



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DEPERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**Identificação molecular e patogenicidade de espécies de
Berkeleyomyces associadas a hortaliças no Brasil com ênfase na
cultura da Alface**

Ruthe Lima de Souza

**Recife - PE
2022**

RUTHE LIMA DE SOUZA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E PATOGENICIDADE DE
ESPÉCIES DE *Berkeleyomyces* ASSOCIADAS A HORTALIÇAS
NO BRASIL COM ÊNFASE NA CULTURA DA ALFACE**

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Ailton Reis (UFRPE)

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

**RECIFE - PE
FEVEREIRO - 2022**

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)

C729i

Souza, Ruthe Lima de

Identificação molecular e patogenicidade de espécies de *Berkeleyomyces* associadas a hortaliças no Brasil com ênfase na cultura da Alface/ Ruthe Lima de Souza. - 2022.
62 f.

Orientador: Ailton Reis.

Coorientador: Leonardo Silva Boiteux.

Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, 2022.

1. *Berkeleyomyces basicola*. 2. *B. rouxiae*. 3. Filogenia. 4. *Lactuca sativa* L. 5. Primers específicos. I. Reis, Ailton, orient. II. Boiteux, Leonardo Silva. III. Título

**Identificação molecular e patogenicidade de espécies de
Berkeleyomyces associadas a hortaliças no Brasil com ênfase na
cultura da Alface**

RUTHE LIMA DE SOUZA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em:

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Ailton Reis (UFRPE/Embrapa)

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Kamila Câmara Correia (UFCA)

Prof. Dr. Alexandre Reis Machado (UFPE)

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2022**

A minha amada maezinha, Maria da Glória. A meu marido Roni Charles. Aos meus irmãos Maria Eduarda, José Francisco e Francisco Diego. A meus amigos e familiares.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade.

A mim mesma.

A minha amada mãe, Maria da Glória, marido Roni Charles e irmãos Maria Eduarda, José Francisco e Francisco Diego, pelo incentivo e apoio até aqui.

A meu orientador, Prof. Dr. Ailton Reis, pelas caronas, paciência, orientações e incentivo.

A meu coorientador, Prof. Dr. Leonardo Silva Boiteux, pelo suporte durante o processo de escrita.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

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, Breno, Fabiana, Luana, Roberta, Ellen, Isabela, Ruan, Tiago, David, Alba, Débora e Wallington, por torna meus dias de laboratório mais divertidos, pelas conversas aleatórias e pelos inúmeros momentos de aprendizagem.

A Dr.^a Josiene S. Veloso, por toda assistência, durante o processo de análise molecular.

A todas as amigadas que Recife me trouxe, Ana Flávia, Rose, Erasmo, Bruno, Dionísio, Andreza, Edinalda, José Marques, Wallison, Tatiana e Dona Luíza.

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

Muito obrigada!

Sumário

RESUMO GERAL.....	8
GENERAL ABSTRACT	9
CAPÍTULO I.....	10
INTRODUÇÃO GERAL	11
1.Hortaliças Folhosas.....	11
1.1.A cultura da Alface	11
1.2.Importância Econômica	12
2.Murchadeira ou podridão-negra das raízes	14
2.1.O Gênero <i>Berkeleyomyces</i> e a espécie <i>Berkeleyomyces basicola</i>	15
2.2.Gama de Hospedeiras da espécie <i>B. basicola</i>	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
CAPÍTULO II	26
RESUMO	28
INTRODUÇÃO	30
MATERIAIS E MÉTODOS	32
RESULTADOS.....	37
DISCUSSÃO.....	47
CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
CONCLUSÕES GERAIS	62

RESUMO GERAL

A alface (*Lactuca sativa* L.; *Asteraceae*) é amplamente consumida e cultivada em todo o mundo, sendo a cultura mais importante dentro do grupo das hortaliças folhosas. A podridão negra das raízes (causada por espécies de *Berkeleyomyces*) tem, nos últimos anos, limitado a produção desta cultura em vários países. O gênero *Berkeleyomyces* é atualmente representado por duas espécies *B. basicola* e *B. rouxiae* (espécie irmã críptica de *B. basicola*). No entanto, não há informação disponível sobre a presença desses patógenos em condições neotropicais. O presente estudo teve por objetivo, identificar molecularmente espécies de *Berkeleyomyces* associadas ao cultivo da alface e outras hortaliças folhosas, avaliar gama de hospedeiras do(s) patógeno(s) e validar “primers” específicos para identificar as duas espécies de *Berkeleyomyces*. A identificação molecular dos isolados, foi realizada com base na filogenia de sequências das regiões genômicas LSU (large subunit rDNA) e MCM7 (DNA replication licensing factor MCM7). As sequências de 53 isolados de *Berkeleyomyces* obtidos de quatro hospedeiras distintas foram comparadas com 26 sequências de isolados referência de espécies da família *Ceratocystidaceae* e com isolados das espécies *B. basicola* e *B. rouxiae* disponíveis no banco de dados do GenBank. Na árvore filogenética de LSU, todos os isolados se agruparam com espécies de *Berkeleyomyces*. A região MCM7 se mostrou informativa e forneceu suporte para distinguir as duas espécies de *Berkeleyomyces*. Fragmentos de aproximadamente 110 bp foram gerados em ensaios de PCR empregando os primers específicos para *B. basicola* (basi60s_F e basi60s_R) e para *B. rouxiae* (roux60s_F e roux60s_R). Os dois pares de primers avaliados nesse trabalho, apresentaram resultados congruentes com aqueles obtidos na filogenia, sendo capazes de identificar e distinguir *B. basicola* e *B. rouxiae*. Em alface, foram identificados 21 isolados de *B. basicola* e 24 isolados de *B. rouxiae*. Esse é o primeiro registro formal de *B. basicola* infectando alface no mundo e a primeira identificação de *B. rouxiae* no Brasil. Para o ensaio de gama de hospedeiras foram utilizados dois isolados de *B. basicola*, dois de *B. rouxiae* e 26 cultivares de dez espécies olerícolas. As mudas foram produzidas em bandejas e mantidas em casa de vegetação. Com 22 dias, as mudas foram transplantadas para bandejas de 60 células, preenchidas com um terço do substrato colonizado com isolados individuais dos patógenos na concentração de $7,5 \times 10^5$ conídios/g de substrato. O delineamento experimental foi inteiramente caualizado, em arranjo fatorial (4 x 26), com seis repetições, incluindo os controles (plantas não inoculadas). As avaliações foram realizadas 22 dias após a inoculação através do critério de severidade da doença (escala variando de 1 = ausência de sintomas a 5 = mais de 90% das raízes severamente afetadas). Alface, almeirão, radício e chicória foram identificadas como novas hospedeiras naturais de *B. basicola* e *B. rouxiae*. Além disso, novas hospedeiras experimentais destes patógenos também foram identificadas (acelga cv. ‘Verde Escura’ e ‘Artémis’, alface cultivares ‘Aurélia’, ‘Elisa’ e ‘Leila’, almeirão cvs. ‘Spadona’, ‘Folha Amarela’, ‘Cabeça Pão-de-Açúcar’ e ‘Cabeça Vermelha’, chicória cv. ‘Catalogna Folha Larga’ e Coentro ‘Verdão’).

Palavras-Chaves: *Berkeleyomyces basicola*; *B. rouxiae*; Filogenia; *Lactuca sativa* L.; Primers específicos

GENERAL ABSTRACT

Lettuce (*Lactuca sativa* L.; *Asteraceae*) is commonly consumed and widely cultivated around the world, being the most important crop within the group of leafy vegetables. Black root rot (caused by *Berkeleyomyces* species) has affected the production of this crop in several countries in recent years. The genus *Berkeleyomyces* is currently represented by two species *B. basicola* and *B. rouxiae* (a cryptic sister species of *B. basicola*). However, no information is available about the *Berkeleyomyces* species present in association with the lettuce in neotropical areas. The present study is the first attempt to characterize *Berkeleyomyces* species associated with lettuce and other leafy vegetables via molecular approaches, including specific PCR primers able to discriminate the two currently described *Berkeleyomyces* species. The host range of the *Berkeleyomyces* isolates from Brazil was also assessed. The molecular identification of the isolates was initially performed based upon the sequence information of the genomic regions LSU (large subunit rDNA) e MCM7 (DNA replication licensing factor MCM7). The sequences of 53 *Berkeleyomyces* isolates obtained from five different hosts were compared with 26 sequences of reference isolates from members of the *Ceratocystidaceae* family as well as with isolates from *B. basicola* and *B. rouxiae* available in the GenBank database. In the LSU phylogenetic tree, all isolates clustered to *Berkeleyomyces* species. The MCM7 region was informative and gave support to distinguish the two *Berkeleyomyces* species. Species-specific fragments of approximately 110 bp were generated via PCR when employing primers specific for *B. basicola* (basi60s_F and basi60s_R) and for *B. rouxiae* (roux60s_F and roux60s_R). These two primer pairs displayed similar results to the identification obtained via phylogeny. In lettuce, 21 isolates were classified as *B. basicola* and 24 isolates as *B. rouxiae*. This is the first formal record of *B. basicola* infecting lettuce in the world and the first identification of *B. rouxiae* in Brazil. Two isolates of each pathogen species (*B. basicola* and *B. rouxiae*) and 26 cultivars of ten vegetable crops were used in host range assays. The seedlings were produced in polystyrene trays and kept under greenhouse conditions. Plantlets were irrigated twice a day. At 22 days, they were transplanted to trays of 60 cells, filled with a third of the substrate colonized with each isolate at a concentration of 7.5×10^5 conidia/g of substrate. The experimental design was completely randomized in a 4 x 26 factorial arrangement, with six replicates plus controls (= mock-inoculated plants). The evaluations were carried out 22 days after inoculation using as criterium a disease severity scale (ranging from 1 = absence of symptoms to 5 = more than 90% of the roots severely affected). Lettuce, chicory, radicchio, and endive were identified as novel natural hosts of *B. basicola* and *B. rouxiae* for the first time in Brazil and in the world. Furthermore, new potential hosts of these pathogens were also identified (Swiss chard cultivars 'Verde Escura' and 'Artemis', lettuce cultivars 'Aurélia', 'Elisa' and 'Leila', chicory cultivar 'Spadona', 'Folha Amarela', 'Cabeça-Pão-de-Açúcar' and 'Cabeça Vermelha', endive cv. 'Catalogna Folha Larga' and coriander cv. 'Verdão').

Key words: *Berkeleyomyces basicola*; *B. rouxiae*; Phylogeny; *Lactuca sativa* L.; Specific primers.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E PATOGENICIDADE DE ESPÉCIES DE *Berkeleyomyces* ASSOCIADAS A HORTALIÇAS NO BRASIL COM ÊNFASE NA CULTURA DA ALFACE

INTRODUÇÃO GERAL

1. Hortaliças Folhosas

A cadeia produtiva de olerícola no Brasil é bem diversificada, apresentando grande variedade de produtos com diferentes formas, texturas, cores, aromas e sabores (NASCIMENTO, 2011). Estima-se que este segmento do agronegócio, movimente anualmente cerca de 19 bilhões de reais (CNA, 2017) sendo 15% do volume total produzido no país, oriundo da comercialização de hortaliças folhosas (ABCSEM, 2018).

Hortaliças folhosas ou hortaliças herbáceas são aquelas cuja a parte comestível fica acima do solo (PUIATTTI, 2019). São consideradas boas fontes de vitaminas e minerais, além de comprovada atividade antimicrobiana, antidiabética e antioxidante (CAUNII *et al.*, 2010). O cultivo hortaliças folhosas possuem grande importância para o Brasil não somente pelo elevado consumo e cultivo, mas também por ser um segmento que emprega e gera renda sobretudo para agricultura familiar (ABCSEM, 2021).

Essa atividade pode ser realizada tanto em pequenas áreas, quanto em médias e grandes propriedades, localizadas no interior ou próximos aos centros urbanos do país (MALDONADE; MATTOS; MORETTI, 2014; NEVES *et al.*, 2016). Atualmente as hortaliças folhosas mais consumidas no país são: alface, rúcula, couve, acelga, agrião, chicória, espinafre, almeirão e repolho (ABCSEM, 2018), sendo a cultura da alface a mais importante pois é a folhosa mais consumida e comercializada (HEINTZE *et al.*, 2018).

1.1. A cultura da Alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma hortaliça de cultivo bastante antigo, datada de 4.500 a.C. no antigo Egito (LINDQVIST, 1960). Acredita-se que a espécie *L. sativa* tenha sido domesticada na região do Mediterrâneo a partir da espécie selvagem *Lactuca serriola* L., sendo o sudoeste da Ásia o provável centro de origem (DURST, 1930; DE VRIES, 1997). Recentes estudos de resequenciamento genômico têm mostrado que a alface foi domesticada pela primeira vez em regiões próximas ao Cáucaso (WEI *et al.*, 2021). Centros secundários de

domesticação incluem a região do Egito e Israel (FISHER, 2019; LEBEDA *et al.*, 2022). Essa hortaliça foi introduzida nas Américas por Cristóvão Colombo no final do século XV (SUBBARAO; KOIKE, 2007), e chegou ao Brasil no século XVI, através dos portugueses.

A espécie *L. sativa* pertence à ordem *Asterales*, família *Asteraceae*, gênero *Lactuca*. É uma planta anual, herbácea, de raiz fina e haste ereta, com cerca de 30-100 cm de altura, ramificada na parte superior. As folhas são dispostas em espiral, formando uma roseta densa ou cabeça. A margem da folha é inteira para dentada, geralmente crespada. As folhas do caule são elípticas oblongas, com uma base cordada. A inflorescência é composta por 7-15 língulas amarelas. O fruto é do tipo aquênio (KRISTKOVA *et al.*, 2008; SAAVEDRA, 2017).

A alface é cultivada em uma ampla faixa de temperatura, embora prefira climas frios e úmidos. A hortaliça é típica de climas amenos e altitudes superiores a 900 metros (NUNES, 1986). Temperaturas entre 20 e 25 °C são consideradas ideais para seu desenvolvimento (MALDONADE; MATTOS; MORETTI, 2014).

Segundo Henz e Suinaga (2009), a ocorrência de temperaturas mais elevadas em geral, acelera o ciclo da cultura e, dependendo da variedade, pode resultar em plantas menores decorrente do processo de pendoamento precoce. Simultaneamente ao processo de pendoamento, ocorre a produção de látex, que torna as folhas impróprias para consumo. Desta forma, quando exposta a altas temperaturas no final da estação de cultivo, a alface pode ter seu sabor modificado, tornando-se amarga, o que dificulta o processo de comercialização (GLENN, 1984). Além disso, foi observado que, no final do ciclo da cultura, temperaturas abaixo de 12 °C e acima de 24 °C, podem resultar em queimadura nas folhas (SAAVEDRA, 2017). Atualmente existem cultivares mais adaptadas a climas quentes e a baixas altitudes (NUNES, 1986, SUINAGA *et al.*, 2013; MALDONADE; MATTOS; MORETTI, 2014).

A hortaliça pode ser cultivada em qualquer tipo de solo, embora haja preferência por solos bem drenados, com pH ligeiramente ácidos (6,0 a 6,5) ou neutro, e rico em matéria orgânica (VALENZUELA; KRATKY; CHO, 1996).

1.2. Importância Econômica

A alface é uma planta popularmente consumida e amplamente cultivada em todo o mundo (KIM *et al.*, 2016), sendo a cultura de maior importância dentro do grupo das hortaliças folhosas (NOUMEDEM *et al.*, 2017). A mesma apresenta grande variedade de cores (verde a arroxeadas), formas e tamanhos e apresenta importantes compostos de valor nutricional e de interesse para a saúde humana (KIM *et al.*, 2016). Devido a esta diversidade, as alfaces podem

ser agrupadas em diferentes tipos. Segundo Mou (2008), existem seis tipos principais de alface, baseados na forma, textura, tamanho, formação da cabeça e tipo de caule da folha. São eles: alface americana ou crespa (var. *capitata* L. *nidus jaggeri* Helm), alface amanteigada (var. *capitata* L. *nidus tenerrima* Helm), alface romana ou cos alface (var. *longifolia* Lam., var. *romana* Hort. em Bailey), alface folha (var. *Acephala* Alef., Syn. Var. *secalina* Alef., syn. var. *crispa* L.), alface caule (Espargos) (var. *angustana* Irish ex Bremer, sin. var. *asparagina* Bailey, syn. L. *angustana* Hort. Em Vilm.), e alface latina. No Brasil, os principais tipos (grupos varietais) de alface cultivados e consumidos em ordem de importância são: crespa, americana, lisa e romana (ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI & FRUTI, 2019).

A hortaliça é consumida principalmente fresca em saladas (MORENO; FERERES, 2012), entretanto as folhas são utilizadas amplamente, no preparo de sopas, sucos, sanduíches e refeições processadas (KIM *et al.*, 2018). É rica em vitamina C, compostos fenólicos e fibra, sendo assim, bastante apreciados por seus consumidores, em virtude dos benefícios oferecidos a saúde humana (MULABAGAL *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2016).

No Brasil, essa cultura é de grande relevância, principalmente, para agricultura familiar, pois ocupa pequenas áreas, e pode ser produzida o ano inteiro, com rápido retorno de capital (MALDONADE; MATTOS; MORETTI, 2014; NEVES *et al.*, 2016). Seu cultivo pode ocorrer isoladamente, com produção contínua na mesma área durante todo ano, com ou sem rotação de culturas, ou com plantas companheiras geralmente outras hortaliças folhosas, como cebolinha, coentro, salsa, rúcula, acelga, agrião, espinafre, chicória, couve, mostarda e almeirão (HENZ; SUINAGA, 2009; SANTIAGO, 2012; SOUZA; RESENDE, 2014).

Considerando o mercado global, China e Estados Unidos são os maiores produtores de alface do mundo, responsáveis por cerca de 67,68 % da produção mundial (FAO, 2020). No Brasil, no ano de 2018, foi produzido 575.529 toneladas de alface, com área plantada de 86.856 hectares (ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI & FRUTI, 2019).

Embora a cultura da alface apresente grande relevância, muitos problemas ainda interferem sua produtividade, principalmente problemas de caráter fitossanitário, com destaque para doenças causadas por patógenos radiculares, incluindo Tombamento ou “damping - of” causado por *Pythium* spp. e *Rhizoctonia solani*, Murcha-de-fusário, causado por *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Lactucae*, Podridão de Sclerotínia causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, Rizoctoniose causado por *Rhizoctonia solani*, Podridão Mole causada por *Pectrobacterium* spp ou *Dickeya* spp. e Morfo Branco causada por *Sclerotium rolfsii* (LOPES, QUEZADO-DURVAL, REIS, 2010).

2. Murchadeira ou podridão-negra das raízes

A podridão negra das raízes tem nos últimos anos, limitado a produção de alface em diversos países, incluindo o Brasil. A doença é causada pelos fungos de solo *Berkeleyomyces basicola* (Berk. & Broome) W.J. Nel, Z.W. de Beer, T.A. Duong & M.J. Wingf. 2017 (Sin. *Thielaviopsis basicola*) e *Berkeleyomyces rouxiae* (Berk. & Broome) W.J. Nel, Z.W. de Beer, T.A. Duong & M.J. Wingf. 2017(O'BRIEN; DAVIS, 1994, 2002; KOIKE; 2008; SALA, 2006; GARIBALDI; GILARDI; GULLINO, 2005; GULLINO; GILARDI; GARIBALDI; 2019; NAKANE *et al.*, 2019).

Espécies do gênero *Thielaviopsis* foram relatadas pela primeira vez no Brasil em 1999, atacando plântulas de alface, no estado do Rio de Janeiro (SILVA *et al.*, 1999). Supõe-se que este patógeno, tenha sido introduzido no país, através de turfas contaminadas, utilizadas na formulação de substrato para produção de mudas (TEIXEIRA-YAÑEZ, 2005).

As alfaces quando infectadas pelo patógeno, apresentam inicialmente lesões amarronzadas nas raízes principais, que com o progresso da doença, aumentam de tamanho e assumem coloração enegrecidas. Geralmente as raízes laterais são destruídas, estimulando a planta a gerar novas raízes (O'BRIEN; DAVIS, 2002), gerando gasto metabólico e resultando em acentuada redução do crescimento das plantas, cabeças de tamanhos menores e consequente diminuição da produtividade (O'BRIEN; DAVIS, 1994; COUMANS *et al.*, 2011).

Nas horas mais quentes do dia as plantas murcham, o que dificulta ainda mais a diagnose, pois os sintomas são frequentemente confundidos com distúrbios fisiológicos causados por déficit hídrico ou deficiências nutricionais (LOPES; QUEZADO-DURVAL; REIS, 2010). A doença é favorecida por temperaturas em torno de 30°C e elevada umidade do solo (BHATTI; KRAFT, 1992). O fungo *B. basicola* cresce bem em uma faixa de temperatura de 23 a 26 ° C, enquanto que temperaturas abaixo de 12 ° C e acima de 32 ° C prejudicam seu desenvolvimento (O'BRIEN; DAVIS, 1994).

Atualmente, o manejo da doença ocorre principalmente de forma preventiva. Entre as principais estratégias adotadas para o controle da podridão negra das raízes em alface, estão: uso de mudas sadias; evitar plantar em áreas com histórico da doença; controle da irrigação com a finalidade de diminuir o excesso de umidade do solo; solarização; adubação equilibrada e rotação de cultura, com gramíneas por no mínimo três anos (LOPES; DURVAL; REIS, 2010). Por se tratar de um patógeno habitante do solo, o controle químico não é eficiente ou economicamente viável. No Brasil, até o momento, não há registro de fungicidas no Ministério da Agricultura para o controle de *B. basicola* em alface (AGROFIT, 2020).

Nesse contexto, o uso de cultivares resistentes é a estratégia mais adequada para o controle da doença (SALA, 2006; CAMARGO, 2011). Atualmente, o melhoramento genético da cultura da alface dispõe de um amplo e diversificado germoplasma com distintas fontes de resistência contra uma ampla gama de patógenos (LEBEDA *et al.*, 2009). Além disso, avanços significativos têm sido obtidos em termos de disponibilidade de marcadores moleculares (EL-ESAWI, 2015; HASSAN *et al.*, 2021) e de recursos genômicos (REYES-CHIN-WO *et al.*, 2017; WEI *et al.*, 2021).

2.1. O Gênero *Berkeleyomyces* e a espécie *Berkeleyomyces basicola*

O gênero *Berkeleyomyces* foi criado no final de 2018, sendo atualmente representado por duas espécies, *B. basicola* e *B. rouxiae* (NEL *et al.*, 2018). Esses patógenos apresentam distribuição cosmopolita, sendo encontrados tanto em patossistemas selvagens quanto agrícolas, podendo sobreviver saprofiticamente em resto de cultura ou através de estruturas de resistência denominadas clamidósporos, que podem ser dispersos através do vento, água de irrigação, mudas ou solo contaminados (TREBILCO *et al.*, 2002).

Espécies de *Berkeleyomyces* apresentam micélio em estado assexuado, conidióforos de origem terminal ou lateral as hifas vegetativas, células conidiogênicas fialídicas, cilíndricas, afinando em direção ao ápice, hialino a sub-hialina. Os conídios (endoconídios) são unicelulares, cilíndricos, hialinos, produzidos em cadeias ou isoladamente. Conídios secundários observados ocasionalmente, apresentam formato arredondado, inicialmente hialino, espesso-murado, com véu de um lado. Os clamidósporos são unicelulares, de coloração marrom escuro, segmentados e produzidos em cadeia (DE BEER *et al.*, 2014; NEL *et al.* 2018). Em meio de cultura, as colônias apresentam coloração marrom ou cinza (STOVER, 1950).

Pertencente ao Filo *Ascomycota*, classe *Sordariomycetes*, ordem *Microascales*, Família *Ceratocystidaceae* (RÉBLOVÁ; GAMS; SEIFER, 2011), gênero *Berkeleyomyces* (NEL *et al.*, 2018). A espécie *Berkeleyomyces basicola* é considerada um importante patógeno de raiz, causando perdas de relevância econômica em diferentes culturas hospedeiras (KING; PRESLEY, 1942; O'BRIEN; DAVIS, 1994, 2002; YARWOOD, 1981; TSAO; GUNDY, 1962; MONDAL; NEHL; ALLEN, 2004; COUMANS *et al.*, 2011).

Desde sua primeira descrição em 1850, a espécie *B. basicola*, teve uma história taxonômica tumultuada, sendo classificado em diferentes gêneros (NEL *et al.*, 2018). A espécie foi relatada pela primeira vez, em 1850 por Berkeley e Broome, causando doença na cultura da ervilha (*Pisum sativum* L.) e em *Nemophila auriculata* na Inglaterra, sendo denominada

inicialmente *Torula basicola*. Anos depois, Nag Raj e Kendrick (1975) redefiniram o nome *Torula basicola* para *Chalara elegans*, pois na descrição anterior proposta por Berkeley e Broome (1850) foi elaborada levando em consideração apenas um tipo de esporo (clamidósporos), sendo que a espécie também produzia endoconídios característicos do gênero *Chalara*.

Outra descrição importante foi feita por Ferraris (1912), ao transferir *Torula basicola* para *Thielaviopsis basicola* e considerar *Thielavia basicola* como sendo a fase teleomórfica do fungo conforme proposto por ZOPF (1876). O sistema de nomenclatura dupla para o fungo *Thielaviopsis basicola*, foi aderido amplamente pela maioria dos autores. Contudo, em 1925, McCormick, mostrou através de uma série de experimentos, que as duas espécies *T. basicola* e *Th. basicola* não apresentavam relação. Segundo Nel *et al.* (2018), os resultados de McCormick, geraram grande confusão na literatura, pois os autores não conseguiam observar o estado sexual para esse fungo. De fato, atualmente apenas se conhece o estado assexuado de *B. basicola*.

Por fim, mais recentemente, foi verificado que *T. basicola* não está relacionado com espécies do gênero *Thielaviopsis* (DE BEER *et al.*, 2014). Nel *et al.* (2018), utilizando 41 isolados identificados como *T. basicola* demonstrou através de análises filogenéticas, usando sequências de seis regiões genômicas: **LSU** (subunidade grande ribossômica), **MCM7** (componente 7 do complexo de manutenção de minicromossomos), **RPB2** (RNA polimerase II segunda maior subunidade), actina (**ACT**); **ITS** (região espaçadora transcrita interna) e **60S** (proteína ribossômica 60S) que os isolados de *T. basicola* formavam uma linhagem distinta de outros gêneros dentro da família *Ceratocystidaceae*, sendo descrito como *Berkeleyomyces* gen. nov. O mesmo ficou sendo representado pela espécie tipo, *B. basicola*. Além disso, no mesmo trabalho, foi introduzida uma nova espécie, *B. rouxiae*, considerada espécie-irmã críptica de *B. basicola*.

Nos últimos anos, com o avanço da biologia molecular tornou-se possível estudar, de maneira mais aprofundada as relações filogenéticas entre espécies do reino Fungi (TAYLOR & BERBEE, 2006). Além disso, a identificação de espécies filogenéticas (baseada em métodos moleculares e bioquímicos), permitiu a combinação de informações genômicas com características morfológicas/morfométricas/biológicas dos organismos estudados (BARBOZA, 2014).

A partir da década de 1980, com o desenvolvimento da tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi observado um significativo avanço na taxonomia e diagnose de fitopatógenos. Essa técnica consiste na síntese de um segmento específico de DNA, milhões de vezes, por meio de ciclos repetitivos de desnaturação, anelamento e extensão (MULLIS;

FALOONA, 1987). Sequências específicas de DNA, geradas a partir do produto da PCR, têm permitido a classificação e a análise filogenética de diversas espécies dentro da família *Ceratocystidaceae*. Para a espécie *B. basicola* são comumente utilizados, as regiões: subunidade grande ribossômica (**LSU**), proteína ribossômica 60S (RPL10 **60S**) e componente 7 do complexo de manutenção de minicromossomos (**MCM7**) por em conjunto serem mais informativas (DE BEER *et al.*, 2014; NEL *et al.*, 2018; CAVALCANTE, 2020).

Recentemente Nakane e Usami (2020), desenharam e validaram primers específicos para as espécies crípticas *B. basicola* e *B. rouxiae* com a finalidade de facilitar a detecção e diagnose do(s) agente(s) causal(is) da podridão negra das raízes em plantas de alface no Japão. Estes primers foram construídos usando informação de sequência de nucleotídeos de três regiões genicas (**LSU**, **MCM7** e **60S**) e permitiram discriminar os diferentes agentes causais da podridão negra das raízes das plantas com precisão (NAKANE; USAMI, 2020).

No entanto, essa estratégia molecular não foi ainda aplicada com isolados neotropicais de *Berkeleyomyces* associados com a alface e outras hospedeiras. A validação desses primers com isolados brasileiros de *Berkeleyomyces* se constitui em uma das ações de pesquisa da presente dissertação.

2.2. Gama de Hospedeiras da espécie *B. basicola*

A espécie *B. basicola* apresenta ampla gama de hospedeiras afetando mais de 170 espécies, distribuídas em mais de 40 famílias, incluindo beterraba (*Beta vulgaris* L.), salsação (*Apium graveolens* L.), cenoura (*Daucus carota* L.) (ADERHOLD; 1906); espécies de azevinho (*Ilex* sp.), (LAMBE ; WILLS , 1978), serralha (*Sonchus oleraceus* L.), alface (O'BRIEN; DAVIS, 1994), almeirão (*Cichorium intybus* L.) (PRINSLOO, 1991), repolho (*Brassica oleracea* L.) (YARWOOD; 1981), chicória (*Cichorium endivia* L.), rúcula (*Eruca sativa* L.) (TEIXEIRA-YAÑEZ, 2005), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), lentilha (*Lens culinaris* L.), fava (*Vicia faba* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), abóbora (*Cucurbita* sp.), beldroega (*Portulaca oleracea* L.) (JOHNSON, 1916), ervilha (*Pisum sativum* L.) (BERKELEY; BROOME, 1850) soja (*Glycine max* L.) (LOCKWOOD *et al.*, 1970), feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (ADERHOLD, 1906), grão de bico (*Cicer arietinum* L.) (BOWDEN *et al.*, 1985), Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* L.) (MICHEL, 2015), algodão (*Gossypium herbaceum* L.) (SMITH, 1899), teca (*Tectona grandis* L.) (BORGES *et al.*, 2014), maracujá (*Passiflora edulis* L.) (YOUNG, 1970), espécies de pinheiro (*Pinus* sp.) (ALLEN, 1990), trigo (*Triticum aestivum* L.) (PEREG, 2013), damasco (*Prunus armeniaca* L.)

(BOSSHARD *et al.*, 2007), cereja doce (*Prunus avium* L.) ameixa roxa (*Prunus pissardii nigra* L.) (HOESTRA, 1965), espécies de citrus (*Citrus* spp.) (TSAO; 1963), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (KOIKE; HENDERSON, 1998) fumo (*Nicotiana tabacum* L.) (PEGLION, 1891) e videira (*Vitis rupestris* L.) (CANTER-VISSCHER; OVER DE LINDEN, 1972). Recentemente, espécies de *Berkeleyomyces* também foram associados à ocorrência de podridão negra das raízes em manga (*Mangifera indica* L.) na Índia (SHUKLA; FATIMA; KUMARI, 2021), batata doce (*Ipomoea batatas* L.) na Argentina (MARTINO *et al.*, 2021) e melão (*Cucumis melo* L.) na província de Heilongjiang, China (WANG, 2019).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADERHOLD, R. (1906). Impfversuche mit *Thielavia basicola* Zopf. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten*, v. 16, 46 p.
- AGROFIT, Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 16 de dezembro de 2020.
- ALLEN, S.J. (1990). *Thielaviopsis basicola*, a new record on cotton in Australia. *Australasian Plant Pathology*, v. 19, p. 24-25.
- ALTSCHUL, S.F. 1990. **BLAST algorithm**. In: eLS
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI&FRUTI 2019 / Benno Bernardo Kist. Editora **Gazeta Santa Cruz**, 2018. 96 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS (ABCSEM) (2018). Disponível em: <http://www.abcsem.com.br/>. Acessado em: março de 2022.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS (ABCSEM) (2021). Disponível em: <http://www.abcsem.com.br/>. Acessado em: março de 2022.
- BARBOZA, Elenice Alves. **Ocorrência e diversidade de *Pythium* e *Phytophthora* em fontes de água utilizada para irrigação na região do Distrito Federal**. 2014. 134p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília - Brasília, 2014.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. (1987) Illustrated genera of imperfect fungi. *Macmillan Publishing*, 218 p.
- BERKELEY, M.J.; BROOME, C.E. (1850). Notices of British fungi XL. *Annals and Magazine of Natural History*, v. 25, p. 455-466.
- BHATTI, M.A.; KRAFT, J.M. (1992). Effects of inoculum density and temperature on root rot and wilt of chickpea. *Plant Disease*, v. 76, n. 1, p. 50-54.
- BONFIELD, J.K.; STADEN R. (1996). Experiment files and their application during large-scale sequencing projects. *DNA Sequence*, v. 6, p. 109-117.
- BORGES, R.C.F.; SANTOS, M.D.M.; MACEDO, M.A.; MARTINS, I.; NASCIMENTO, A.G.; BOITEUX, L.S.; MELLO, S.C.M. (2014). First report of a wilt disease of *Tectona grandis* caused by *Thielaviopsis basicola* in Brazil. *New Disease Reports*, v. 30, n. 1, p. 17-17.
- BOSSHARD, E.; HELLER, W.; LADNER, J.; RÜEGG, J.; SCHWIZER, T.; WIDMER, A.; (2007). Decline of stone fruit trees in Switzerland. *Acta Horticulturae*, v. 734, p. 363-365.
- BOWDEN, R.L.; WIESE, M.V.; CROCK, J.E.; AULD, D.L. (1985). Root rot of chickpeas and lentils caused by *Thielaviopsis basicola*. *Plant Disease*, v. 69, p. 1089-1091.
- CAMARGO, L.E.A. Controle genético. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (ed.). **Manual de Fitopatologia**. Princípios e conceitos. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. v.1, p. 325-340.

CANTER-VISSCHER, T.W.; OVER DE LINDEN, A.J. (1972). Root and basal stem rot of grapevine caused by *Thielaviopsis basicola* (Berk. And Br.) Ferraris. *New Zealand J Agric Res*, v. 15, p. 184-185.

CAUNII, A.; CUCIUREANU, R.; ZAKAR, A.M.; TONEA, E.; GIUCHICI, C. (2010). **Chemical composition of common leafy vegetables**. Stud. Univ. Vasile Goldis Arad. Seria Stiintele Viet. v. 20, p. 45-48.

CAVALCANTE, Suzilaine Yasmim da Silva. **Etiologia da podridão negra da cenoura no Brasil**. 2020. 57p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2020.

CNA. 2017. Hortaliças. Disponível em: http://www.cnabrazil.org.br/sites/default/files/sites/default/files/uploads/11_hortalicas.pdf. Acessado em: março de 2022.

COUMANS, J.V.F.; HARVEY, J.; BACKHOUSE, D.; POLJAK, A.; RAFTERY, M. J.; NEHL, D.; KATZ, M. E.; PEREG, L. Proteomic assessment of host-associated microevolution in the fungus *Thielaviopsis basicola*. *Environmental Microbiology*, v. 13, n. 3, p. 576-588, 2011.

DE BEER, Z.W.; DUONG, T.A.; BARNES, I.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M. J. Redefining *Ceratocystis* and allied genera. *Studies in Mycology*, v. 79, p. 187-219, 2014.

DE VRIES, I.M. (1997). Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. *Genet Resour Crop Evol* v. 44, p. 165-174.

DOYLE, J.J, DOYLE, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, p.13-15.

DURST, C.E. (1930). Inheritance in lettuce. *Univ Illinois Agri Exp Sta Bull*, 356 p.

EL-ESAWI, M.A. (2015). Molecular genetic markers for assessing the genetic variation and relationships in *Lactuca* germplasm. *Annu Res Rev Biol*, v.8 n. 5, p. 1-13.

FERRARIS, T.A. (1912). Fungi: Hyphales. Flora Italica Cryptogamica Pars I. *Fungi*, p. 233-234.

FISCHER, N. (2019). The history of lettuce. From Ancient Egypt to outer space, lettuce is a well-traveled little plant. <https://medium.com/nannie-appleseed/the-history-of-lettuce-6b0c1f77c285>. Accessed 29 Oct 2020.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Crops**. 2020. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>. Acesso em: 03 de março de 2022.

GARIBALDI, A.; GILARDI, G.; GULLINO, M.L. (2005). First report of root rot caused by *Thielaviopsis basicola* in lamb's lettuce (*Valerianella oleritoria*) in Europe. *Plant Disease*, v. 89, n. 2, p. 205-205.

GHINI, R. Desinfestação do solo com o uso de energia solar: solarização e coletor solar. **EMBRAPA-CNPMA (CIRCULAR TÉCNICA, 1)**, Jaguariúna, 1997. 29 p.

- GLENN, E.P. (1984). Seasonal effect of radiation and temperature on growth of greenhouse lettuce in a high insolation desert environment. *Scientia Horticulturae*, v. 22, p. 9-21.
- GULLINO, M.L.; GILARDI, G.; GARIBALDI, A. (2019). Ready-to-eat salad crops: a plant Pathogen's heaven. *Plant Disease*, v.103, n. 9, p. 2153-2170.
- HASSAN, M.N.; MEKKAWY, S.A.; MAHDY, M.; SALEM, K.F.M.; TAWFIK, E. (2021). Recent molecular and breeding strategies in lettuce (*Lactuca* spp.). *Genet Resour Crop Evol*, v. 68, p. 3055-3079.
- HEINTZE, T. C.; JUNIOR, I.L.C.; VINCENZI, S.L.; DE MENDONÇA, S.N. (2018). **Perfil de Consumo de Alface em Instituição de Ensino Superior da Região Oeste do Paraná**. Higiene Alimentar, v. 32, p. 41-45.
- HENZ, G. P.; SUINAGA, F.A. Tipos de alface cultivados no Brasil. **Embrapa Hortaliças- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2009.
- HOESTRA, H. (1965). *Thielaviopsis basicola*, a factor in the cherry replant problem in the Netherlands. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, v. 71, p. 180-182.
- JOHNSON, J. (1916). Host plants of *Thielavia basicola*. *Journal of Agricultural Research*, v. 7, p. 289-300.
- KIM, M.J.; MOON, Y.; TOU, J.C, MOU B, WATERLAND, N.L (2016). Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **J Food Composit Anal** v. 49, p.19–34.
- KIM, S.X.; ASSEFA, A.D.; KEUM, Y.S.; SAINI R.K. (2018). Metabolite profiling of green, green/red, and red lettuce cultivars: Variation in health beneficial compounds and antioxidant potential. *Food Research International*, v.105, p. 361-370.
- KING, C.J.; PRESLEY, J.T. (1942). A root rot of cotton caused by *Thielaviopsis basicola*. *Phytopathology*, v. 32, n. 9, p. 752-761.
- KOIKE, S.T. (2008). Black root rot caused by *Thielaviopsis basicola* on lettuce in California. *Plant Disease*, v .92, 1368 pp.
- KOIKE, S.T.; HENDERSON, D.M. (1998). Black Root Rot, Caused by *Thielaviopsis basicola*, on Tomato Transplants in California. *Plant Disease*, v. 82, p. 447-447.
- KRISTKOVÁ, E.; DOLEŽALOVÁ, I.; LEBEDA, A.; VINTER, V.; NOVOTNÁ, A. (2008). Description of morphological characters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) genetic resources. *Horticultural Science*, v. 35, n. 3, p. 113-129.
- LAMBE, R.C.; WILLS, W.H. (1978). Pathogenicity of *Thielaviopsis basicola* to Japanese holly. *Plant Disease Reporter*, v. 62, p. 859-863
- LEBEDA A, DOLEŽALOVÁ I, KRÍSTKOVÁ E, KITNER M, PETRŽELOVÁ I, MIESLEROVÁ B, NOVOTNÁ A (2009). Wild *Lactuca* germplasm for lettuce breeding: Current status, gaps and challenges. *Euphytica* 170:15–34

- LEBEDA, A., KŘÍSTKOVÁ, E., KITNER, M., WIDRLECHNER, M. P., MARAS, M., & EL-ESAWI, M. A. (2022). Egypt as one of the centers of lettuce domestication: Morphological and genetic evidence. *Euphytica*, v. 218, p. 1-19.
- LINDQVIST, K. (1960). On the origin of cultivated lettuce. *Hereditas*, v. 46, p. 319-350.
- LLOYD, A.B.; LOCKWOOD, J.L. (1963) Effect off soil temperature, host variety, and fungus strains on *Thielaviopsis* root rot of peas. *Phytopathology*, v. 53, n. 3, p. 329-331, 1963.
- LOCKWOOD, J.L.; YODER, D.L.; SMITH, N.A, (1970). *Thielaviopsis basicola* root rot of soybeans in Michigan. *Plant Disease Reporter*, v. 54, p. 849-850.
- LOPES, C.A.; QUEZADO-DUVAL, A.M.; REIS, A. **Doenças da alface**. Embrapa Hortaliças, Brasília- DF, 2010.
- MALDONADE, I.R.; MATTOS, L.M.; MORETTI, C.L. Manual de boas práticas agrícolas na produção de alface. **Embrapa Hortaliças-Documentos (INFOTECA-E)**, 2014.
- MARTINO, J.A.; DI FEO, L.D. V.; PACCIORETTI, M.A.; CONTARDI, C.A.; SANCHEZ, M.A.; ORTEGA, L.I.; PASTOR, S.E. (2021). First report of *Berkeleyomyces basicola* (synonymous: *Thielaviopsis basicola*) on roots of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) in Argentina. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo.
- MCCORMICK, F.A. (1925). Perithecia of *Thielavia basicola* Zopf in culture and the stimulation of their production by extracts from other fungi. *Connecticut Agricultural Experiment Station*, v. 269, p. 539-554.
- MICHEL, V.V. (2015). First Report of *Chalara elegans* causing wilt on *Lisianthus* in Switzerland. *Plant Disease*, v. 99, p. 1187.
- MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: Gateway Computing Environments Workshop (GCE). New Orleans, Louisiana. 1-8 p.
- MONDAL, A.H.; NEHL, D.B.; ALLEN, S.J.; (2004). First report f *Thielaviopsis basicola* on soybean in Australia. *Australasian Plant Pathology*, v. 33, p. 451-452.
- MORENO, A.; FERERES, A. (2012). Virus diseases in lettuce in the Mediterranean Basin. *Advances in Virus Research*, v. 84, p. 249-278.
- MOU, B. (2008). Lettuce. In: PROHENS, J.; NUEZ, F. (eds) Vegetables I. Handbook of Plant Breeding, vol 1. Springer, New York, NY.
- MULABAGAL, V.; NGOUAJIO, M.; NAIR, A.; ZHANG, Y.; GOTTUMUKKALA, A. L.; AND NAIR, M.G. (2010). In: vitro evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties. *Food Chemistry*. v. 118, p. 300-306.
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*, v. 155, p. 335-350.
- NAG RAJ, T.R.; KENDRICK, W.B. (1975). **A Monograph of Chalara and Allied Genera**. Waterloo. Wilfrid Laurier University Pres. 200 p.

- NAKANE, R.; MIKI, S.; IKEDA, K.; SAKAI, H.; HAYASHI, K.; USAMI, T. (2019). First report of black root rot of lettuce in Japan caused by *Berkeleyomyces rouxiae*. *Journal of General Plant Pathology*, v. 85, n. 6, p. 436-439.
- NAKANE, R.; USAMI, T. (2020). PCR primers to identify and detect *Berkeleyomyces rouxiae*, a causal agent of black root rot of lettuce. *Journal of General Plant Pathology*, v. 86, p. 335-339.
- NASCIMENTO, W.; M. **Hortaliças: Tecnologia de Produção de Sementes**. Brasília DF, 2011.
- NEL, W. J.; DUONG, T. A.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J.; DE BEER, Z. W. A. (2018). New genus and species for the globally important, multihost root pathogen *Thielaviopsis basicola*. *Plant Pathology*, v. 67, n. 4, p. 871-882, 2018.
- NEVES, J.F.N.F.; NODARI, I.D.E.; JÚNIOR, S.S.; DIAS, L.D.E.; SILVA DA, L.B.; DALLACORT, R. **Produção de cultivares de alface americana sob diferentes ambientes em condições tropicais**. Revista Agro@mbiente on-line-line, v. 10, n. 2, p. 130-136, 2016.
- NOUMEDEM, J.A.K.; DJEUSSI, D.E.; HRITCU, L.; MIHASAN, M.; KUETE, V. (2017). *Lactuca sativa*. In: **Medicinal Spices and Vegetables from Africa**; Academic Press: Cambridge, MA, USA, p. 437-449.
- NUNES, M.U.C. (1986). **Produtividade de cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) durante a época seca no Acre**. Embrapa comunicado técnico, n. 43.
- O'BRIEN, R.G.; DAVIS, R.D. (1994). Lettuce black root rot - a disease caused by *Chalara elegans*. *Australasian Plant Pathology*, v. 23, p.106-111.
- O'BRIEN, R.G.; DAVIS, R.D. (2002). **Black root rot of lettuce - dpi note**.
- PEGLION, V. (1891). Marciume radicale delle piantine di tabacco causato dalla *Thielavia basicola* Zopf. *Cent Bakt Abt II*, v.3, p. 580-584.
- PEREG, L.L. (2013). Black root rot of cotton in Australia: The host, the pathogen and disease management. *Crop and Pasture Science*, v. 64, p. 1112-1126.
- POSADA, D.; CRANDALL, K.A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, v. 14, p. 817-818.
- PRINSLOO, G.C.; BAARD, S.W.; FERREIRA, J.F. (1991). Organisms associated with black root rot of chicory in South Africa. *Phytophylactica*, v. 23, p. 59-67.
- PUIATTTI, M. **Olericultura: A arte de cultivar hortaliças / Viçosa, MG: UFV, CEAD, 2019**.
- RANNALA, B.; YANG, Z. (1996). Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*, v. 43, p. 304-311.
- RÉBLOVÁ, M.; GAMS, W.; SEIFERT, K.A ,K.A. (2011) . *Monilochaetes* e gêneros aliados dos *Glomerellales* , e uma reconsideração das famílias nas *Microascales* . *Estudos em Micologia*, v. 68 , p. 163 - 91 .

- REYES-CHIN-WO, S., WANG, Z., YANG, X., KOZIK, A., ARIKIT, S., SONG, C., & MICHELMORE, R. W. (2017). Genome assembly with in vitro proximity ligation data and whole-genome triplication in lettuce. *Nature Communications*, 8(1), 1-11.
- RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D.L.; DARLING, A.; HÖHNA S.; HUELSENBECK, J.P. (2012). MrBayes efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, v. 61, p. 539-542.
- SAAVEDRA, G.; CORRADINI, F.; ANTÚNEZ, A.; FELMER, S.; ESTAY, P.; SEPÚLVEDA, P. (2017). **Manual de producción de lechuga**, Boletín INIA N° 9.
- SALA, F.C. (2006). **Reação de alface (*Lactuca sativa* L.) a *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferraris**. Piracicaba: USP-ESALQ. 97p. (Tese doutorado).
- SANTIAGO, Ocinéia Márcia Andrade. **Caracterização da cadeia produtiva de hortaliças em sistema orgânico em Manaus, Amazonas**. 2012. 177 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.
- SHUKLA, P. K., FATIMA, T.; KUMARI, N. (2021). First report of *Berkeleyomyces basicola* causing mango root rot and decline in India. *Plant Disease*, v. 105, n. 4, p. 1214.
- SILVA, A.M.S.; AKIBA, F.; CARVALHO, A.O.; RIBEIRO, R.L.D.; ARAÚJO, J.S.P. **Podridão negra de raízes de quiabeiro e alface incitada por *Thielaviopsis* spp.** 32° Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 4. Resumos... Brasília: SBF. (CD-ROM), 1999.
- SMITH, E.F. (1899). Wilt disease of cotton, watermelon, and cowpea (*Neocosmospora* nov. gen.). *United States Department of Agriculture Division of Vegetable Physiology and Pathology Bulletin*, v. 17, p. 1-54.
- SOUZA, J.L.; REZENDE, P. **Manual de horticultura orgânica**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2014. 841p.
- STIELOW, J.B.; LEVESQUE, C.A.; SEIFERT, K.A.; MEYER W, IRINY, L.; SMITS, D.; LOMASCOLO, A. *et al.* (2015). One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* v. 35, p. 242-263.
- STOVER, R.H. (1950). The black root rot disease of tobacco: I Studies on the causal organism *Thielaviopsis basicola*. *Canadian Journal of Research* v. 28, p. 445-470.
- SUBBARAO, K.V.; KOIKE, S.T. (2007). **Lettuce diseases: Ecology and control**. Pimentel, D. (Ed.), *Encyclopedia of Pest Management*, v. 2, CRC Press, Boca Raton, FL.
- SUINAGA, F. A.; BOITEUX, L. S.; CABRAL, C. S.; RODRIGUES, C. D. S. (2013). Métodos de avaliação do florescimento precoce e identificação de fontes de tolerância ao calor em cultivares de alface do grupo varietal ‘crespa’. **Comunicado Técnico Número 89**. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 4pp.
- TAYLOR, J.W.; BERBEE, M. L. (2006). Dating divergences in the Fungal Tree of Life: review and new analyses. *Mycologia*, v. 98, n. 6, p. 838-849.

TEIXEIRA-YAÑEZ, L. D. D. **Resistência genética, fungicidas e solarização para o controle de *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferraris na cultura de alface (*Lactuca sativa* L.)**. 2005, 103 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2005.

TRANI, P.S.; TIVELLI, S.W.; PURQUERIO, L.F.V.; AZEVEDO-FILHO, J.A. Hortaliças: Alface (*Lactuca sativa* L.). **Instituto Agrônômico – IAC**, 2005.

TREBILCO E; HOWELL J; FORSBERG L; BODMAN K. (2002). **Beware of *Chalara elegans* black root rot**. Disponível em: [http:// www.ngia.com.au/np/99_13/99_13.html](http://www.ngia.com.au/np/99_13/99_13.html). Acessado em 25 de janeiro de 2021.

TSAO, P.H. (1963). The relative susceptibility of certain varieties and hybrids of citrus species and relatives of *Thielaviopsis basicola*. ***Plant Disease Reporter***, v. 47, p. 437-439.

TSAO, P.H.; GUNDY, S.D. (1962). *Thielaviopsis basicola* as a citrus root pathogen. ***Phytopathology***, v. 52, p. 781-786.

VALENZUELA, H.R.; KRATKY, B.; CHO, J. (1996). **Lettuce production guidelines for Hawaii**. CTAHR, University of Hawaii, USA, p. 1-12.

VILGALYS, R.; HESTER, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. ***Journal of Bacteriology***, v.172, p. 4238-4246.

WANG, F.; ZHANG, W.; YUAN, X.; LIU, D.W. (2019). First Report of Black Root Rot on Cucumis melo Caused by *Berkeleyomyces rouxiae* in Heilongjiang Province of China. ***Plant Disease***, v. 103, n. 10, p. 2675-2675.

WEI, T.; VAN TREUREN, R.; LIU, X.; ZHANG, Z.; CHEN, J.; LIU, Y.; DONG, S.; SUN, P.; YANG, T.; LAN, T.; WANG, X.; XIONG, Z.; LIU, Y.; WEI, J.; LU, H.; HAN, S.; CHEN, J.C.; NI, X.; WANG, J.; YANG, H.; XU, X.; KUANG, H.; VAN HINTUM, T.; LIU, X.; LIU, H. (2021) Whole genome-resequencing of 445 *Lactuca* accessions reveals the domestication history of cultivated lettuce. ***Nature Genetics***, v. 53, p. 752-760.

YARWOOD, C.E. (1981). Occurrence of *Chalara elegans*. ***Mycologia***, v. 73, p. 524-530.

YOUNG, B.R. (1970). Root rot of passionfruit vine (*Passiflora edulis* Sims.) in the Auckland area. ***New Zealand J Agric Res***, v. 13, p. 119-125.

ZOPF, W. Über *Thielavia basicola*, einen endophytischen Parasiten in den Wurzeln des *Senecio elegans*. ***Verhandlungen des Botanischen Vereins für die Provinz Brandenburg***, v. 18, p. 101-5, 1876.

CAPÍTULO II

Molecular identification and pathogenicity of *Berkeleyomyces* species associated with vegetables in Brazil with emphasis on lettuce

Molecular identification and pathogenicity of *Berkeleyomyces* species associated with vegetables in Brazil with emphasis on lettuce

R.L. Souza¹ , D.N. Perdomo¹ , T.B. Torres¹ , J.S. Veloso¹ , L.S. Boiteux^{1,2} , A. Reis^{1,2}

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

² Laboratório de Fitopatologia, Embrapa Hortaliças, 70275-970, Brasília, DF, Brazil. 10
Corresponding author: ailton.reis@embrapa.br

RESUMO

O gênero *Berkeleyomyces* é atualmente representado pelas espécies *B. basicola* e *B. rouxiae* (uma espécie irmã críptica de *B. basicola*). No entanto, não há informações disponíveis sobre as espécies de *Berkeleyomyces* presentes em associação com a alface (*Lactuca sativa* L.) em áreas neotropicais. O presente estudo é a primeira tentativa de caracterizar espécies de *Berkeleyomyces* associadas à alface e outras hortaliças folhosas por meio de abordagens moleculares, incluindo primers de PCR específicos capazes de discriminar as duas espécies descritas de *Berkeleyomyces*. A gama de hospedeiros dos isolados de *Berkeleyomyces* do Brasil também foi avaliada. A identificação molecular dos isolados foi realizada inicialmente com base na informação da sequência das regiões genômicas **LSU** (grande subunidade rDNA) e **MCM7** (fator de licenciamento de replicação de DNA MCM7). As sequências de 53 isolados de *Berkeleyomyces* obtidos de quatro hospedeiras diferentes foram comparadas com 26 sequências de isolados de referência de membros da família *Ceratocystidaceae*, bem como com isolados de *B. basicola* e *B. rouxiae* disponíveis no banco de dados do GenBank. Na árvore filogenética **LSU**, todos os isolados agruparam-se em espécies de *Berkeleyomyces*. A região **MCM7** foi informativa e deu suporte para distinguir as duas espécies de *Berkeleyomyces*. Fragmentos específicos da espécie fúngica de aproximadamente 110 pb foram gerados via PCR ao empregar primers específicos para *B. basicola* (basi60s_F e basi60s_R) e para *B. rouxiae* (roux60s_F e roux60s_R). Esses dois pares de primers apresentaram resultados semelhantes à identificação obtida via filogenia. Em alface, 21 isolados foram classificados como *B. basicola* e 24 isolados como *B. rouxiae*. Este é o primeiro registro formal de *B. basicola* infectando alface no mundo e a primeira identificação de *B. rouxiae* no Brasil. Dois isolados de cada espécie de patógeno (*B. basicola* e *B. rouxiae*) e 26 cultivares de dez hortaliças foram utilizados nos ensaios de gama de hospedeiros. As mudas foram produzidas em bandejas de poliestireno e mantidas em casa de vegetação. As plântulas foram irrigadas duas vezes ao dia. Aos 22 dias, foram transplantados para bandejas de 60 células, preenchidas com um terço do substrato colonizado com cada isolado na concentração de $7,5 \times 10^5$ conídios/g de substrato. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4×26 , com seis repetições mais controles (= plantas não inoculadas). As avaliações foram realizadas 22 dias após a inoculação utilizando como critério uma escala de severidade da doença (variando de 1 = ausência de sintomas a 5 = mais de 90% das raízes severamente afetadas). Alface, almeirão, radício e chicória foram identificados pela primeira vez no Brasil e no mundo como novos hospedeiros naturais de *B. basicola* e *B. rouxiae*. Além disso, também foram identificados novos potenciais hospedeiros desses patógenos (cultivares de acelga ‘Verde Escura’ e ‘Artemis’, cultivares de alface ‘Aurélia’, ‘Elisa’ e ‘Leila’, cultivares de almeirão ‘Spadona’, ‘Folha Amarela’, ‘Cabeça-Pão-de-Açúcar’ e ‘Cabeça Vermelha’, e chicória cv. ‘Catalogna Folha Larga’ e coentro cv. ‘Verdão’).

Palavras-Chaves: *Berkeleyomyces basicola*; *B. rouxiae*; Filogenia; *Lactuca sativa* L.; hortaliças folhosas, Primers específicos

ABSTRACT

The genus *Berkeleyomyces* is currently represented by two species *B. basicola* and *B. rouxiae* (a cryptic sister species of *B. basicola*). However, no information is available about the *Berkeleyomyces* species present in association with the lettuce (*Lactuca sativa* L.) in neotropical areas. The present study is the first attempt to characterize *Berkeleyomyces* species associated with lettuce and other leafy vegetables via molecular approaches, including specific PCR primers able to discriminate the two currently described *Berkeleyomyces* species. The host range of the *Berkeleyomyces* isolates from Brazil was also assessed. The molecular identification of the isolates was initially performed based upon the sequence information of the genomic regions **LSU** (large subunit rDNA) e **MCM7** (DNA replication licensing factor MCM7). The sequences of 53 *Berkeleyomyces* isolates obtained from four different hosts were compared with 26 sequences of reference isolates from members of the *Ceratocystidaceae* family as well as with isolates from *B. basicola* and *B. rouxiae* available in the GenBank database. In the **LSU** phylogenetic tree, all isolates clustered to *Berkeleyomyces* species. The **MCM7** region was informative and gave support to distinguish the two *Berkeleyomyces* species. Fungal-species-specific fragments of approximately 110 bp were generated via PCR when employing specific primers for *B. basicola* (basi60s_F and basi60s_R) and for *B. rouxiae* (roux60s_F and roux60s_R). These two primer pairs displayed similar results to the identification obtained via phylogeny. In lettuce, 21 isolates were classified as *B. basicola* and 24 isolates as *B. rouxiae*. This is the first formal record of *B. basicola* infecting lettuce in the world and the first identification of *B. rouxiae* in Brazil. Two isolates of each pathogen species (*B. basicola* and *B. rouxiae*) and 26 cultivars of ten vegetable crops were used in host range assays. The seedlings were produced in polystyrene trays and kept under greenhouse conditions. Plantlets were irrigated twice a day. At 22 days, they were transplanted to trays of 60 cells, filled with a third of the substrate colonized with each isolate at a concentration of 7.5×10^5 conidia/g of substrate. The experimental design was completely randomized in a 4 x 26 factorial arrangement, with six replicates plus controls (= mock-inoculated plants). The evaluations were carried out 22 days after inoculation using as criterium a disease severity scale (ranging from 1 = absence of symptoms to 5 = more than 90% of the roots severely affected). New natural hosts of *B. basicola* and *B. rouxiae* (lettuce, chicory, radicchio, and endive) were identified for the first time in Brazil and in the world. Furthermore, new potential hosts of these pathogens were also identified (Swiss chard cultivars 'Verde Escura' and 'Artemis', lettuce cultivars 'Aurélia', 'Elisa' and 'Leila', chicory cultivars 'Spadona', 'Folha Amarela', 'Cabeça-Pão-de-Açúcar' and 'Cabeça Vermelha', endive cv. 'Catalogna Folha Larga' and coriander cv. 'Verdão').

Key words: *Berkeleyomyces basicola*; *B. rouxiae*; Phylogeny; *Lactuca sativa* L.; leaf vegetables, Specific primers.

INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta popularmente consumida e amplamente cultivada em todo o mundo (KIM *et al.*, 2016), sendo a cultura mais importante dentro do grupo das hortaliças folhosas (NOUMEDEM *et al.*, 2017). É consumida principalmente fresca em saladas (MORENO; FERERES, 2012), entretanto as folhas são amplamente utilizadas, no preparo de sopas, sucos, sanduíches e refeições processadas (KIM *et al.*, 2018). Esta hortaliça é rica em vitamina C, compostos fenólicos e possui alto conteúdo de fibra, sendo bastante apreciados por seus consumidores, em virtude dos benefícios oferecidos a saúde humana (MULABAGAL *et al.*, 2010).

No Brasil, a cultura da alface é de grande relevância, principalmente, para agricultura familiar, pois ocupa pequenas áreas, e pode ser produzida o ano inteiro, com rápido retorno de capital (MALDONADE; MATTOS; MORETTI, 2014; NEVES *et al.*, 2016). Além disso, é a folhosa mais consumida e comercializada no país (HEINTZE *et al.*, 2018). Seu cultivo pode ocorrer isoladamente, com produção contínua na mesma área durante todo ano, com ou sem rotação de culturas, ou em consórcio com outras hortaliças folhosas, como cebolinha, coentro, salsa, rúcula, acelga, agrião, espinafre, chicória, couve, mostarda e almeirão (HENZ; SUINAGA, 2009; SANTIAGO, 2012; SOUZA; RESENDE, 2014).

Muitos problemas fitossanitários ainda interferem na produtividade da alface, sendo as doenças causadas por patógenos de solo as de maior destaque econômico e com a maior dificuldade de manejo. A podridão negra das raízes, causada pelo fungo de solo *Berkeleyomyces basicola* (= *Thielaviopsis basicola*) tem limitado, nos últimos anos, a produção desta cultura em vários países (O'BRIEN; DAVIS, 1994, 2002; KOIKE; 2008; GARIBALDI; GILARDI; GULLINO, 2005; GULLINO; GILARDI; GARIBALDI; 2019), incluindo o Brasil (SILVA *et al.*, 1999; SALA, 2006).

O fungo do gênero *Thielaviopsis* foi relatado pela primeira vez no Brasil em 1999, atacando plântulas de alface e quiabo, no estado do Rio de Janeiro (SILVA *et al.*, 1999). Mais tarde, a espécie *Berkeleyomyces basicola* (= *Thielaviopsis basicola*) foi registrada como o agente causal podridão negra das raízes em alface, chicória e rúcula em cultivos comerciais no interior de São Paulo. Foi especulado que esse patógeno tenha sido introduzido no país, através de turfas contaminadas, utilizadas na formulação de substrato para produção de mudas (TEIXEIRA-YAÑEZ, 2005).

A espécie *B. basicola* é considerada um importante patógeno de raiz, apresentando uma ampla gama de hospederias, causando sérios danos a culturas de significativa relevância econômica (KING; PRESLEY, 1942; O'BRIEN; DAVIS, 1994, 2002; YARWOOD, 1981; TSAO; GUNDY, 1962; MONDAL; NEHL; ALLEN, 2004; COUMANS *et al.*, 2011), incluindo beterraba (*Beta*

vulgaris L.), salsão (*Apium graveolens* L.), cenoura (*Daucus carota* L.) (ADERHOLD; 1906); espécies de azevinho (*Ilex* spp.), (LAMBE ; WILLS, 1978), serralha (*Sonchus oleraceus* L.), alface (O'BRIEN; DAVIS, 1994), almeirão (*Cichorium intybus* L.) (PRINSLOO, 1991), repolho (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) (YARWOOD; 1981), chicória (*Cichorium endivia* L.), rúcula (*Eruca sativa* L.) (TEIXEIRA-YAÑEZ, 2005), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), lentilha (*Lens culinaris* L.), fava (*Vicia faba* L.), melão (*Cucumis melo* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), abóbora (*Cucurbita* sp.), beldroega (*Portulaca oleracea* L.) (JOHNSON, 1916), ervilha (*Pisum sativum* L.) (BERKELEY; BROOME, 1850) soja (*Glycine max* L.) (LOCKWOOD; YODER; SMITH, 1970), feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (ADERHOLD, 1906), grão de bico (*Cicer arietinum* L.) (BOWDEN *et al.*, 1985), Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* L.) (MICHEL, 2015), algodão (*Gossypium herbaceum* L.) (SMITH, 1899), teca (*Tectona grandis* L.) (BORGES *et al.*, 2014), maracujá (*Passiflora edulis* L.) (YOUNG, 1970), espécies de pinheiro (*Pinus* sp.) (ALLEN, 1990), trigo (*Triticum aestivum* L.) (PEREG, 2013), damasco, (*Prunus armeniaca* L.) (BOSSHARD *et al.*, 2007), cereja doce (*Prunus avium* L.) ameixa roxa (*Prunus pissardii nigra* L.) (HOESTRA, 1965), espécies de citrus (*Citrus* sp.) (TSAO; 1963), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (KOIKE; HENDERSON, 1998) fumo (*Nicotiana tabacum* L.) (PEGLION, 1891) e videira (*Vitis rupestris* L.) (CANTER-VISSCHER; OVER DE LINDEN, 1972).

O fungo *B. basicola* apresenta uma tumultuada história taxonômica desde sua descrição, sendo classificado em diferentes gêneros (NEL *et al.*, 2018). A espécie foi relatada pela primeira vez por Berkeley e Broome (1850), causando doença na cultura da ervilha (*Pisum sativum* L.) e *Nemophila auriculata* na Inglaterra, sendo denominada inicialmente de *Torula basicola*. Anos depois, Nag Raj e Kendrick (1975) redefiniram o nome *Torula basicola*, para *Chalara elegans*, pois na descrição anterior proposta por Berkeley e Broome (1850), foi elaborada levando em consideração apenas um tipo de esporo (clamidósporos), sendo que a espécie também produzia endoconídios característicos do gênero *Chalara*.

Outra descrição não menos importante foi feita por Ferraris (1912), ao transferir *Torula basicola* para *Thielaviopsis basicola* e ao considerar *Thielavia basicola* como sendo a fase teleomórfica do fungo conforme proposto por ZOPF (1876). O sistema de nomenclatura dupla para o fungo *T. basicola*, foi amplamente aceito na literatura. Contudo, McCormick (1925) demonstrou através de uma série de experimentos, que as espécies *T. basicola* e *Th. basicola* não apresentavam relação. Os resultados de McCormick (1925) geraram grande confusão na literatura, pois os autores não conseguiam detectar o estado sexual desse fungo (NEL *et al.* 2018). De fato, atualmente se conhece apenas o estado assexuado de *Berkeleyomyces basicola*. Por fim, mais recentemente, foi verificado que *T. basicola* não apresenta relação com espécies do gênero *Thielaviopsis* (DE BEER

et al., 2014). Nel *et al.* (2018), utilizando 41 isolados identificados como *T. basicola* demonstrou através de análises filogenéticas, usando sequências de seis regiões genômicas: **LSU** (subunidade grande ribossômica), **MCM7** (componente 7 do complexo de manutenção de minicromossomos), **RPB2** (RNA polimerase II segunda maior subunidade), actina (**ACT**); **ITS** (região espaçadora transcrita interna) e **60S** (proteína ribossômica 60S) que os isolados de *T. basicola* formavam uma linhagem distinta de outros gêneros dentro da família *Ceratocystidaceae*, sendo descrito como *Berkeleyomyces* gen. nov. O mesmo ficou sendo representado pela espécie tipo, *B. basicola*. Além disso, no mesmo trabalho, foi introduzida *B. rouxiae*, considerada uma espécie-irmã críptica de *B. basicola*.

Recentemente, Nakane e Usami (2020), com a finalidade de facilitar a detecção e diagnose dos agentes causais da podridão negra das raízes em plantas de alface no Japão, desenharam e validaram primers específicos para as espécies *B. basicola* e *B. rouxiae*, com base na sequência de nucleotídios de três regiões genicas (**LSU**, **MCM7** e **60S**). Esses primers específicos para *B. basicola* (*bas60s_F* e *bas60s_R*) e *B. rouxiae*, (*roux60s_F* e *roux60s_R*) permitiram identificar/discriminar de maneira eficiente e confiável os dois agentes causais da podridão negra das raízes. No entanto, essa estratégia molecular não foi ainda explorada e/ou aplicada com isolados neotropicais de *Berkeleyomyces* associados com a alface e outras hortaliças hospedeiras. Nesse contexto, o presente estudo teve por objetivo, identificar molecularmente espécies de *Berkeleyomyces* associadas à alface e outras hortaliças folhosas no Brasil, avaliar gama de hospedeiras do patógeno e validar os “primers” espécie-específicos visando confirmar a presença das duas espécies de *Berkeleyomyces* nas condições brasileiras

MATERIAIS E MÉTODOS

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.

Obtenção e conservação dos isolados

Os isolados fúngicos foram obtidos a partir de plantas de alface (*Lactuca sativa* L.) chicória (*Cichorium endivia* L.), almeirão (*Cichorium intybus* L.) e radício (*Cichorium intybus* var. *foliosum* L.) apresentando sintomas de murchadeira e podridão negra da raiz (lesões amarronzadas ou enegrecidas nas raízes) em condições naturais de cultivo em diferentes regiões produtoras (Tabelas 1).

Para o isolamento foram seguidas as recomendações propostas por Lloyd e Lockwood (1963). Fragmentos radiculares (de aproximadamente 2 cm de comprimento) foram lavados em água de torneira por cinco minutos e desinfestadas com álcool a 70%. Depois, com o auxílio de uma pinça esterilizada, os fragmentos foram depositados na superfície de discos de cenoura de 1 cm de espessura, desinfestados superficialmente. Os discos de cenoura foram acondicionados em caixas do tipo Gerbox, em temperatura ambiente de 25 °C. Após sete dias, estruturas típicas do fungo (conídios e clamidósporos) foram transferidas para placas de Petri com meio batata cenoura ágar (BCA = 20 g de batata, 20 g de cenoura, 20 g de ágar em 1L de água destilada) com 30 mg de tetraciclina /L (TEIXEIRA-YANEZ, 2005). As placas foram transferidas para incubadora BOD por dois dias e mantidas a 25 °C no escuro. Após o crescimento inicial das colônias, pontas de hifas foram transferidas para outras placas de Petri, contendo BCA. A conservação dos isolados foi realizada através do método de Castellani (CASTELLANI, 1939) e em ultrafreezer a -80° C.

Caracterização molecular dos isolados

A identificação molecular dos isolados, foi realizada com base na filogenia de sequências de duas regiões genômicas: subunidade grande do DNA ribossômico (**LSU**) e componente 7 do complexo de manutenção de minicromossomos (**MCM7**).

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento de DNA

Os isolados, foram cultivados em meio BCA (batata-cenoura-ágar com 20 g de batata, 20 g de cenoura, 20 g de ágar e 1000 mL de água destilada) por 7 dias e incubados a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. O DNA dos isolados foi extraído de acordo com a metodologia proposta por Dellaporta *et al.* (1983) modificada por Boiteux *et al.* (1999). Uma porção do micélio (1/3 da placa) foi transferida para tubos Eppendorf (2 mL) esterilizados contendo duas esferas de aço (“beads”). Ao micélio foi adicionado 1 mL de tampão de extração (EDTA 50 mM pH 8,0, 100 Tris-HCl mM pH 8,0, NaCl 400 mM e β -Mercaptoetanol 10 mM) e 140 μL de SDS 10 %. Em seguida as amostras foram homogeneizadas 3 vezes a 20 Hz por 3 minutos com sistemas Tissue Lyser II (QIAGEN[®]), Germantown, MD). As amostras foram levadas ao ultrafreezer (- 80 °C) por 15 minutos e em seguida incubadas a 65 °C por 15 minutos. Após esse período foi adicionado 250 μL de acetato de amônio (7,5 M), sendo a solução homogeneizada novamente e levada ao - 80 °C por 8 minutos. As amostras foram centrifugadas a 9.000 rpm por 15 minutos. Posteriormente foi realizada a coleta do sobrenadante, estes foram transferidos para microtubos (1,5 mL) contendo 540 μL de isopropanol. As amostras foram levadas ao - 80 °C por 8 minutos e depois centrifugadas novamente. Por fim, foi descartado o sobrenadante e

o pellet foi cuidadosamente lavado com álcool a 70% por três vezes. Em seguida as amostras foram mantidas em câmara de fluxo laminar para secagem por 3 horas. Para a ressuspensão do DNA, 50 µL de tampão TE com RNase foi adicionado às amostras e estas foram incubadas a 37 ° C por 1 hora e armazenadas em freezer (- 20 °C).

Para avaliar a qualidade do DNA extraído, com a finalidade de usá-los na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), as amostras de DNA foram analisadas em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 0,5 X (Tris-borato-EDTA), coradas com GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, EUA) e visualizados em fotodocumentador L-Pix ST (Loccus Biotecnologia). Os ensaios de PCR foram realizados utilizando termociclador Bio-Rad T100™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Todas as reações de PCR foram realizadas em um volume final de 12 µL, contendo 2.5 µL de água Milli-Q; 2,0 µL de Buffer 10 X; 1.0 µL de MgCl₂; 1.0 µL de dNTPs (10mM); 1,5 µL de cada primer (10mM); 0.5µL de *Taq* DNA polimerase e 2 µL de DNA. Para amplificação e sequenciamento da região **LSU**, foram utilizados os primers **LR0R** (5'-GTA CCC GCT GAA CTT AAG C-3') e **LR5** (5'-ATC CTG AGG GAA ACT TC-3') (VILGALYS; HESTER, 1990). Para a região **MCM7**, foram utilizados os primers **MCM7-forward** (**Cer-MCM7F** // 5'-ACI CGI GTI TCI GAY GTN AAG CC-3') e **MCM7-reverse** (**Cer-MCM7R** // 5'-TTR GCA ACA CCA GGR TCA CCC AT-3') (DE BEER *et al.*, 2014).

As condições de amplificação da região **LSU**, incluíram uma desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos; seguida por 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 50 segundos, extensão a 72 °C por 1:30 minutos, e extensão final a 72 °C por 10 minutos. Para amplificação da região **MCM7** as condições térmicas incluíram, uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 45 segundos e 72 °C por 2 minutos, e terminou com uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. Após a amplificação, os produtos da PCR foram visualizados novamente em gel de agarose a 1,5%, e tampão TBE 0,5X (Tris-borato-EDTA) para verificação da qualidade. As amostras de boa qualidade foram purificadas com o kit PureLink® PCR Purification (Invitrogen®, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante e levados ao Laboratório de Melhoramento genético da Embrapa Hortaliças, para sequenciamento

Análise Filogenética

As análises filogenéticas foram realizadas individualmente para cada região gênica (**LSU** e **MCM7**) e em conjunto (= concatenadas), contendo as duas regiões gênicas. Para a construção das árvores filogenéticas, foram utilizadas sequências obtidas neste trabalho, em conjunto com 26 sequências de isolados referência de espécies de fungos da família *Ceratocystidaceae* e das espécies

B. basicola e *B. rouxiae* obtidas no banco de dados do GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Tabela S1).

As leituras das sequências diretas e reversas foram montadas e revisadas usando o pacote 'Staden' (STADEN; BEAL; BONFIELD, 1998). Todas as sequências de consenso obtidas foram comparadas com o banco de dados de sequências do GenBank do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando BLAST visando confirmar as atribuições taxonômicas dos isolados em análise. As sequências que representam ex-tipos e publicações relacionadas foram recuperadas do GenBank (Tabela S1). As sequências de cada gene foram alinhadas usando a estratégia G-INS-i no programa online MAFFT v.7 (KATO; STANDLEY, 2013; KATO, ROZEWICKI, YAMADA, 2019), com parâmetros padrão para abertura e extensão de gap e 200PAM / κ = Matriz de pontuação de 2 nucleotídeos e ajustada manualmente quando necessário em MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). Sequências das duas regiões genômicas foram concatenadas usando SequenceMatrix v.1.8 (VAIDYA; LOHMAN; MEIER, 2011).

As relações filogenéticas foram estimadas usando os métodos de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) para regiões genômicas individuais bem como concatenadas. As análises de ML e BI foram realizadas usando RAXML-HCP2 v.7.0.4 (STAMATAKIS, 2014) e MrBayes v 3.2.1 (RONQUIST *et al.*, 2012), respectivamente, implementados no cluster CIPRES (<https://www.phylo.org/portal2/home.action>). As buscas em árvore de ML foram realizadas com 1000 pseudoreplicas (-m GTRGAMMA -p 12345 -k -f a -N 1000 -x 12345) sob o modelo GTR-GAMMA.

Os modelos de evolução foram estimados no MrModeltest 2.3 (NYLANDER, 2004) usando o critério de informação Akaike (AIC) para cada região genômica. O conjunto de dados combinado foi subdividido para refletir o modelo de substituição de nucleotídeo mais apropriado para cada um dos conjuntos de dados de cada região genômica para a análise Bayesiana do conjunto de dados combinados. Quatro cadeias de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) foram conduzidas por 5×10^7 gerações, com amostragens a cada 1000 gerações. A convergência de todos os parâmetros foi verificada usando Tracer v 1.5 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2010) e as primeiras gerações de 25% foram descartadas como 'burn-in'. As árvores filogenéticas foram visualizadas no FigTree v1.4.3 (RAMBAUT, 2012) e editadas no software Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems, EUA).

Avaliação de primers específicos para identificação das espécies de *Berkeleyomyces*

Os ensaios de PCR foram realizados utilizando termociclador Bio-Rad T100™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Um 'mix' foi preparado, contendo 17.05 μ L de água Milli-Q; 2,5 μ L de Buffer 10 X; 0.75 μ L de MgCl₂; 0.50 μ L de dNTPs (10 mM); 1 μ L de cada primer (10 mM); 0.20 μ L

de *Taq* DNA polimerase e 2 µL de DNA com volume da final reação de 25 µL. Foram usados os pares de primers específicos para *B. basicola* [**basi60s_F** (5'-GGC GCC AAC ACT CAA ACA AGC A-3') e **basi60s_R** (5'-TGC TGG TCG TGT GTT AGC GG-3')], e os pares de primers específicos para amplificação de segmento do genoma de *B. Rouxiae* [**roux60s_F** (5'-AGC GCC AAA ACT TAA ACA AGC C-3') e **roux60s_R** (5'-TGC TGG TCG TGT GTT AGC AA-3')] (NAKANE; USAMI, 2020). Os ensaios de PCR foram realizados individualmente para cada primer, e conduzidos a 95 °C por 5 minutos; 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos, e 72 °C por 30 segundos, com 35 ciclos e extensão final de 72 °C durante 5 minutos. Os produtos da PCR (amplicons) foram analisados em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 0,5X (Tris-borato-EDTA), e coradas com GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, EUA) e visualizados em fotodocumentador L-Pix ST (Loccus Biotecnologia).

Determinação da gama de hospedeiras

Vinte e seis (26) cultivares de dez (10) espécies pertencentes a quatro famílias botânicas de hortaliças folhosas foram selecionadas para a avaliação da gama de hospedeiras de isolados de *Berkeleyomyces* obtidos no presente trabalho. Acelga (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) cultivares 'Verde Escura' e 'Ártemis', agrião (*Nasturtium officinale* L.) cultivares da Água e da Terra, alface cultivares 'Elisa', 'Aurélia' e 'Leila'; almeirão (*Cichorium intybus* L.) cultivares 'Catalonha Folha Larga' 'Spadona', 'Folha Amarela', 'Cabeça Pão-de-Açúcar' e 'Cabeça Vermelha'; chicória (*Cichorium endivia*. L.) cultivares 'Catalogna Folha Larga', 'Crespa' e 'Escarola Batávia'; coentro (*Coriandrum sativum* L.) cv. 'Verdão'; espinafre (*Spinacea oleracea* L.) cv. 'Virofly'; mostarda (*Brassica juncea* L.) cultivars 'Lisa', 'Crespa' e 'Roxa'; salsa (*Petroselinum crispum* L.) cultivares 'Lisa' e 'Crespa' e rúcula (*Eruca sativa* L.) cultivares 'Antonela', 'Donatella', 'Rokita' e 'Folha Larga'.

Preparo do inóculo, produção de mudas, inoculação e avaliação

Dois isolados de *B. basicola* (**EH2723** e **EH2740**) e dois isolados de *B. rouxiae* (**EH2742** e **EH2790**), previamente identificados como sendo agressivos em alface, foram multiplicados em meio de cultura BCA. Discos de micélio com 0,5 cm de diâmetro foram transferidos para o centro de placas de Petri, contendo meio BCA. Estas foram vedadas e acondicionado em câmara de crescimento - BOD sob temperatura de 25 ± 1°C, durante 15 dias. Após este período, foi adicionado a cada placa, 10 mL de água destilada esterilizada e, com o auxílio de uma escova de cerdas macias, a superfície do meio foi raspada. A suspensão obtida foi filtrada através de uma dupla camada de gaze (MENEZES; SILVA-HANLIN, 1997). A estimativa da concentração de conídios na suspensão foi realizada com auxílio de

uma câmara de Neubauer. As mudas foram produzidas em bandejas de poliestireno de 128 células, preenchidas com substrato esterilizado (Bioplant Plus®). Após a semeadura, as bandejas foram mantidas em casa de vegetação e foram submetidas a irrigações diárias, duas vezes ao dia. Com 22 dias, estas foram transplantadas para bandejas de 60 células, preenchidas com um terço do substrato colonizado com o isolado na concentração de $7,5 \times 10^5$ conídios/g de substrato.

Após o transplante, foi adicionado 3 mL de uma suspensão de 2×10^6 conídios/mL próximo a região do colo de cada planta, com auxílio de uma micropipeta. Todo o substrato utilizado no experimento, foi previamente autoclavado por 2 horas. As mudas não inoculadas (testemunhas) foram transplantadas para bandejas de 60 células preenchidas com substrato não colonizado pelo patógeno. As avaliações foram realizadas 22 dias após a inoculação através do critério de severidade da doença, numa adaptação à escala de O'Brien e Davis (1994) variando de 1 = ausência de sintomas, 2 = traços de necrose nas radículas, 3 = menos de 50% das raízes necrosadas, 4 = mais de 50% e menos de 90% das raízes necrosadas e 5 = mais de 90% das raízes severamente afetadas (SALA, 2006).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em fatorial 26×4 (26 cultivares, e 4 isolados) com seis repetições cada. Os valores obtidos foram usados para calcular a severidade com base no índice de doença (ID), de acordo com a fórmula estabelecida por McKinney (1923):

$$ID (\%) = \frac{\sum(\text{valor da nota} \times \text{N}^\circ \text{ de plantas com esta nota})}{(\text{N}^\circ \text{ total de plantas} \times \text{valor máximo da escala de notas})} \times 100$$

RESULTADOS

Caracterização molecular dos isolados

Sequências de um total de 53 isolados de *Berkeleyomyces*, oriundos de quatro espécies hospedeiras (**Tabelas 1**), foram previamente comparadas com sequências de referência das regiões genômicas **LSU** e **MCM7** disponíveis no GenBank. Após a amplificação das regiões **LSU** e **MCM7**, foram gerados fragmentos de aproximadamente 850 e 1100 pb, respectivamente. As análises foram realizadas individualmente para cada região genômica: **LSU** (**Figura 1**), **MCM7** (**Figura 2**) e também em conjunto, contendo informação combinada das duas regiões genômicas (**Figura 3**).

Como observado anteriormente, a filogenia envolvendo sequências da região **LSU** foi útil para apenas separar isolados de *Berkeleyomyces* de isolados de outros gêneros dentro da família *Ceratocystidaceae*. Por sua vez, as árvores concatenadas (**LSU** e **MCM7**) e a região **MCM7**

permitiram distinguir precisamente as duas espécies de *Berkeleyomyces*. Nesse estudo, foram identificados 23 isolados da espécie *B. basicola* e 30 da espécie *B. rouxiae*. A maioria agrupou em um clado maior (100 % de probabilidade posterior e 92% bootstrap), porém sem separação das duas espécies. Foi observado nas árvores filogenéticas geradas a partir das regiões **LSU** e **MCM7** (apesar de apresentarem topologias diferentes) que todos os isolados avaliados no presente estudo se agruparam próximos a isolados representantes do gênero *Berkeleyomyces*.

Em **alface**, foram identificados 21 isolados de *B. basicola* e 24 isolados de *B. rouxiae*. De acordo com a literatura, esse é o primeiro registo formal da espécie *B. basicola* infectando alface no mundo e a primeira identificação de *B. rouxiae* no Brasil. Dos cinco isolados oriundos de **chicória**, dois (**EH2740** e **EH2781**) foram identificados como sendo *B. basicola* e três isolados (**EH2759**, **EH2777** e **EH2793**) como sendo de *B. rouxiae*. Os dois isolados (**EH2762** e **EH2766**) recuperados de **radício** foram identificados como *B. rouxiae*. Em **almeirão** foi encontrada apenas a espécie *B. rouxiae* (**EH2798**).

Validação de primers específicos para identificação das espécies de *Berkeleyomyces*

Os primers específicos descritos por NAKANE & USAMI (2020) geraram amplicons de aproximadamente 110 bp específicos para *B. basicola* (primers **basi60s_F** e **basi60s_R**) e específicos para *B. rouxiae* (primers **roux60s_F** e **roux60s_R**) (**Figura 4**). Com base nesses ensaios de PCR, os isolados EH2723, EH2726, EH2727, EH2728, EH2730, EH2731, EH2733, EH2735, EH2736, EH2738, EH2740; EH2747, EH2778, EH2779, EH2780, EH2781, EH2782, EH2783, EH2785, EH2787, EH2796, foram assinalados como sendo *B. Basicola*

Por sua vez, os isolados EH2725, EH2732, EH2734, EH2739, EH2741, EH2742, EH2743, EH2746, EH2757, EH2758, EH2759, EH2760, EH2761, EH2762, EH2765, EH2766, EH2767, EH2768, EH2769, EH2771, EH2772, EH2773, EH2775, EH2777, EH2788, EH2790, EH2793, EH2795, EH2797 e EH2798 amplificaram para *B. rouxiae*.

Um subgrupo composto por 11 isolados (EH2734, EH2739, EH2741, EH2742, EH2743, EH2746, EH2762, EH2773, EH2777, EH2788 e EH2793) que foram identificados como *B. basicola*, na análise concatenada, foram identificados como pertencentes a espécie *B. rouxiae* nas análises empregando os primers espécie-específicos.

Tabela 1. Isolados de *Berkeleyomyces* utilizados no presente estudo, código do isolado, espécie, hospedeiro, cidade/estado e ano de coleta.

Isolado	Espécie	Hospedeiro	Cidade/ Estado	Ano de coleta
EH2723	<i>B. basicola</i>	Alface	Vargem Bonita/DF	2021
EH2725	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Santa Maria de Jetibá/ES	2021
EH2726	<i>B. basicola</i>	Alface	Vargem Bonita/DF	2021
EH2727	<i>B. basicola</i>	Alface	Vargem Bonita/DF	2021
EH2728	<i>B. basicola</i>	Alface	Vargem Bonita/DF	2021
EH2730	<i>B. basicola</i>	Alface	Vargem Bonita/DF	2021
EH2731	<i>B. basicola</i>	Alface	Vargem Bonita/DF	2021
EH2732	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Vargem Bonita/DF	2021
EH2733	<i>B. basicola</i>	Alface	Vargem Bonita/DF	2021
EH2734	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Vargem Bonita/DF	2021
EH2735	<i>B. basicola</i>	Alface	Vargem Bonita/DF	2021
EH2736	<i>B. basicola</i>	Alface	Santa Maria de Jetibá/ES	2021
EH2738	<i>B. basicola</i>	Alface	Santa Maria de Jetibá/ES	2021
EH2739	<i>B. basicola</i>	Alface	Vargem Bonita/DF	2021
EH2740	<i>B. basicola</i>	Chicória	Paulínea/ SP	2021
EH2741	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Uberlândia/MG	2021
EH2742	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Santa Maria de Jetibá/ES	2021
EH2743	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Santa Maria de Jetibá/ES	2021
EH2746	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Taguatinga/DF	2021
EH2747	<i>B. basicola</i>	Alface	Santa Maria de Jetibá/ES	2021
EH2757	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Limeira/SP	2021
EH2758	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Louveira/ SP	2021
EH2759	<i>B. rouxiae</i>	Chicória	Louveira/ SP	2021
EH2760	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Louveira/SP	2021
EH2761	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Campinas/SP	2021
EH2762	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Campinas/ SP	2021
EH2763	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Campinas/ SP	2021
EH2765	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Campinas/SP	2021
EH2766	<i>B. rouxiae</i>	Radício	Cidade Estrutural/DF	2021
EH2767	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Cidade Estrutural/DF	2021
EH2768	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Cidade Estrutural/DF	2021
EH2769	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Cidade Estrutural/DF	2021
EH2771	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Cidade Estrutural/DF	2021
EH2772	<i>B. rouxiae</i>	Radício	Cidade Estrutural/DF	2021
EH2773	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Cidade Estrutural/DF	2021
EH2775	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Cidade Estrutural/DF	2021
EH2777	<i>B. rouxiae</i>	Chicória	Sumidouro/RJ	2021
EH2778	<i>B. basicola</i>	Alface	Sumidouro/RJ	2021
EH2779	<i>B. basicola</i>	Alface	Teresópolis/RJ	2021
EH2780	<i>B. basicola</i>	Alface	Nova Friburgo/RJ	2021
EH2781	<i>B. basicola</i>	Chicória	Nova Friburgo/RJ	2021
EH2782	<i>B. basicola</i>	Alface	Nova Friburgo/RJ	2021
EH2783	<i>B. basicola</i>	Alface	Teresópolis/RJ	2021
EH2784	<i>B. basicola</i>	Alface	Sumidouro/RJ	2021
EH2785	<i>B. basicola</i>	Alface	Nova Friburgo/RJ	2021
EH2787	<i>B. basicola</i>	Alface	Nova Friburgo/RJ	2021
EH2788	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Brazlândia/DF	2021
EH2790	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Brazlândia/DF	2021
EH2793	<i>B. rouxiae</i>	Chicória	Brazlândia/DF	2021
EH2795	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Brazlândia/DF	2021
EH2796	<i>B. basicola</i>	Alface	Brazlândia/DF	2021
EH2797	<i>B. rouxiae</i>	Alface	Brazlândia/DF	2021
EH2798	<i>B. rouxiae</i>	Almeirão	Sumidouro/RJ	2021

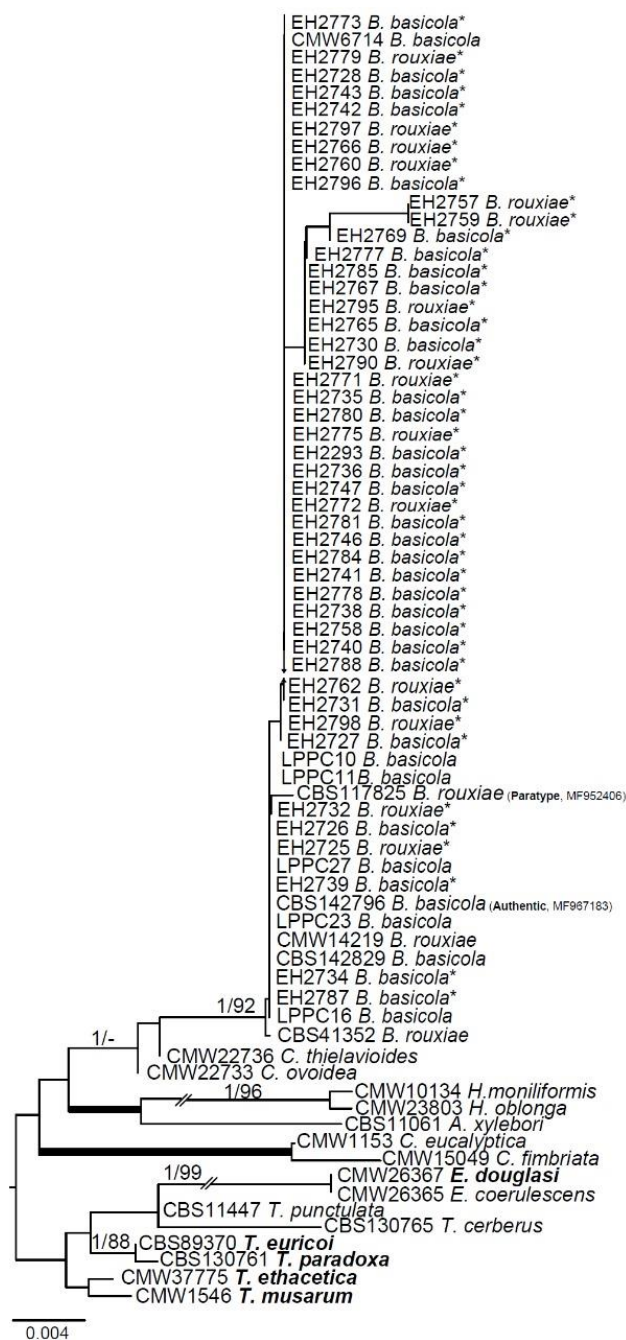


Figura 1. Árvore filogenética de máxima verossimilhança de sequências de isolados de espécies da família *Ceratocystidaceae* inferida a partir do alinhamento da região genômica **LSU**. Os valores de suporte de bootstrap (ML \geq 70) e os valores de probabilidade posterior Bayesiana (PP \geq 0,95) são mostrados nos nós. As ramificações com suporte total (ML-BI = 100 / BI-PP = 1) são indicadas em negrito. “-” indica suporte não significativo ou ausência do nó. Ex-tipos são enfatizados em negrito. “*” indica isolados de hortaliças. A árvore está enraizada no ponto médio. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site.

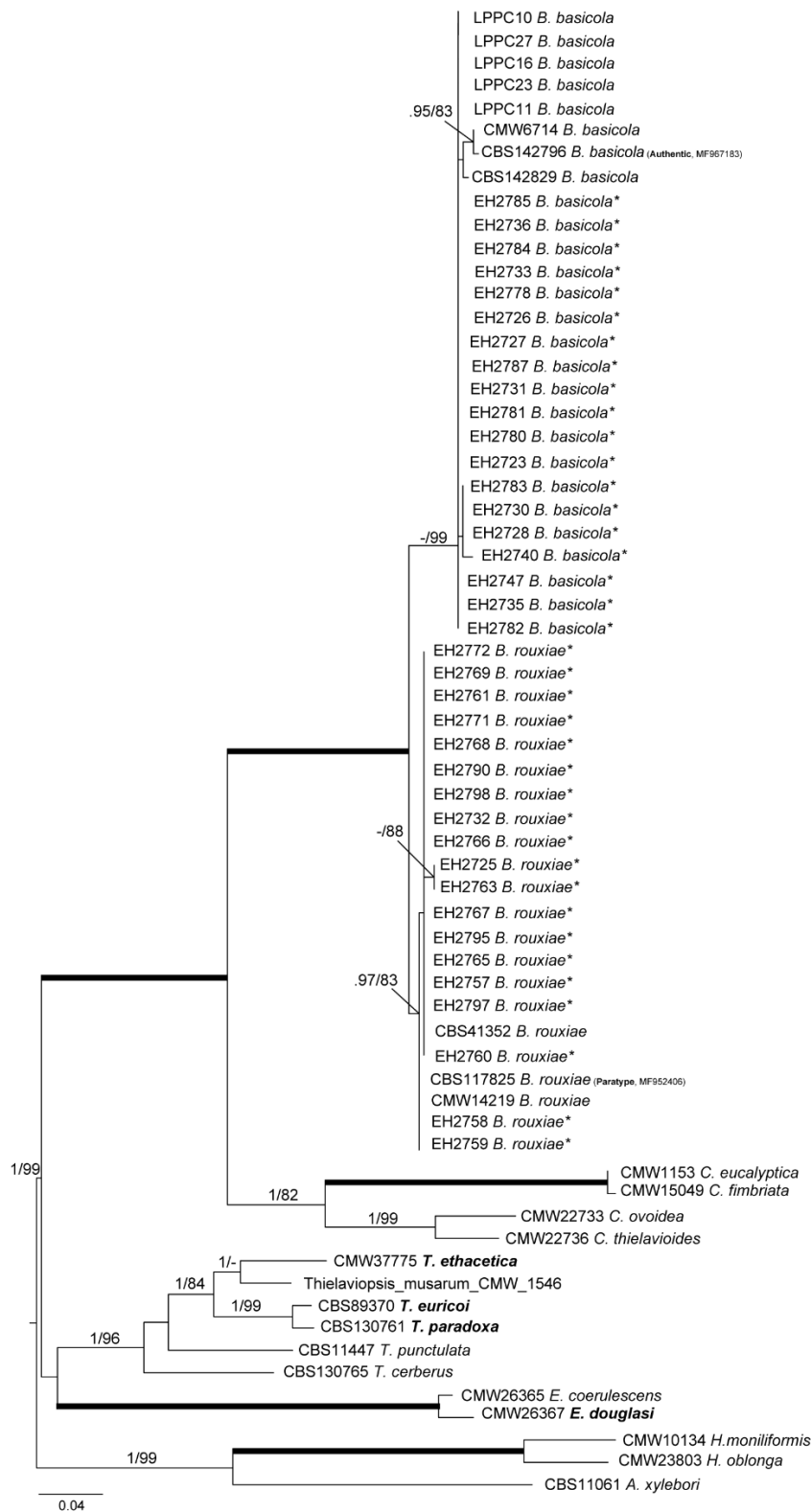


Figura 2. Árvore filogenética de máxima verossimilhança de sequências de isolados de espécies da família Ceratocystidaceae inferida a partir do alinhamento da região genômica **MCM7**. Os valores de suporte de bootstrap (ML ≥ 70) e os valores de probabilidade posterior Bayesiana (PP $\geq 0,95$) são mostrados nos nós. As ramificações com suporte total (ML-BI = 100 / BI-PP = 1) são indicadas em negrito. “-” indica suporte não significativo ou ausência do nó. Ex-tipo são enfatizados em negrito. “*” indica isolados de hortaliças. A árvore está enraizada no ponto médio. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site.

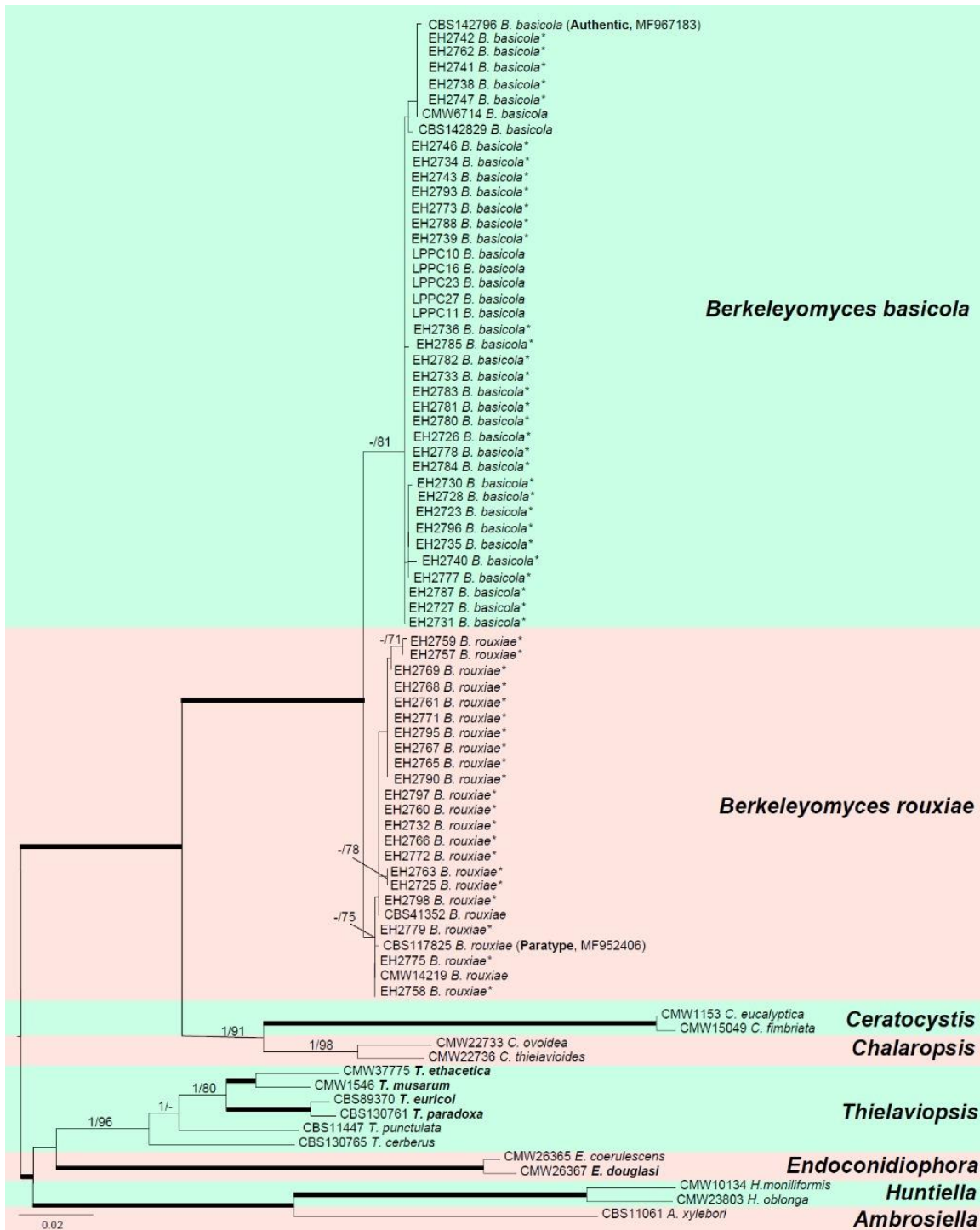


Figura 3. Árvore filogenética de máxima verossimilhança de sequências de isolados de espécies da família Ceratocystidaceae inferida a partir de um alinhamento concatenado de **LSU** e **MCM7**. Os valores de suporte de bootstrap ($ML \geq 70$) e os valores de probabilidade posterior Bayesiana ($PP \geq 0,95$) são mostrados nos nós. As ramificações com suporte total ($ML-BI = 100 / BI-PP = 1$) são indicadas em negrito. “-” indica suporte não significativo ou ausência do nó. Ex-tipos são enfatizados em negrito. “*” indica isolados de hortaliças. A árvore está enraizada no ponto médio. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site.

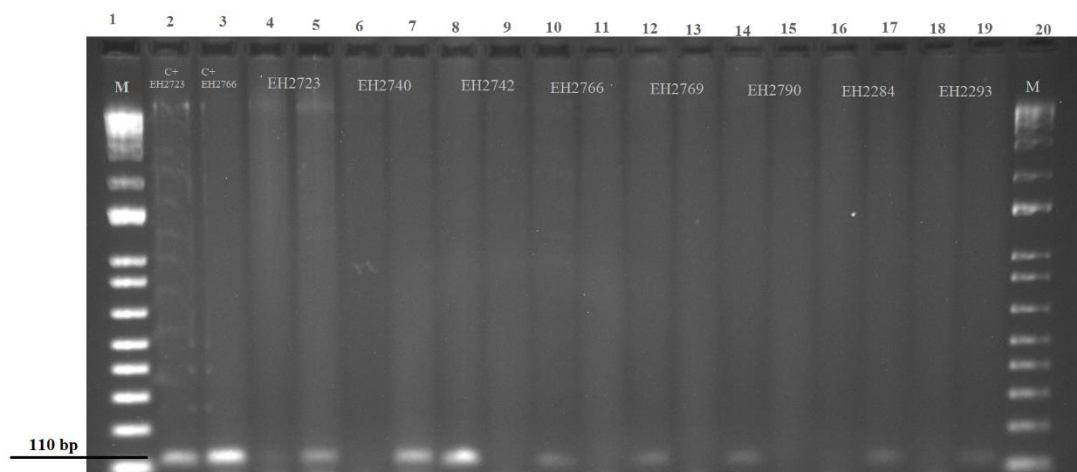


Figura 4. Ilustração de um gel de agarose demonstrando resultados do ensaio de PCR obtidos com “primers” específicos para *B. basicola* (linhas de corrida #5, #7, #17 e #19) e para *B. rouxiae* (linhas de corrida #8, #10, #12 e #14) utilizando primers específicos para as respectivas espécies. O par de primers **basi60s_F** e **basi60s_R** (linhas de corrida #5, #7, #9, #11, #13, #15, #17 e 19) é específico para *B. basicola*. O par de primers **roux60s_F** e **roux60s_R** (linhas de corrida #4, #6, #8, #10, #12, #14, #16 e #18) é específico para *B. rouxiae*. **M** = marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen.

Determinação da gama de hospedeiras

Os quatro isolados, utilizados nos ensaios de gama de hospedeiras (**EH2723**, **EH2740**, **EH2742** e **EH2790**) foram patogênicos a pelo menos sete das cultivares testadas (**Tabela 2**). *Berkeleyomyces rouxiae* (isolado **EH2790**) infectou um maior número de plantas dentre as avaliadas, causando sintomas de podridão negra das raízes em 12 das 26 cultivares testadas. Entre elas, as duas cultivares de acelga, cv. ‘Verde-escura’ e ‘Ártemis’ (incidências de 83,30% e 100% respectivamente, e severidade de 50% para ambas). Todas as cultivares de almeirão se mostraram suscetíveis: ‘Catalonha Folha Larga’, ‘Spadona’, e ‘Folha Amarela’, (todas com 100% de incidência e 40% severidade), ‘Cabeça Pão-de-Açúcar’ (100% de incidência e 60% severidade) e ‘Cabeça Vermelha’ (50% de incidência e 40% de severidade). As três cultivares de alface foram altamente suscetíveis: ‘Elisa’ (100% de incidência e severidade), ‘Aurélia’ (100% de incidência e 70% de severidade) e ‘Leila’ (100% de incidência e 60% de severidade). O coentro ‘Verdão’ (100% de incidência e 60% de severidade) e a Chicória cv. Catalogna Folha Larga (100% de incidência e 50% de severidade) também foram suscetíveis a este isolado.

O isolado **EH2740** (*B. basicola*), induziu sintomas em nove cultivares, infectando 100% das cultivares de alface, ‘Aurélia’, ‘Leila’ e ‘Elisa’ (100% de incidência e 63,3%, 30% e 63,3% de severidade, respectivamente). As duas cultivares de acelga (‘Verde-escura’ e ‘Ártemis’) apresentaram incidência de 100% e severidade de 63,3% e 66,6%, respectivamente. Três das cinco cultivares de

almeirão, Catalonha Folha Larga, (50% de incidência e 40% de severidade), 'Spadona' (100% de incidência e 40% de severidade), 'Cabeça Vermelha' (100% de incidência e 60% de severidade) e coentro cv. 'Verdão' (100% de incidência e 60% de severidade) se mostraram igualmente suscetíveis.

O isolado **EH2723** (*B. basicola*) foi patogênico à acelga cv. Ártemis (100% incidência e 63,3% de severidade), alface cultivares 'Elisa' e 'Aurélia' (ambas 100% incidência e severidade de 60% e 73% respectivamente), almeirão cv. 'Folha Amarela', 'Cabeça Pão-de-Açúcar' e 'Cabeça Vermelha' (100% incidência e 43% de severidade) e coentro cv. 'Verdão' (100% de incidência e 46% de severidade).

A espécie *B. rouxiae* (isolado **EH2742**) foi reisolada das duas cultivares de acelga ('Verde-escura' e 'Ártemis'), com incidência de 66,64% e 100%, e severidade de 63,3% para ambas, coentro cv. Verdão (50% de incidência e 46% de severidade), chicória cv. Catalogna Folha Larga (100% incidência e 63,3% de severidade) e almeirão cultivar 'Cabeça Pão-de-Açúcar' (83,3% incidência e 46% de severidade) e 'Catalonha Folha Larga' (66,64% de incidência e 36% de severidade).

As cultivares de espinafre, mostarda, rúcula salsa e agrião não apresentaram sintomas típicos de podridão negra das raízes, quando inoculadas com os isolados de *B. basicola* ou *B. rouxiae*, assim como as duas cultivares de chicória ('Crespa' e 'Escarola Batávia').

O isolado **EH2723** (*B. basicola*) não foi patogênico às cultivares de acelga 'Verde-escura', e não induziu sintomas na cultivar de alface 'Leila' bem como nas cultivares de almeirão ('Catalonha Folha Larga' e 'Spadona'). As cultivares Verdão, Spadona, Folha Amarela e Cabeça Vermelha' não foram infectadas pelo isolado **EH2742** (*B. rouxiae*). Sintomas também não foram observados nas cultivares de almeirão 'Cabeça Pão de Açúcar' e 'Almeirão Folha Amarela' quando inoculadas com o isolado **EH2740** (*B. basicola*). Todas as plantas sintomáticas apresentaram subdesenvolvimento da parte aérea e/ou do sistema radicular (Figura 5).

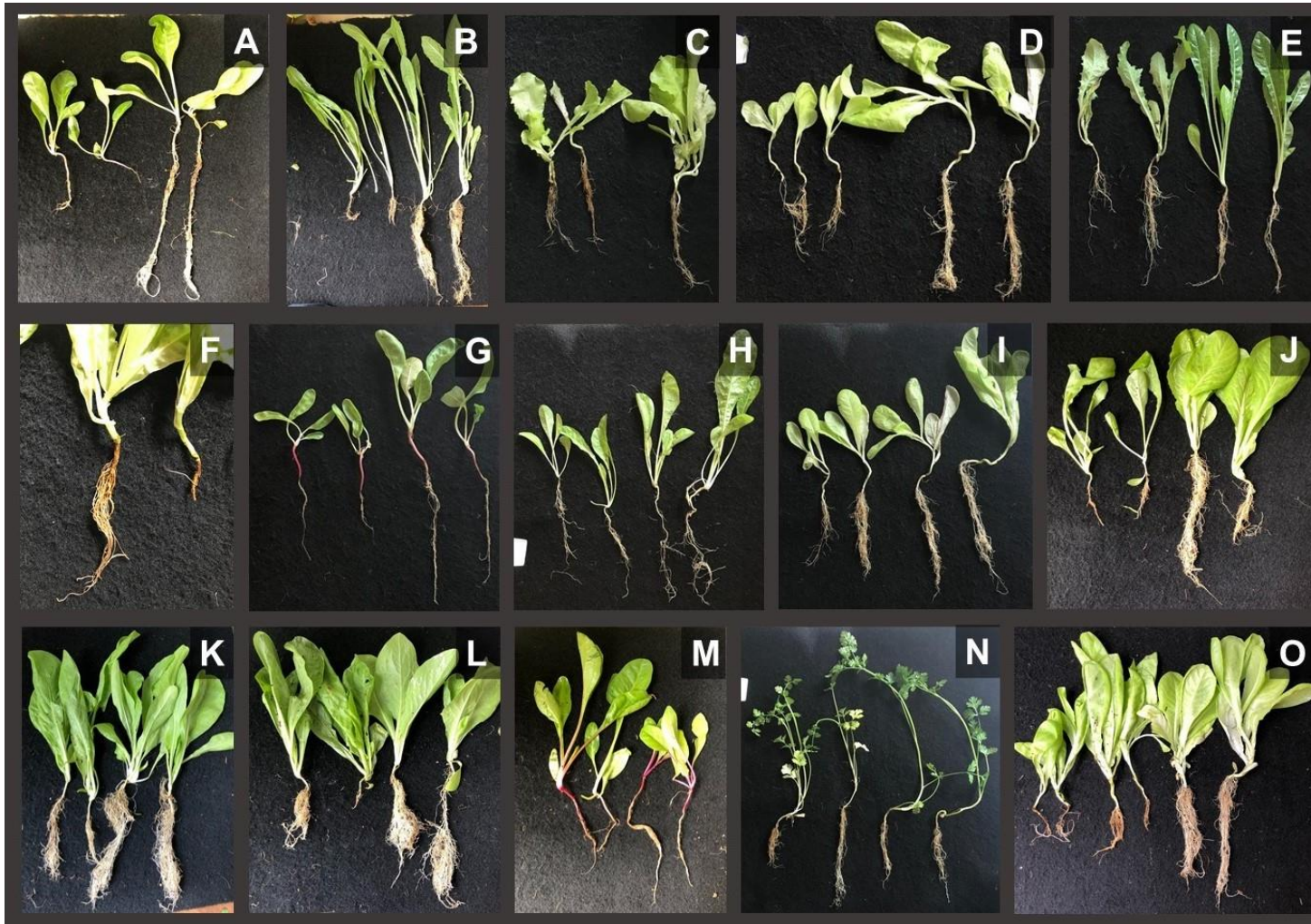


Figura 5. Sintomas de podridão negra das raízes, após inoculação de hortaliças folhosas com isolados de *Berkeleyomyces*: **A.** *B. basicola* (EH2740) x acelga cv. Verde Escura, **B.** *B. rouxiae* (EH2790) x almeirão cv. Catalonha Folha Larga, **C.** *B. rouxiae* (EH2790) x alface cv. Leila, **D.** *B. rouxiae* (EH2790) x alface cv. Aurélia, **E.** *B. rouxiae* (EH2742) x chicória cv. Catalogna Folha Larga, **F.** *B. rouxiae* (EH2790) x alface cv. Elisa, **G.** *B. basicola* (EH2740) x acelga cv. Verde Escura, **H.** *B. basicola* (EH2740) x almeirão cv. Spadona, **I.** *B. basicola* (EH2740) x alface cv. Aurélia, **J.** *B. rouxiae* (EH2742) x almeirão cv. Cabeça Vermelha, **K.** *B. basicola* (EH2723) x almeirão cv. Folha amarela, **L.** *B. basicola* (EH2723) x almeirão cv. Cabeça Pão de Açucar, **M.** *B. basicola* (EH2740) x acelga cv. Artémis, **N.** *B. basicola* (EH2790) x coentro cv. Verdão, **O.** alface cv. aurélia x *B. rouxiae* (EH2742) x *B. basicola* (EH2723) e testemunha. OBS: Plantas a direita testemunha, a esquerda plantas inoculadas.

Tabela 2. Porcentagem de plantas expressando sintomas em relação ao total de plantas inoculadas (= incidência) com dois isolados de *Berkeleyomices basicola* e dois isolados de *B. rouxiae*.

Espécies / Cultivares	Isolados			
	EH2723 <i>B. basicola</i>	EH2740 <i>B. basicola</i>	EH2742 <i>B. rouxiae</i>	EH2790 <i>B. rouxiae</i>
Acelga Verde-escura	-	100	66,64	100
Acelga Ártemis	100	100	100	100
Agrião da Água	-	-	-	-
Agrião da Terra	-	-	-	-
Alface Elisa	100	100	100	100
Alface Aurélia	100	100	100	100
Alface Leila	-	50	100	100
Almeirão Catalonha Folha Larga	-	50	66,64	100
Almeirão Spadona	-	100	-	100
Almeirão Folha Amarela	83,30	-	-	100
Almeirão Cabeça Pão-De-Açúcar	83,30	-	83,30	50
Almeirão De Cabeça Vermelha	83,30	100	-	50
Chicória Catalogna Folha Larga	-	100	100	100
Chicória Crespa	-	-	-	-
Chicória Escarola Batávia	-	-	-	-
Coentro Verdão	100	100	-	100
Espinafre Virofly	-	-	-	-
Mostarda Lisa	-	-	-	-
Mostarda Crespa	-	-	-	-
Mostarda Roxa	-	-	-	-
Rúcula Donatella	-	-	-	-
Rúcula Rokita	-	-	-	-
Rúcula Antonela	-	-	-	-
Rúcula Folha Larga	-	-	-	-
Salsa Folha Crespa	-	-	-	-
Salsa Lisa	-	-	-	-

- : Ausencia de sintomas

DISCUSSÃO

Análise filogenética de isolados de espécies de *Berkeleyomyces* associadas com alface e outras hortaliças no Brasil

A espécie *B. basicola* é considerada um importante patógeno de raiz, apresentando um amplo círculo de plantas hospederias e induzindo severos danos em uma ampla gama de espécies vegetais de relevância econômica. Este fungo apresenta uma tumultuada história taxonômica, sendo classificado em diferentes gêneros (NEL *et al.*, 2018). Antes considerado monotípico, o novo gênero *Berkeleyomyces*, proposto com base em análises filogenéticas de seis regiões genômicas, **LSU**, **MCM7**, **60S**, **ITS**, **RPB2** e **ACT** (NEL *et al.*, 2018), engloba duas espécies crípticas irmãs: *B. basicola* e *B. rouxiae*. De fato, a nova espécie *B. rouxiae* apresenta características morfológicas muito semelhantes às de *B. basicola* inviabilizando sua separação com base exclusiva em características morfológicas e biológicas, demandando o emprego de ferramentas moleculares para viabilizar uma discriminação precisa destes dois patógenos (NEL *et al.*, 2018).

As regiões **LSU** e **MCM7** têm sido citadas em trabalhos envolvendo filogenia de espécies da família *Ceratocystidaceae*. Entretanto, no presente trabalho, observou-se que a região genômica **LSU**, permitiu apenas separar representantes do gênero *Berkeleyomyces* de fungos alocados em outros gêneros desta família, corroborando resultados anteriores (DE BEER *et al.*, 2014; NEL *et al.*, 2018). As análises das árvores filogenéticas geradas a partir das regiões **LSU**, **MCM7** e concatenada indicaram maiores níveis de informação filogenética da região **MCM7**, que apresentou topologia similar com aquela obtida a partir de dados concatenados. Além disso, a informação gerada pela região **MCM7** permitiu separar de maneira consistente as duas espécies de *Berkeleyomyces*.

Um trabalho amplo de revisão da taxonomia e filogenia de isolados de *Ceratocystis* recuperados de amendoeiras sintomáticas na Califórnia (HOLANDA *et al.* 2019) foi conduzido empregando seis regiões genômicas, incluindo **LSU**, β -tubulina (**TUB2**), fator de alongamento de tradução 1-alfa (**EF1- α**), **MCM7**, proteína ribossomal 60S RPL10 (**60S**) e fragmentos do gene Ceratoplatanina (**CP**). Para esses isolados do gênero *Ceratocystis* todas as regiões, exceto **LSU** e **60S** foram capazes de discernir os grupos irmãos *C. betulina* e *C. variosporacomo*. De maneira similar ao presente trabalho, a informação derivada da região **MCM7** se mostrou como a mais indicada para utilização em análises filogenéticas dentro da família *Ceratocystidaceae*. Ellingham, David e Culham (2019), objetivando melhorar a precisão na identificação de espécies causadoras de oídio, utilizaram sete novas regiões genômicas (**actina**, **TUB2**, **calmodulina**, **CHS**, **EF1- α** , **MCM7** e **TSR1**).

De modo semelhante aos resultados observados no presente trabalho, a região **MCM7** foi a mais útil na diferenciação entre espécies de oídio, tanto sendo usada separadamente como conjunto

com **ITS** (região espaçadora transcrita interna). Também, ao utilizar os marcadores **LSU** e **MCM7** na análise filogenética de Ascomycotas, Raja *et al.* (2011), observaram que a região **MCM7** apresenta maior informatividade e suporte, quando comparado ao locus LSU. No presente trabalho, as sequências oriundas da região **LSU** forneceram informações filogenéticas suficientes para separar as espécies do gênero *Berkeleyomyces* de membros de outros gêneros dentro da família *Ceratocystidae*.

Por sua vez, a informação gerada a partir da região **MCM7** foi mais discriminativa, permitindo separar as duas espécies irmãs de *Berkeleyomyces* (NEL *et al.*, 2018; CAVALCANTE, 2020). Desta forma, a análise filogenética empregando informação da região **MCM7** se apresenta como a ferramenta mais adequada para separar isolados pertencentes ao gênero *Berkeleyomyces*.

Validação de primers específicos para identificação das espécies de *Berkeleyomyces*

Como mencionado, as espécies *B. basicola* e *B. rouxiae* são morfologicamente e fisiologicamente indistinguíveis, mas diferem nas sequências de nucleotídeos das regiões genômicas **60S**, **LSU**, **ITS** e **MCM7** (NEL *et al.*, 2018). Os primers **basi60s_F** **basi60s_R** e **roux60s_F** **roux60s_R** foram desenhados para anelar em sequências nucleotídicas franqueadoras de segmentos genômicos contendo polimorfismos específicos para *B. basicola* e para *B. rouxiae* (NAKANE; USAMI, 2020).

No presente trabalho, esses ensaios baseados em PCR, apresentam alta eficiência, sendo ambos altamente específicos. Incongruências foram observadas para 11 isolados (EH2734, EH2739, EH2741, EH2742, EH2743, EH2746, EH2762, EH2773, EH2777, EH2788 e EH2793) identificados como *B. rouxiae* utilizando os primers específicos, que foram inicialmente identificados na análise concatenada como pertencentes a espécie *B. basicola*. No entanto, esses resultados podem ser explicados pelo fato de todos esses 11 isolados não terem gerado informações de sequência para a região **MCM7** devido a falhas nas reações (**Figura 2**), que é justamente a região informativa e que fornece suporte para distinguir as duas espécies de *Berkeleyomyces* (NEL *et al.*, 2018; CAVALCANTE, 2020). A identificação de espécies fúngicas via análise filogenética é uma operação trabalhosa e cara. Neste contexto, estes dois pares de primers espécie-específicos poderão ser constituir em uma nova e útil ferramenta no estabelecimento de sistemas de diagnose rápida e precisa de espécies de *Berkeleyomyces* em hortaliças no Brasil.

Determinação da gama de hospedeiras de isolados neotropicais de *B. basicola* e *B. rouxiae*

As espécies de *Berkeleyomyces* avaliadas nesse estudo apresentam ampla gama de hospedeiras confirmando que ambas são polífagas. Na verdade, estas duas espécies, em conjunto, já foram reportadas como agentes causais de doenças em mais de 170 culturas (NEL *et al.*, 2019; FARR; ROSSMAN, 2022).

As cultivares de acelga, ‘Verde-escura’ e ‘Ártemis’ foram infectadas pelas duas espécies de *Berkeleyomyces*, e apesar de não haver relato na literatura das mesmas infectando a cultura, a espécie *B. basicola* já foi previamente associada com a ocorrência de podridão negra das raízes, em pelo menos três espécies da mesma família a qual a acelga pertence (Amaranthaceae), incluindo beterraba (*Beta vulgaris* L.) (ADERHOLD; 1906), Redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus* L) e *Album Chenopodium* L. (GAYED, 1972).

De maneira similar, todas as três cultivares de alface (‘Elisa’, ‘Leila’ e ‘Aurélia’) foram infectadas por isolados das duas espécies de *Berkeleyomyces*, mas apresentaram diferentes reações a estes patógenos. De fato, a alface já foi previamente identificada como hospedeira das duas espécies de *Berkeleyomyces* (NAKANE *et al.*, 2019, FARR; ROSSMAN, 2022). No presente trabalho, as cultivares ‘Elisa’ e ‘Aurélia’ se mostraram altamente suscetíveis, enquanto a cultivar ‘Leila’ apresentou moderada resistência. Sala (2006) também observou diferenças de resposta a esse grupo de patógenos ao avaliar uma coleção de 37 acessos de alface quando à resistência ou suscetibilidade a *Berkeleyomyces* spp. Cultivares de alface do grupo varietal “lisa” se mostraram altamente suscetíveis a infecção por *T. basicola*, enquanto as cultivares do grupo varietal “crespa” foram moderadamente ou altamente resistentes. Todas as cultivares de almeirão (*C. intybus* L.) avaliadas no presente estudo foram suscetíveis a infecção por *B. basicola* e *B. rouxiae*. A cultivar de chicória ‘Catalogna Folha Larga’, foi suscetível a três (EH2740, EH2742 e EH2790) dos quatro isolados utilizados nesse estudo. Por seu lado as cvs. ‘Crespa’ e ‘Escarola Batávia’ não apresentaram sintomas quando inoculadas com os patógenos, o que indica a presença de potenciais fatores de resistência à infecção por espécies de *Berkeleyomyces* nesses materiais genéticos.

Mostarda, rúcula e agrião não apresentaram sintomas típicos de podridão negra das raízes, quando inoculados com os isolados EH2723, EH2740, EH2742 e EH2790, apesar de existir relatos de danos causados por *Thielaviopsis basicola* em espécies da família Brassicaceae como repolho (*Brassica oleraceae* L.) (YARWOOD; 1981), bolsa-de-pastor (*Capsella bursa-pastoris* L.) (MASSEE; 1912) e raiz forte (*Cochlearia armoracia* L.) (SOROKIN; 1876). As cultivares de espinafre e salsa também não apresentaram sintomas quando inoculadas com os isolados de *Berkeleyomyces*, indicando serem resistentes ou não hospedeiras de *B. basicola* e *B. rouxiae*.

Variabilidade patogênica de isolados neotropicais de *B. basicola* e *B. rouxiae*

Os dois isolados de *B. basicola* apresentaram patogenicidade diferencial, sendo que o isolado **EH2740** induziu sintomas em dez cultivares, enquanto o isolado **EH2723** afetou apenas sete, não sendo patogênico para a acelga cv. ‘Verde-escura’, almeirão cv. ‘Catalonha Folha Larga’, ‘Spadona’ e para a alface cv. ‘Leila’.

Padrões diferenciais de patogenicidade também foram observados para os isolados de *B. rouxiae*. O isolado **EH2790**, foi apresentado um círculo de plantas hospedeiras mais amplo afetando 12 das 26 cultivares avaliadas, enquanto o isolado **EH2742** afetou apenas oito materiais genéticos. De modo geral, os isolados das duas espécies apresentaram uma marcante superposição, afetando grupos similares de materiais genéticos hospedeiros.

A variação de patogenicidade pode estar relacionada a diferenças genéticas em componentes de agressividade e virulência de cada isolado. Além disso, já foi relatado evidências de especificidade de interação em isolados de *T. basicola* (= *Berkeleyomyces basicola*) com diferentes plantas hospedeiras (LLOYD; LOCKWOOD, 1963; O'BRIEN; DAVIS, 1994; KELLER; SHANKS, 1955). Isolados de *T. basicola* oriundos de ervilha, laranja, e poinsettia, foram patogênicos ao feijão e à ervilha, mas não ao fumo. Em contrapartida, isolados de *T. basicola* isoladas de fumo foram altamente patogênicas à esta espécie e não patogênico ao feijão (LLOYD; LOCKWOOD, 1963).

Do mesmo modo, Keller e Shanks (1955), observaram que isolados de *T. basicola* de fumo não induziam sintomas em a poinsettia e vice-versa. Prinsloo, Baard e Ferreira (1993), ao avaliar 34 cultivares de almeirão (*C. intybus*) e 12 de chicória (*C. ediviva*) quanto a infecção por *Thielaviopsis basicola* observaram que em geral, as cultivares de chicória se mostravam mais resistentes ao ataque do patógeno. Por sua vez, as cultivares de almeirão foram bem sensíveis ao patógeno, com exceção da cv. 'Chicoree sauvage Doree Amel de Milan' que apresentou uma alta porcentagem de sobrevivência e baixos índices de doença. Os autores sugeriram ainda, que a resistência observada nas cvs de chicória, a infecção por *Thielaviopsis basicola* poderia ser transferida para o almeirão, já que ambas as espécies apresentam 18 cromossomos e hibridizam livremente (RYDER, 1979).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gênero *Berkeleyomyces* é atualmente representado pelas espécies *B. basicola* e *B. rouxiae*. No entanto, ainda não existiam informações disponíveis sobre as espécies de *Berkeleyomyces* presentes em associação com a alface e outras hortaliças folhosas em áreas neotropicais. Neste contexto, o presente estudo é a primeira tentativa de caracterizar espécies de *Berkeleyomyces* associadas à alface e outras hortaliças folhosas por meio de abordagens moleculares, incluindo primers específicos capazes de discriminar as duas espécies descritas de *Berkeleyomyces* por PCR convencional.

Cinquenta e três isolados de *Berkeleyomyces* foram obtidos de quatro hospedeiros diferentes e em diferentes regiões produtoras do Brasil. As sequências de duas regiões genômicas desses isolados foram comparadas com 26 sequências de isolados de referência de membros da família *Ceratocystidaceae*, bem como com isolados de *B. basicola* e *B. rouxiae* disponíveis no banco de dados do GenBank. Na árvore filogenética **LSU**, todos os isolados agruparam-se com espécies de *Berkeleyomyces*. No entanto, a região **MCM7** se mostrou ainda mais informativa, dando suporte filogenético para distinguir as duas espécies de *Berkeleyomyces*.

Análises filogenéticas não são ferramentas empregadas como rotina em sistemas de diagnose. Por essa razão, o sistema de marcadores baseado em PCR desenvolvido por Nakane e Usami (2020) capaz de distinguir de forma simples e eficiente isolados de *B. Basicola* e *B. Rouxiae* foi empregado no presente estudo com a finalidade de facilitar a detecção e diagnose dos agentes causais da podridão negra das raízes nas condições brasileiras. Fragmentos específicos da espécie fúngica de aproximadamente 110 pb foram gerados via PCR ao empregar primers específicos para *B. basicola* e para *B. rouxiae*. Esse sistema de marcadores apresentou resultados semelhantes à identificação obtida via filogenia.

Em alface, 21 isolados foram classificados como *B. basicola* e 24 isolados como *B. rouxiae*. Este é o primeiro registro formal de *B. basicola* infectando alface no mundo e a primeira identificação de *B. rouxiae* no Brasil. Dois isolados de cada espécie de patógeno (*B. basicola* e *B. rouxiae*) e 26 cultivares de dez hortaliças foram utilizados nos ensaios de gama de hospedeiros. Alface, almeirão, radício e chicória foram identificados pela primeira vez no Brasil e no mundo como novos hospedeiros naturais de *B. basicola* e *B. rouxiae*. Além disso, também foram identificados novos potenciais hospedeiros experimentais desses patógenos, incluindo as cultivares de acelga ‘Verde Escura’ e ‘Artemis’, cultivares de alface ‘Aurélia’, ‘Elisa’ e ‘Leila’, cultivares de almeirão ‘Spadona’, ‘Folha Amarela’, ‘Cabeça-Pão-de-Açúcar’ e ‘Cabeça Vermelha’, e chicória cv. ‘Catalogna Folha Larga’ e coentro cv. ‘Verdão’).

Desta forma, o conhecimento gerado no presente trabalho representa uma importante contribuição para a caracterização de aspectos epidemiológicos da epidemiologia da podridão negra em hortaliças, permitindo uma melhor tomada de decisão quanto às estratégias de manejo da doença. Além disso, a informação gerada no presente trabalho serve para guiar os programas de melhoramento genético na seleção de isolados representativos dos patógenos para utilização em sistemas de seleção que visem desenvolver cultivares de alface e outras hortaliças com resistência estável e durável contra essa doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADERHOLD, R. (1906). Impfversuche mit *Thielavia basicola* Zopf. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten*, v. 16, 46 p.
- BERKELEY, M.J.; BROOME, C.E. (1850). Notices of British fungi XL. *Annals and Magazine of Natural History*, v. 25, p. 455-466.
- BOITEUX, L.S, FONSECA MEN.; SIMON, P.W. (1999). Effects of plant tissue and DNA purification method on RAPD-based genetic fingerprinting analysis in carrot. *Journal of the American Horticultural Science*, v. 124, p. 32-38.
- BORGES, R.C.F.; SANTOS, M.D.M.; MACEDO, M.A.; MARTINS, I.; NASCIMENTO, A.G.; BOITEUX, L.S.; MELLO, S.C.M. (2014). First report of a wilt disease of *Tectona grandis* caused by *Thielaviopsis basicola* in Brazil. *New Disease Reports*, v. 30, n. 1, p. 17-17.
- BOSSHARD, E.; HELLER, W.; LADNER, J.; RÜEGG, J.; SCHWIZER, T.; WIDMER, A.; (2007). Decline of stone fruit trees in Switzerland. *Acta Horticulturae*, v. 734, p. 363-365.
- BOWDEN, R.L.; WIESE, M.V.; CROCK, J.E.; AULD, D.L. (1985). Root rot of chickpeas and lentils caused by *Thielaviopsis basicola*. *Plant disease*, v. 69, p. 1089-1091.
- CANTER-VISSCHER, T.W.; OVER DE LINDEN, A.J. (1972). Root and basal stem rot of grapevine caused by *Thielaviopsis basicola* (Berk. And Br.) Ferraris. *New Zealand J Agric Res*, v. 15, p. 184-185.
- CASTELLANI, A. (1939). Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.24, p. 270-276.
- CAVALCANTE, Suzilaine Yasmim da Silva. **Etiologia da podridão negra da cenoura no Brasil.** 2020. 57p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2020.
- COUMANS, J.V.F.; HARVEY, J.; BACKHOUSE, D.; POLJAK, A.; RAFTERY, M. J.; NEHL, D.; KATZ, M. E.; PEREG, L. Proteomic assessment of host-associated microevolution in the fungus *Thielaviopsis basicola*. *Environmental Microbiology*, Oxford, v. 13, n. 3, p. 576-588, 2011.
- DE BEER, Z.W.; DUONG, T.A.; BARNES, I.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M. J. Redefining *Ceratocystis* and allied genera. *Studies in Mycology*, Utrecht, v. 79, p. 187-219, 2014.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B.A. (1983). Plant DNA minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* v. 1, p. 19-2.

ELLINGHAM, O.; DAVID, J.; CULHAM, A. (2019). Enhancing identification accuracy for powdery mildews using previously underexploited DNA loci. *Mycologia*, v. 11, n. 5, p. 798-812.

FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrieved January 18, 2022, from <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>

FERRARIS, T.A. (1912). Fungi: Hyphales. Flora Italica Cryptogamica Pars I. *Fungi*, p. 233-234.

GARIBALDI, A.; GILARDI, G.; GULLINO, M.L. (2005). First report of root rot caused by *Thielaviopsis basicola* in lamb's lettuce (*Valerianella olitoria*) in Europe. *Plant disease*, v. 89, n. 2, p. 205-205.

GAYED, S.K. (1972). Host range and persistence of *Thielaviopsis basicola* in tobacco soil. *Canadian Journal of Plant Science*, v. 52, p. 869-873.

GULLINO, M.L.; GILARDI, G.; GARIBALDI, A. (2019). Ready-to-eat salad crops: a plant Pathogen's heaven. *Plant disease*, v.103, n. 9, p. 2153-2170.

HEINTZE, T. C.; JUNIOR, I.L.C.; VINCENZI, S.L.; DE MENDONÇA, S.N. (2018). **Perfil de Consumo de Alface em Instituição de Ensino Superior da Região Oeste do Paraná.** Higiene Alimentar, v. 32, p. 41-45.

HENZ, G. P.; SUINAGA, F.A. Tipos de alface cultivados no Brasil. **Embrapa Hortaliças- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2009.

HOESTRA, H. (1965). *Thielaviopsis basicola*, a factor in the cherry replant problem in the Netherlands. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, v. 71, p. 180-182.

HOLLAND, L.A.; LAWRENCE, D.P.; NOURI, M.T.; TRAVADON, R.; HARRINGTON, T.C.; TROUILLAS, F.P. (2019). Taxonomic revision and multi-locus phylogeny of the North American clade of *Ceratocystis*. *Fungal Systematics and Evolution*, v. 3, 135 p.

JOHNSON, J. (1916). Host plants of *Thielavia basicola*. *Journal of Agricultural Research*, v. 7, p. 289-300.

KATOH, K.; STANDLEY, D.M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and Evolution*, v. 30, p. 772-780.

KATOH, ROZEWICKI, YAMADA. (2019). (Briefings in Bioinformatics 20:1160-1166) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization.

KELLER, J.R.; SHANKS, J.B. (1955). Poinsettia root rot. *Phytopathology*. v. 45, p. 552-558.

KIM, M.J.; MOON, Y.; TOU, J.C.; MOU, B.; WATERLAND, N.L. (2016). Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 49, p. 19-34.

KIM, S.X.; ASSEFA, A.D.; KEUM, Y.S.; SAINI R.K. (2018). Metabolite profiling of green, green/red, and red lettuce cultivars: Variation in health beneficial compounds and antioxidant potential. *Food Research International*, v.105, p. 361-370.

KING, C.J.; PRESLEY, J.T. (1942). A root rot of cotton caused by *Thielaviopsis basicola*. *Phytopathology*, v. 32, n. 9, p. 752-761.

KOIKE, S.T. (2008). Black root rot caused by *Thielaviopsis basicola* on lettuce in California. *Plant Dis*, v. 92, 1368 pp.

KOIKE, S.T.; HENDERSON, D.M. (1998). Black Root Rot, Caused by *Thielaviopsis basicola*, on Tomato Transplants in California. *Plant Disease*, v. 82, p. 447-447.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution* v. 33, p. 1870-1874.

LAMBE, R.C.; WILLS, W.H. (1978). Pathogenicity of *Thielaviopsis basicola* to Japanese holly. *Plant Disease Reporter*, v. 62, p. 859-863.

LLOYD, A.B.; LOCKWOOD, J.L. (1963) Effect of soil temperature, host variety, and fungus strains on *Thielaviopsis* root rot of peas. *Phytopathology*, v. 53, n. 3, p. 329-331, 1963.

LOCKWOOD, J.L.; YODER, D.L.; SMITH, N.A. (1970). *Thielaviopsis basicola* root rot of Soybeans in Michigan. *Plant Disease Reporter*, v. 54, p. 849-850.

MALDONADE, I.R.; MATTOS, L.M.; MORETTI, C.L. Manual de boas práticas agrícolas na produção de alface. **Embrapa Hortaliças-Documentos (INFOTECA-E)**, 2014.

MASSEE, G.E. (1912). A Disease of Sweet Peas, Asters, and Other Plants. (*Thielavia basicola*, Zopf.). *Bulletin of Miscellaneous Information* (Royal Botanic Gardens, Kew), p. 44-52.

MCCORMICK, F.A. (1925). Perithecia of *Thielavia basicola* Zopf in culture and the stimulation of their production by extracts from other fungi. *Connecticut Agricultural Experiment Station*, v. 269, p. 539-554.

McKINNEY, H. H. (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, Washington, v. 26 n. 5, p. 195-219.

MENEZES, M.; SILVA-HANLIN, D.M.W. (1997). **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, 106p.

MICHEL, V.V. (2015). First Report of *Chalara elegans* causing wilt on *Lisianthus* in Switzerland. *Plant Disease*, v. 99, p. 1187.

MONDAL, A.H.; NEHL, D.B.; ALLEN, S.J.; (2004). First report of *Thielaviopsis basicola* on soybean in Australia. *Australasian Plant Pathology*, v. 33, p. 451-452.

MORENO, A.; FERERES, A. (2012). Virus diseases in lettuce in the Mediterranean Basin. **Advances in Virus Research**, v. 84, p. 249-278.

MULABAGAL, V.; NGOUAJIO, M.; NAIR, A.; ZHANG, Y.; GOTTUMUKKALA, A. L.; AND NAIR, M.G. (2010). *In vitro* evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties. **Food Chem.** v. 118, p. 300-306.

NAKANE, R.; MIKI, S.; IKEDA, K.; SAKAI, H.; HAYASHI, K.; USAMI, T. (2019). First report of black root rot of lettuce in Japan caused by *Berkeleyomyces rouxiae*. *Journal of General Plant Pathology*, v. 85, n. 6, p. 436-439.

NAKANE, R.; USAMI, T. (2020). PCR primers to identify and detect *Berkeleyomyces rouxiae*, a causal agent of black root rot of lettuce. *Journal of General Plant Pathology*, v. 86, p. 335-339.

NEL, W.J.; DUONG, T.A.; DE BEER, Z. W.; WINGFIELD, M.J. (2018). Black root rot: a long known but little understood disease. *Plant Pathology*, v. 68 n.(5), p. 834-842.

NEVES, J.F.N.F.; NODARI, I.D.E.; JÚNIOR, S.S.; DIAS, L.D.E.; SILVA DA, L.B.; DALLACORT, R. **Produção de cultivares de alface americana sob diferentes ambientes em condições tropicais**. Revista Agro@mbiente on-line-line, v. 10, n. 2, p. 130-136, 2016.

NOUMEDEM, J.A.K.; DJEUSSI, D.E.; HRITCU, L.; MIHASAN, M.; KUETE, V. (2017). *Lactuca sativa*. In: **Medicinal Spices and Vegetables from Africa**; Academic Press: Cambridge, MA, USA, p. 437-449.

- NYLANDER, J.A.A. (2004). MrModeltest v2. Program distributed by the author. *Evolutionary Biology Centre*, Uppsala University.
- O'BRIEN, R.G.; DAVIS, R.D. (1994). Lettuce black root rot - a disease caused by *Chalara elegans*. *Australasian Plant Pathology*, v. 23, p.106-111.
- O'BRIEN, R.G.; DAVIS, R.D. (2002). *Black root rot of lettuce - dpi note*.
- PEGLION, V. (1891). Marciume radicale delle piantine di tabacco causato dalla *Thielavia basicola* Zopf. *Cent Bakt Abt II*, v.3, p. 580-584.
- PEREG, L.L. (2013). Black root rot of cotton in Australia: The host, the pathogen and disease management. *Crop and Pasture Science*, v. 64, p. 1112-1126.
- PRINSLOO, G.C.; BAARD, S.W.; FERREIRA, J.F. (1991). Organisms associated with black root rot of chicory in South Africa. *Phytophylactica*, v. 23, p. 59-67.
- PRINSLOO, GC, BAARD, SW AND FERREIRA, J. F. (1993). Resistance of chicory and endive to black root rot and the effect of their exudates on the *Thielaviopsis basicola*. *Phytophylactica*, v. 25, n. 2, p. 107-114.
- RAJA, H.; SCHOCH, C.L.; HUSTAD, V.; SHEARER, C.; MILLE, A. (2011). Testing the phylogenetic utility of MCM7 in the Ascomycota. *MycKeys*, v.1, p. 63-94.
- RAMBAUT, A. (2012). FigTree v1.4.0: Tree Figure Drawing Tool. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. (2010). Tracer v. 1.4 Available at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. Accessed 12 December 2021.
- RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MAR, P.; AYRES, D.L.; DARLING, A.; HOHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M.A.; HUELSENBECK, J.P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* v. 61, p. 539-542.
- RYDER, E.J. (1979). Leafy salad vegetables. **AVI Publishing Company**, Westport.
- SALA, F.C. (2006). **Reação de alface (*Lactuca sativa* L.) a *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferraris**. Piracicaba: USP-ESALQ. 97p. (Tese doutorado).

SANTIAGO, Ocinéia Márcia Andrade. **Caracterização da cadeia produtiva de hortaliças em sistema orgânico em Manaus, Amazonas**. 2012. 177 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.

SILVA, A.M.S.; AKIBA, F.; CARVALHO, A.O.; RIBEIRO, R.L.D.; ARAÚJO, J.S.P. **Podridão negra de raízes de quiabeiro e alface incitada por *Thielaviopsis* spp.** 32º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 4. Resumos... Brasília: SBF. (CD-ROM), 1999.

SMITH, E.F. (1899). Wilt disease of cotton, watermelon, and cowpea (*Neocosmospora* nov. gen.). *United States Department of Agriculture Division of Vegetable Physiology and Pathology Bulletin*, v. 17, p. 1-54.

SOROKĪN, N.V. (1876). Ueber *Helminthosporium fragile* sp. n. *Hedwigia*, v. 15, 113 p.

SOUZA, J.L.; REZENDE, P. **Manual de horticultura orgânica**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2014. 841p.

STADEN, R.; BEAL, K.F.; BONFIELD, J.K. (1998). The Staden package. In: MISENER, S.; KRAWETZ, S.A. (eds) **Bioinformatics methods and protocols**. Humana, New York, p. 115-130.

STAMATAKIS, A. (2014). RAxML version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics*, 30:1312-1313.

TEIXEIRA-YAÑEZ, L. D. D. **Resistência genética, fungicidas e solarização para o controle de *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferraris na cultura de alface (*Lactuca sativa* L.)**. 2005, 103 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2005.

TSAO, P.H. (1963). The relative susceptibility of certain varieties and hybrids of citrus species and relatives of *Thielaviopsis basicola*. *Plant Disease Reporter*, v. 47, p. 437-439.

TSAO, P.H.; GUNDY, S.D. (1962). *Thielaviopsis basicola* as a citrus root pathogen. *Phytopathology*, v. 52, p. 781-786.

VAIDYA, G.; LOHMAN, D.J.; MEIER, R. (2011). SequenceMatrix: Concatenation Software for the Fast Assembly of Multi-Gene Datasets with Character Set and Codon Information. *Cladistics*, v. 27, p. 171-180.

YARWOOD, C.E. (1981). The occurrence of *Chalara elegans*. *Mycologia*, p. 524-530.

YOUNG, B.R, (1970). Root rot of passionfruit vine (*Passiflora edulis* Sims.) in the Auckland area. *New Zealand J Agric Res*, v. 13, p. 119-125.

ZOPF, W. Über *Thielavia basicola*, einen endophytischen Parasiten in den Wurzeln des *Senecio elegans*. **Verhandlungen des Botanischen Vereins für die Provinz Brandenburg**, v. 18, p. 101-5, 1876.

Tabela S1. Relação dos isolados e número de acesso do GenBank das sequências utilizadas como referência nas análises filogenéticas.

Nome da espécie	Código	Código de acesso de GenBank	
		LSU	MCM7
<i>Ambrosiella xylebori</i>	CBS11061	KM495318	KM495407
<i>Berkeleyomyces basicola</i>	CMW6714	MF948658	MF967079
<i>Berkeleyomyces basicola</i>	CBS142796; CMW49352 (Authentic, MF952429)	MF948659	MF967102
<i>Berkeleyomyces basicola</i>	CBS142829; CMW25440	MF948661	MF967088
<i>Berkeleyomyces basicola</i>	LPPC10	OK490475	OK618534
<i>Berkeleyomyces basicola</i>	LPPC11	OK490476	OK618535
<i>Berkeleyomyces basicola</i>	LPPC16	OK490481	OK618540
<i>Berkeleyomyces basicola</i>	LPPC23	OK490488	OK618547
<i>Berkeleyomyces basicola</i>	LPPC27	OK490492	OK618551
<i>Berkeleyomyces rouxiae</i>	CMW5472; CBS117825 (Paratype, MF952406)	MF948657	MF967080
<i>Berkeleyomyces rouxiae</i>	CBS413.52	MF948662	MF967106
<i>Berkeleyomyces rouxiae</i>	CMW14219	MF948660	MF967086
<i>Ceratocystis eucalyptica</i>	CMW1153	KM495339	KM495428
<i>Ceratocystis fimbriata</i>	CMW15049	KM495343	KM495432
<i>Chalaropsis thielavioides</i>	CMW22736	KM495402	KM495489
<i>Chalaropsis ovoidea</i>	CMW22733	KM495400	KM495487
<i>Endoconidiophora coerulea</i>	CMW26365	KM495329	KM495418
<i>Endoconidiophora douglasi</i>	CMW26367 T	KM495335	KM495424
<i>Huntia oblonga</i>	CMW23803	KM495359	KM495447
<i>Huntiamoniliformis</i>	CMW10134	KM495355	KM495443
<i>Thielaviopsis cerberus</i>	CMW 36668; CBS 130765	KM495326	KM495415
<i>Thielaviopsis ethacetica</i>	CMW 37775; IMI 50560; MUCL 2170T	KM495337	KM495426
<i>Thielaviopsis euricoi</i>	CMW 28537; CBS 893.70; MUCL 1887; UAMH 1382T	KM495340	KM495429
<i>Thielaviopsis musarum</i>	CMW 1546; C 907T	KM495357	KM495445
<i>Thielaviopsis paradoxa</i>	CMW 36689; CBS 130761T	KM495363	KM495451
<i>Thielaviopsis punctulata</i>	CMW 1032; CBS 114.47; MUCL 9526	KM495371	KM495459

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

1. No Brasil, a doença podridão negra das raízes em hortaliças folhosas, incluindo alface, chicória, almeirão e radício é causada por duas espécies fúngicas, *B. basicola* e *B. rouxiae*;
2. A região MCM7, sozinha, possui boa informatividade e suporte para distinguir as duas espécies de *Berkeleyomyces*;
3. Os primers específicos basi60s_F e basi60s_R e roux60s_F e roux60s_R permitem uma identificação rápida, precisa e econômica para as espécies *Berkeleyomyces*;
4. Novas hospedeiras naturais de *B. basicola* e *B. rouxiae* foram identificadas neste trabalho;
5. Acelga cv. Verde Escura e Artémis,, almeirão cv. Catalonha Folha Larga, Spadona, Folha Amarela, Cabeça Pão-de-Açúcar e Cabeça Vermelha, chicória cv. Catalogna Folha Larga e Coentro Verdão reagiram como hospedeiras experimentais das espécies de *Berkeleyomyces*.