incluindo *Neocosmospora solani* e *Neocospora falciformes* (O'DONNELL et al., 2008b, 2020). Análises recentes levaram a proposição e a adoção destas espécies dentro dos complexos *Fusarium/Neocosmospora*. (CROUS et al., 2021; BRAIT, 2023)

A classificação do gênero *Fusarium* constitui um estado anamórfico da ordem Hypocreales do filo Ascomycota (Seifert, 1996). Este grupo encontram-se as espécies: *Fusarium verticillioides* (Sacc. & Neirenberg), *Fusarium proliferatum* (Matsushima & Neirenberg) e *Fusarium subglutinans* (Wollenweber & Reinking), que representam os anamorfos do complexo de espécies de *Gibberella subglutinans* (Winelland), *Gibberella intermedia* (Kuhlman) (MELO, 2011).

1.9. Importância e estratégias de manejo das podridões de raiz e colo do pepino

O grande impacto socioeconômico das doenças radiculares causadas por fungos representa dano direto sobre a produção de culturas de interesse alimentar. Nesse contexto, em diversas situações há a perda ou substituição de cultivares com características produtivas interessantes, em decorrência do dano causado por estes patógenos, além de situações mais desastrosas tais como o abandono de áreas de cultivo (MICHEREFF et al., 2005b).

Mesmo que as doenças radiculares recebam pouca atenção quando comparadas às doenças de parte aérea, é válido salientar que não é devido à falta de importância destas doenças, e sim em decorrência à dificuldade de diagnose, visto que os sintomas iniciais ocorrem abaixo do nível do solo, aliado a complexidade de fatores que englobam a interação patógeno-hospedeiro-ambiente, além das características bióticas e abióticas do solo que influenciam direta e indiretamente o desenvolvimento dessas doenças (MICHEREFF et al., 2005a).

O controle dos fitopatógenos de solo através de pesticidas químicos não é usualmente econômico, tão pouco tecnicamente viável, fora a série de restrições ambientais envolvidas nessa estratégia. O controle biológico também é limitado, tendo poucos antagonistas que apresentam sucesso para se estabelecerem em um ambiente tão competitivo como é o solo. Diante destes pressupostos, a resistência genética da planta hospedeira é uma estratégia extremamente útil no manejo de doenças causadas por fitopatógenos habitantes do solo (LIMA; ASSUNÇÃO; VALLE, 2005).

Objetivos do presente trabalho

Sabendo-se dos desafios de manejo e controle de doenças radiculares causadas pelos gêneros *Fusarium*, *Pythium* e *Phytophthora*, o presente trabalho buscou:

- (i) Caracterizar a diversidade dos patógenos associados com a podridão de raízes e colo do pepino no Brasil;

- (ii) Buscar fontes de resistência para *Phytophthora capsici* (um componente desse complexo de patógenos) em germoplasma de pepino;
- (iii) Catalogar a variabilidade genética e molecular dentro grupo de agentes causais de podridão de raízes e colo do pepino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT (2023). Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/SDA Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofitcons. Acessado em 13/12/2023.

AJURU, M. G. E.; OKOLI, B. E. (2013). The morphological characterization of the melon species in the family Cucurbitaceae Juss., and their utilization in Nígeria. *International Journal of Modern Botany, Rosemead*, v. 3, n. 2, p. 15-19,

ALMEIDA, D. (2006). Cucurbitáceas. In: *Manual de Culturas Hortícolas*. Lisboa: Presença, p.111-194. v. 2.

BAYLEY, L. H. (1969). *Manual of Cultivated Plants*. Macmillian Company, NW. p. 390-393.

BERIAN, L. O. S; OCCHENA, E. M. (2018). Doenças Bacterianas. In: FILHO, J. U. T. B; FREITAS, P. S. L; BERIAN, L. O. S; GOTO, R. (Org.) *Hortaliças-fruto*. Maringá: Eduem, 2018, p.72-109

BRASIER, C.; SCANU, B.; COOKE, D. & JUNG, T. (2022). *Phytophthora*: An ancient, historic, biologically and structurally cohesive and evolutionarily successful generic concept in need of preservation. *IMA Fungus*. 13(1): 1-25.

CARVALHO, A. D. F; AMARO, G. B; LOPES, J. F; VILELA, N. J; FILHO, M. M; ANDRADE, R (2013). *A cultura do pepino*. Brasília, Embrapa Hortaliças, Circular Técnica 113, 18pp.

CHEN, Q; BAKHSHI, M.; BALCI, Y; BRODERS, K. D; CHEEWANGKON, R; CHEN, S. F; FAN, X. L; GRAMAJE, D; HALLEEN, F.; HORTA, J. M; JIANG, N; JUNG, T; MÁJEK, T; MARINCOWITZ, S; MILENKOVIĆ, T; MOSTERT, L; NAKASHIMA, C; FAZIHA, I. N; PAN, M; RAZA, M; SCANU, B; SPIES, C. F. J; SUHAIZAN, L; SUZUKI, H.; TIAN, C.M.; TOMŠOVSKÝ, M.; ÚRBEZ-TORRES, J. R.; WANG, W; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J.; YANG, Q; YANG, X; ZARE, R.; ZHAO, P; GROENEWALD, J. Z; CAI, L. & CROUS, P. W. (2022). Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 4. *Studies in Mycology*. 101: 417–564.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. (2024). Disponível em: <http://www3.ceasa.gov.br/siscomweb/>>. Acessado em 01/02/2024.

CORREA, E. B; GALVÃO, J. A. H; BETTIOL, W. (2011). Controle biológico da podridão radicular e promoção de crescimento em pepino hidropônico com microorganismos em manguezais. *Embrapa, Pesquisa Agropecuária brasileira*. Brasília-DF. v. 46, ed. 2, p.130- 136. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011000200003>

CORREA, K. C; MICHEREFF, S. J. (2018). Fundamentos e desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos. In: MICHEREFF, S. J; LOPES, U. P. (Eds.) *Desafios do Manejo de Doenças Radiculares Causadas por Fungos*. Recife: EDUFRPE, 2018. p. 1-16.

COSTA, G. A. G. (2012). *Cucurbitaceae na floresta Atlântica de terras baixas ao norte do rio São Francisco*. 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia vegetal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE.

CROUS, P. W; ROSSMAN, A. Y; AIME, M. C; ALLEN, W. C.; BURGESS, T; GROENEWALD, J. Z; CASTLEBURY, L. A. (2021). Names of phytopathogenic fungi: A

practical guide. *Phytopathology*. 111(9): 1500-1508.

DAS, A., SINGH, S., ISLAM, Z., MUNSHI, A. D., BEHERA, T. K., DUTTA, S. et al. (2022). Current progress in genetic and genomics-aided breeding for stress resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Scientia Horticulturae*, 300, 111059.

DEAKIN, J. R; BOHN, G. W; WHITAKER, T. W. (1971). Intraespecific hybridization in *Cucumis*. *Econ. ed.* 25, p.195-211.

FILGUEIRA, F. A. R. (2013). *Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. 3. ed. rev. e ampl. Viçosa, MG: UFV.

FONTES, P. C. R.; PUIATTI, M. (2005). Cultura do pepino. In: FONTES, P. C. R. (Ed.). *Olericultura: teoria e prática*. Viçosa: DFT - Setor de Olericultura/UFV, 1. ed. p. 439-455

FONTES, P. C. R.; PUIATTI, M. (2019). Cultura do pepino. In: FONTES, P. C. R. (Ed.). *Olericultura: teoria e prática*. Viçosa: DFT - Setor de Olericultura/UFV, 2. ed. p. 575-593

FONTES, P. C. R; NICK, C. (2019). *Olericultura: Teoria e Prática*. 2. ed. Viçosa: UFV,

GRÄFENHAN, T; SCHROERS, H. J; NIRENBERG, H. I; SEIFERT. K. A. (2011). An overview of the; taxonomy, phylogeny, and typification of nectriaceous fungi in *Cosmospora*; *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella*, and *Volutella*. *Studies in Mycology*, v. 68, p. 79–113. DOI: 10.3114/sim.2011.68.04

GOING, N. O; SUTTON, J.C.; GRODZINSKI, B. (2003). Relationships of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v. 25, n.2, p.155-167.

GONÇALVES-PEREIRA, D. (2023). *Phytophthora capsici*: Diversidade e resistência em *Solanum (Lycopersicon)*. 186 f. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, DF.

HENZ, G. P.; LIMA, M. F. (1997). Resistência de plântulas de cultivares de cucurbitáceas à podridão-das-raízes causada por *Phytophthora capsici*. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPATSA/7348/1/OPB1140.pdf>

HORA, R. C; CAMARGO, O. A. C; BUZZANINI, A. C (2018). Cucurbitáceas e outras. In: FILHO, J. U. T. B; FREITAS, P. S. L; BERIAN, L. O. S; GOTO, R. (Org.) *Hortaliças-fruto*. Maringá: Eduem, p.72-109

HUANG, S., LI, R., ZHANG, Z., LI, L. I., GU, X., FAN, W., et al. (2009). The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nature genetics*, 41(12), 1275-1281.

JEFFREY, C. A (1980). Review of the Cucurbitaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, Oxford, v.81, no. 3, p. 233-247,

KIM, J. S., JUNG, J. D., LEE, J. A., PARK, H. W., OH, K. H., JEONG, W. J, et al. (2006). Complete sequence and organization of the cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Baekmibaekdadagi) chloroplast genome. *Plant Cell Reports*, 25, 334-340.

KRONMILLER, B. A.; FEAU, N.; SHEN, D.; TABIMA, J. F.; ALI, S. S.; ARMITAGE, A. D.; ARREDONDO, F.; BAILEY, B. A.; BOLLMANN, S. R.; DALE, A.; HARRISON, R.J.; HRYWKI, K.; KASUGA, T.; MCDUGAL, R.; NELLIST, C.F.; PANDA, P.; TRIPATHY,

S.; WILLIAMS, N.M.; YE, W.; WANG, Y.; HAMELIN, R. C., GRUNWALD, N. J. (2022). Comparative genomic analysis of 31 *Phytophthora* genomes reveal genome plasticity and horizontal gene transfer. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 36(1): 26-46.

KUCHAREK, T.; MITCHELL, D. (2000). Diseases of agronomic and vegetable crops caused by *Pythium*. In: *Plant pathology fact sheet*. Gainesville: Institute of Food and Agriculture Service, p.53

LI, Q., LI, H., HUANG, W. U., XU, Y., ZHOU, Q., WANG, S., et al. (2019). A chromosome-scale genome assembly of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *GigaScience*, 8(6), giz072.

LIMA, G. S. A; ASSUNÇÃO, I. P; VALLE, L. A. C (2005). Controle genético de doenças radiculares. In: *Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais*. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.). *Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais*. Recife: EDUFRPE, p. 247-270.

LUCON, C. M. M; AKAMATSU, M. A; HARAKAVA, R. (2008). Promoção de crescimento e controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias. *Embrapa, Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília-DF. v. 43, n. 6, p.691-697. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000600004>

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2024). Disponível em: <https://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/>

MELO, M. P. (2011). Detecção de espécies de *Fusarium* potencialmente produtoras de micotoxinas em grãos de milho no nordeste do Brasil. 64 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

MICHEREFF, S. J; ANDRADE, D. E. G. T; PERUCH, L. A. M. (2005a). Inóculo de patógenos radiculares. In: MICHEREFF, S. J; ANDRADE, D. E. G. T; MENEZES, M. (Eds.); *Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais*. Recife: Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, p. 93-124.

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

NIE, J., WANG, Y., HE, H., GUO, C., ZHU, W., PAN, J., CAI, R. (2015). Loss-of-function mutations in CsMLO1 confer durable powdery mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Frontiers in plant science*, 6, 1155.

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

OLIVEIRA, C. M. G; ROSA, J. M. O; GLORIA, R; BRAGA, K. R. B. (2018). Nematoides em

Cucurbitaceas. In: FILHO, J. U. T. B; FREITAS, P. S. L; BERIAN, L. O. S; GOTO, R. (Org.) Hortaliças-fruto. Maringá: Eduem, , p.72-109

PAVAN, M. A; SKATE, R. K; MOURA, M. F; BRAGA, R. S. (2018). Principais viroses em cucurbitáceas. In: FILHO, J. U. T. B; FREITAS, P. S. L; BERIAN, L. O. S; GOTO, R. (Org.) Hortaliças-fruto. Maringá: Eduem, p.72-109

PAWEŁKOWICZ, M., ZIELIŃSKI, K., ZIELIŃSKA, D., PLAĐER, W., YAGI, K., WOJCIESZEK, M. PRZYBECKI, Z. (2016). Next generation sequencing and omics in cucumber (*Cucumis sativus* L.) breeding directed research. *Plant Science*, 242, 77-88.

PLAĐER, W., YUKAWA, Y., SUGIURA, M., MALEPSZY, S. (2007). The complete structure of the cucumber (*Cucumis sativus* L.) chloroplast genome: its composition and comparative analysis. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 12(4), 584-594.

PREVITAL, E., GASTALDI, A. C. R., NOVAKOSKI, A. S., FRANCISCO, J. P., SILVA, R. A., LOPES, A. D. (2022). Potencial produtivo de frutos de pepino (*Cucumis sativus* L.) para conserva sob diferentes sistemas de condução. *Research, Society and Development*. v. 11, n. 1. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24841>

PRZYBECKI, Z. (2016). Next generation sequencing and omics in cucumber (*Cucumis sativus* L.) breeding directed research. *Plante Science*. v.22, p.77-88.

QUEZADO, A. M. S; CRUZ, D. M; LOPES, C. A. (1995). Murcha bacteriana em pepino sob estufa plástica no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, DF, v. 20, p. 300,

QUEZADO, A. M. S; SOUZA, R. M.; TAKATSU, A. (1990). Ocorrência de mancha angular do pepino (*Cucumis sativus*) causada por *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, DF, v. 15, n. 2, p 126.

REIS, A. (2007). *Comunicado Técnico 44*. Embrapa, [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/781611/1/cot44.pdf>>.

ROBINSON, R. W.; MUNGER, H. M.; WHITAKER, T. W.; BOHN, G. W. (1976). Genes of Cucurbitaceae. *HortScience*, Alexandria, v.11, n.6, p.554-568,

SCHROERS, H. J; GRÄFENHAN, T.; NIRENBERG, H. I; SEIFERT, K. A. (2011). A revision of *Cyanonectria* and *Geejayessia* gen. nov., and related species with *Fusarium*-like anamorphs. *Studies in Mycology*, v. 68, p. 115–138.

SCHAEFER, H; RENNER, S. S. (2011). Phylogenetic relationships in the order Cucurbitales and a new classification of the gourd family (Cucurbitaceae). *Taxon*, v. 60, p. 122–13.

SCHALLENBERGER, E. (2010). Pepino orgânico tem alta produtividade sem uso de agroquímicos. Epagri, Florianópolis, Disponível em: <<https://www.epagri.sc.gov.br>>. Acesso em: 19 fev. 2023.

SEIFERT, K.A; AOKI, T; BAAYEN, R. P; BRAYFORD, D; BURGESS, L. W; CHRULZE, S; GAMS, W; GEISER, D; GRUYTER, J; LESLIE, J. F. (2003). The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. *Mycological Research News*. Amsterdam, v. 107, p. 643-644.

- TÖFOLI, J. G; DOMINGUES, R. J. (2018). Doenças Fúngicas em Cucurbitáceas. In: FILHO, J. U. T. B; FREITAS, P. S. L; BERIAN, L. O. S; GOTO, R. (Org.) Hortaliças-fruto. Maringá: Eduem, p.72-109
- TRANI, E. P; PASSOS, F. A; ARAUJO, H. S. (2015). Calagem e adubação do pepino. Campinas, Instituto Agrônômico de Campinas, Circular Técnica, 13p.
- WENG, Y; WEHNER, T. C. (2017). Cucumber Gene Catalog. In: CHAIR, A. L; BEAVER, L. W; NG, T. J; (Org.). Cucurbit Genetics Cooperative. Charleston: U.S. Vegetable Laboratory, p. 17-54.
- WANG, Y., TAN, J., WU, Z., VANDENLANGENBERG, K., WEHNER, T. C., WEN, C., WENG, Y. (2019). STAYGREEN, STAY HEALTHY: A loss-of-susceptibility mutation in the STAYGREEN gene provides durable, broad-spectrum disease resistances for over 50 years of US cucumber production. *New Phytologist*, 221(1), 415-430.
- WÓYCICKI, R., WITKOWICZ, J., GAWROŃSKI, P., DĄBROWSKA, J., LOMSADZE, A., PAWEŁKOWICZ, M., et al. (2011). The genome sequence of the North-European cucumber (*Cucumis sativus* L.) unravels evolutionary adaptation mechanisms in plants. *PloS one*, 6(7), e22728.
- YANG, L.; KOO, D.H.; LI, Y.; ZHANG, X.; LUAN, F.; HAVEY, M.J.; JIANG, J.; WENG, Y. (2012). Chromosome rearrangements during domestication of cucumber as revealed by high-density genetic mapping and draft genome assembly. *Plant J*, 71 pp. 895-906.
- ZHANG, W.W.; PAN, J.S.; HE, H.L. ZHANG, C.; LI, Z.; ZHAO, J.L.; YUAN, X.J.; ZHU, L.H.; HUANG, S.W.; CAI, R. (2012). Construction of a high density integrated genetic map for cucumber (*Cucumis sativus* L.) *Theor Appl Genet*, 124 pp. 249-259.

CAPÍTULO II

Diversidade de espécies de oomicetos associadas com podridão radicular e tombamento em pepino (*Cucumis sativus*) no Brasil.

Diversidade de espécies de oomicetos associadas com podridões radiculares e tombamentos em pepino.

B.W.S. Lima¹, M.E.N Fonseca², L.S. Boiteux^{1,2} & A. Reis^{1,2}

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Fitopatologia, Recife–PE, 52171–900, Brasil.

²Embrapa Hortaliças, Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPQ), 70275–970, Brasília–DF, Brasil.

RESUMO

A podridão radicular e tombamento são importantes doenças que afetam a cultura do pepino (*Cucumis sativus* L.) e de outros membros da família Cucurbitaceae. Na literatura, essas doenças são atribuídas a um complexo de patógenos, com especial destaque para os oomicetos dos gêneros *Globisporangium*, *Pythium* e *Phytophthora*. No entanto, pouco se sabe sobre quais agentes causais estão envolvidos nessas doenças e estudos de caracterização molecular dessas espécies são escassos no Brasil. De posse destas informações, este estudo teve como objetivo efetuar a caracterização molecular de oomicetos causadores de tombamentos e de podridões radiculares e de colo em pepino. No presente trabalho, uma coleção de isolados de oomicetos associados ao pepino foi obtida de plantas com sintomas de murcha, tombamento, podridão radicular e podridão de frutos, em cultivo protegido e no campo, em áreas produtoras distintas. Os isolados foram cultivados em meio de cultura V8 20% + ágar. Todos os isolados foram patogênicos em plantas de pepino cultivar ‘Caipira’. O DNA total foi extraído de isolados patogênicos e utilizado como molde para a amplificação via PCR de duas regiões genômicas para isolados de *Globisporangium/Pythium*: o espaçador transcrito interno (ITS) e o gene codificador da subunidade da enzima citocromo oxidase (*cox2*). Para os isolados de *Phytophthora* foi usada apenas a informação de *cox2*. A identificação molecular dos isolados foi realizada com base na filogenia dessas regiões genômicas. A comparação das sequências de nucleotídeos e a análise filogenética dos oomicetos associados ao pepino indicou a presença de complexos de agentes causais, incluindo *Phytophthora capsici*, *Globisporangium spinosum*, *G. splendens* e *G. attrantheridium*. Este é o primeiro relato desse complexo de patógenos causando podridão radiculares e tombamentos em cultivares de pepino no Brasil.

Palavras-chave: Cucurbitaceae, podridão de raiz, damping-off, *Phytophthora capsici*, *Pythium* spp.

ABSTRACT

Root-rot and damping-off are important diseases of the cucumber crop (*Cucumis sativus* L.) and other members of the family Cucurbitaceae. In the literature, these diseases are attributed to a complex of pathogens, with special emphasis on oomycetes of the genera *Globisporangium/Pythium* and *Phytophthora*. However, little is yet known about which causal agents are involved in these diseases. In addition, the molecular characterization of these species are scarce in Brazilian. With this information at hand, this study aimed to perform the molecular characterization of oomycetes causing damping-off and root and crown rot in cucumber. In the present work, a collection of isolates cucumber-associated oomycetes was obtained from plants showing symptoms of wilting, damping-off, root rot, and fruit rot, in protected cultivation and in the field, in distinct producing areas. The isolates were cultivated in 20% V8 culture medium + agar. All isolates were pathogenic in cucumber seedlings (cultivar 'Caipira'). Total DNA was extracted from pathogenic isolates and used as a template for the amplification via PCR of two genomic regions for *Globisporangium/Pythium* isolates: the internal transcribed spacer (ITS) and the gene coding for the subunit of the enzyme cytochrome-c- oxidase (*cox2*). Only the genomic information of *cox2* was used to characterize the *Phytophthora* isolates. The molecular identification of the isolates was based upon the phylogeny of these genomic regions. Comparison of the nucleotide sequences and the phylogenetic analysis of the cucumber-associated oomycetes indicated the presence of complex of causal agents, including *Phytophthora capsici*, *Globisporangium spinosum*, *G. splendens*, and *G. attrantheridium*. This is the first report of this complex of pathogens causing root-rot and damping-off diseases in cucumber cultivars in Brazil.

Keywords: Cucurbitaceae, root rot, damping-off, *Phytophthora capsici*, *Pythium* spp.

1. INTRODUÇÃO

Muitas das espécies da família Cucurbitaceae são hortaliças de elevada importância socioeconômica, sendo os seus frutos e sementes destinados à alimentação humana e animal (REIS & FEITOSA, 2021). Os frutos do pepino (*Cucumis sativus* L.) são muito apreciados e consumidos em todas as regiões, apresentando uma grande importância econômica e social dentro do agronegócio de hortaliças no Brasil, especialmente para pequenos produtores (CARVALHO et al., 2013). O pepino apresenta diferentes segmentos varietais com várias classificações e com diferentes finalidades mercadológicas (CARVALHO et al., 2013).

Aproximadamente 200 patógenos afetam as cucurbitáceas, e destas, a grande maioria é causada por fungos e oomicetos (FARR & ROSMMAN, 2020; REIS & FEITOSA, 2021; ZITTER et al., 1996). Os principais oomicetos responsáveis por danos econômicos estão classificados nos gêneros *Albugo*, *Aphanomyces*, *Bremia*, *Hyaloperonospora*, *Phytophthora*, *Pasmopara*, *Pythium*, *Phytopyrium*, *Peronospora* e *Pseudoperonosopra* (KAMOUN et al., 2015; FEITOSA, et al., 2023). As podridões radiculares e de colo da cultura do pepino e outras cucurbitáceas são causadas por um complexo de patógenos, dentre estes, destacam-se espécies dos gêneros *Pythium* e *Phytophthora* (LIMA & HENZ, 1997; CORREA et al., 2011). As espécies de *Pythium* são favorecidas por condições de temperatura e umidade elevadas (KUCHAREK 2000). Por sua vez, um subgrupo de espécies do gênero *Phytophthora* se beneficia, de condições ambientais com temperaturas mais elevadas (acima de 20°C) (YANG et al., 2014). Além disso, um subgrupo distinto de espécies de *Phytophthora* está mais bem adaptado a temperaturas amenas situadas entre 12–22°C (ERWIN & RIBEIRO, 1996; HO, 1987).

A família Peronosporaceae Oomycota é um grupo monofilético de patógenos vegetais com interações com as plantas hospedeiras do tipo biotróficas e hemibiotróficas (THINES & CHOI 2016). Atualmente, a família Peronosporaceae compreende 19 clados genômicos (WINKWORTH et al., 2022), compreendendo cerca de 1.000 espécies, sendo mais de 300 delas colocadas dentro do gênero *Phytophthora* (THINES & CHOI 2016; WINKWORTH et al., 2022).

O gênero *Phytophthora* pertence ao Reino Stramenopliles, Filo Oomycota, Classe Oomycetes, Ordem Peronosporales, Família Peronosporaceae (ROSKOV et al., 2016). O gênero *Phytophthora* foi descrito pela primeira vez por Anton de Bary em 1876, tendo *P. infestans* como espécie tipo, afetando atualmente uma ampla gama de plantas hospedeiras (ERWIN & RIBEIRO, 1996; LUZ, 1996, LUZ et al., 2001; SANTOS et al., 2014). A murcha

de *Phytophthora* é uma doença com alto potencial destrutivo em cucurbitáceas, podendo evoluir para a morte das plantas em um período muito curto. Em todos os hospedeiros, a doença induz falhas de germinação bem como o tombamento de plântulas durante a formação das mudas (TÖFOLI & DOMINGUES, 2018).

O gênero *Pythium* pertence ao Reino Straminiplina, Filo Oomicota, e foi descrito em 1858 por Pring-Shei, e hoje engloba aproximadamente 140 espécies, cujo suas identificações geralmente baseadas em características morfológicas (KAGEYAMA, 2014; PLAATS-NITERINK, 1981). As espécies desse grupamento taxonômico são alvos de constantes estudos devido ao amplo número de hospedeiras e de sua disseminação geográfica. Considerados parasitas facultativos, são geralmente associados a sintomas nos tecidos de plantas mais jovens, podridões radiculares e de sementes, e em tecidos vegetais que tem contato direto com o solo (BUSH et al., 2003; FEITOSA et al., 2023). Desde a sua descrição, o gênero *Pythium* sofreu inúmeras mudanças de classificação taxonômica (UZUHASHI et al., 2010). Dentre as tentativas de organização taxonômica desse gênero, a mais aceita envolve a sua subdivisão mas ainda mantendo o gênero *Pythium*, porém tendo o surgimento de mais cinco novos gêneros, baseados em características morfológicas e filogenéticas, são eles: *Globisporangium*, *Elongisporangium*, *Ovatisporangium* e *Pilasporangium* (UZUHASHI et al., 2010). E seguindo os mesmos parâmetros, uma nova abordagem taxonômica (BALA et al., 2010) propôs uma subdivisão adicional, resultando na criação do gênero *Phytopythium* Abad. (DE COCK et al. 2015). Esse gênero engloba espécies com características que se assemelham bastante às do gênero *Phytophthora* (para revisão ver BARBOZA, 2020).

Vários estudos têm utilizado a informação derivada do DNA mitocondrial para diferenciação de oomicetos. Os bancos de dados mais robustos englobam as sequencias correspondentes a região gênica do gene codificador da subunidade 2 da enzima citocromo oxidase 'c' subunidade II (*cox2*) presente no DNA mitocondrial. ITS e *cox2* oferecem informações filogenéticas que permitem evidenciar diferenças intraespecíficas significativas, sendo um dos mais recomendados para identificação a nível de espécie (CHOI et al., 2015). As análises de oomicetos usando a combinação de diferentes regiões gênicas, para nível de gênero (por exemplo ITS, LSU e *cox1*) combinadas às análises das regiões *cox2*, *nad9*, *Tub2*, *TigA* para nível de espécies são suficientes para uma identificação confiável dentro deste taxum (CHEN et al., 2022; CROUS et al., 2021; PEREIRA, 2023).

Além de apresentar um elevado custo, o manejo químico e cultural das doenças causadas pelos oomicetos *Pythium* e *Phytophthora* é também tecnicamente de difícil implementação e com baixa eficiência, principalmente pelo fato de se tratarem de organismos habitantes do solo

e apresentarem uma alta capacidade de sobrevivência e uma ampla gama de hospedeiras (REIS et al., 2023). De posse destas informações, o presente estudo teve como objetivo efetuar a caracterização molecular de oomicetos causadores de tombamentos e de podridões radiculares e de colo em *Cucumis sativus*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Local dos estudos

Os trabalhos foram conduzidos nos Laboratórios de Fitopatologia e Melhoramento Vegetal e nas casas de vegetação da Embrapa Hortaliças, localizada na zona rural da Ponte Alta, em Brasília-DF, a 15°56'00" latitude sul, 48°08'00" longitude oeste e altitude 997,6 metros.

2.2. Obtenção e conservação dos isolados

Os isolados fúngicos foram retirados tanto da coleção fúngica do CNPH, quanto em condições de campo, obtidos a partir de plântulas e frutos de pepino apresentando sintomas de murcha, tombamento, podridão radicular e podridão em frutos, em cultivo protegido e em campo, em diversas regiões produtoras de pepino (**Tabela 1**) e 1 isolado de berinjela (*Solanum melongena* L.) que se mostrou promissor em bioensaios anteriores com alta agressividade. Para o isolamento foi seguido o protocolo de isolamento indireto de microrganismos em órgãos lenhosos ou carnosos, descrito por Carollo e Filho (2016), retirando fragmentos das raízes, passando pelo processo de desinfestação e por fim, depositados em meio seletivo para oomicetos. Os isolados dos oomicetos da micoteca da Embrapa Hortaliças são mantidos principalmente pelo método de conservação em óleo mineral (BUEL & WESTON, 1947), e todos foram recuperados desta coleção em meio de cultura V8 20%+ágar.

Tabela 1. Isolados da coleção da Embrapa Hortaliças classificados (via morfologia) como *Phytophthora* e *Globisporangium* (*Pythium*) obtidos de pepino e berinjela, contendo o código, gênero, planta hospedeira, cidade/estado e ano de coleta.

Isolado	Gênero	Hospedeira	Cidade/Estado	Ano de Coleta
PCPE 16	<i>Phytophthora</i>	Pepino	Brazlândia-DF	2023
PCPE17	<i>Phytophthora</i>	Pepino	Brazlândia-DF	2023

PN 22	<i>Phytophthora</i>	Pepino	Padre Bernardo–GO	2021
PN 23	<i>Phytophthora</i>	Pepino	Padre Bernardo–GO	2021
PCBE 23	<i>Phytophthora</i>	Berinjela	Brazlândia–DF	2023
PYT 386	<i>Globisporangium</i>	Pepino	Bonito–PE	2011
PYT 728	<i>Globisporangium</i>	Pepino	Camocim de S. Félix–PE	2011
PYT 836	<i>Globisporangium</i>	Pepino	Chã Grande–PE	2019
PYT 837	<i>Globisporangium</i>	Pepino	Chã Grande–PE	2021

2.3. Caracterização molecular dos isolados de oomicetos

Os isolados foram submetidos ao processo de extração de DNA utilizando o método de CTAB 2X, que utiliza solventes orgânicos, tais como álcool isoamílico e clorofórmio, essencialmente como descrito (SAGHAI-MARROF et al. 1984; BOITEUX et al. 1999). A identificação molecular dos isolados foi realizada com base na filogenia de sequências de duas regiões genômicas para isolados de *Globisporangium/Pythium*: espaçador interno transcrito do DNA ribossomal nuclear (ITS) e o gene codificador da subunidade da enzima citrocomo oxidase (*cox2*). Para os isolados de *Phytophthora* foi usada apenas a informação de *cox2*. Para amplificação do espaçador transcrito interno (ITS) foi utilizado o par de primers: ‘**ITS4**’ (5’–GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G–3’) e ‘**ITS5**’ (3’–TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC–5’) (WHITE et al., 1990). Para a região correspondendo ao gene codificador da segunda subunidade da enzima citrocomo oxidase (*cox2*) foram utilizados os iniciadores de síntese: ‘**PF34**’ (5’–GGC AAA TGG GTT TTC AAG ATC C–3’) e ‘**PF35**’ (5’–CCA TGA TTA ATA CCA CAA ATT TCA CTA–3’) (CHEN, et al., 2022; CROUS et al., 2021; HUDSPETH et al., 2000).

Todos os ensaios de PCR foram realizados utilizando termociclador Bio-Rad T100™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Para amplificação da região ITS, a PCR foi realizada a preparação de um master mix contendo: 1,5µL de DNA (30 ng/µL); 1,5 µL de MgCl₂, 1,0 µL de cada primer (10 mM); 1µL de dNTPs (10 mM); 0,5µL de *Taq* DNA polimerase (5 U/µL) e 16,5 µL de água Milli-Q, com volume da reação final de 25 µL (Caixeta et al., 2013). O ciclo da PCR constitui-se da desnaturação inicial a 95 °C por 1 minuto; e 35 ciclos seguindo por desnaturação inicial a 92 °C por 35 segundos, anelamento a 62°C por 55 segundos e extensão a 72 °C por 50 segundos, e por fim, um ciclo de extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Para amplificação da região *cox2*, a PCR foi realizada através da preparação de um master mix contendo: 1,5 µL de DNA (30 ng/µl); 1,5 µL de MgCl₂, 1,25 µL de cada primer (10 mM); 1 µL de dNTPs (10mM); 0,64 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U/µL) e 14,36 µL de água Milli-Q, com volume da reação final de 25 µL (Caixeta et al., 2013). O ciclo da PCR constituiu-se da desnaturação inicial a 96 °C por 4 minutos; e 35 ciclos seguindo por desnaturação inicial a 96 °C por 30 segundos, anelamento a 50 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, e por fim, um ciclo de extensão final a 72 °C por 10 minutos. Por fim, os produtos da PCR de ambas as regiões gênicas foram purificados com o kit PureLink® PCR Purification (Invitrogen®, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Os produtos contendo amplicons foram separados em eletroforese em gel de agarose (1,5%), e a confirmação das concentrações de dsDNA foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop® Lite (**Tabela 2**). E por fim, levados ao Laboratório de Genômica da Embrapa Hortaliças para sequenciamento.

Tabela 2. Quantificação em NanoDrop® dos produtos de PCR das regiões gênicas ITS e *cox2* para isolados *Phytophthora* e *Globisporangium*.

Isolado	ITS (ng/µl)	COX2 (ng/µl)
PCPE 16	9,3	7,3
PCPE17	7,8	6,4
PN 22	6,0	10,7
PN 23	5,8	10,4
PCBE 23	3,6	8,7
PYT 386	7,4	11,5
PYT 728	6,9	10,6
PYT 836	6,7	12,0
PYT 837	5,0	10,7

2.4. Análise filogenética

Os dados da região ITS e do gene *cox2* de oomicetos utilizados para comparação com os isolados neste trabalho foram obtidos a partir de genomas de isolados de referência depositados no GenBank. Os contigs de cada isolado foram construídos combinando as sequências obtidas com os primers correspondentes no software SeqMan (Lasergene®, Madison, WI). As sequências dos isolados foram alinhadas no programa Geneious® 8.1.9 utilizando o algoritmo ClustalW. Os contigs foram ajustados manualmente para garantir que os alinhamentos fossem mantidos de acordo com as sequências de referência. As análises

filogenéticas foram realizadas utilizando Máxima Verossimilhança (ML) e inferência Bayesiana (BI). Os dois métodos disponíveis como “plugins” do programa Geneious® 8.1.9 foram utilizados neste trabalho. Para ML os parâmetros utilizados foram: 1000 pseudoréplicas (-m GTRGAMMA -p 12345 -k -fa -N 1000 -x 12.345), modelo GTR GAMMA. Para o BI, inicialmente o melhor modelo de substituição evolutiva foi estimado pelo programa MrModeltest 2.3, sendo definido como HKY85. Quatro algoritmos “Markov Chain Monte Carlo” (MCMC) foram conduzidos por 107 gerações, com amostragens a cada 1.000 gerações. A convergência de todos os parâmetros foi verificada utilizando o Tracer versão 1.7 (RAMBAUT et al. 2018) e os primeiros 25% das gerações foram descartados como *burn-in*.

2.5. Bioensaios de patogenicidade: Preparo do inóculo, inoculação e avaliação

A inoculação foi realizada utilizando o método de suspensão de zoósporos, em que os isolados foram cultivados em placas de Petri não vedadas contendo meio V8 20% e submetidos à um stress, levando-os à câmara germinadora $\pm 28^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo 12 horas luz/12 horas escuridão durante um período de 24 horas, e à temperatura ambiente sob luz constante, forçando a produção de zoosporângios (**Figura 3**). Nas placas contendo abundante esporulação (**Figura 3**) foram adicionadas 20 mL de água destilada esterelizada (ADE) e posteriormente deixadas em refrigerador à temperatura de 6°C durante $\cong 2$ horas, por conseguinte foram deixadas em temperatura ambiente por 30 minutos, visando a liberação de zoósporos. A solução foi filtrada em gaze dupla, em seguida foi retirada uma alíquota para ser aquecida, a fim de interromper a motilidade dos zoósporos, permitindo a contagem em câmara de Neubauer. A suspensão foi ajustada para 2×10^4 zoósporos/mL⁻¹. Em seguida, as plântulas com $\cong 14$ dias apresentando o início do lançamento do primeiro par de folhas verdadeiras, foram transferidas para vasos de 0,5 L contendo solo adubado estéril, e pipetados 3 mL⁻¹ de suspensão no colo de cada plântula. A avaliação dos sintomas foi feita a cada 48 horas. As plântulas que estavam tombadas e/ou murchas/mortas, eram coletadas para re-isolamento, e as colônias do oomiceto obtidas foram comparadas com as colônias originais.

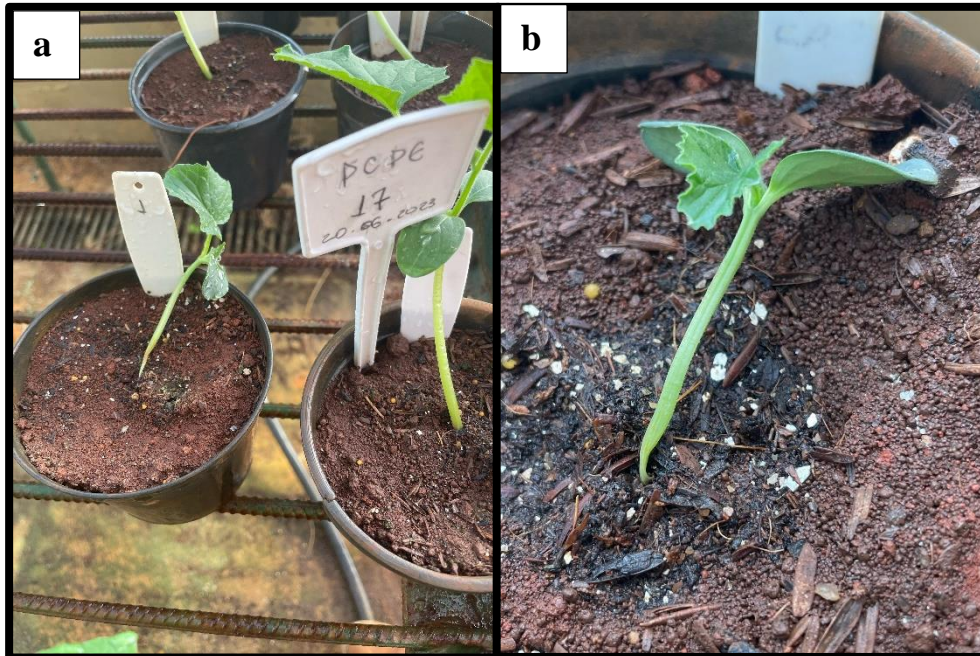
3. RESULTADOS

3.1. Patogenicidade em plântulas de pepino

Todos os isolados obtidos de pepino (e um de berinjela) classificados previamente (via morfologia) como *Phytophthora* ou *Globisporangium* (= *Pythium*) se mostraram patogênicos em bioensaios envolvendo inoculação controlada de plântulas de pepino cultivar ‘Caipira’,

complementando assim o postulado de Koch.

Figura 1. Plântulas de pepino, dois dias após a inoculação, apresentando sintomas de estrangulamento do colo e tombamento causado por *Phytophthora capsici* isolados PCPE17. (a) e PCBE 23 (b).



3.2. Amplificação das regiões ITS e *cox2* dos isolados de oomicetos associados com o pepino

Os produtos de PCR resultaram em uma única banda de cada região, mostradas em gel de agarose (1,5%) variando entre 400~1000 pb dependendo da região genômica amplificada (**Figuras 2 e 3**).

Figura 2. Amplificação da região ITS (5.8S) dos isolados de *Phytophthora* e *Globisporangium* (*Pythium*) obtidos de pepino e berinjela utilizando os primers ITS4 e ITS5 (WHITE et al., 1990). Utilizando o marcador 1Kb Ladder Plus®.

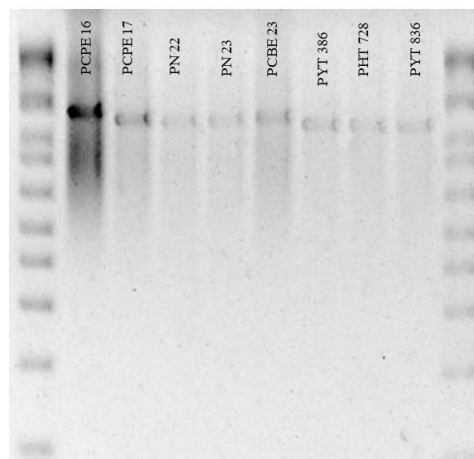


Figura 3. Amplificação da região *cox2* dos isolados de *Phytophthora* e *Globisporangium* obtidos de pepino e berinjela, utilizando os primers ITS4 e ITS5. Utilizando o marcador 1Kb Ladder Plus®.

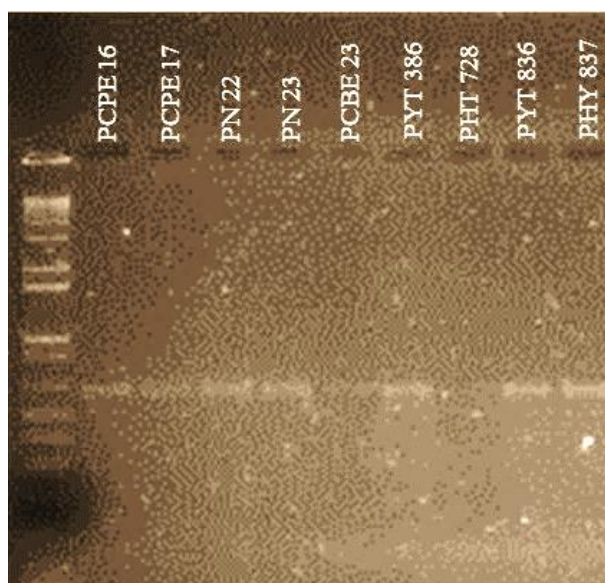
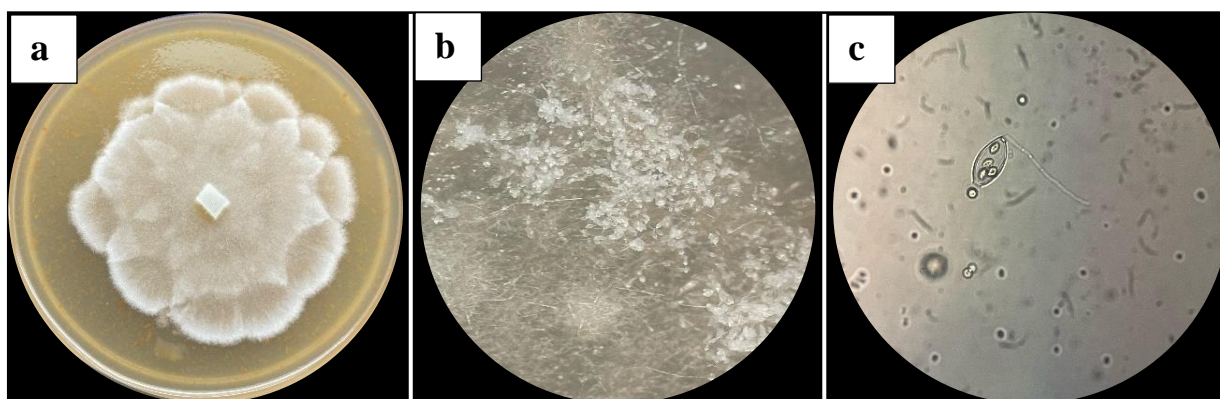


Figura 4. Crescimento de *Phytophthora capsici* em placa de Petri em meio V8+ágar (a); Esporângios abundantes (ampliado 8x) após período de três dias (b); Zoosporângio liberando zoósporos após as placas serem submetidas à baixa temperatura (c).



3.3. Análises moleculares de isolados de pepino previamente alocados para o gênero *Phytophthora*.

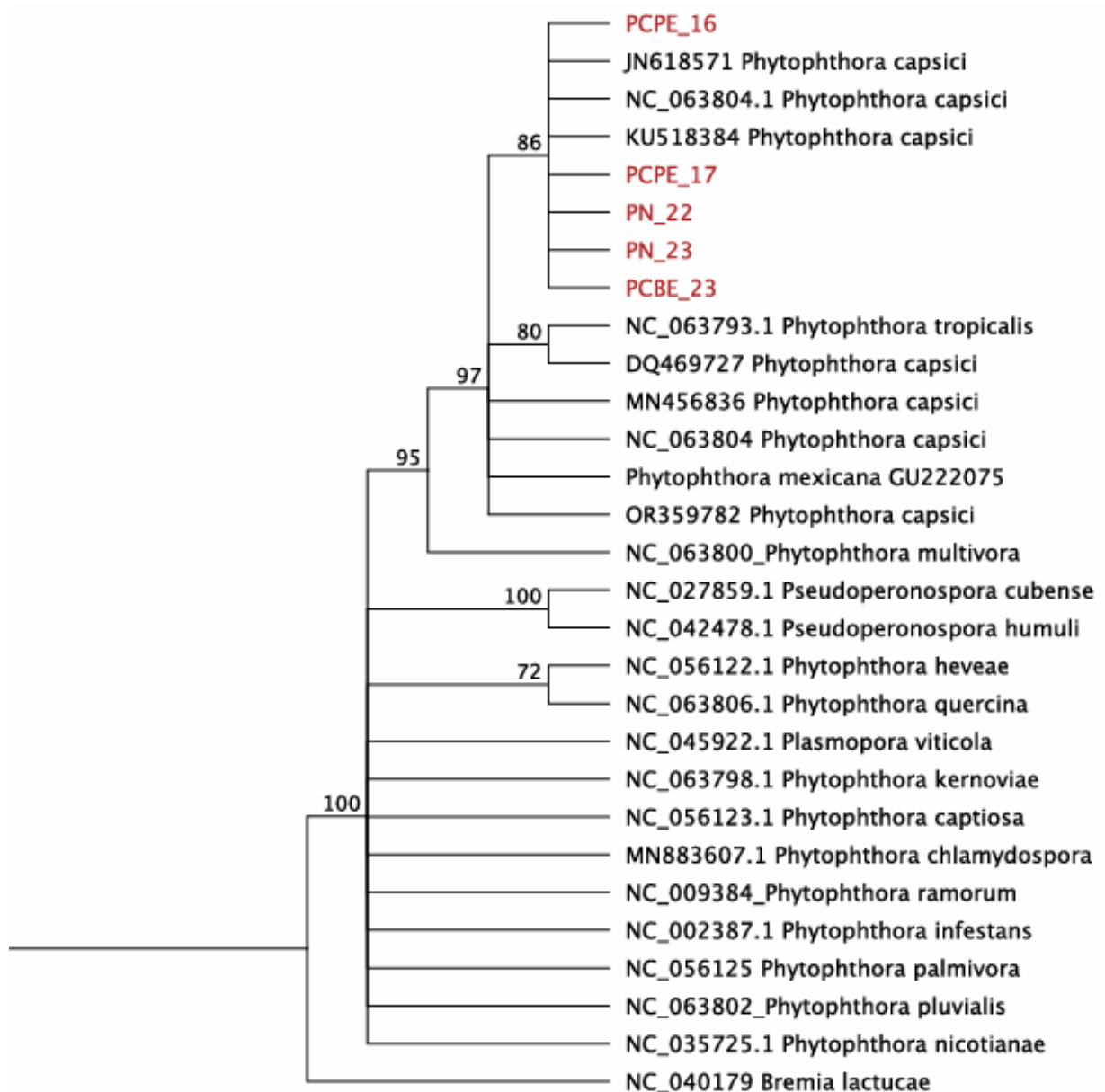
A comparação das sequências de nucleotídeos dos isolados foi realizada através do algoritmo BLASTn com as sequências ITS e *cox2* dos isolados de pepino previamente identificados como pertencentes ao gênero *Phytophthora*. Os isolados obtidos no presente trabalho foram então comparados com isolados relacionados disponíveis no banco de dados do NCBI/GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Estas análises via BLAST (**Tabelas 3 e 4**)

para as duas regiões genômicas revelaram identidades variando entre 95,54–100 % com ex-type strain (isolado de referência) de *Phytophthora capsici* (NR_147863). A análise filogenética foi conduzida apenas com o gene *cox2* confirmaram a alocação desses isolados no clado de *P. capsici* (Figuras 5).

Tabela 3. Resultado das comparações no banco de dados do NCBI da região ITS para isolados *Phytophthora* e *Globisporangium* (*Pythium*) obtidos de pepino e berinjela

Isolado	Espécie	Query Cover	Identidade (%)
PCPE 16	<i>Phytophthora capsici</i>	100	100
PCPE17	<i>Phytophthora capsici</i>	100	100
PN 22	<i>Phytophthora capsici</i>	100	95,54
PN 23	<i>Phytophthora capsici</i>	97	94,62
PCBE 23	<i>Phytophthora capsici</i>	100	100
PYT 728	<i>Globisporangium attranteridium</i>	100	92,23
PYT 386	<i>Globisporangium spinosum</i>	100	100
PYT 836	<i>Globisporangium splendens</i>	100	98,29
PYT 837	<i>Globisporangium splendens</i>	100	99,62

Figura 5. Árvore de máxima verossimilhança inferida a partir dos alinhamentos do gene codificador da cytochrome-c oxidase subunit 2 (cox2) de isolados de pepino previamente alocados para o gênero *Phytophthora*. Valores de suporte de bootstrap (≥ 50) e valores de probabilidade posterior bayesiana ($\geq 0,50$) são indicados nos nós. Os isolados gerados neste estudo foram indicados em fonte vermelha. Os números dos acessos do GenBank são mostrados ao lado do binomial latino. A árvore está enraizada no ponto médio. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site. Os isolados estão codificados conforme Tabela 1. O isolado de referência de *Bremia lactucae* (NC_040179) foi utilizado como outgroup.



3.4. Análises moleculares de isolados de pepino previamente alocados para o gênero *Globisporangium* (= *Pythium*)

Análises via BLAST foram conduzidas com as sequências das regiões ITS e *cox2* dos isolados de pepino previamente identificados como pertencentes ao gênero *Globisporangium* (= *Pythium*) com isolados relacionados disponíveis no GenBank. Entre os isolados previamente identificados como *Globisporangium* (*Pythium*) foram detectadas as espécies: *Globisporangium spinosum* (= *Pythium spinosum*) para o isolado PYT386; *G. splendens* (= *Pythium splendens*) para os isolados PYT836 e PYT837 e *G. attrantheridium* para o isolado PYT728 (Tabelas 3 e 4). Estas análises via BLAST (Tabelas 3 e 4) revelaram para as duas regiões genômicas revelaram identidades variando entre 95,54–100 % com com os ex-type strains de *P. attrantheridium* (AY286014), *Globisporangium spinosum* (MT539127) e *G. splendens* (AY 598655). As identidades desses isolados *Globisporangium* foram ainda validadas em análises filogenéticas com sequências de referência de espécies relacionadas disponíveis no GenBank. A árvore filogenética agrupou os isolados de pepino com os isolados de referência com suportes adequados (Figuras 6 e 7), confirmando a alocação e a identidade dos isolados nos respectivos clados. Amostras voucher desses isolados serão depositadas em coleções de referência.

Tabela 4. Resultado das comparações no banco de dados do NCBI da região *cox2* para isolados de *Phytophthora* e *Globisporangium* (*Pythium*) obtidos de pepino e berinjela

Isolado	Espécie	Query Cover (%)	Identidade (%)
PCPE 16	<i>Phytophthora capsici</i>	99	100
PCPE17	<i>Phytophthora capsici</i>	100	100
PN 22	<i>Phytophthora capsici</i>	99	99,01
PN 23	<i>Phytophthora capsici</i>	99	99,91
PCBE 23	<i>Phytophthora capsici</i>	99	99,27
PYT 386	<i>Globisporangium spinosum</i>	99	98,37
PYT 728	<i>Globisporangium attrantheridium</i>	100	96,54
PYT 836	<i>Globisporangium splendens</i>	99	99,81
PYT 837	<i>Globisporangium splendens</i>	99	99,44

Figura 6. Árvore de máxima verossimilhança inferida a partir dos alinhamentos da região ITS de isolados de pepino previamente alocados para o gênero *Globisporangium* (= *Pythium*). Valores de suporte de bootstrap (≥ 50) e valores de probabilidade posterior bayesiana ($\geq 0,50$) são indicados nos nós. Os isolados gerados neste estudo foram indicados em fonte vermelha. Os números dos acessos do GenBank são mostrados ao lado do binomial latino. A árvore está enraizada no ponto médio. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site. Os isolados estão codificados conforme Tabela 1. O isolado de referência de *Phytophthora capsici* (NR_147863) foi utilizado como outgroup.

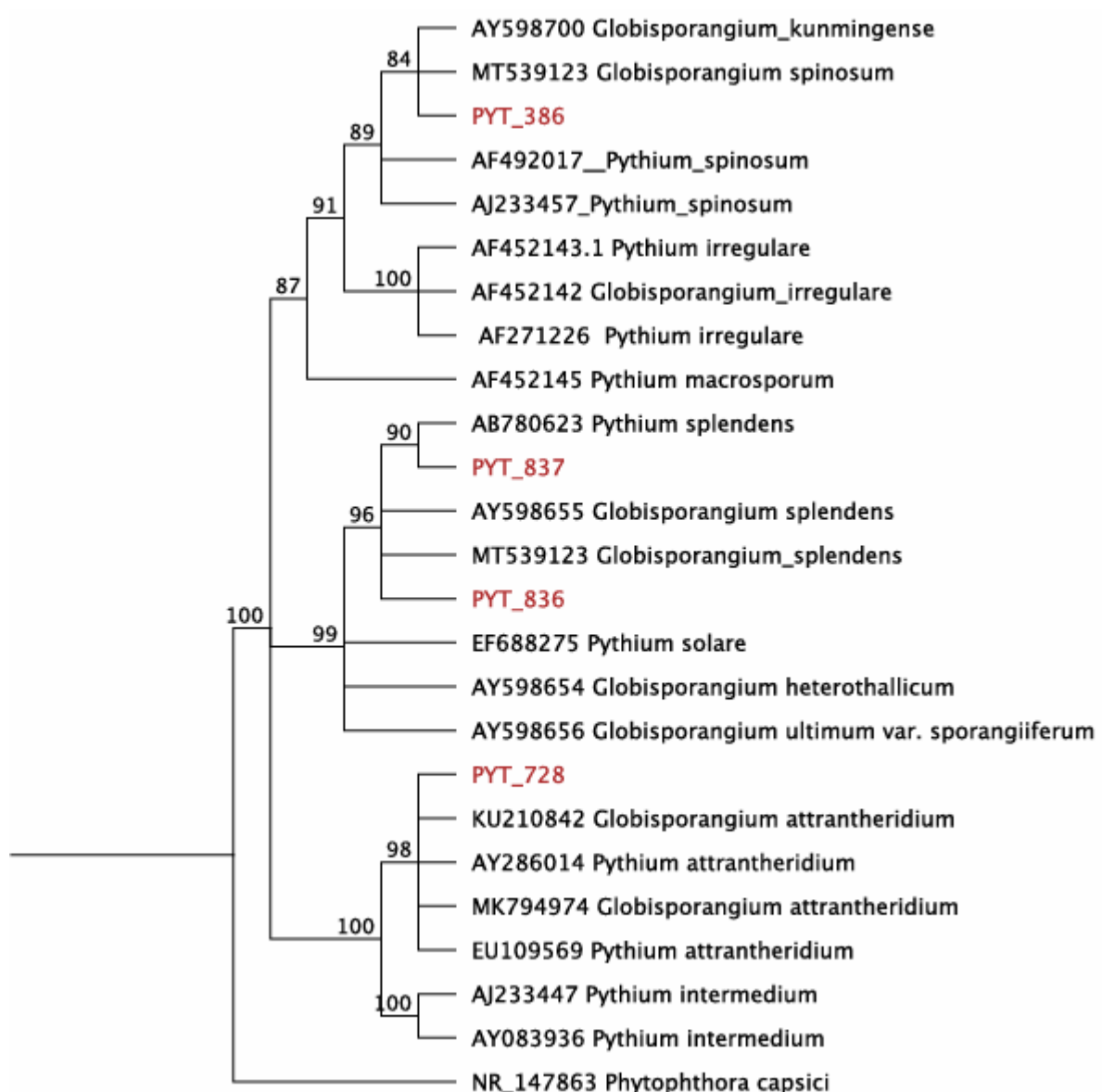
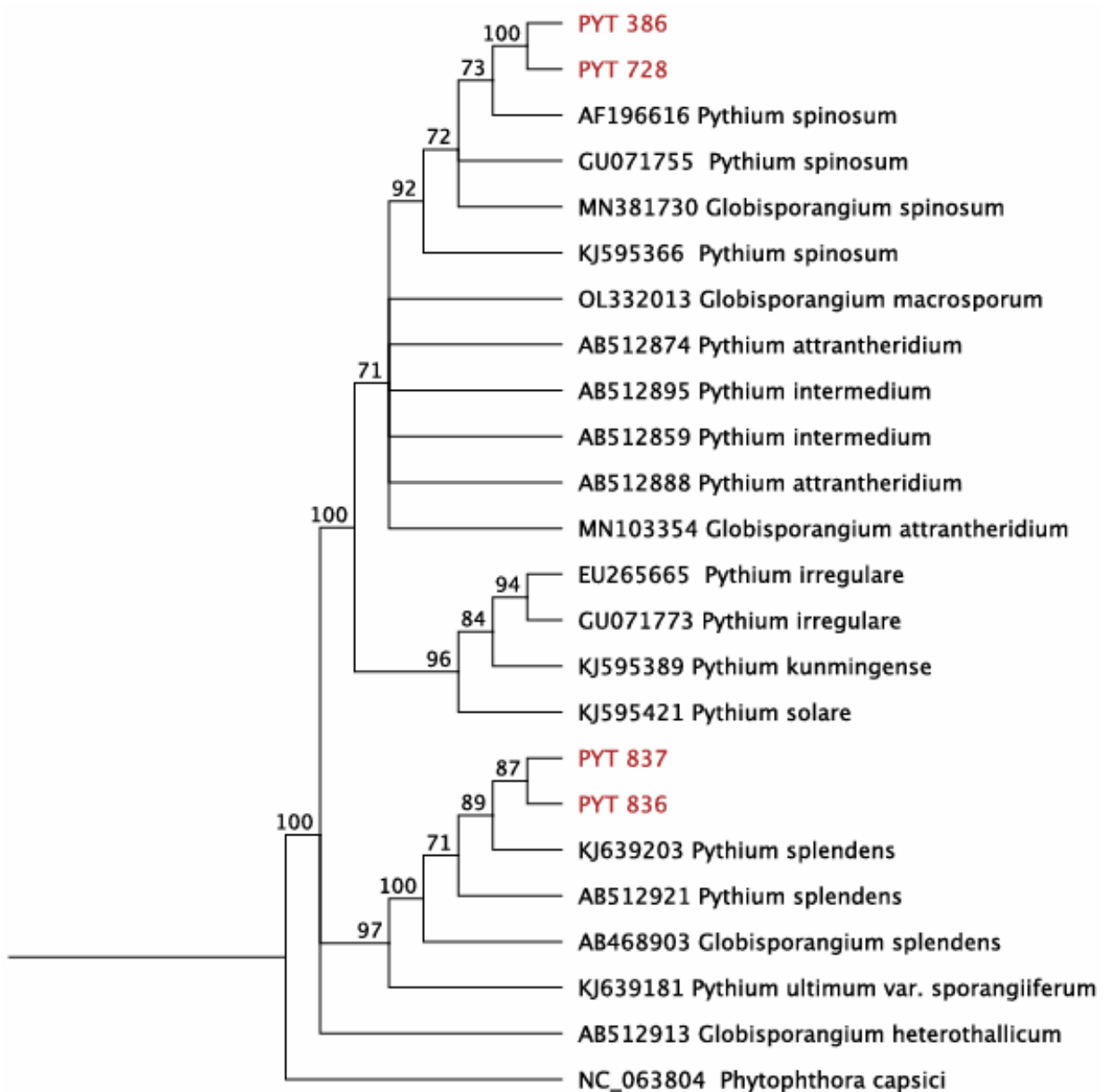


Figura 7. Árvore de máxima verossimilhança inferida a partir dos alinhamentos do gene codificador da *cytochrome-c oxidase subunit 2 (cox2)* de isolados de pepino previamente alocados para o gênero *Globisporangium* (= *Pythium*). Valores de suporte de bootstrap (≥ 50) e valores de probabilidade posterior bayesiana ($\geq 0,50$) são indicados nos nós. Os isolados gerados neste estudo foram indicados em fonte vermelha. Os números de acesso do GenBank são mostrados entre parênteses. A árvore está enraizada no ponto médio. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site. Os isolados estão codificados conforme **Tabela 1**. O isolado de referência de *Phytophthora capsici* (NC_063804) foi utilizado como *outgroup*.



4. DISCUSSÃO

Bioensaios de inoculação bem como a comparação das sequências de nucleotídeos e análises filogenéticas das regiões ITS e *cox2* dos oomicetos associados a tombamentos e podridões radiculares do pepino indicaram a presença de um complexo de agentes causais, incluindo: *Phytophthora capsici*, *Globisporangium spinosum*, *G. splendens* e *G. attrantheridium*.

A espécie *Phytophthora capsici* (LEONIAN, 1922; ALIZADEH & TSAO, 1998; TSAO, 1991; MCHAU & COFFEY, 1995) é um patógeno cosmopolita, estando amplamente distribuída em todas as regiões do Brasil e comumente associada com hortaliças das famílias Curcubitaceae (*C. melo*, *C. sativus* e espécies de *Cucurbita*); Fabaceae (*Phaseolus vulgaris*) e Solanaceae (*Solanum melongena*, *S. aethiopicum* var. *gilo*, *Capsicum annum*, *Capsicum* spp. e *S. lycopersicum*) (FARR & ROSSMAN, 2022; REIS et al., 2018; REIS & HENRIQUE, 2007; SANTOS et al., 2014). Os sintomas em plantas, independente da espécie, podem se manifestar em qualquer estágio fenológico (HUNG-WAN & LIEW, 2020). No presente trabalho, plântulas de pepino foram severamente afetadas por isolados deste patógeno. Os sinais do patógeno podem aparecer em vários órgãos, e condições de temperaturas entre 25~28°C aliadas à umidade relativa do ar acima de 80% favorecem o patógeno podendo causar grandes epidemias, que podem levar a perdas de até 100% da produção se a infecção ocorrer no início das estações que a favorecem (GANDARIASBEITIA et al., 2019; LIU et al., 2014). O patógeno possui hifas cenocíticas, que apresentam crescimento estelares em meio de cultivo V8+ágar, esporângios caducos, papilados, elipsóides ou obovóides; pedicelos longos; heterotáticos apresentando dois grupos de compatibilidade A1 e A2, ambos são necessários se encontrar na natureza ou em laboratório para que ocorra a reprodução sexuada (LAMOUR et al., 2012; SANTOS et al., 2014). Este oomiceto é um patógeno hemibiotrófico, iniciando no estilo biotrófico para, em seguida, alterar para um estágio necrotrófico (JUPE et al., 2013). A alta umidade do solo favorece a germinação direta dos oósporos ou dos esporângios. O patógeno pode penetrar no hospedeiro suscetível diretamente através do tubo germinativo gerado pelos oósporos/esporângios, ou através dos zoósporos produzidos a partir dos esporângios. Estes zoósporos são biflagelados e são atraídos para superfície do hospedeiro através de sinais químicos ou eletrostáticos (FAWKE et al., 2015; SALTOS et al., 2022). Desta forma, podemos considerar *P. capsici* como uma potencial ameaça para o cultivo sustentável do pepino no Brasil.

A espécie *Globisporangium splendens* (Hans Braun) Uzuhashi, Tojo & Kakish (=

Pythium splendens) tem sido registrado como um dos patógenos responsáveis por causar podridões em solanáceas e cucurbitáceas. É também um patógeno favorecido por altas temperaturas (25~30°C) e umidade relativa do ar superiores a 80%, onde a doença prevalece em estações chuvosas em comparação as outras estações (EWAD, 2020; TOFÖLI et al., 2019; VAFA et al., 2024). No Brasil, esse patógeno já foi reportado nos estados do Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro e no Distrito Federal, causando doença nos cultivos de feijão vagem (*Phaseolus vulgaris* L.), melão (*Cucumis melo*), cebolinha (*Allium schoenoprasum*), quiabo (*Abelmoschus esculentus*) e tomateiro (*Solanum lycopersicum*) (BARBOZA, 2020). Desta forma, de acordo com o nosso conhecimento, o presente trabalho é o primeiro relato deste oomiceto afetando o cultivo do pepino no Brasil. A nível mundial, isolados desse patógeno já em sido reportado em causando *damping-off* em pepino no Sultanato de Omã (AL-SA'DI et al., 2007).

Estudos prévios de virulência e agressividade de isolados de *Globisporangium spinosum* (= *Pythium spinosum*) mostraram que esta é uma das espécies mais agressivas e de mais difícil manejo (TOPOREK & KEINATH, 2020). Os danos provocados por patógeno são severos em espécies de cucurbitáceas (incluindo o pepino) especialmente quando a infecção ocorre ainda na fase de plântulas. Isolados de *G. spinosum* mesmo em baixas concentrações de inóculo (10 g/kg de solo) exibiram altos níveis de agressividade após cerca de três semanas de inoculação em mudas de pepino (GHARIEB et al., 2020); além de interferir significativamente na taxa de germinação das sementes inoculadas ($p > 0,001$). Características morfológicas incluindo a forma de esporângios, oogônias e anterídios fazem parte da caracterização de isolados de *G. spinosum*, além da utilização de ferramentas moleculares para maior precisão na identificação de espécies. Com base em recentes estudos filogenéticos, *Pythium spinosum* passou a ser descrito como *G. spinosum*. Este patógeno apresenta oogônias intercalares ornamentadas (“espinhosas”) com diâmetro médio de 20 µm e com múltiplos anterídios (HENDRICKS & ROBERTS, 2015). As principais espécies de Cucurbitaceae cultivadas apresentam elevada suscetibilidade a isolados de espécies de *Pythium*. Pesquisas recentes apontam a recuperação frequente de *G. spinosum* em cucurbitáceas sob condições de temperaturas mais amenas (TOPOREK & KEINATH, 2020b). No Brasil, a ocorrência deste patógeno ainda é reduzida, demandando investigações mais intensas. Até o presente momento relatos de isolados de *G. spinosum* estão restritos a regiões de clima ameno de Santa Catarina (região Sul) e São Paulo (região Sudeste) (BARBOZA 2020). A nível mundial, isolados desse patógeno estão geograficamente bem disseminados já tendo sido reportados causando *damping-off* em pepino no Sultanato de Omã (AL-SA'DI et al., 2007), Estados Unidos (GenBank

MT222931.1), Israel (GenBank MF116303.1) e na Itália (GenBank MN988850.1).

O oomiceto *Globisporangium attrantheridium* foi identificado pela primeira vez como um patógeno vegetal induzindo lesões do tipo cavidade em cenouras (ALLAIN-BOULÉ et al., 2004). Do mesmo modo, foi associado a lesões marrons nas pontas das raízes de mudas de milho e soja (BRODERS et al., 2007). Mais recentemente, o sequenciamento completo do genoma e análise filogenômica de espécies de *Pythium* confirmaram a transferência deste taxum de *P. attrantheridium* para *G. attrantheridium* (NGUYEN et al. 2022). Morfologicamente, os isolados de *G. attrantheridium* produzem esporângios globosos, intercalares, às vezes terminais ou adjacentes, seus zoósporos são encistados e apresentam oósporos do tipo pleróticos, raramente apleróticos em oogônias (CHU et al. 2022). A espécie *G. attrantheridium* também tem sido relatada afetando o sistema radicular de plantas perenes, causando o tombamento e a mortalidade de plântulas (REINHART et al. 2010). Mais recentemente, esse oomiceto foi identificado causando podridão radicular em *Gynostemma pentaphyllum* no Vietnã (CHU et al. 2022). Esta planta é uma liana (cipó ou trepadeira lenhosa) perene também da família Cucurbitaceae. No entanto, de acordo com o nosso conhecimento, esse é o primeiro relato desta espécie infectando plantas do gênero *Cucumis* a nível mundial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAIN-BOULÉ, N.; LÉVESQUE, C.A.; MARTINEZ, C.; BÉLANGER, R.R.; TWEDDELL, R.J. (2004). Identification of *Pythium* species associated with cavity-spot lesions on carrots in eastern Quebec. *Can. J. Plant Pathol.* 26: 365–370.
- AL-SA'DI, A. M., DRENTH, A., DEADMAN, M. L., DE COCK, A. W. A. M., & AITKEN, E. A. B. (2007). Molecular characterization and pathogenicity of *Pythium* species associated with damping-off in greenhouse cucumber (*Cucumis sativus*) in Oman. *Plant Pathology*, 56(1): 140–149.
- BALA, K; ROBIDEAU, G. P; LÉVESQUE, C. A; DE COCK, A. W. A. M; ABAD, Z. G; LODHI, A. M; SHAHZAD, S; GHAFAR, A; COFFEY, M. D. (2010). *Phytopythium* Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque, gen. nov. and *Phytopythium sindhum* Lodhi, Shahzad & Lévesque, sp. nov. *Persoonia* 24: 136–137.
- BARBOZA, E. A. (2020). Diversidade de *Pythium* e *Phytopythium* associados a hortaliças e plantas invasoras no Brasil, sensibilidade de isolados a mefenoxam e gama de hospedeiras. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia. 2023. 166 f. Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, DF.
- BRODERS, K.D.; LIPPS, P.E.; PAUL, P.A.; DORRANCE, A.E. (2007). Characterization of *Pythium* spp. associated with corn and soybean seed and seedling disease in Ohio. *Plant Dis.* 91: 727–735.
- BUSH EA, HONG C, STROMBERG E (2003). Fluctuations of *Phytophthora* and *Pythium* spp. in components of a recycling irrigation system. *Plant Disease* 87: 1500–1506. DOI:/10.1094/PDIS.2003.87.12.1500
- BUELL, C. B; WESTON, W. H. (1947). Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections of fungus cultures. *American Journal of Botany* 34: 555–561.
- CAIXETA, M. P; CARVALHO NUNES, W. M; SANTOS, A. F; TESSMANN, D. J; VIDA, J. B. (2013). Espécies de *Phytophthora* associadas à gomose em pomares de citros no Estado do Paraná, Brasil. *Summa Phytopathologica* 39, 242–247.
- CARVALHO, A. D. F; AMARO, G. B; LOPES, J. F; VILELA, N. J; FILHO, M. M; ANDRADE, R. (2013). A cultura do pepino. Brasília, Embrapa Hortaliças, Circular Técnica #113, 18p.
- CHOI, J; BEAKES, G; GLOCKLING, S; KRUSE, J; NAM, B; NIGRELLI, L; PLOCH, S; SHIN, D.; SHIVAS, R. G.; TELLE, S; VOGLMAYR, H; THINES, M. (2015). Towards a universal barcode of oomycetes – A comparison of the *cox1* and *cox2* loci. *Molecular Ecology Resources*. 15(6): 1275.
- CHEN, Q; BAKHSHI, M; BALCI, Y; BRODERS, K. D; CHEEWANGKON, R; CHEN, S. F; FAN, X. L; GRAMAJE, D; HALLEEN, F.; HORTA, J. M; JIANG, N; JUNG, T; MÁJEK, T; MARINCOWITZ, S; MILENKOVIĆ, T; MOSTERT, L; NAKASHIMA, C; FAZIHA, I. N; PAN, M; RAZA, M; SCANU, B; SPIES, C. F. J; SUHAIZAN, L; SUZUKI, H; TIAN, C. M; TOMŠOVSKÝ, M; ÚRBEZ-TORRES, J. R; WANG, W; WINGFIELD, B. D; WINGFIELD, M. J; YANG, Q; YANG, X; ZARE, R; ZHAO, P; GROENEWALD, J. Z; CAI, L; CROUS, P. W. (2022). Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 4. *Studies in Mycology*. 101:417–564.

CHU, M.T., HAN, VC., LE, T.T. et al. (2022). First report of *Globisporangium attrantheridium* causing root rot of *Gynostemma pentaphyllum*. Australasian Plant Dis. Notes 17:21 <https://doi.org/10.1007/s13314-022-00467-x>

CROUS, P. W; ROSSMAN, A. Y; AIME, M. C; ALLEN, W. C.; BURGESS, T; GROENEWALD, J. Z; CASTLEBURY, L. A. (2021). Names of phytopathogenic fungi: A practical guide. Phytopathology. 111(9): 1500–1508.

DE COCK, A. W. A. M., LODHI, A. M., RINTOUL, T. L., BALA, K., ROBIDEAU, G. P., ABAD, Z. G., LÉVESQUE, C. A. (2015). *Phytophthium*: Molecular phylogeny and systematics. Persoonia – Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi 34(1): 25–39.

EWAD – Department of Agriculture, Water and the Environment (2020). Final review of import conditions for cucurbitaceous vegetable seeds for sowing. Australian Government. Canberra – AU.

ERWIN D. C; RIBEIRO, O. K. (1996). *Phytophthora* – diseases worldwide. Saint. Paul, Minnesota: APS Press. 562p.

ERWIN, D. C; RIBEIRO, O. K. (1999). *Phytophthora* – disease worldwide. St Paul, Minnesota:APS Press., DOI: 10.1046/j.1365- 3059.1998.0179-a.x.

FARR, D.F; ROSSMAN, A.Y. (2020). Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Disponível em: <<https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>>. Acessado em 01/02/2024.

FARR, D.F; ROSSMAN, A.Y. (2022). Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Disponível em: <<https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>>. Acessado em 01/02/2024.

FAWKE, S; DOUMANE, M; SCHORNACK, S. (2015). Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles. Microbiology and Molecular Biology Reviews 79: 263–280. DOI: doi.org/10.1128/MMBR.00010-15

FEITOSA, M. I. S; AMÂNCIO, L. C. S; LOPES, C. A; REIS, A. (2023). Fitopatógenos do gênero *Pythium*: Polípagos e destrutivos em ambientes úmidos. Revisão anual de Patologia de Plantas 29: 148–171. DOI: doi.org/10.1007/s42161-018-0069-z

GANDARIASBEITIA, M; OJINAGA, M; ORBEGOZO, E; ORTIZ-BARREDO1, A; NÚÑEZ-ZOFÍO, M; MENDARTE, S; LARREGLA, S. (2019). Winter biodisinfestation with Brassica green manure is a promising management strategy for *Phytophthora capsici* control of protected pepper crops in humid temperate climate regions of northern Spain. Spanish Journal of Agricultural Research 17: 1–11 DOI: doi.org/10.5424/sjar/2019171-13808

GHARIEB, M. M.; GABER, A. A; SHIMAA, I. B.; ELSAYED, E. H. (2020). Morphological characterization and pathogenicity of *Pythium* sp. infecting cucumber seedlings in greenhouses. Alexandria Science Exchange Journal 41: 123–128, DOI: 10.21608/asejaiqsae.2020.84490

HANSEN, E. M; REESER P. W; SUTTON, W. (2012). Phytophthora Beyond Agriculture. Annual Review of Phytopathology 50: 359–378.

- HENDRICKS, K.E.; ROBERTS, P.D. (2015). First report of *Pythium spinosum* as a pathogen of watermelon and in association with a dieback of watermelon in southwest Florida. *Plant Health Prog.* 16, 77–79. <https://doi.org/10.1094/PHP-BR-14-0048>
- HO, H. H. (1987). Effect of hymexazol on growth and reproduction of low temperature *Phytophthora* species. *Mycopathologia* 98:17–20.
- HORA, R. C; CAMARGO, O. A. C; BUZZANINI, A. C. (2018). Cucurbitáceas e outras. In: FILHO, J. U. T. B; FREITAS, P. S. L; BERIAN, L. O. S; GOTO, R. (Org.) Hortaliças-fruto. Maringá: Eduem, p.72–109.
- HUDSPETH, D.S; NADLER, S.A; HUDSPETH, M.E. (2000). A COX2 molecular phylogeny of the Peronosporomycetes. *Mycologia* 92:674-684. DOI: doi.org/10.2307/3761425
- HUNG-WAN, J. S; LIEW, E. C. (2020). Efficacy of chemical and biological agents against pepper blight (*Phytophthora capsici* Leonion) in East Asia: a meta-analysis of laboratory and field trial data. *Journal of Plant Pathology* 102: 835–842. DOI: doi.org/10.1007/s42161-020-00519-0
- JUPE, J; STAM, R; HOWDEN, A; MORRIS, J. A; ZHANG, R; HEDLEY, P. H; HUITEMA, E. (2013). *Phytophthora capsici*-tomato interaction features dramatic shifts in gene expression associated with a hemi-biotrophic lifestyle. *Genome Biology* 14: R63. DOI: doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-r63
- KAGEYAMA, K. (2014). Molecular taxonomy and its application to ecological studies of *Pythium* species. *Journal of General Plant Pathology* 80: 314–326
- KUCHAREK, T; MITCHELL, D. (2000). Diseases of agronomic and vegetable crops caused by *Pythium*. In: *Plant Pathology Fact Sheet*. Gainesville: Institute of Food and Agriculture Service, p.53.
- LAMOUR, K. H; STAM, R; JUPE, J; HUITEMA, E. (2012). The oomycete broadhost - range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, 13: 329–337. DOI: doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x
- LIU, W. T; KANG, J. H; JEONG, H. S; CHOI, H. J; YANG, H. B; KIM, K. T; CHOI, D; CHOI, G. J; JAHN, M; KANG, B. C. (2014). Combined use of bulked segregant analysis and microarrays reveals SNP markers pinpointing a major QTL for resistance to *Phytophthora capsici* in pepper. *Theoretical and Applied Genetics* 127: 2503–2513. DOI: doi.org/10.1007/s00122-014-2394-8
- LUZ E. D. M. N; SANTOS A. F; MATSUOKA K; BEZERRA J. L. (2001). Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Campinas: Editora Rural, 757p.
- LUZ, E. D. M. N; MATSUOKA, K. (2001) *Phytophthora*: fungo, protista ou chromista? 1ª ed. In: LUZ, E. D. M. N; SANTOS A. F; MATSUOKA, K; BEZERRA, J. L. Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Campinas: Editora Rural, p. 1-22.
- MENDES M. A. S; SILVA, V, L; DIANESE, J. C; FERREIRA, M. A. S. V; SANTOS, C. E. N; GOMES, N. E; URBEN, A. F; CASTRO, C. (1998). Fungos em plantas no Brasil. Brasília: Embrapa SPI/Embrapa-Cenargen, 569p.

- NGUYEN, H.D.; DODGE, A.; DADEJ, K.; RINTOUL, T. L.; PONOMAREVA, E.; MARTIN F. N; COCK, A. W.; LÉVESQUE, C. A.; REDHEAD, S. A; SPIES, C. F. (2022) Whole genome sequencing and phylogenomic analysis show support for the splitting of genus *Pythium*. *Mycologia* 114(3): 501–515.
- PEREIRA, D. G. (2023). *Phytophthora capsici*: Diversidade e resistência em *Solanum* (*Lycopersicon*). 186 f. Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, DF.
- PLAATS-NITERINK, A. J. V. D. (1981). Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology. Baarn, Centraalbureau voor Schimmelcultures. Monograph 21:242
- RAMBAUT, A. (2012) FigTree v1.4.0: Tree figure drawing tool. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- RAMBAUT, A., DRUMMOND, A. J., XIE, D., BAELE, G., SUCHARD, M. A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology* 67(5): 901–904.
- REINHART KO, TYTGAT T, VAN DER PUTTEN WH, CLAY K (2010). Virulence of soil-borne pathogens and invasion by *Prunus serotina*. *New Phytol.* 186:484–495
- REIS, A; FEITOSA, M. I. S. (2021). Identificação e manejo da mancha zonada do pepino e do chuchu. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, Circular Técnica 127. 10p.
- REIS, A; HENRIQUE, I. M. (2007). *Phytophthora nicotianae* e *Rhizoctonia solani*: Dois novos patógenos da vinca no Brasil. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 30.
- REIS, A; PAZ-LIMA, M. L; MOITA, A. W; AGUIAR, F. M; FONSECA, M. E. N; CAFÉ-FILHO, A.C; BOITEUX, L. S. (2018). A reappraisal of the natural and experimental host range of Neotropical *Phytophthora capsici* isolates from Solanaceae, Cucurbitaceae, Rosaceae, and Fabaceae. *Journal of Plant Pathology* 100:215–223. DOI: 10.1007/s42161-018-0069-z.
- ROSKOV, Y; ABUCAY, L; ORRELL, T; NICOLSON, D; FLANN, C; BAILLY, N; KIRK, P; BOURGOIN, T; DEWALT, R. E; DECOCK, W; DE WEVER, A. (2016). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2016 Annual Checklist.
- SALTOS, L. A; MONTEROS-ALTAMIRANO, A; REIS, A, GARCÉS-FIALLOS, F. R. (2022). *Phytophthora capsici*: The diseases it causes and management strategies to produce healthier vegetable crops. *Horticultura Brasileira* 40: 005–017. DOI: doi.org/10.1590/s0102-0536-20220101.
- SANTOS, A. F; LUZ, E. D. M. N; REIS, A. (2014). *Phytophthora* spp.: Distribuição e associação com espécies florestais. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/107534/1/2014-AAC-Santos-PhytophthoraDistribuicao.pdf>>. Acesso em: 01 fev. 2024
- THINES, M.; CHOI, Y. J. (2016). Evolution, diversity, and taxonomy of the Peronosporaceae, with focus on the genus *Peronospora*. *Phytopathology* 106: 6–18.
- TOPOREK, S. M; KEINAT, A. P. (2020). Characterization of *Pythium* species collected from a multiple time-point sampling of Cucurbits in South Carolina. *Plant Disease* 79: 263–280. DOI: doi.org/10.1094/PDIS-04-20-0728-RE

- UZUHASHI, S; TOJO, M; KAKISHIMA, M. (2010). Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. *Mycoscience* 51:337–365. DOI: doi.org/10.1007/S10267-010-0046-7)
- VAFI, A. L; ANJU, J. V.; RAJAN, P. P.; RAJESH, K. P. (2024). Emergence of *Globisporangium (Pythium) splendens* on ginger in peninsular India. *Indian Phytopathology*, on line. <https://doi.org/10.1007/s42360-024-00711-7>
- WHITE, T. J; BRUNS, T; LEE, S; TAYLOR, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A; GELFAND, D. H; SNINSKY, J. J; WHITE, T.J. (Eds). *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press .315-322.
- WINKWORTH, R. C.; NEAL, G.; OGAS, R. A.; NELSON, B. C.; MCLENACHAN, P. A.; BELLGARD, S. E.; LOCKHART, P. J. (2022). Comparative analyses of complete Peronosporaceae (Oomycota) mitogenome sequences – Insights into structural evolution and phylogeny. *Genome Biology and Evolution* 14(4): evac049.
- YANG, X; COPE, W. E; HONG, C. (2014). Two novel species representing a new clade and cluster of *Phytophthora*. *Fungal Biology* 118(1): 72–82.
- ZITTER, T. A; HOPKINS, D. L; THOMAS, C. E. (1996). *Compendium of cucurbit diseases*. American Phytopathological Society, St. Paul, p. 87.

Busca por fontes de resistência à podridão de colo (*Phytophthora capsici*) em germoplasma de pepino

**Busca por fontes de resistência à podridão de colo (*Phytophthora capsici*)
em germoplasma de pepino**

B.W.S. Lima¹, M. E. N. Fonseca², L.S. Boiteux^{1,2} & A. Reis^{1,2}

¹ Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, PE, Brasil.

² Embrapa Hortaliças, 70275-970, Brasília, DF, Brasil.

RESUMO

Estresses bióticos são responsáveis por reduções significativas na produção de pepino (*Cucumis sativus* L.) em diferentes regiões do mundo. A podridão de colo e tombamento são importantes doenças que afetam a cultura do pepino e de outros membros da família Cucurbitaceae em diferentes regiões do mundo. No pepino essa doença é induzida por um complexo de espécies de *Phytophthora*, incluindo, *P. capsici* e *P. melonis*. No Brasil, esta doença apresenta etiologia complexa sendo causada por *P. capsici* e três espécies de *Globisporangium = Pythium*. Dentro deste complexo, a podridão de colo induzida por *P. capsici* merece destaque por ser uma doença com alto potencial destrutivo. No entanto, poucos trabalhos foram conduzidos na busca por fontes de resistência a *P. capsici* na fase de plântulas, que é a principal manifestação da doença nas condições brasileiras. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar uma coleção de germoplasma de pepino visando identificar potenciais fontes de resistência para isolados de *P. capsici* na fase de plântulas. Os dois isolados utilizados foram identificados previamente como *Phytophthora capsici*. A caracterização molecular dos isolados foi realizada com base na filogenia de sequências do gene *cox2*. A avaliação dos sintomas foi feito respeitando o período de incubação da doença, de 48 horas, e as avaliações foram realizadas cada 24 horas durante sete dias, as plântulas que estavam tombadas e/ou murchas/mortas, eram retiradas para reisolamento, e as colônias do oomiceto obtidas foram comparadas com as colônias originais. As análises estatísticas foram realizadas através do software R. Foram analisados os índices de incidência da doença para cada acesso fazendo uso de análises descritivas. Os acessos CNPH-008, CNPH-0104, CNPH-0154, CNPH-0160 e CNPH-0342L apresentaram respostas estáveis de resistência em plântula e podem representar importantes fontes de resistência para programas de melhoramento. Alguns destes acessos já variedades comerciais, podendo, desta forma, ter uso imediato especialmente em áreas com histórico de infestação por *P. capsici*.

Palavras chave: melhoramento, oomiceto, *Phytophthora*, plântulas.

ABSTRACT

Biotic stresses are responsible for significant reductions in cucumber (*Cucumis sativus* L.) production in different regions of the world. Collar rot and damping-off are important diseases that affect cucumber crops and other members of the Cucurbitaceae family in different regions of the world. In cucumber, this disease is induced by a complex of *Phytophthora* species, including *P. capsici* and *P. melonis*. In Brazil, this disease has a complex etiology being caused by *P. capsici* and three species of *Globisporangium* = *Pythium*. Within this complex, collar rot induced by *P. capsici* deserves special highlight, as it is a disease with high destructive potential. However, few studies have been conducted in the search for sources of resistance to *P. capsici* at the seedling phase, which is the main manifestation of the disease in Brazilian conditions. In this context, the objective of the present work was to evaluate a collection of *C. sativus* germplasm in order to identify potential sources of resistance for *P. capsici* isolates at the seedling stage. The two isolates used were previously identified as *Phytophthora capsici*. Molecular characterization of the isolates was conducted based on the phylogeny of sequences from the *cox2* gene. Symptom assessment was carried out respecting the disease's incubation period of 48 hours, and evaluations were performed every 24 hours for seven days. Seedlings that were wilted and/or dead were removed for re-isolation, and the resulting oomycete colonies were compared with the original colonies. Statistical analyses were performed using R software. Disease incidence indices were analyzed for each accession using descriptive analyses. Accessions CNPH-008, CNPH-0104, CNPH-0154, CNPH-0160, and CNPH-0342L showed stable “juvenile” resistance responses and may represent important sources of resistance for breeding programs. Some of these accessions are already commercial varieties and can, therefore, be used immediately, especially in areas with a history of infestation by *P. capsici*.

Keywords: Breeding, oomycete, *Phytophthora*, seedlings.

1. INTRODUÇÃO

O pepino (*Cucumis sativus* L.) é uma cultura de grande importância econômica e biológica pertencente à família Cucurbitaceae, nativa do sul do Himalaia (NAEGELE & WEHNER, 2017). Seu alto consumo e valor de mercado se devem a qualidade nutricional dos frutos, contendo fibras, cálcio, ferro, multivitaminas, cucurbitacina-C, diácido propanol e outras substâncias indispensáveis na dieta humana (LI et al., 2015). A de polissacarídeos e flavonoides nos frutos conferem propriedades antioxidantes capazes de eliminar radicais livres (SHI et al. 2010; HE et al., 2011). Além disso, algumas variedades têm sido empregadas como matéria prima na indústria farmacêutica visto que a cucurbitacina-C apresenta propriedades anti-herpética, anti-inflamatória e ação citotóxica frente a linhagens celulares tumorais (YANG et al., 2005; ZHANG et al., 2012).

Estresses bióticos e abióticos são responsáveis por reduções significativas na produção de pepino em diferentes regiões do mundo (DAS et al., 2022). Os fungos e oomicetos fitopatogênicos estão entre um dos principais fatores bióticos causando cerca de 10-20% das perdas. Com isso, à necessidade de maiores estudos sobre a aplicação de estratégias integradas no melhoramento de cultivares da cultura para triagem de linhagens resistentes ou tolerantes doença (WANG et al., 2015). Em cucurbitáceas, oomicetos causam a podridão de colo, de hastes e de frutos, podendo induz falhas de germinação bem como o tombamento de plântulas durante a formação das mudas (TÖFOLI & DOMINGUES, 2018).

A podridão de colo e tombamento são importantes doenças que afetam a cultura do pepino e de outros membros da família Cucurbitaceae em diferentes regiões do mundo (BABADOOST, 2016; KAUR & SHARMA, 2022; REIS et al., 2023). No pepino essa doença é induzida por um complexo de espécies de *Phytophthora*, incluindo, *P. capsici* (REIS et al., 2018) e *P. melonis* (HASHEMI et al., 2019; HASHEMI et al., 2020; NASR-ESFAHANI et al., 2020; NNEMATI & BANIHASHEMI, 2015; WU et al. 2014).

Fontes de resistência para *P. capsici* na **fase de plântulas** têm sido detectadas em *Cucurbita moschata*, *Cucurbita pepo* e outras espécies de *Cucurbita* (CHAVEZ et al., 2011; KRASNOW et al., 2017; PADLEY et al., 2008) e melão (DONAHOO et al., 2013; PAZ-LIMA et al., 2005; PONTES et al., 2014). Fontes de resistência a *P. capsici* **na fase de frutos** têm sido detectadas em germoplasma de *Cucurbita* (GRANKE et al., 2012; KRASNOW et al., 2014), melão (GRANKE et al., 2012; ANDO et al., 2015) e em pepino (ANDO et al., 2009; COLLE et al., 2014; GEVENS et al., 2006; GRANKE et al., 2012).

Avanços no melhoramento de pepino para resistência a *P. capsici* na fase frutos têm sido mais intensos. Cultivares de pepino com resistência na fase de frutos têm sido liberadas pelos programas de melhoramento genético (GRUMET & COLLE, 2017), associação via transcrito de genes expressos em frutos (MANSFELD et al., 2017; MANSFELD et al., 2020) bem fatores genéticos controlando este tipo de resistência já foram mapeados no genoma de pepino (LIN et al., 2023).

Estudos empregando bioensaios e análise molecular com isolados de oomicetos afetando o pepino nas condições brasileiras (**ver capítulo 3 da presente Dissertação**) permitiu a elucidar a presença de um complexo de agentes causais da podridão de colo e tombamento nesta hortaliça, incluindo *P. capsici*, *Globisporangium spinosum* (= *Pythium spinosum*), *G. splendens* (= *Pythium splendens*) e *G. attrantheridium* (= *Pythium attrantheridium*). A presença deste complexo patogênico pode representar um enorme obstáculo no desenvolvimento de cultivares melhoradas de pepino, exigindo a identificação de fontes de resistência genética de amplo espectro.

Dentro deste complexo, a murcha de *P. capsici* merece destaque por ser uma doença com alto potencial destrutivo, podendo afetar também os frutos (QUESADA-OCAMPO et al., 2023; SANOGO et al., 2023). O germoplasma de pepino representa um extraordinário recurso na busca de fatores de resistência contra uma expressiva gama de patógenos (NAEGELE & WEHNER, 2017; WANG et al., 2018; GRUMET et al., 2021). No entanto, poucos trabalhos foram conduzidos na busca por fontes de resistência a *P. capsici* na fase de plântulas, que é a principal manifestação da doença nas condições brasileiras. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar uma coleção de germoplasma de *Cucumis sativus* visando identificar potenciais fontes de resistência para isolados de *P. capsici* que é uma das principais e mais destrutivas espécies componentes deste complexo de oomicetos habitantes do solo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local

Os trabalhos foram conduzidos nos Laboratórios de Fitopatologia e Melhoramento Vegetal e nas casas de vegetação da Embrapa Hortaliças, localizada na zona rural da Ponte Alta, em Brasília-DF, a 15°56'00" latitude sul, 48°08'00" longitude oeste e altitude 997,6 m.

2.2. Obtenção e conservação dos isolados

Os isolados fúngicos foram retirados tanto da coleção do CNPH, quanto em condições de campo, obtidos a partir de plântulas de pepino apresentando sintomas de murcha, tombamento, podridão radicular em campo, em propriedades produtoras de pepino (**Tabela 1**) e um isolado obtido de berinjela (*Solanum melongena* L.). Para o isolamento foi seguido o protocolo de isolamento indireto de microrganismos em órgãos lenhosos ou carnosos, retirando fragmentos das raízes, passando pelo processo de desinfestação e por fim, depositados em meio seletivo para oomicetos. Os isolados foram recuperados desta coleção em meio de cultura V8 20% + ágar.

2.3. Caracterização dos isolados de *Phytophthora*

Os dois isolados foram identificados previamente como *Phytophthora capsici* A caracterização molecular dos isolados foi realizada com base na filogenia de sequências do gene *cox2* (**ver capítulo 3 dessa dissertação**)

2.4. Preparo do inóculo, produção de mudas e inoculação

O preparo das mudas foi feito em bandejas de polietileno contendo substrato Bioplant Plus[®], com suplementação utilizando o fertilizante Osmocote[®] colocando 2 sementes por célula. O semeio foi realizado com um intervalo de 7 dias, por conseguinte as bandejas foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas duas vezes ao dia. O experimento foi realizado em duas etapas, a primeira em mudas apresentando dois pares de folhas verdadeiras em 55 acessos do banco de germoplasma de pepino do CNPH (**Tabela 2**). Na segunda etapa, foram avaliados 21 acessos (previamente avaliados) para a reação contra os dois isolados de *P. capsici* (**Tabela 1**) com dois estágios vegetativos (1 e 2 pares de folhas verdadeiras). A inoculação de ambos os experimentos foi realizada utilizando o método de suspensão de zoósporos seguindo a metodologia descrita (REISFSCHNEIDER et al., 1986), em que os isolados foram cultivados em placas de Petri não vedadas contendo meio V8 20% e submetidos à um stress, levando-os à câmara germinadora $\pm 28^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo 12 horas de luz/12 horas de escuridão durante 24 horas, e à temperatura ambiente sob luz constante, forçando a produção de zoosporângios e induzindo abundante esporulação (**Figura 1-D**). As estas placas foram adicionadas 30 mL^{-1} de ADE e posteriormente levadas à temperatura de 6°C durante $\cong 2$ horas, por conseguinte foram deixadas em temperatura ambiente por 30 minutos afim de forçar a

produção e liberação dos zoósporos (**Figura 1E**). A solução foi filtrada em gaze, e em seguida foi retirada uma alíquota para ser aquecida, a fim de suprimir a motilidade dos zoósporos para permitir contagem na câmara de Neubauer.

A solução foi ajustada para 2×10^4 conídios/mL⁻¹, em seguida as plântulas com \cong 7 dias após a emergência, apresentando o início do lançamento do primeiro par de folhas verdadeiras, e as mudas com \cong 14 dias apresentando o início do lançamento do primeiro par de folhas verdadeiras, foram transferidas para vasos de 0,5 L contendo solo adubado estéril, e pipetados 3 mL de suspensão no colo cada plântula.

Tabela 1. Isolados de *Phytophthora capsici* obtidos da coleção do CNPH, contendo o código, gênero, hospedeiro, cidade e/ou estado, e ano de coleta.

Isolado	Espécie	Hospedeiro	Cidade/Estado	Ano
PCPE17	<i>Phytophthora</i>	Pepino	Brazlândia-DF	2023
PCBE	<i>Phytophthora</i>	Berinjela	Brazlândia-DF	2023

Figura 1. Crescimento com formato estelar de *Phytophthora capsici* em meio V8 (**a**); Massa de esporângios (**b**); Crescimento simpodial do esporangióforo (**c**); Esporângio papilado (**d**); Esporângio no momento de liberação de zoósporos após o período de stress luminoso e mudança de temperatura (**e**); Esporângio vazio após a liberação dos zoósporos (**f**).

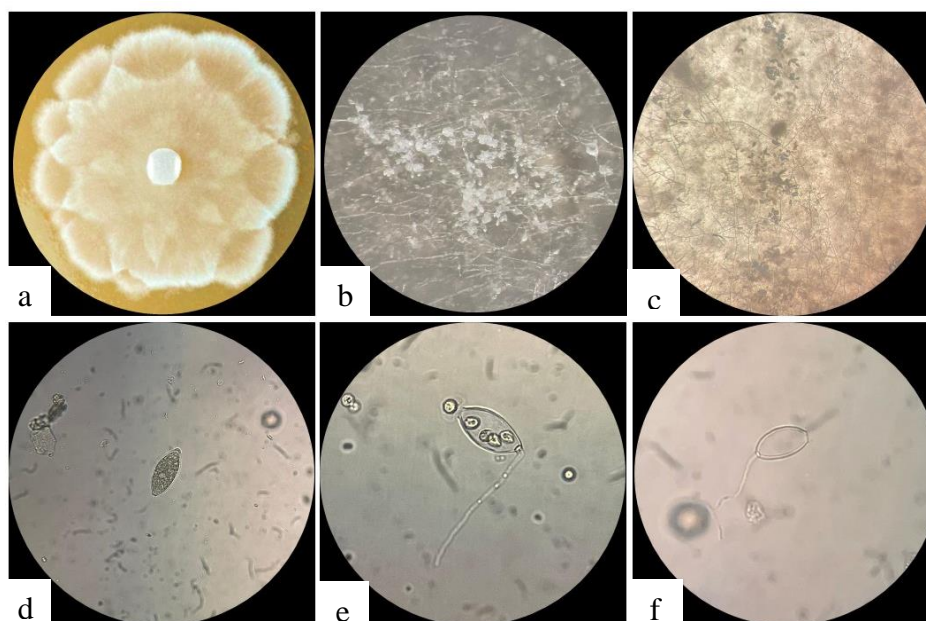


Tabela 2. Acessos de pepino avaliados no experimento 01 obtidos do banco de germoplasma do CNPH.

CNPH-0002	CNPH-0176	CNPH-0790	CNPH-1062	Pepino Caipira (Cascalho Rico) F2
CHPH-0008	CNPH-0180	CNPH-0796	CNPH-1063	Pepino Japonês (Cascalho Rico) F2
CNPH-0104	CNPH-0183	CNPH-0798	CNPH-1104	Natsu-no-Kagayaki F1 – TopSeed
CNPH-0147	CNPH-0196	CNPH-0799	CNPH-1107	Porta enxerto Seishin Eagle
CNPH-0151	CNPH-0342 L	CNPH-0800	CNPH-0706 L	Curumin (lote 5109)
CNPH-0153	CNPH-0655	CNPH-0975	Robusto F1 – TopSeed	LLG01+LLG02
CNPH-0154	CNPH-0661 L	CNPH-0976	Kouki F1 – TopSeed	CNPH-AC761
CNPH-0155	CNPH-0705	CNPH-0983	Murayama F1 – TopSeed	CNPH-AC769
CNPH-0160	CNPH-0706	CNPH-0999	Tikara F1 – TopSeed	CNPH-AC814
CNPH-0169	CNPH-0707	CNPH-1007	Kataná F1 – Horticeses	HS-1020 Hib. Horticeses
CNPH-0174	CNPH-0788	CNPH-1061	Aladdin F1 – TopSeed	Zebu F1 SUPERSEED

Tabela 3. Acessos de pepino avaliados no segundo experimento, obtidos do banco de germoplasma do CNPH, contendo o código de identificação e/ou o nome comercial.

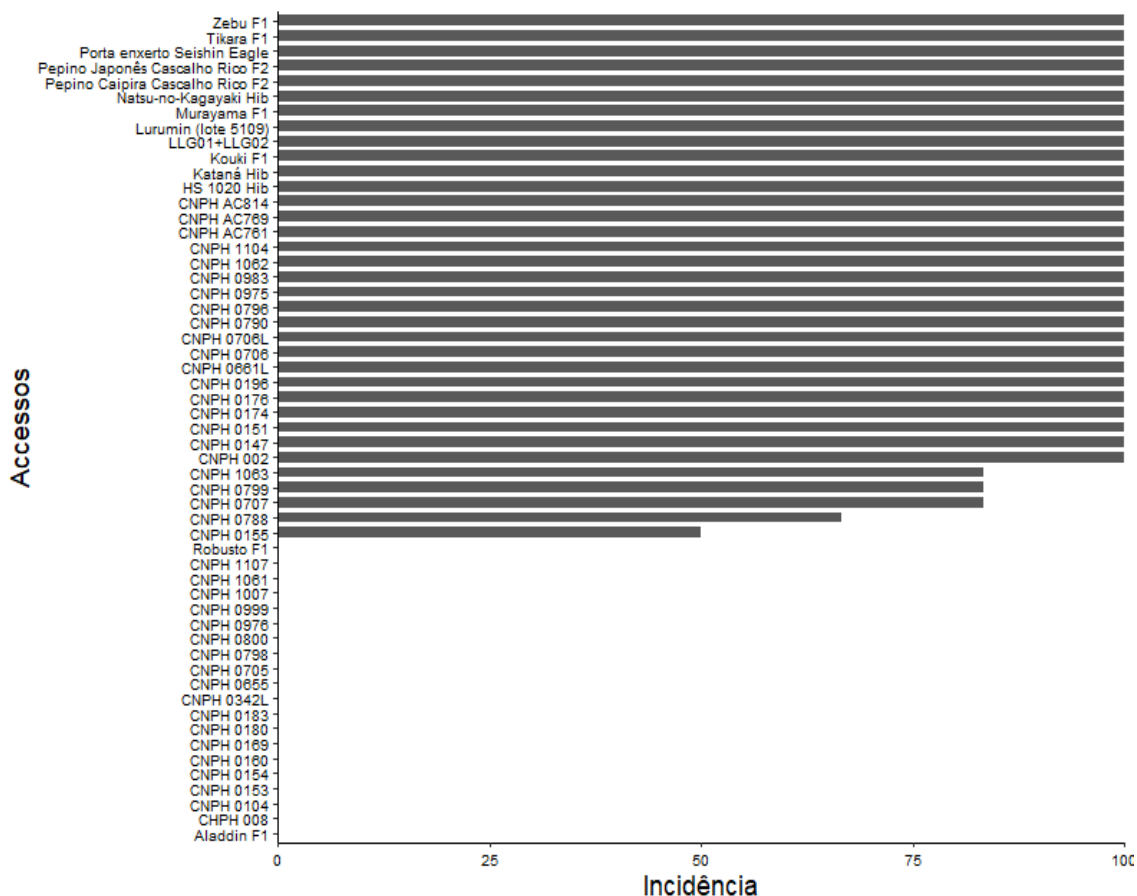
CNPH-0008	CNPH-0154	CNPH-0183	CNPH-0798	CNPH-1007	Robusto F1 – TopSeed
CNPH-0104	CNPH-0160	CNPH-0342 L	CNPH-0800	CNPH-1061	Aladdin F1 – TopSeed
CNPH-0147	CNPH-0174	CNPH-0655	CNPH-0976	CNPH-1097	Kouki F1 – TopSeed
CNPH-0153	CNPH-0180	CNPH-0705	CNPH-0999	CNPH-1104	

O critério de avaliação dos sintomas foi feito segundo recomendações prévias (REIS et al., 2018), respeitando o período de incubação da doença, de 48 horas, e as avaliações foram realizadas cada 24 horas durante sete dias, as plântulas que estavam tombadas e/ou murchas/mortas, eram retiradas para reisolamento, e as colônicas do oomiceto obtidas foram comparadas com as colônias originais. As análises estatísticas foram realizadas através do software R. Foram analisados os índices de incidência da doença para cada acesso fazendo uso de análises descritivas. O delineamento experimental da primeira análise foi inteiramente casualizado, com três blocos, duas repetições, um tratamento. O segundo experimento seguiu o delineamento inteiramente casualizado, três blocos e duas repetições com dois tratamentos, sendo cada tratamento um estágio vegetativo diferente em 21 acessos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao final da avaliação do primeiro experimento foram obtidos os seguintes acessos com promissores níveis de resistência: Robusto F1, CNPH-1107, CNPH-1061, CNPH-1007, CNPH-0999, CNPH-976, CNPH-0800, CNPH-0798, CNPH-0705, CNPH-0655, CNPH-0342L, CNPH-0183, CNPH-0180, CNPH-0169, CNPH-0160, CNPH-0154, CNPH-0153, CNPH-0104, CNPH-008 e Aladdin F1-Topseed (**Figura 2**). Os acessos CNPH-1063, CNPH-0799, CNPH-0707, CNPH-0788 e CNPH-0155, obtiveram menores índices de incidência devido à demora na manifestação dos sintomas, porém ao final da avaliação estes acessos também morreram, conferindo o resultado final como suscetível. De acordo com o levantamento realizado por Ferreira et al. (2015), não há registro de cultivares comerciais com resistência do tipo imunidade à *P. capsici* no Brasil. Desta forma, um novo ensaio foi conduzido para confirmar os níveis de resistência observados neste ensaio.

Figura 2. Resultado do experimento 01, com mudas apresentando 2 pares de folhas verdadeiras, o gráfico mostra dos níveis de incidência em cada acesso.

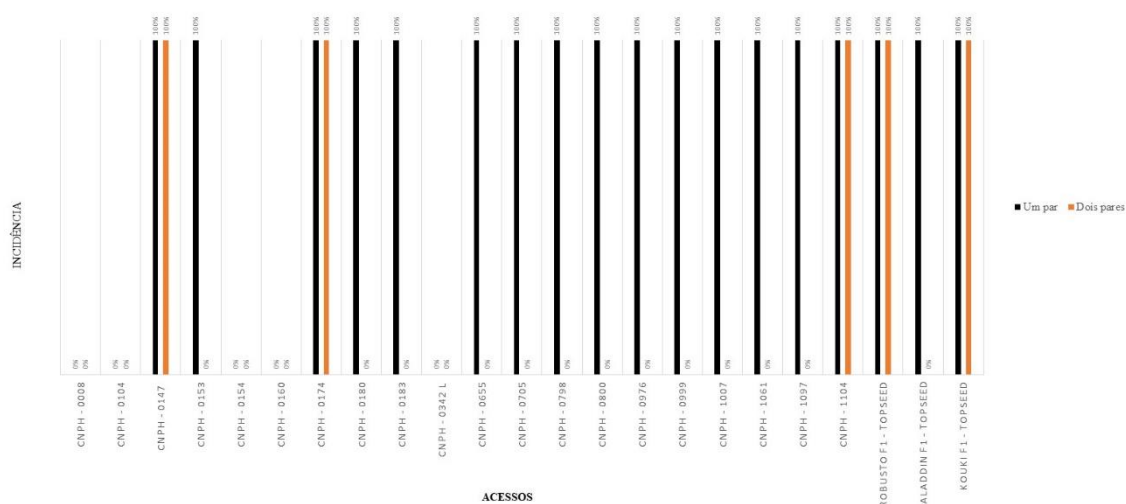


No segundo experimento, os acessos CNPH-008, CNPH-0104, CNPH-0154, CNPH-0160 e CNPH-0342L apresentaram resistência em ambos os estágios fisiológicos. Os acessos Aladdin F1, CNPH-0153, CNPH-0160, CNPH-0180, CNPH-0183, CNPH-0655, CNPH-0705, CNPH-0798, CNPH-0800, CNPH-0976, CNPH-0999 e CNPH-1007 apresentaram resposta do tipo resistência somente quando inoculadas em plântulas com dois pares de folhas verdadeiras, enquanto no estágio de um par de folhas verdadeiras destes acessos se mostraram altamente suscetíveis (**Figura 3**). Respostas de resistência diferenciadas de acordo com a idade da planta têm sido reportadas na literatura para diferentes patossistemas envolvendo isolados de *P. capsici* (ANDO et al., 2009; ANDO et al., 2015; GEVENS et al. 2006; MANSFELD et al. 2017; MANSFELD et al. 2020; REIFSCHNEIDER et al., 1992; PAZ-LIMA et al., 2005).

Os demais acessos apresentaram uma estabilidade fenotípica, exceto pelo acesso Robusto F1, que no segundo experimento se apresentou suscetível em ambos os estágios vegetativos, o que pode mostrar que no primeiro experimento possa ter havido um

possível escape para este único acesso em questão. É válido salientar que todos os acessos se comportaram da mesma maneira para os isolados (PCPE17 e PCBE 23).

Figura 3. Resultado do experimento 02, com mudas apresentando um e dois pares de folhas verdadeiras, o gráfico mostra dos níveis de incidência em ambos os estágios para cada acesso.



Avanços no melhoramento de pepino para resistência a *P. capsici* na fase frutos têm sido mais intensos e concentrado em regiões temperadas (ANDO et al., 2009; COLLE et al., 2014; GEVENS et al., 2006; GRANKE et al., 2012; GRUMET & COLLE, 2017; MANSFELD et al., 2017; MANSFELD et al., 2020; LIN et al., 2023). No entanto, poucos trabalhos foram conduzidos na busca por fontes de resistência a *P. capsici* na fase de plântulas, que é a principal manifestação da doença nas condições brasileiras. Neste contexto, o presente trabalho representa uma importante contribuição para o melhoramento do pepino em condições Neotropicais.

É interessante observar que o acesso CNPH-0008 apresenta em seu genoma o gene recessivo *STAYGREEN* que confere resistência durável de amplo espectro, incluindo resistência a isolados de outro oomiceto – *Pseudoperonospora cubensis* – agente causal do míldio do pepino (WANG et al. 2019).

No presente trabalho foi verificado uma influência da resposta da planta para *P. capsici* em função da idade da planta como observado em outros patossistema envolvendo esse oomiceto (ANDO et al., 2009; ANDO et al., 2015; GEVENS et al. 2006; MANSFELD et al. 2017; MANSFELD et al. 2020; REIFSCHNEIDER et al., 1992; PAZ-LIMA et al., 2005). Acessos com respostas estáveis de resistência do tipo “juvenil” foram detectadas no presente trabalho e podem representar importantes fontes de resistência

para programas de melhoramento. Alguns destes acessos já variedades comerciais, podendo, desta forma, ter uso imediato especialmente em áreas com histórico de infestação por *P. capsici*.

Figura 4. Mudanças de pepino com um par de folhas verdadeiras apresentando sintomas de murcha de *Phytophthora capsici*.



Figura 5. Mudanças de pepino com um par de folhas verdadeiras dois dias após a inoculação, apresentando o resultado severo de infecção por *Phytophthora capsici*.



Figura 6. Mudanças de pepino com dois pares de folhas verdadeiras apresentando sintomas de murcha de *Phytophthora capsici*.



REFERÊNCIAS

- ANDO, K., HAMMAR, S., GRUMET, R. (2009). Age-related resistance of diverse cucurbit fruit to infection by *Phytophthora capsici*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(2), 176-182.
- ANDO, K., & GRUMET, R. (2006). Evaluation of altered cucumber plant architecture as a means to reduce *Phytophthora capsici* disease incidence on cucumber fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131(4), 491-498.
- ANDO, K., CARR, K. M., COLLE, M., MANSFELD, B. N., GRUMET, R. (2015). Exocarp properties and transcriptomic analysis of cucumber (*Cucumis sativus*) fruit expressing age-related resistance to *Phytophthora capsici*. *PLoS One*, 10(11), e0142133.
- BABADOOST, M. (2016). Oomycete diseases of cucurbits: History, significance, and management. *Horticultural Reviews Volume 44*, 44, 279-314.
- CHAVEZ, D. J., KABELKA, E. A., CHAPARRO, J. X. (2011). Screening of *Cucurbita moschata* Duchesne germplasm for crown rot resistance to Floridian isolates of *Phytophthora capsici* Leonian. *HortScience*, 46(4), 536-540.
- COLLE, M., STRALEY, E. N., MAKELA, S. B., HAMMAR, S. A., & GRUMET, R. (2014). Screening the cucumber plant introduction collection for young fruit resistance to *Phytophthora capsici*. *HortScience*, 49(3), 244-249.
- DAS, A., SINGH, S., ISLAM, Z., MUNSHI, A. D., BEHERA, T. K., DUTTA, S., DEY, S. S. (2022). Current progress in genetic and genomics-aided breeding for stress resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Scientia Horticulturae*, 300, 111059.
- DONAHOO, R. S., TURECHEK, W. W., THIES, J. A., & KOUSIK, C. S. (2013). Potential sources of resistance in US *Cucumis melo* PIs to crown rot caused by *Phytophthora capsici*. *HortScience*, 48(2), 164-170.
- GEVENS, A. J., ANDO, K., LAMOUR, K. H., GRUMET, R., & HAUSBECK, M. K. (2006). A detached cucumber fruit method to screen for resistance to *Phytophthora capsici* and effect of fruit age on susceptibility to infection. *Plant Disease*, 90(10), 1276-1282.
- GRANKE, L. L., QUESADA-OCAMPO, L. M., & HAUSBECK, M. K. (2012). Differences in virulence of *Phytophthora capsici* isolates from a worldwide collection on host fruits. *European Journal of Plant Pathology*, 132, 281-296.
- GRUMET, R., & COLLE, M. (2017). Cucumber (*Cucumis sativus*) breeding line with young fruit resistance to infection by *Phytophthora capsici*. *HortScience*, 52(6), 922-924.
- GRUMET, R., MCCREIGHT, J. D., MCGREGOR, C., WENG, Y., MAZOUREK, M., REITSMA, K., FEI, Z. (2021). Genetic resources and vulnerabilities of major cucurbit crops. *Genes*, 12(8), 1222.
- HASHEMI, L., GOLPARVAR, A. R., NASR ESFAHANI, M., GOLABADI, M. (2019). Correlation between cucumber genotype and resistance to damping-off disease caused by *Phytophthora melonis*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 1494-1504.

- HASHEMI, L., GOLPARVAR, A. R., NASR-ESFAHANI, M., GOLABADI, M. (2020). Expression analysis of defense-related genes in cucumber (*Cucumis sativus* L.) against *Phytophthora melonis*. *Molecular Biology Reports*, 47, 4933-4944.
- HAUSBECK, M. K., & LAMOUR, K. H. (2004). *Phytophthora capsici* on vegetable crops: Research progress and management challenges. *Plant Disease*, 88(12), 1292-1303.
- HE, N. W.; YANG, X. B.; TIAN, L. M.; ZHAO, Y. (2011). In vitro antioxidant activity of cucumber polysaccharides. *Food Sci* 32:70–74.
- KANG, Y., TONG, J., LIU, W., JIANG, Z., PAN, G., NING, X., ZHONG, M. (2023). Comprehensive Analysis of Major Latex-Like Protein Family Genes in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) and Their Potential Roles in Phytophthora Blight Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 784.
- KAUR, M., & SHARMA, P. (2022). Recent advances in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 97(1), 3-23.
- KRASNOW, C. S., NAEGELE, R. P., & HAUSBECK, M. K. (2014). Evaluation of fruit rot resistance in cucurbita germplasm resistant to *Phytophthora capsici* crown rot. *HortScience*, 49(3), 285-288.
- KRASNOW, C. S., HAMMERSCHMIDT, R., HAUSBECK, M. K. (2017). Characteristics of resistance to Phytophthora root and crown rot in *Cucurbita pepo*. *Plant Disease*, 101(5), 659-665.
- LI Y. P.; LIANG, K. J.; LI, M. T.; ZHANG, Y.; ZHOU, S. K.; CHEN, X.; LANG, J. B. (2015) Nutritional content and function of cucumber and grafting technique. *Shanghai Agric Sci Technol* 1:89–131.
- LIN, Y. C., MANSFELD, B. N., TANG, X., COLLE, M., CHEN, F., WENG, Y., GRUMET, R. (2023). Identification of QTL associated with resistance to *Phytophthora* fruit rot in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Frontiers in Plant Science*, 14.
- MANSFELD, B. N., COLLE, M., KANG, Y., JONES, A. D., GRUMET, R. (2017). Transcriptomic and metabolomic analyses of cucumber fruit peels reveal a developmental increase in terpenoid glycosides associated with age-related resistance to *Phytophthora capsici*. *Horticulture research*, 4.
- MANSFELD, B. N., COLLE, M., ZHANG, C., LIN, Y. C., GRUMET, R. (2020). Developmentally regulated activation of defense allows for rapid inhibition of infection in age-related resistance to *Phytophthora capsici* in cucumber fruit. *BMC Genomics*, 21(1), 1-25.
- NAEGELE, R. P; WEHNER, T. C. (2017). Genetic resources of cucumber. In: GRUMET, R; KATZIR, N; GARCIA-MAS, J. (eds). *Genetics and genomics of Cucurbitaceae*. Springer, Berlin, pp 61–86.
- NASR-ESFAHANI, M., HASHEMI, L., NASEHI, A., NASR-ESFAHANI, A., NASR-ESFAHANI, A. (2020). Novel Cucumis enzymes associated with host-specific disease resistance to *Phytophthora melonis* Katsura. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 34(1), 873-884.

- NNEMATI, Z., & BANIHASHEMI, Z. (2015). Reaction of different *Cucurbita* species to *Phytophthora capsici*, *P. melonis* and *P. drechsleri* under greenhouse conditions. *Journal of Crop Protection*, 4(5), 705-709.
- PADLEY, L. D., KABELKA, E. A., ROBERTS, P. D., FRENCH, R. (2008). Evaluation of *Cucurbita pepo* accessions for crown rot resistance to isolates of *Phytophthora capsici*. *HortScience*, 43(7), 1996-1999.
- PAZ-LIMA, M. L.; BOITEUX, L. S.; REIS, A.; VARGAS, A. M.; LOPES, C. A.; CAFÉ FILHO, A. C. (2005). Efeito da idade da planta na expressão da resistência a *Phytophthora capsici* em genótipos de Cucurbitáceas e Solanáceas. *Summa Phytopatologica* 31(suplemento):82.
- PONTES, N. D. C., AGUIAR, F. M., BOITEUX, L. S., LIMA, M. L., OLIVEIRA, V. R., CAFÉ FILHO, A. C., REIS, A. (2014). Identification of sources of seedling resistance to *Phytophthora capsici* in *Cucumis melo*. *Tropical Plant Pathology*, 39, 74-81.
- QUESADA-OCAMPO, L. M., PARADA-ROJAS, C. H., HANSEN, Z., VOGEL, G., SMART, C., HAUSBECK, M. K., LAMOUR, K. (2023). *Phytophthora capsici*: Recent Progress on Fundamental Biology and Disease Management 100 Years After Its Description. *Annual Review of Phytopathology*, 61.
- REIS, A.; FEITOSA, M. I. S.; LUZ, E. D. N.; SANTOS A. F. (2023). Espécies fitopatogênicas de *Phytophthora*. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 100:215- 223. DOI: doi.org/10.31976/0104-038321v290003
- REIS A; PAZ-LIMA M. L; MOITA A. W; AGUIAR, F. M; FONSECA M. E. N; CAFÉ-FILHO A. C; BOITEUX, L. S. (2018). A reappraisal of the natural and experimental host range of Neotropical *Phytophthora capsici* isolates from Solanaceae, Cucurbitaceae, Rosaceae, and Fabaceae. *Journal of Plant Pathology* 100:215- 223. DOI: doi.org/10.1007/s42161-018-0069-z
- REIFSCHNEIDER, F. J. B; CAFÉ FILHO, A. C; RÊGO, A. M. (1986). Factors affecting the expression of pepper resistance to *Phytophthora* blight in screening trials. *Plant Pathology* 35: 451-456. DOI: doi.org/10.1111/j.1365-3059.1986.tb02042.x
- REIFSCHNEIDER, F. J. B; BOITEUX, L. S; DELLA-VECHIA, P. T; KURODA, N; POULOS, J. M. (1992). Inheritance of adult-plant resistance to *Phytophthora capsici* in pepper. *Euphytica*. 62. p.45-49.
- SANOGO, S., LAMOUR, K., KOUSIK, C. S., LOZADA, D. N., PARADA-ROJAS, C. H., QUESADA-OCAMPO, L. M., MILLER, S. A. (2023). *Phytophthora capsici*, 100 years later: Research mile markers from 1922 to 2022. *Phytopathology*, 113(6), 921-930.
- SHI, X. F; LI, Q; LI, X. H; XIAO, C; WANG, S. N. (2010). The anti-oxidation effect of *Cucumis sativus* Linn. flavonoids. *Food Res Dev* 31:85–86. A high-resolution cucumber cytogenetic map integrated with the genome assembly. *BMC Genomics*. v.14.
- TÖFOLI, J. G; DOMINGUES, R. J. (2018) Doenças Fúngicas em Cucurbitáceas. In: FILHO, J. U. T. B; FREITAS, P. S. L; BERIAN, L. O. S; GOTO, R. (Org.) Hortaliças-fruto. Maringá: Eduem, p.72-109

WANG, S.; KU, S. S.; YE, X.; HE, C.; KWON, S. Y.; CHOI, P. S. (2015). Current status of genetic transformation technology developed in cucumber (*Cucumis sativus* L.), Journal of Integrative Agriculture, v.14, 3^a ed., p.469-482 DOI: doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60899-6

WANG, X., BAO, K., REDDY, U. K., BAI, Y., HAMMAR, S. A., JIAO, C., FEI, Z. (2018). The USDA cucumber (*Cucumis sativus* L.) collection: Genetic diversity, population structure, genome-wide association studies, and core collection development. Horticulture research, 5.

WANG, Y., TAN, J., WU, Z., VANDENLANGENBERG, K., WEHNER, T. C., WEN, C., WENG, Y. (2019). STAYGREEN, STAY HEALTHY: A loss-of-susceptibility mutation in the STAYGREEN gene provides durable, broad-spectrum disease resistances for over 50 years of US cucumber production. New Phytologist, 221(1), 415-430.

WU, T., WANG, R., XU, X., HE, X., SUN, B., ZHONG, Y., LUO, S. (2014). *Cucumis sativus* L-type lectin receptor kinase (CsLecRK) gene family response to *Phytophthora melonis*, *Phytophthora capsici* and water immersion in disease resistant and susceptible cucumber cultivars. Gene, 549(2), 214-222.

YANG, S. J.; CHANG, Y. Q.; ZHENG, L. H.; WEI, Z. R.; QU, H. G.; CAO, S. G. (2005) Protective effects of cucurbitacin B on the acute liver injury induced by CCL4. Food Sci 26:9.

ZHANG, Y. T.; OU, Y. D. Y.; HE, X. H. (2012) Progress in antitumor effect of cucurbitacin B and its mechanism. Chin J Pharmacol Toxicol 26:112–115.

Patogenicidade e identificação molecular de espécies relacionadas aos complexos *Fusarium/Neocosmospora* causadoras de escurecimentos vasculares e podridões radiculares em pepino

Patogenicidade e identificação molecular de espécies relacionadas aos complexos *Fusarium/Neocosmospora* causadoras de escurecimentos vasculares e podridões radiculares em pepino

B.W.S. Lima¹, M. E. N. Fonseca², L.S. Boiteux^{1,2} & A. Reis^{1,2}

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, PE, Brazil.

²Embrapa Hortaliças, 70275-970, Brasília, DF, Brazil.

RESUMO

Doenças vasculares e podridões radiculares, coletivamente denominadas como “fusarioses”, têm sido reportadas como as principais doenças do pepino. As espécies mais comumente associadas com essa doença pertencem aos complexos *Fusarium/Neocosmospora*. A filogenia molecular passou a ser uma ferramenta crucial para caracterizações de patógenos destes complexos e outros gêneros relacionados. Novas abordagens taxonômicas mais precisas e robustas têm sido propostas. No entanto, esses novos tratamentos taxonômicos ainda não foram empregados e/ou validados em isolados relacionados indutores das “fusarioses” do pepino. O presente trabalho teve como objetivo conduzir a caracterização, via ensaios de patogenicidade e filogenia molecular, de isolados relacionados aos complexos *Fusarium/Neocosmospora* associados com as “fusarioses” do pepino. Os isolados de *Fusarium/Neocosmospora* foram submetidos ao processo de extração de DNA utilizando o método de CTAB 2X. Todos os isolados foram patogênicos em plântulas de pepino. A identificação molecular de um subconjunto de oito isolados foi realizada com base na informação de sequências da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*RPB2*) e do fator de alongamento da tradução 1-alfa (*TEF1*). Foi possível identificar dois isolados relacionados com o complexo de espécies *Fusarium oxysporum*, um com a espécie *F. verticillioides*, quatro pertencentes ao complexo *Fusarium incarnatum-equiseti* (relacionados com as espécies *F. pernambucanum* e *F. coffearum*). Também foi detectado um isolado do complexo *Neocosmospora solani*.

Palavras-chave: Murcha de *Fusarium*, etiologia, filogenia molecular, Cucurbitaceae.

ABSTRACT

Vascular diseases and root rots (collectively named as “*Fusarium wilts*”) have been reported as the main diseases of cucumber. The species most commonly associated with this disease belong to the *Fusarium/Neocosmospora* complexes. Molecular phylogeny has become a crucial tool for characterizing pathogens of the genus *Fusarium* and related genera. More accurate and robust taxonomic approaches have been proposed. However, these new taxonomic treatments have not yet been used and/or validated in isolates related to this complex able to induce “*Fusarium wilts*” of cucumber. The present work aimed to conduct the characterization, via molecular phylogeny and pathogenicity assays, of *Fusarium/Neocosmospora*-like isolates associated with the wilt diseases of cucumber. The isolates of *Fusarium/Neocosmospora* were subjected to DNA extraction using the CTAB 2X method. Molecular identification of a subset of eight isolates was performed based on sequence information from the second largest subunit of RNA polymerase II (RPB2) and translation elongation factor 1-alpha (TEF1). It was possible to identify two isolates related to the *Fusarium oxysporum* species complex, one to the *F. verticillioides*, four belonging to the *Fusarium incarnatum-equiseti* complex (related to the *F. perambucanum* and *F. coffearum*). An isolate from the *Neocosmospora solani* complex was also detected.

Keywords: *Fusarium* wilt, etiology, molecular phylogeny, Cucurbitaceae.

1. INTRODUÇÃO

O pepino (*Cucumis sativus* L.) é uma hortaliça amplamente difundida por todo o mundo. O cultivo do pepino se iniciou no Brasil através da colonização europeia, sendo atualmente produzido e comercializado em todo o país (ALMEIDA, 2006). O pepino é uma cultura anual de ciclo rápido, podendo alcançar mais de 40 t/ha⁻¹ em sistemas de cultivo convencionais (TAMWING, 2020), podendo variar dependendo das condições de plantio, e cultivar escolhida dada a sua finalidade tanto para o consumo in natura, quanto para o consumo na forma de conserva (SOUZA, et al., 2020).

Doenças vasculares e podridões radiculares, coletivamente denominadas como “fusarioses”, têm sido reportadas como as principais doenças do pepino, apresentando ocorrência também generalizada em campos de cultivo de outros membros da família das cucurbitáceas. As espécies mais comumente associadas com essa doença pertencem aos complexos *Fusarium solani* e *F. oxysporum* (TÖFOLI & DOMINGUES, 2018). A taxonomia clássica e molecular do gênero *Fusarium* tem sido objeto de constante revisão (BURGESS et al., 1994; CARRERA, 1975; NELSON et al., 1983). Inicialmente, a definição de novas espécies dentro do gênero dependia da planta hospedeira, o que resultou em um número elevado de espécies. Uma nova proposta de sistema organizacional (WOLLENWEBER & REINKING, 1935) envolveu a conjunção de informações morfológicas, características das colônias em meios de cultura específicos e círculo de plantas hospedeiras. Este trabalho levou a um reagrupamento do gênero em seções, reduzindo consideravelmente o número de espécies (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

O complexo de espécies de *Neocosmospora solani* como agente causal de podridão radicular de pepino, juntamente ao complexo de espécies de *Fusarium oxysporum* causando murcha, provocam perdas significativas em campos de cultivo. Em condições de monocultivo em estufas a alta densidade de inóculo do patógeno causa morte de plantas, levando a grandes perdas de produção (MELO, VALARINI, 1995; LOMBARD, et al., 2015).

Diferenças morfológicas e no alinhamento molecular com a combinação de diversas regiões gênicas, tais como RPB-2, TEF-1 e TUB-2, são utilizadas para diferenciação de espécies de *Fusarium* (Lima, 2020; Lombard et al, 2019). Corroborando com O’Donnel et al. (2015), que sugere as regiões da segunda subunidade maior da RNA polimerase II dependente de DNA (RPB-2) aliada ao fator de alongação 1- α (TEF-1) possuem maior confiabilidade para definição inicial do complexo de espécies dentro do gênero *Fusarium*.

O avanço nos estudos envolvendo complexo de espécies de *Fusarium* culminou no

estabelecimento de muitas novas espécies (DENIS et al., 2019). No entanto, uma controvérsia vigorou na taxonomia desse grupo de patógenos sendo que uma vertente se baseia na consolidação apenas dos clados F1 e F2 e outra que defende a existência do clado F3. A consolidação do clado F3 veio após a designação do gênero *Neocosmospora* para representar alguns importantes complexos incluindo *Neocosmospora solani* e *Neocospora falciformes* (O'DONNELL et al., 2008b, 2020). Análises recentes levaram a proposição e a adoção destas espécies dentro dos complexos *Fusarium/Neocosmospora*. (CROUS et al., 2021; BRAIT, 2023)

Desta forma, a filogenia molecular passou a ser uma ferramenta crucial para caracterizações mais precisa de espécies dentro do gênero *Fusarium* Nessa nova abordagem taxonômica, o clado terminal ficou como representante de todo o gênero *Fusarium* (CROUS et al., 2021; BRAIT, 2023). No entanto, esse novo tratamento taxonômico ainda não foi empregado e/ou validado em isolados relacionados ao gênero *Fusarium* associados com a fusariose ou podridão radiculares do pepino.

Foi proposto após análises filogenética de quatro genes, a introdução do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC), para identificar 28 espécies crípticas até então conhecidas como *Fusarium equiseti* e *Fusarium incarnatum* (O'DONNELL et al., 2009; WANG et al., 2019). O complexo de espécies *Fusarium incarnatum* compõe um grupamento cosmopolita presente no solo, sendo descrito pela primeira vez como patógeno causadores de podridão em sementes de feijão. Membros desse complexo também foram relatados reduzindo o potencial germinativo e o desenvolvimento de sementes e plântulas de sorgo, causando podridões em espécies de *Musa* e em *C. melo*. (DHINGRA & MUCHOVET, 1979; GOPOINATH et al., 1985; MCGOVERN, 1994; MARIN et al., 1996; SETA et al., 2004).

Devido à baixa quantidade de estudos atualizados sobre diversidade molecular de espécies de *Fusarium* em pepino nas condições brasileiras, o presente trabalho teve como objetivos: **(i)** conduzir a caracterização filogenética de isolados de *Fusarium/Neocosmospora* associados à podridão de raízes e colo do pepino (*C. sativus*); e **(ii)** confirmar e caracterizar a patogenicidade do complexo de espécies de *Fusarium/Neocosmospora* na cultura do pepino.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local dos experimentos

Os trabalhos foram conduzidos nos Laboratórios de Fitopatologia e Melhoramento Vegetal e nas casas de vegetação da Embrapa Hortaliças, localizada na zona rural da Ponte

Alta, em Brasília-DF, a 15°56'00" latitude sul, 48°08'00" longitude oeste e altitude de 997,6 m.

2.2. Obtenção e conservação dos isolados

Os isolados fúngicos foram retirados tanto da coleção fúngica do CNPH, quanto em condições de campo, obtidos a partir de plântulas e frutos de pepino apresentando sintomas de murcha, tombamento, podridão radicular e podridão em frutos, em cultivo protegido e em campo aberto, em diversas regiões produtoras de pepino (**Tabela 1**). Para o isolamento foi seguido o protocolo de isolamento indireto de microrganismos em órgãos lenhosos ou carnosos (CAROLLO & FILHO, 2016), retirando fragmentos das raízes, passando pelo processo de desinfestação afim de reduzir a probabilidade de contaminação por organismos oportunistas. Os isolados da micoteca da Embrapa Hortaliças relacionados aos complexos *Fusarium/Neocosmospora* foram mantidos pelo método de conservação em água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1939), e todos foram recuperados desta coleção em meio de cultura Batata-dextrose-ágar (BDA).

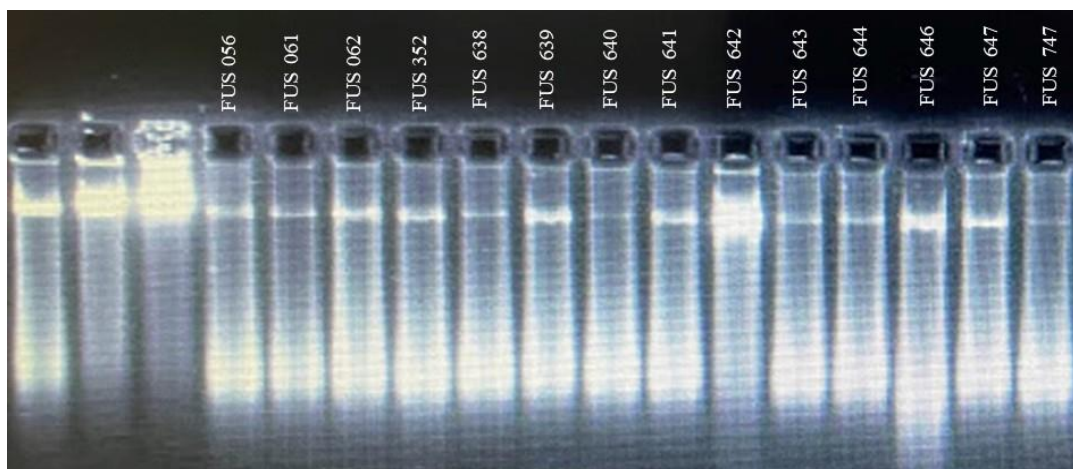
Tabela 1. Isolados de *Fusarium/Neocosmospora* usados neste trabalho e mantidos na coleção de fungos e oomicetos da Embrapa Hortaliças (CNPH), contendo o código, gênero/espécie, hospedeiro, cidade/estado e ano de coleta.

Código do isolado	Hospedeira	Cidade/Estado	Ano de coleta
FUS056	Pepino	Ponte Alta-DF	1994
FUS061	Pepino	Posse-SP	1995
FUS062	Pepino	Posse-SP	1995
FUS352	Pepino	Tijucas-SC	2015
FUS638	Pepino	Brazlândia-DF	2021
FUS639	Pepino	Brazlândia-DF	2021
FUS640	Pepino	Padre Bernardo-GO	2021
FUS641	Pepino	Padre Bernardo-GO	2021
FUS642	Pepino	Padre Bernardo-GO	2021
FUS643	Pepino	Padre Bernardo-GO	2021
FUS644	Pepino	Padre Bernardo-GO	2021
FUS646	Pepino	Brazlândia-DF	2021
FUS647	Pepino	Brazlândia-DF	2021
FUS747	Pepino	Posse-SP	2022

2.3. Caracterização molecular dos isolados de *Fusarium/Neocosmospora*

Os isolados de *Fusarium/Neocosmospora* foram submetidos ao processo de extração de DNA utilizando o método de CTAB 2X, que utiliza solventes orgânicos, tais como álcool isoamílico e clorofórmio, essencialmente como previamente (SAGHAI-MARROF et al., 1984; BOITEUX et al., 1999). A identificação molecular dos isolados, foi realizada com base na filogenia de sequências de duas regiões genômicas: segunda maior subunidade da RNA polimerase II (**RPB2**) utilizando os primers: '**RPB2-5F2**' (5'-GAT-GAT-CGT-GAT-CAT-TTC-GG-3') e '**RPB2-7cr**' (5'-CCC-ATA-GCT-TGC-TTA-CCC-AT-3'). Para o fator de alongamento da tradução 1-alfa (**TEF1**) foram utilizados os primers: '**EF1**' (5'-ATG-GGT-TAA-GGA-RGA-CAA-GAC-3') e '**EF2**' (5'-GGA-RGT-ACC-AGT-SAT-CAT-G-3') (O'DONNELL et. al., 2008b). Todos os ensaios de PCR foram realizados utilizando termociclador Bio-Rad T100™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Figura 1. Extração de DNA total de isolados de *Fusarium/Neocosmospora* associados com a cultura do pepino, empregando o método CTAB.

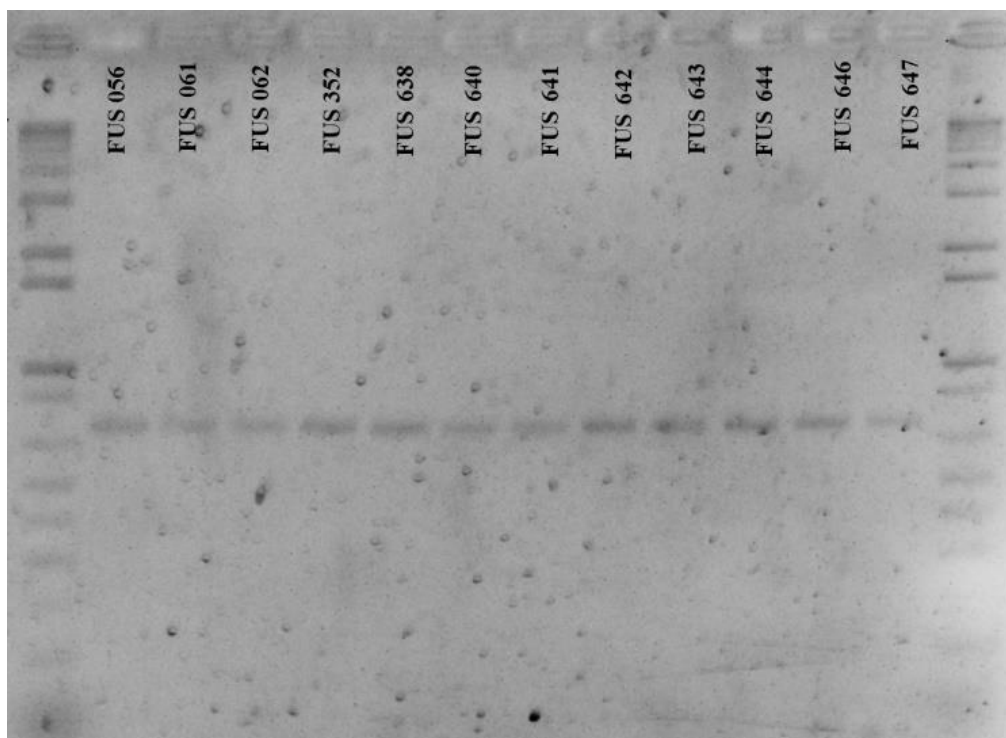


2.4. Amplificação da região do gene codificador do fator de alongação de tradução 1 α (TEF-1) e do gene codificador da RNA polimerase II (RPB2)

Para amplificação da região TEF1, ensaios de PCR foram realizados empregando um master mix contendo 1,5 μ L de DNA (50 ng/ μ l); 1.2 μ L de MgCl₂, 1 μ L de cada primer (10 mM); 2 μ L de dNTPs (10 mM); 0.64 μ L de *Taq* DNA polimerase (5 U/ μ L) e 10,66 μ L de água Milli-Q, com volume da reação final de 20 μ L (CAIXETA et al., 2013). O ciclo da PCR constitui-se da desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos; e 35 ciclos seguindo por desnaturação inicial a 95 °C por 45 segundos, anelamento a 53°C por 45 segundos e extensão a

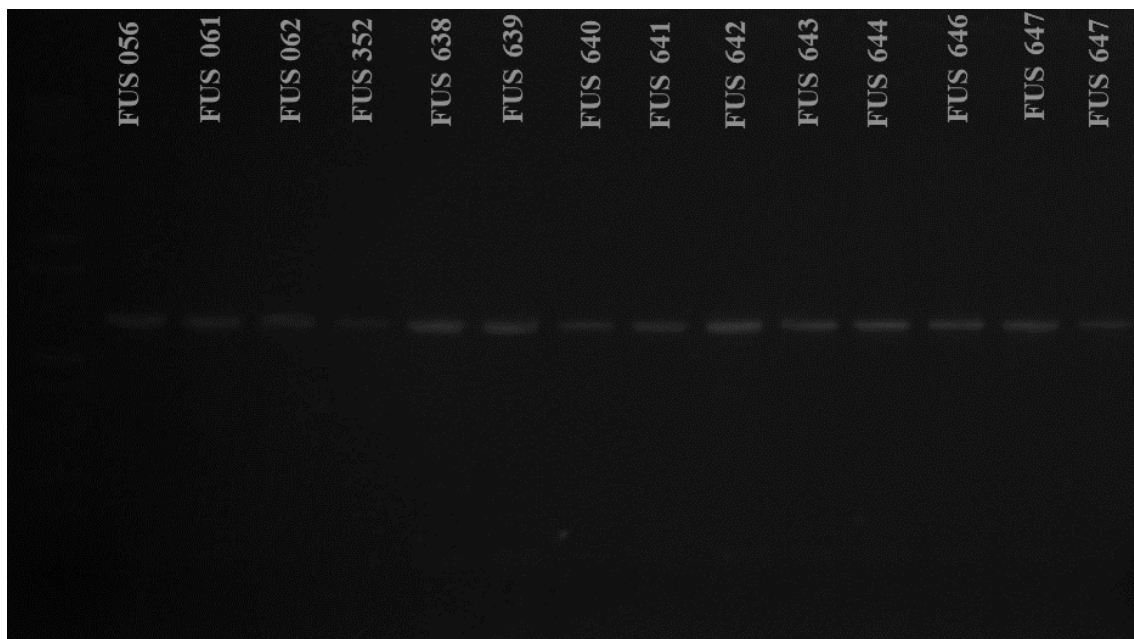
72 °C por 2 minutos, e por fim, um ciclo de extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Figura 2. Produtos PCR (650~850 pb) obtidos do DNA extraído de doze isolados de *Fusarium/Neocosmospora* associados com a cultura do pepino com primers EF1 5'-ATG-GGT-TAA-GGA-RGA-CAA-GAC-3' e EF2 5'-GGA-RGT-ACC-AGT-SAT-CAT-G. 3' (O'DONNELL *et. al.*, 2008). Estes primers foram desenhados para anelar com um segmento do gene codificador do **fator de alongação de tradução 1 α** (TEF-1) de isolados de pepino.



Para amplificação da **região RPB2**, os ensaios de PCR foram realizados através da preparação de um master mix contendo: DNA (50 ng/ μ l); 1.2 μ L de MgCl₂, 1 μ L de cada primer (10 mM); 2 μ L de dNTPs (10mM); 0.64 μ L de *Taq* DNA polimerase (5 U/ μ L) e 10,66 μ L de água Milli-Q com volume da reação final de 20 μ L (CAIXETA *et al.*, 2013). O ciclo da PCR constitui-se da desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos; e 35 ciclos seguindo por desnaturação inicial a 95 °C por 45 segundos, anelamento a 53 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos, e por fim, um ciclo de extensão final a 72 °C por 10 minutos. Por fim, os produtos de amplificação (amplicons) de ambas as regiões gênicas foram purificados com o kit PureLink[®] PCR Purification (Invitrogen[®], CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante, e levados ao Laboratório de Geômica da Embrapa Hortaliças para sequenciamento.

Figura 3. Produtos PCR (650~850 pb) obtidos do DNA extraído de isolados de *Fusarium/Neocosmospora* associados com a cultura do pepino) utilizando os primers **RPB2-5F2** (5'-GAT-GAT-CGT-GAT-CAT-TTC-GG-3') e **RPB2-7cr** (5'-CCC-ATA-GCT-TGC-TTA-CCC-AT-3') (O'DONNELL *et. al.*, 2008). Estes primers foram desenhados para anelar com um segmento do gene codificador **RNA polimerase II (RPB2)** de isolados de pepino.



2.6. Análise filogenética

Um subconjunto de isolados com alta qualidade de sequência (ou seja, nucleotídeos bem definidos e qualidade acima de 50), de acordo com o software Seqman (Lasergene[®], Madison, WI), foi selecionado para análises moleculares. Os dados da região ITS e do gene *cox2* de oomicetos utilizados para comparação com os isolados neste trabalho foram obtidos a partir de genomas de isolados de referência depositados no GenBank. Os contigs de cada isolado foram construídos combinando as sequências obtidas com os primers correspondentes no software SeqMan (Lasergene[®], Madison, WI). As sequências dos isolados foram alinhadas no programa Geneious[®] 8.1.9 utilizando o algoritmo ClustalW. Os contigs foram ajustados manualmente para garantir que os alinhamentos dos códons fossem mantidos de acordo com as sequências de referência. As análises filogenéticas foram realizadas utilizando Máxima Verossimilhança (ML) e inferência Bayesiana (BI). Os dois métodos disponíveis como “plugins” do programa Geneious[®] 8.1.9 foram utilizados neste trabalho. Para ML os parâmetros utilizados foram: 1000 pseudoréplicas (-m GTRGAMMA -p 12345 -k -fa -N 1000 -x 12.345), modelo GTR GAMMA. Para o BI, inicialmente o melhor modelo de substituição evolutiva foi estimado pelo programa MrModeltest 2.3 (incluído no plugin PAUP), sendo definido como HKY85. Quatro

algoritmos “Markov Chain Monte Carlo” (MCMC) foram conduzidos por 107 gerações, com amostragens a cada 1.000 gerações. A convergência de todos os parâmetros foi verificada utilizando o Tracer versão 1.7 (RAMBAUT et al. 2018) e os primeiros 25% das gerações foram descartados como *burn-in*.

2.7. Preparo do inóculo, produção de mudas, inoculação e avaliação

Foi testada a patogenicidade de uma coleção de isolados de *Fusarium/Neocosmospora*, obtidos de plantas de pepino com sintomas de podridão de raiz e murcha vascular (**Tabela 1**). O preparo de mudas foi feito em bandejas de polietileno contendo substrato Bioplant Plus[®], com suplementação utilizando o fertilizante Osmocote[®], colocando 2 sementes por célula, as bandejas foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas duas vezes ao dia. Os isolados foram cultivados em Elermeyers contendo meio líquido batata-dextrose (BD) durante sete dias. Para a preparação de inóculo, o conteúdo dos Elermeyers foi filtrado em gazes esterilizadas, em seguida adicionado uma alíquota de ADE e os conídios foram contados em câmara de Neubauer. A solução de conídios foi ajustada para 2×10^6 conídios/mL⁻¹. A inoculação foi realizada utilizando o método de imersão de raízes (*root dipping*). As plântulas, com 14 dias apresentando o início do lançamento do primeiro par de folhas verdadeiras, tiveram suas raízes lavadas e podadas com o auxílio de uma tesoura, e imersas na solução de conídios por três minutos e foram transferidas para vasos de 0,5 L contendo solo adubado estéril (McKNIGHT 1951). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. Cada repetição foi constituída de um vaso com duas plantas. A avaliação dos sintomas foi feita a cada 48 horas, as plântulas que estavam tombadas e/ou murchas/mortas, eram retiradas para reisolamento e as colônias fúngicas obtidas foram comparadas com as colônias originais.

3. RESULTADOS

3.1. Bioensaios com isolados associados com as “fusarioses” do pepino e amplificação das duas regiões genômicas

Foram obtidos 14 isolados de *Fusarium/Neocosmospora* de plantas e frutos de pepino, coletados em em quatro unidades da federacao e três regiões do Brasil (Tabela 1). Foi obtido sucesso na extração total de DNA de todos os isolados (Figura 1) e na obtenção de fragmentos de DNA de 650~850 pb das regiões TEF-1 (Figura 2) e RPB2 (Figura 3) em um subgrupo de 13 isolados. No entanto, não foi possível obter sequencias para as duas regiões genômicas para todos os isolados. Os 14 isolados se mostraram patogênicos em mudas de pepino, induzindo

diferentes quadros sintomatológicos em condições de campo e nos bioensaios (Figura 4).

Figura 4. Plantas de pepino com sintomas de murcha em campo (**a, b**). Raízes de pepino apresentando podridão (**c**); Teste de patogenicidade dos isolados (**d**); Plântulas com sintoma de tombamento e murcha em contraste com plântulas saudáveis (**e, f**).



3.2. Análise preliminar (via BLASTn) das sequências do gene TEF-1 para um subgrupo de 13 isolados

Os resultados do BLASTn para ambas as regiões genômicas estão apresentados nas Tabelas 2 e 3. Foi possível nesta análise preliminar a identificação de pelo menos quatro diferentes espécies/complexos. Para o gene TEF-1, os isolados FUS056 e FUS747 foram classificados como *Fusarium oxysporum*, o isolado FUS352 foi classificado como *Neocosmospora solani*, FUS061 como *F. verticillioides*, FUS062, FUS638 e FUS646 como *F. flageliforme*, e o isolado FUS643 como um membro do complexo *F. incarnatum-equiset*. O isolado FUS639 após a amplificação da região TEF-1 foi relacionado com isolados *F. caatingaense*. No entanto, não foi obtido sucesso na amplificação da região RPB2 para esse isolado. É importante destacar que os isolados FUS062, FUS638, FUS639, FUS643, FUS646 pertencem ao mesmo grupo do complexo *F. incarnatum-equiset* (FIESC).

Tabela 2. Resultado das comparações com o banco de dados do NCBI (via BLASTn) para as sequencias correspondendo a uma região do gene codificador do fator de alongação de tradução 1 α (TEF-1) de 13 isolados de *Fusarium*/*Neocosmospora* associados com a cultura do pepino.

Isolado	Espécie	Query	Per. Ident. (%)
FUS056	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	99,35
FUS061	<i>Fusarium verticillioides</i>	100	99,56
FUS062	<i>Fusarium</i> sp.	94	95,83
FUS352	<i>Neocosmospora solani</i>	99	99,59
FUS638	<i>Fusarium flageliforme</i>	99	99,30
FUS639	<i>Fusarium caatingaense</i>	99	96,04
FUS640	<i>Fusarium</i> sp.	100	96,08
FUS641	<i>Fusarium</i> sp.	100	84,49
FUS642	<i>Fusarium</i> sp.	97	95,36
FUS643	<i>F. incarnatum-equiseti</i>	96	97,47
FUS644	<i>Fusarium</i> sp.	100	90,44
FUS646	<i>Fusarium</i> sp.	100	100
FUS647	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	100

Tabela 3. Resultado das comparações com o banco de dados do NCBI (via BLASTn) para as sequencias correspondendo a uma região do gene codificador da RNA polimerase II (RPB2) de oito isolados de *Fusarium*/*Neocosmospora* associados com a cultura do pepino. ND = sequência não disponível.

Isolado	Espécie	Query Cover (%)	Per. Ident. (%)
FUS056	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	99,35
FUS061	<i>Fusarium verticillioides</i>	100	99,56
FUS062	<i>Fusarium equiseti</i>	94	95,83
FUS352	<i>Neocosmospora solani</i>	99	99,59
FUS638	<i>Fusarium equiseti</i>	95	99,51
FUS639	ND	ND	ND
FUS640	ND	ND	ND
FUS641	ND	ND	ND
FUS642	ND	ND	ND
FUS643	<i>Fusarium coffeatum</i>	97	98,83
FUS644	ND	ND	ND
FUS646	<i>Fusarium coffeatum</i>	99	97,30
FUS647	<i>Fusarium oxysporum</i>	97	99,70

3.3. Análise filogenética RNA polimerase II (RPB2) com um subconjunto de oito isolados

Devido a impossibilidade de obtenção de sequências das duas regiões genômicas para todos os isolados, a identificação via filogenia molecular foi conduzida apenas com um subconjunto de oito isolados foi realizada com base na informação de sequências da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*RPB2*). Foi possível identificar via filogenia dois isolados relacionados com o complexo de espécies *Fusarium oxysporum*, um com a espécie *F. verticillioides*, quatro pertencentes ao complexo *Fusarium incarnatum-equiseti* (relacionados com as espécies *F. pernambucanum* e *F. coffearum*) (Figura 5). Também foi detectado um isolado do complexo *Neocosmospora solani* (Figura 6).

Figura 5. Árvore de máxima verossimilhança inferida a partir dos alinhamentos do gene codificador **RNA polimerase II (RPB2)** de sete isolados de pepino previamente alocados para o gênero *Fusarium*. Valores de suporte de bootstrap (≥ 50) e valores de probabilidade posterior bayesiana ($\geq 0,50$) são indicados nos nós. Os isolados gerados neste estudo foram indicados em fonte vermelha. Os números dos acessos do GenBank são mostrados ao lado do binomial latino. A árvore está enraizada no ponto médio. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site. Os isolados estão codificados conforme **Tabela 1**. *Neurospora crassa* (AF107789) foi utilizada como *outgroup*.

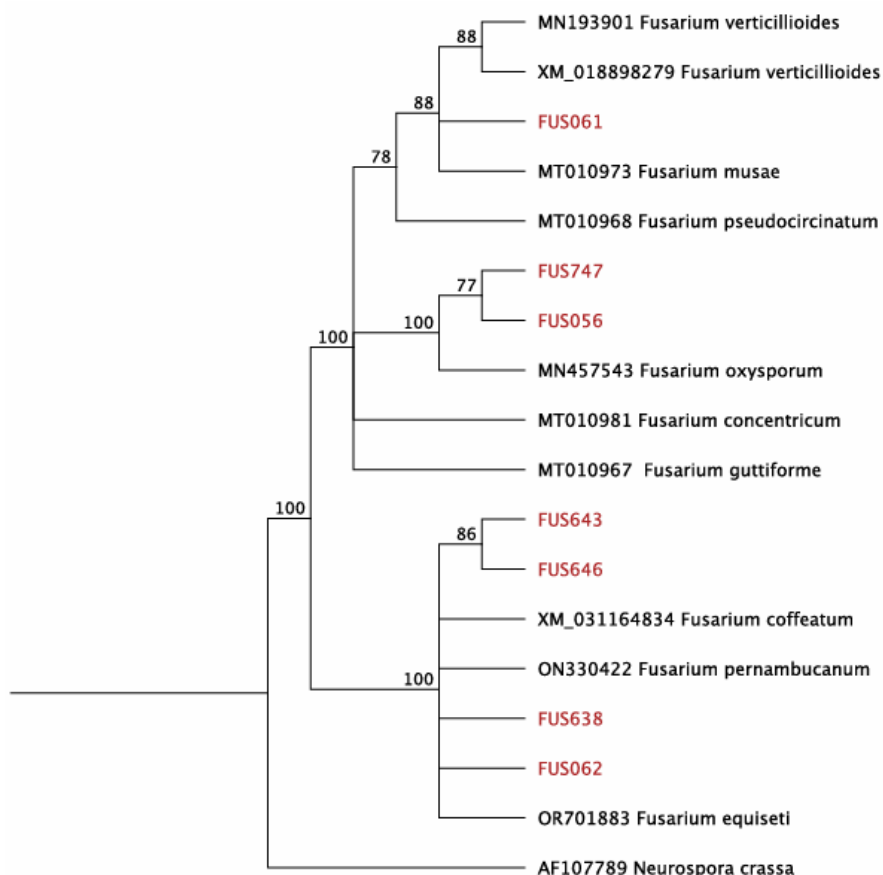
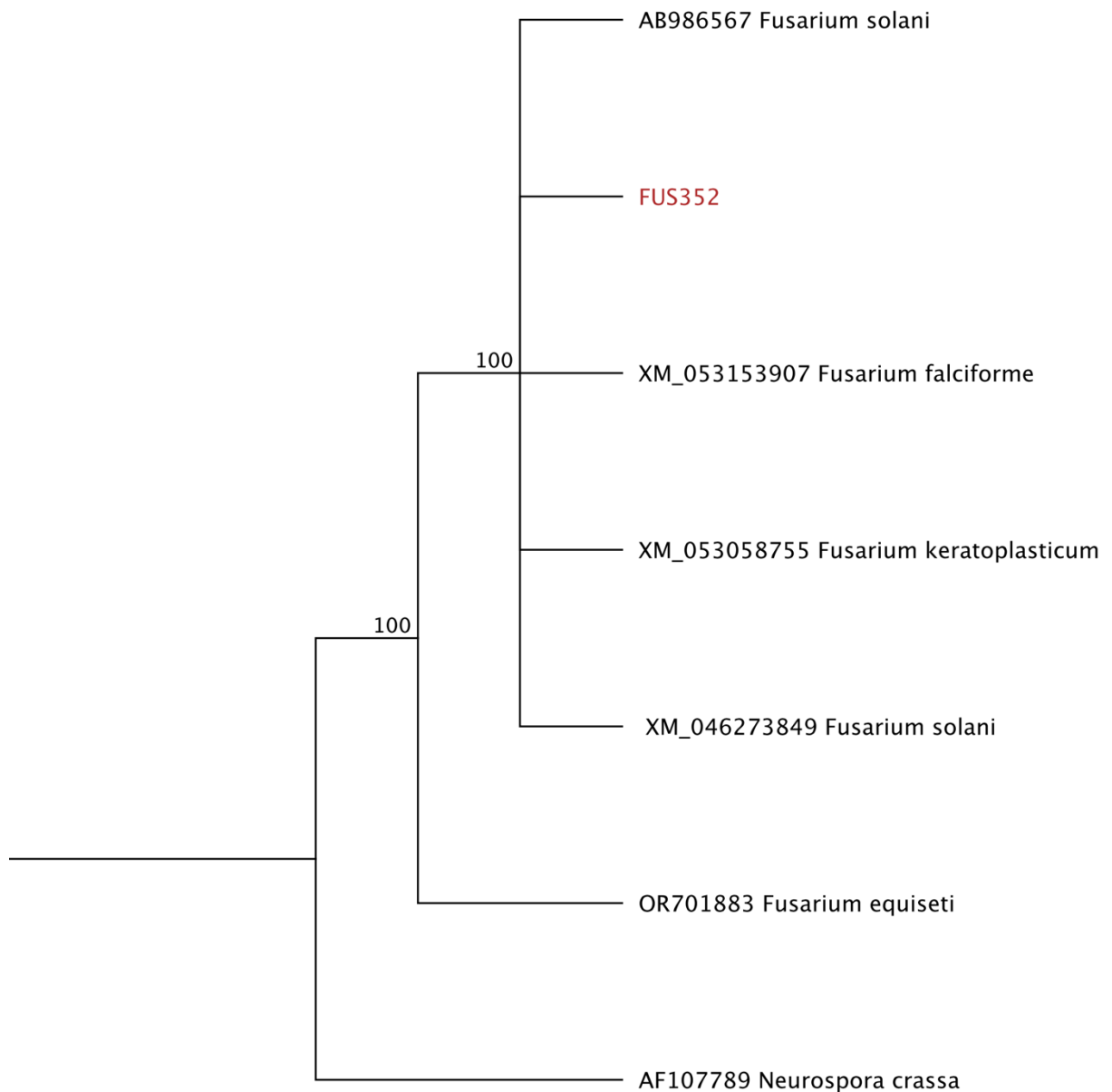


Figura 6. Árvore de máxima verossimilhança inferida a partir dos alinhamentos do gene codificador **RNA polimerase II (RPB2)** do isolado de pepino previamente alocados para o gênero *Neocosmospora* (= complexo de espécies *Fusarium solani*). Valores de suporte de bootstrap (≥ 50) e valores de

probabilidade posterior bayesiana ($\geq 0,50$) são indicados nos nós. Os isolados gerados neste estudo foram indicados em fonte vermelha. Os números dos acessos do GenBank são mostrados ao lado do binomial latino. A árvore está enraizada no ponto médio. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site. Os isolados estão codificados conforme **Tabela 1**. *Neurospora crassa* (AF107789) foi utilizada como *outgroup*.



No presente trabalho foi possível identificar via filogenia molecular foi conduzida apenas com um subconjunto de oito isolados foi realizada com base na informação de sequências da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*RPB2*). Foi possível identificar dois isolados, foram relacionados com o complexo de espécies *Fusarium oxysporum*, um com a espécie *F. verticillioides*, quatro pertencentes ao complexo *Fusarium incarnatum-equiseti* (relacionados com as espécies *F. pernambucanum* e *F. coffearum*), sendo este, o primeiro relato destes complexos associados à cultivos de pepino no Brasil. Por fim, também foi detectado um isolado do complexo *Neocosmospora solani*.

4. DISCUSSÃO

O gênero *Fusarium* abriga espécies fitopatogênicas com uma ampla variedade de hospedeiros e estratégias de infecção (PIETRO et al., 2003). A coleção de linhagens clonais dentro do gênero como o complexo de espécies *Fusarium oxysporum* causa doenças graves em mais de 100 espécies de plantas, incluindo culturas economicamente importantes, como grão de bico, tomate, banana e cucurbitáceas (MICHELSE et al., 2009).

Patógenos importantes de uma série de culturas agrícolas recentemente classificados dentro dos complexos *Fusarium/Neocosmospora* (CROUS et al., 2021), podem causar doenças associadas a mais de uma espécie do mesmo complexo. Um exemplo é a cultura da soja onde, *Neocosmospora phaseoli*, *F. tucumaniae*, *F. brasiliense* e *F. cuneirostrum* foram reportados como causadores da síndrome da morte súbita (AOKI et al., 2003). O agente causal da murcha do fusário em pepineiro é, em geral, pertencente ao complexo *Fusarium oxysporum*. Espécies de *Fusarium* têm sido relatadas por causar doenças de murcha similares às aquelas causadas por *F. oxysporum*, como, por exemplo registros de *N. solani* como causador de doenças vasculares em melão (MENEZES, 2009). O primeiro registro de *N. solani* (agora *F. solani*) em plantas de abobrinha (*Cucurbita pepo*) ocorreu no continente africano (DOIDGER & KRESFELDER, 1932), mais tarde o termo “formae speciales” foi adicionado, passando a ser chamado de *F. solani* f. sp. *cucurbitae* (SNYDER & HANSEN, 1941). O termo raça 1 foi atribuído anos depois que em seus estudos verificaram a patogenicidade também em pepino, melão (*C. melo*) e abóbora (*C. vulgaris*) (TOUNSSON & SNYDER, 1961), enquanto outros isolados obtidos de abobrinha não se mostraram patogênicos. Com o avanço da divulgação de estudos a respeito deste patógeno, houve também o relato de ser patogênico em frutos, raízes e colo de cucurbitáceas na América do Norte, Oriente Médio e Europa. (ELMER et al. 2007; MEHL, EPSTEIN 2007; GÓMEZ et al. 2014; HUSSEIN & JUBER 2014; TOUSSON & SNYDER, 1961). Também estão disponíveis relatos de murcha de *Fusarium* em plantas de melancia

(*Citrullus lanatus*), causada por *F. moniliforme* I. Sheld e *F. moniliforme* var. *subglutinans* Wollen Web. & Reinking, com sintomas de atrofia, amarelecimento, necrose das folhas e murcha. Isolados de *N. solani* e *F. javanicum* Koord causando murchas em plântulas de pepino também foram reportados em Israel (ZITTER et al., 1996).

Em cucurbitáceas o complexo *F. esquisteti* tem sido reportado causando podridões em frutos com contato direto no solo, raízes e mudas, e já foi relatado em diversas partes do mundo: causando podridão em *C. sativus* e *C. melo* no Irã, em abóbora no Paquistão e também causando descoloração em raízes de *Panax ginseng* no continente norte americano e tombamento de mudas de *C. melo* na China (AKRAM et al., 2019; CHEHRI, et al., 2011; LI, et al., 2017; NAZ et al., 2018; PUNJA, et al., 2007; RAMDIAL, 2017). No Brasil, *F. esquisteti* foi encontrado causando podridão em *C. melo* e *Oryza sativa*, além também de ser relatado como entomopatogênico, sendo estudado como um potencial agente de controle biológico de insetos (AVILA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2014; SANTOS et al., 2019).

O gênero *Neocosmospora* (complexo de espécies *Fusarium solani*) engloba saprófitos, endófitos vegetais e patógenos de grande importância econômica, bem como patógenos animais oportunistas. Mesmo com os recentes avanços na filogenia de espécies, a diversidade de espécies deste gênero permanece pouco caracterizada e com enormes carências de descrições formais e nomes latinos (SANDOVAL-DENIS et al., 2019). A estabilização taxonômica deste grupo tem sido buscada por meio de análises morfológicas e filogenéticas baseadas nas sequências de rDNA (ITS e LSU), *rpb2* e *tef1e* atualmente, sendo um total de 78 espécies são aceitas dentro de *Neocosmospora*. No presente trabalho um isolado foi identificado com *N. solani*.

É possível que esse complexo seja ainda mais diverso em pepino. Devido a impossibilidade de obtenção de sequências das duas regiões genômicas para todos os isolados, a identificação via filogenia molecular foi conduzida apenas com um subconjunto de oito isolados foi realizada com base na informação de sequências da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*RPB2*). Desta forma, uma análise molecular mais completa com um número mais expressivo de isolados vai permitir relevar essa potencial diversidade presente nesta doença de evidente etiologia complexa.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, D. (2006). Cucurbitáceas. In: Manual de Culturas Hortícolas. Lisboa: Presença, p.111-194. v. 2.
- AOKI, T., O'DONNELL, K., HOMMA, Y. AND LATTANZI, A.R. (2003). Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex—*F. virguliforme* in North America and *tucumaniae* in South America. *Mycologia*, 95, 660–684.
- AKRAM, W; AHMAD, A; LUO, W; YASIN, N. A; WU, T; GUO, J; WANG, Q; LI, G. (2019). First report of stem and root rot of chinese kale caused by *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex in China. *Plant Disease*, v. 103, n. 7, p. 1781. DOI:<<https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0261-PDN>>
- AVILA, C. F; MOREIRA, G. M; NICOLLI, C. P; GOMES, L. B; ABREU, L. M; PFENNING, L. H; HAIDUKOWSKI, M; MORETTI, A; LOGRIECO, A; PONTE, E. M. (2019). *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex associated with Brazilian rice: phylogeny, morphology and toxigenic potential. *International Journal of Food Microbiology*, v. 306, doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108267
- BRAIT, V. H. A. H. (2023). Caracterização morfológica, filogenética e patogênica de isolados de *Neocosmospora* (complexo *Solani* de *Fusarium*) de raízes de soja do cerrado brasileiro. 47 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP
- BURGESS, L. W; SUMMERELL, B. A; BULLOK, S; GOTT, K. P; BACKHOUSE, D. (1994). Laboratory manual for *Fusarium* research. Sydney. US.
- CAROLLO, E. M; FILHO, H. P. S. (2016). Manual básico de técnicas fitopatológicas. Cruz das Almas, Embrapa Mandioca e Fruticultura; BA, 109 p.
- CARVALHO, A. D. F; AMARO, G. B; LOPES, J. F; VILELA, N. J; MICHEREFF; FILHO, M.; ANDRADE, R. (2013). A cultura do pepino. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 18 p. (Circular técnica, 113).
- CARRERA, C. J. M. (1975). Las especies de *Fusarium* causales de enfermedades em plantas de la Republica Argentina. In: SARASOLA, A. A; SARASOLA, M. A. R. (Ed.) *Fitopatologia: curso moderno*: Buenos Aires, Argentina, p. 81-163.
- CASTELLANI, A. (1939). Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J Trop Med Hyg.*24:270-6.
- CAIXETA, M. P; CARVALHO NUNES, W. M; SANTOS, A. F; TESSMANN, D. J; VIDA, J. B. (2013). Espécies de *Phytophthora* associadas à gomose em pomares de citros no Estado do Paraná, Brasil. *Summa Phytopathologica* 39: 242-247.
- CHEHRI, K; SALLEH, B; MATTILA, T. Y; REDDY, K. R. N; ABBASI, S. (2011). Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. *Saudi Journal Biological Sciences*, v. 18, n. 4, p. 341-35. DOI: 10.1016/j.sjbs.2011.01.007.
- CROUS, P. W.; LOMBARD, L.; DENIS, S. M.; SEIFERT, K.A.; SCHROERS, H.J.; CHAVERRI, P.; GENÉ, J.; GUARRO, J.; HIROOKA, Y.; BENSCH, K.; KEMA, G.H.J.;

LAMPRECHT, S.C.; CAI, L.; ROSSMAN, A.Y.; STADLER, M.; SUMMERBELL, R.C.; RAYLOR, J.W.; PLOCH, S.; VISAGIE, C.M.; YILMAZ, N.; THINES, M. (2021). *Fusarium*: More than a node or a foot-shaped basal cell. *Studies in Mycology*, v. 98, p. 100116.

DENIS, S. M; LOMBARD, L; CROUS, P. W. (2019). Back to the roots: a reappraisal of *Neocosmospora*. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v. 43, n. 1p. 90–185.

DOIDGE, E. M; KRESFELDER, L. J. (1932). A wilt disease of Cucurbits. *Farming in South Africa* 7: 299-300.

ELMER, W. H; COVERT, S. F; O'DONNELL, K. (2007). Investigation of an outbreak of *Fusarium* foot and fruit rot of pumpkin within the United States. *Plant Disease* 91: 1142-1146.

GÓMEZ, J; SERRANO, Y; PEREZ, A; PORCEL, E; GOMEZ, R. M. I; AGUILAR, M. I. (2014). *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*, affecting melon in Almería Province, Spain. *Australasian Plant Dis. Notes* 9: 136.

GRÄFENHAN, T; SCHROERS, H. J; NIRENBERG, H. I; SEIFERT, K. A. (2011). An overview of the; taxonomy, phylogeny, and typification of nectriaceous fungi in *Cosmospora*; *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella*, and *Volutella*. *Studies in Mycology*, v. 68, p. 79–113. DOI: 10.3114/sim.2011.68.04

HUSSEIN, S. N; JUBER, K. S. (2014). First report of identification *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1 and 2 the causal agent of crown and root rot disease of watermelon in Iraq. *International J of Agriculture Innovations and Research* 3: 2319-1473.

LESLIE, J. F; SUMMERELL, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Sydney. Blakwell, 388p.

LI, P. L; SHI, Y. X; GUO, M. Y; XIE, X. W; CHAI, A. L; LI, B. J. (2017). *Fusarium* wilt of cauliflower caused by *Fusarium equiseti* in China. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v. 39, n. 1, p. 77-82. DOI:10.1080/07060661.2017.1301998.

LIMA, A. F. (2020). Espécies de *Fusarium* associadas a sementes de maracujá. 59 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

LOMBARD, L.; SANDOVAL-DENIS, M.; LAMPRECHT, S.C., CROUS, P.W. (2019). Epitypification of *Fusarium oxysporum* –clearing the taxonomic chaos. *Persoonia*.v.43, p. 1–47. DOI: 10.3767/persoonia.2019.43.01.

LOMBARD, L; MERWE, N. A; GROENEWALD, J. Z; CROUS, P. W. (2015). Generic concepts in Nectriaceae. *Studies in Mycology*, v. 80, p. 189–245, mar.

MEHL, H. L; EPSTEIN, L. (2007). Identification of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1 and race 2 with PCR and production of disease-free pumpkin seeds. *Plant Disease* 91: 1288-1292

MELO, I. S; VALARINI, P. J. (1995). Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Em pepino (*Cucumis sativus* L.). *Scientia Agrícola*, Piracicaba-SP. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-90161995000200020>

MENEZES, V.O. (2009). Inoculação de *Fusarium moniliforme* (Sheld.) em sementes de duas

cultivares de pepino através da técnica da restrição hídrica e sua influência sobre a qualidade fisiológica. 85 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria. RS.

MICHIELSE, C. B.; WIJK, R. V.; REIJNEN, L.; CORNELISSEN, B.J.C.; REP, M. (2009). Insight into the molecular requirements for pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through large-scale insertional mutagenesis. *Genome Biology*, 10, R4.

NAZ, F.; TARIQ, A.; RAUF, C. A.; SULTANA, T. (2018). First report of stem and root rot of bell pepper caused by *Fusarium equiseti* in Pakistan. *Journal of Plant Pathology*, v. 100, n. 3, p. 589. DOI:10.1007/s42161-018-0093-z

NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. (1983). *Fusarium* species na Illustrated manual for identification. University Park: The Pennsylvania State University Press.

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

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

O'DONNELL, K.; SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A.; MCCARTHY, D.; RINALDI, M. G.; BRANDT, M. E.; ZHANG, N.; GEISER, D. M. (2008b). Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46. p. 2477-2490. DOI: 10.1128/JCM.02371-07.

O'DONNELL, K.; SUTTON, D. A.; RINALDI, M. G.; GUEIDAN, C.; CROUS, P. W. (2009). Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum–equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, n. 12, p. 3851-3861. DOI: 10.1128/JCM.01616-09

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

OLIVEIRA, M. J.; LARANJEIRA, D.; CÂMARA, M. P. S.; LARANJEIRA, F. F.; ARMENGOL, J.; MICHEREFF, S. J. (2014). Effects of wounding, humidity, temperature, and inoculum concentrations on the severity of corky dry rot caused by *Fusarium semitectum* in melon fruits. *Acta Scientiarum*, v. 36, n. 3, p. 281-289. DOI: 10.4025/actasciagron.v36i3.17656

PIETRO, A. D.; MADRID, M.P.; CARACUEL, Z., DELGADO, J. J.; RONCERO, M. I. G. (2003). *Fusarium oxysporum*: Exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol. Plant Pathol.* 4, 315–325.

- RAMBAUT, A., DRUMMOND, A. J., XIE, D., BAELE, G., SUCHARD, M. A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology* 67(5): 901–904.
- RAMDIAL, H; LATCHOO, R. K; HOSEIN, F, N; RAMPERSAD, S, N. (2017). Phylogeny and haplotype analysis of fungi within the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex. *Phytopathology*, 107, n. 1, p. 109-120. DOI:10.1094/PHYTO-05-16-0209-R
- SANDOVAL-DENIS, M., LOMBARD, L., CROUS, P. W. (2019). Back to the roots: a reappraisal of *Neocosmospora*. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 43(1), 90-185.
- SANTOS, A. C. S; TRINDADE, J. V. C; LIMA, C. S; BARBOSA, R. N; COSTA, A. F; TIAGO, P. V; OLIVEIRA, N. T. (2019). Morphology, phylogeny, and sexual stage of *Fusarium caatingaense* and *Fusarium pernambucanum*, new species of the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex associated with insects in Brazil. *Mycologia*, v. 111, n. 2, p. 244-259. DOI:10.1080/00275514.2019.1573047
- SCHROERS, H. J; GRÄFENHAN, T.; NIRENBERG, H. I; SEIFERT, K. A. (2011). A revision of *Cyanonectria* and *Geejayessia* gen. nov., and related species with *Fusarium*-like anamorphs. *Studies in Mycology*, v. 68, p. 115–138.
- SEIFERT, K.A; AOKI, T; BAAYEN, R. P; BRAYFORD, D; BURGESS, L. W; CHRULZE, S; GAMS, W; GEISER, D; GRUYTER, J; LESLIE, J. F. (2003). The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. *Mycological Research News*. Amsterdam, v. 107, p. 643-644.
- SOUZA, A. O; FERREIRA, R. L. F; NETO, S. E. A; TAMWING, G. S. (2020). Produtividade de pepino em cultivo orgânico utilizando mudas produzidas com diferentes volumes de substrato. *Scientia Naturalis*, Rio Branco-AC, v. 2, n. 2, p. 469-477.
- TAMWING, G. S. (2020). Cultivo orgânico de pepineiro em resposta à aplicação de biofertilizante via solo e foliar. 59 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Acre. Rio Branco.
- TÖFOLI, J. G; DOMINGUES, R. J. (2018). Doenças Fúngicas em Cucurbitáceas. In: FILHO, J. U. T. B; FREITAS, P. S. L; BERIAN, L. O. S; GOTO, R. (Org.) *Hortaliças-fruto*. Maringá: Eduem, p.72-109
- TOUSSON, T. A; SNYDER, W. C. (1961). The pathogenicity, distribution, and control of two races of *Fusarium* (*Hypomyces*) *solani* f. sp *cucurbitae*. *Phytopathology* 51: 17- 22.
- WANG, M. M., CHEN, Q., DIAO, Y. Z., DUAN, W. J., CAI, L. (2019). *Fusarium incarnatum-equiseti* complex from China. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 43(1), 70-89.
- WOLLENWEBER, H. W; REINKING, O. A. (1935). *Die Fusarien: ihre Beschreibung; Schadwirkung und Bekämpfung*. Berlin, Alemanha: P. Parey.
- ZITTER, T. A; HOPKINS, D. L; THOMAS, C. E. (1996). *Compendium of cucurbit diseases*. Saint Paul, Minnesota: American Phytopathological Society - APS, 87 p.

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- Dentre os patógenos associados a podridão de raízes e colo do pepino em Pernambuco e no Brasil foram identificados e caracterizados molecularmente os oomicetos *Globisporangium attrantheridium*, *G. spinosum*, *G. splendens* e *Phytophthora capsici*;
- Os acessos CNPH-008, CNPH-0104, CNPH-0154 e CNPH-0342L de pepino apresentaram um resultado satisfatório na investigação por fontes de resistência para *Phytophthora capsici*;
- Contudo, foi possível relacionar dois isolados com o complexo de espécies *Fusarium oxysporum*, um com a espécie *F. verticillioides*, quatro pertencentes ao complexo *Fusarium incarnatum-equiseti* (relacionados com as espécies *F. pernambucanum* e *F. coffearum*). Além da identificação de um isolado do complexo *Neocosmospora solani*.