

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E
MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *Fusarium*
ENVOLVIDAS NA ETIOLOGIA DA
MALFORMAÇÃO DA MANGUEIRA**

CRISTIANO SOUZA LIMA

2006

CRISTIANO SOUZA LIMA

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES DE
Fusarium ENVOLVIDAS NA ETIOLOGIA DA MALFORMAÇÃO DA
MANGUEIRA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. PhD. Ludwig Heinrich Pfenning

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Lima, Cristiano Souza

Caracterização biológica e molecular de espécies de *Fusarium* envolvidas na etiologia da malformação da mangueira / Cristiano Souza Lima. – Lavras : UFLA, 2005.

111 p. : il.

Orientador: Ludwig H. Pfenning

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Manga. 2. *Mangifera indica*. 3. Espécie biológica. 4. Malformação floral. 5. Malformação vegetativa. 6. *Mating population*. 7. Espécie filogenética. 8. Etiologia. 9. β -tubulina. 10. Fator de alongação-1 α . 11. *Fusarium mangiferae*. 12. *Fusarium sterilihyphosum*. 13. Tipo de acasalamento. 14. Liseola. 15. *Gibberella fujikuroi*. 16. Cruzamento. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.44

CRISTIANO SOUZA LIMA

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES DE
Fusarium ENVOLVIDAS NA ETIOLOGIA DA MALFORMAÇÃO DA
MANGUEIRA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 22 de fevereiro de 2006

Prof. PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende	UFLA
Prof. Dr. Eduardo Alves	UFLA
Profª. Dra. Elaine Aparecida de Souza	UFLA
Prof. PhD. Marcos Paz Saraiva Câmara	UFRPE

Prof. PhD. Ludwig Heinrich Pfenning
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Aos meus pais, co-autores da minha existência,
Adelino Ferreira Lima Filho e Isabel de Souza Lima,

À Darci de Oliveira Cruz,
que com amor sempre me apoiou, principalmente nos
momentos mais difíceis,

Aos meus irmãos Adelino Ferreira Lima Neto e
Cristiane Souza Lima, e aos meus familiares e
amigos, pelo grande apoio moral,

DEDICO.

A todos que, com suas ações, fazem deste mundo um bom lugar para se viver,

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me inspira a buscar o inimaginável.

À Universidade Federal de Lavras, por meio do Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do doutorado.

À CAPES e ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos para a realização do doutorado sanduíche na *Kansas State University*, Manhattan, Kansas, EUA.

À FAPEMIG, por financiar parte do projeto de pesquisa que resultou, dentre outros produtos, nesta tese.

Ao professor PhD. Ludwig Heinrich Pfenning, pela orientação, amizade, confiança e apoio, permitindo uma excelente convivência que em muito contribuiu para a realização deste estudo.

À Sarah da Silva Costa-Guimarães que em muito contribuiu na execução desta tese, bem como ao Edson, do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos (DFP-UFLA), por suas contribuições e amizade.

À Dra. Magnólia Araújo Campos-Pfenning, pelas valiosas sugestões na execução dos experimentos e elaboração deste estudo.

Ao professor PhD. John F. Leslie, pela orientação e amizade, durante a minha estada na *Kansas State University* para a execução dos estudos de AFLP e compatibilidade sexual.

Ao professor PhD. Mário Lúcio Vilela Resende, pela orientação nos ensaios de patogenicidade.

Ao professor Dr. Luciano Vilela Paiva, pelo seqüenciamento das amostras de DNA utilizadas neste estudo e por me acolher em seu laboratório para realizar o preparo das amostras para o seqüenciamento.

Aos professores PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende, Dr. Eduardo Alves, Dra. Elaine Aparecida de Souza e PhD. Marcos Paz Saraiva Câmara, pelas valiosas sugestões e participação na banca examinadora.

A todos os amigos da turma de doutorado e da UFLA, que são pessoas especiais.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia.

À professora Dra. Maria Nenmaura Gomes Pessoa, por me proporcionar o primeiro contato com a ciência da Fitopatologia.

Aos colegas do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos e do Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA.

Ao colega Lucas Magalhães de Abreu, pelas sugestões na elaboração do texto e ao colega Pedro Martins Ribeiro Júnior, pelo auxílio no teste de patogenicidade.

Aos colegas PhD. Amgad Saleh, Amy Beyer e Brook van Scoyoc, pelas sugestões e auxílio na execução dos ensaios de AFLP e compatibilidade sexual durante o estágio na *Kansas State University*.

A todos que, de alguma forma, contribuíram nesta escalada.

BIOGRAFIA

Cristiano Souza Lima, filho de Adelino Ferreira Lima Filho e de Isabel de Souza Lima, nasceu no dia 30 de março de 1978, em Fortaleza, Ceará.

Em Fortaleza, iniciou o curso de graduação em agronomia pela Universidade Federal do Ceará, em março de 1995, graduando-se em janeiro de 2000.

Desenvolveu projetos na área de patologia de sementes, sob a orientação da professora Dra. Maria Nenmaura Gomes Pessoa com a qual publicou monografia, por ocasião da conclusão de seu curso de graduação.

Em 2000, iniciou o curso de mestrado em agronomia, área de concentração em fitopatologia, na Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, sob orientação do professor Dr. Paulo Estevão de Souza, concluindo-o em fevereiro de 2002, com a defesa de dissertação intitulada “Doenças fúngicas em plantas medicinais em Lavras, Minas Gerais”.

Em 2002, iniciou o curso de doutorado em agronomia, área de concentração em fitopatologia, na Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, sob orientação do professor PhD. Ludwig H. Pfenning. Realizou parte dos estudos de doutoramento, no Laboratório de Genética de Fungos, Kansas State University, Manhattan, Kansas, EUA, sob orientação do professor PhD. John F. Leslie. O doutorado foi concluído em fevereiro de 2006, com a defesa de tese.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.....	01
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	02
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	04
2.1 Importância e histórico da malformação da mangueira.....	04
2.2 Sintomatologia e epidemiologia.....	06
2.3 Etiologia da malformação da mangueira.....	08
2.4 <i>Mating types</i> e <i>mating populations</i> ou espécies biológicas.....	10
2.5 Conceitos de fertilidade e genes regulando a troca genética no complexo <i>Gibberella fujikuroi</i>	11
2.6 Influência da temperatura no ciclo sexual de <i>Gibberella</i>	14
2.7 O complexo <i>Gibberella fujikuroi</i> de <i>Fusarium</i>	14
2.8 Isolamento e preservação de espécies de <i>Fusarium</i>	17
2.9 Caracterização morfológica de espécies de <i>Fusarium</i>	17
2.10 Caracterização molecular de espécies de <i>Fusarium</i>	18
2.10.1 Identificação de espécies do complexo <i>Gibberella fujikuroi</i> por AFLP e outras técnicas de <i>fingerprinting</i>	19
2.10.2 Estudos filogenéticos com base em seqüências de DNA.....	21
3 BIBLIOGRAFIA CITADA.....	25
CAPÍTULO 2 Caracterização molecular do agente etiológico da malformação da mangueira.....	34
1 RESUMO.....	35
2 ABSTRACT.....	36
3 INTRODUÇÃO.....	37

4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 Isolamento e estudos morfológicos.....	40
4.2 Extração de DNA.....	47
4.2.1 Protocolo I.....	47
4.2.2 Protocolo II.....	48
4.3 Reações e análises de AFLP.....	49
4.4 Seqüenciamento de DNA e análises filogenéticas.....	51
5 RESULTADOS.....	53
5.1 Morfologia.....	53
5.2 Diversidade da população de <i>Fusarium</i> sp. do Brasil, determinada por AFLP.....	53
5.3 Avaliação da utilização de AFLP na comparação de espécies do complexo <i>Gibberella fujikuroi</i>	55
5.4 Análise das seqüências de DNA.....	57
5.5 Filogenia dos isolados obtidos de mangueiras no Brasil.....	60
6 DISCUSSÃO.....	65
7 CONCLUSÕES.....	70
8 BIBLIOGRAFIA CITADA.....	71
CAPÍTULO 3 Caracterização biológica e patogênica do agente etiológico da malformação da mangueira.....	76
1 RESUMO.....	77
2 ABSTRACT.....	78
3 INTRODUÇÃO.....	79
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	81
4.1 Isolamento e preservação das culturas.....	81
4.2 Caracterização morfológica.....	81
4.2.1 Fase anamórfica.....	81
4.2.2 Fase teleomórfica.....	82

4.3 Determinação de <i>mating types</i> por PCR.....	83
4.4 Indução da fase sexuada.....	83
4.5 Determinação da viabilidade de ascósporos.....	85
4.6 Fotodocumentação.....	85
4.7 Teste de patogenicidade de <i>Fusarium</i> spp. em mudas de mangueira.....	86
5 RESULTADOS.....	88
5.1 Caracterização morfológica.....	88
5.1.1 Fase anamórfica.....	88
5.1.2 Fase teleomórfica.....	91
5.2 Taxonomia.....	94
5.3 Determinação de <i>mating types</i> por PCR.....	97
5.4 Indução da fase sexuada.....	98
5.5 Viabilidade de ascósporos.....	98
5.6 Teste de patogenicidade de <i>Fusarium</i> spp. em mudas de mangueira.....	98
6 DISCUSSÃO.....	101
7 CONCLUSÕES.....	105
8 BIBLIOGRAFIA CITADA.....	106
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	110

RESUMO

LIMA, Cristiano Souza. **Caracterização biológica e molecular de espécies de *Fusarium* envolvidas na etiologia da malformação da mangueira.** 2006. 111 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.*

Com o objetivo de caracterizar biológica e molecularmente o agente etiológico da malformação floral e vegetativa da mangueira no Brasil, foram utilizadas as técnicas de AFLP, compatibilidade sexual, análise de seqüências gênicas, bem como o estudo da morfologia e patogenicidade. Na análise de AFLP, os padrões de bandas para a maioria dos isolados coletados no Brasil foram diferentes daqueles de *Fusarium mangiferae* e *Fusarium sterilihyphosum*. O dendrograma gerado na análise de AFLP, utilizando o coeficiente de Dice, apresentou *Fusarium* sp. do Brasil em um grupo, enquanto que os outros grupos foram de isolados de *F. sterilihyphosum* do Brasil e da África do Sul, e de isolados de *F. mangiferae* da África do Sul, Egito, EUA e Índia, respectivamente. *Fusarium* sp. do Brasil foi comparado à 24 espécies do complexo *Gibberella fujikuroi* (CGF) por meio de AFLPs, comportando-se como uma espécie única. O dendrograma de UPGMA nesta análise foi muito semelhante à genealogia de genes do CGF, com três clados filogeográficos, americano, africano e asiático. Nos ensaios de compatibilidade sexual, isolados de *Fusarium* sp. do Brasil foram compatíveis entre si, mas não com *F. sterilihyphosum* e nem *F. mangiferae*. Foram observados peritécios típicos de *Gibberella* exsudando ascósporos nos cruzamentos de *Fusarium* sp. do Brasil. Análises de fragmentos de seqüências de β -tubulina e fator de alongação-1a foram utilizadas para determinar as relações filogenéticas entre *Fusarium* sp. do Brasil e espécies do CGF. Na análise de máxima parcimônia, *Fusarium* sp. do Brasil agrupou no clado americano, mas, como sendo uma espécie distinta próxima a *F. sterilihyphosum*. Na caracterização morfológica, observou-se a presença de hifa estéril espiralada em alguns isolados de *Fusarium* sp. do Brasil, o mesmo ocorrendo para *F. sterilihyphosum*, sendo difícil separá-las com base apenas em morfologia. Entretanto, podem ser facilmente separadas por padrões de AFLP, fertilidade e análise de seqüências gênicas. *Fusarium mangiferae* não foi detectado nas amostras com malformação obtidas no Brasil. Isolados de *Fusarium* sp. do Brasil e *F. sterilihyphosum* induziram sintomas típicos de malformação quando inoculados em mudas de mangueira. Uma nova espécie de *Gibberella*, associada à malformação da mangueira no Brasil, será descrita.

*Comitê Orientador: Ludwig H. Pfenning (Orientador), John F. Leslie – *Kansas State University* e Mário Lúcio Vilela de Resende – *UFLA* (Co-orientadores)

ABSTRACT

LIMA, Cristiano Souza. **Biological and molecular characterization of *Fusarium* species involved in the etiology of mango malformation.** 2006. 111 p. Thesis (Doctorate in Plant Pathology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

In order to characterize biologically and molecularly the etiological agent of mango floral and vegetative malformation in Brazil AFLPs, sexual compatibility, sequence analysis, morphological and pathogenicity assays were used. The AFLP patterns of the majority of isolates collected in Brazil were different from *Fusarium mangiferae* and *Fusarium sterilihyphosum*, two previously described *Fusarium* species associated with mango malformation. The cluster analysis of AFLP data using Dice coefficient produced a network where *Fusarium* sp. from Brazil were in one group apart from two other groups represented by isolates of *F. sterilihyphosum* from Brazil and South Africa, and by isolates of *F. mangiferae* from Egypt, India, South Africa and USA, respectively. *Fusarium* sp. from Brazil was compared with 24 species of the *Gibberella fujikuroi* complex (GFC) using AFLP data and showed to be a distinctive species. The UPGMA network generated from the AFLP data showed a similar topology to the gene genealogies of the GFC with three phylogeographic clades, the american, african and asian. Isolates of *Fusarium* sp. from Brazil were sexually compatible with each other but not with *F. sterilihyphosum*, and neither *F. mangiferae*. The crosses produced by isolates of *Fusarium* sp. formed perithecia with oozing ascospores typical of *Gibberella*. Sequence analyses of portions of β -tubulin and EF-1 α were used to elucidate the phylogenetic relationships between *Fusarium* sp. from Brazil and the species of the GFC. Maximum parsimony analyses grouped this *Fusarium* sp. in the American clade, but within a distinct subgroup which indicates a different species close related to *F. sterilihyphosum*. In the morphological comparisons some isolates of *Fusarium* sp. from Brazil produced the coiled sterile hyphae and the same occurred with *F. sterilihyphosum*. These species are not easily separated when only morphological characters are used, but can be distinguished through AFLP patterns, fertility and sequence analyses. None of the studied isolates from Brazil were identified as *F. mangiferae*. Isolates of *Fusarium* sp. from Brazil and *F. sterilihyphosum* induced typical malformation symptoms in inoculated mango plantlets. A new species of *Gibberella*, associated with mango malformation in Brazil, will be described.

*Advising Committee: Ludwig H. Pfenning (Adviser), John F. Leslie – Kansas State University and Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Co-advisers)

CAPÍTULO 1

MALFORMAÇÃO DA MANGUEIRA: novidades sobre a etiologia

1 INTRODUÇÃO GERAL

A malformação floral e vegetativa da mangueira causa sério impacto na produção de frutos, principalmente nas áreas de clima semi-árido onde a severidade da doença é maior (Tavarez & Lima, 1997; Ploetz et al., 2002).

Estudos recentes tem mostrado que a malformação é causada por espécies de fungos do gênero *Fusarium* Link. Dentre elas, *Fusarium mangiferae* Britz, Wingfield & Marasas é apontado como o principal agente etiológico da doença em vários países produtores de manga, enquanto que *Fusarium sterilihyphosum* Britz, Marasas & Wingfield está restrito à África do Sul (Freeman et al., 1999; Britiz et al., 2002).

Fusarium mangiferae e *F. sterilihyphosum* foram identificados no passa do como *Fusarium subglutinans sensu lato*. Porém, *F. subglutinans sensu lato* corresponde a várias espécies filogenéticas da Seção *Liseola*. Esta subdivisão foi possível após o uso de genealogias de genes para a reconstrução da filogenia desse grupo de fungos (O'Donnell et al., 1998, 2000).

No Brasil, os estudos já realizados sobre a etiologia da malformação identificaram o agente etiológico da malformação como sendo *F. subglutinans sensu lato*. Em estudos realizados na Flórida, EUA, onde foram empregados 3 isolados de *Fusarium* obtidos de malformação da mangueira no Brasil, foi mostrado que os isolados do Brasil eram geneticamente diferentes dos isolados obtidos de outros países, além de apresentarem a estrutura morfológica denominada de hifa estéril espiralada, típica de *F. sterilihyphosum* (Terao et al., 2001; Zheng & Ploetz, 2002).

Em virtude da escassez de informações sobre a diversidade populacional, filogenia, patogenicidade e a importância do estabelecimento de isolados testadores para a indução da fase sexuada do fungo em laboratório para

estudos genéticos e para a identificação de isolados do campo, objetivou-se, neste trabalho: i. montar uma coleção de isolados de *Fusarium* spp. associados à malformação floral e vegetativa da mangueira, representativa das diversas regiões produtoras do Brasil; ii. entender a estrutura populacional de espécies de *Fusarium* associadas à malformação da mangueira no Brasil, por meio da técnica de AFLP; iii. reconstruir a filogenia para as espécies de *Fusarium* associadas à malformação da mangueira no Brasil, baseado em seqüências dos genes *fator de alongação-1 α* e *β -tubulina*; iv. identificar, por PCR, os *mating types* existentes dentro da coleção de isolados obtida; v. induzir a fase sexuada do fungo por cruzamentos em laboratório e caracterizar morfológicamente as fases anamórfica e teleomórfica e vi. testar a patogenicidade de isolados selecionados em mudas de mangueira da cultivar ‘Tommy Atkins’.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância e histórico da malformação da mangueira

A mangueira, *Mangifera indica* L., é uma das principais frutíferas tropicais. Seu fruto é bastante apreciado em vários países do mundo, sendo o Brasil um dos principais países exportadores, com 111.181 toneladas exportadas em 2004 (FAOstat, 2006). Com origem nos centros indiano e indo-malaio, a mangueira pertence à família *Anacardiaceae*, a qual apresenta outras espécies, além de *M. indica*, que possuem frutos comestíveis, como *Mangifera altissima* Blanco, *Mangifera caesia* Jack, *Mangifera lagenifera* Griffith, *Mangifera macrocarpa* Blume, *Mangifera odorata* Griffith e *Mangifera sylvatica* Roxb.

A espécie *M. indica*, que deu origem às variedades cultivadas atualmente, como por exemplo ‘Tommy Atkins’, possui duas raças, a indiana, com sementes monoembriônicas e frutos de coloração rosa a vermelho intenso e a filipínica ou indochinesa, com sementes poliembriônicas e frutos alongados e casca verde-amarelada, quando maduros. Mangueiras da raça filipínica foram introduzidas no Brasil no século XVI. No entanto, somente em 1931 foi introduzida no país a primeira variedade da raça indiana, a ‘Haden’, desenvolvida na Flórida, EUA. Porém, esta variedade só começou a ser utilizada comercialmente na década de 1960. A variedade ‘Tommy Atkins’, por sua vez, foi introduzida no Brasil em 1970, tendo, a partir de 1980, sido amplamente difundida em todo o país, juntamente com a variedade ‘Keitt’, para a produção com fins de exportação (Ferreira et al., 2002).

A mangueira é afetada por várias pragas, destacando-se a mosca-das-frutas (*Anastrepha* spp.), a broca-da-mangueira (*Hypocryphalus mangiferae* Stebbing), os ácaros (*Eriophyes mangiferae* Sayed, considerado disseminador da malformação), as lagartas (*Megalopyge lanata* Stolf-Cramer) e as cochonilhas

(*Aulacaspis tubercularis* Newstedead, entre outras). Com relação às doenças da mangueira, as mais importantes são, malformação floral (MF) e vegetativa (MV) (*Fusarium* spp.), antracnose (*Colletotrichum gloesporioides* Penz.), oídio (*Oidium mangiferae* Bert), seca-da-mangueira (*Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted), morte-descendente-da-mangueira (*Lasiodiplodia theobromae* Pat.), verrugose (*Elsinoe mangiferae* Bit & Jenkis) e mancha-angular [*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferae indicae* (Patel, Moniz & Kulkarni) Robbs, Ribeiro & Kimura] (Cunha et al., 2000).

A malformação floral e vegetativa constitui fator preocupante na cultura da mangueira, podendo causar perdas de até 86%, na Índia (Kumar et al., 1993). Esta doença tem sério impacto na propagação de plantas e na produção comercial de frutos, devido aos danos causados nas panículas e nas gemas vegetativas, especialmente em regiões áridas (Tavares & Lima, 1997; Ploetz, 2001). Plântulas afetadas pela malformação não podem ser utilizadas como porta enxerto e consideráveis perdas são observadas em viveiros mal conduzidos (Ploetz, 2001).

A ocorrência da malformação da mangueira foi constatada pela primeira vez no distrito de Bihar, Índia, em 1891 (Kumar et al., 1993). Posteriormente, foi relatada na maior parte dos países da África (África do Sul, Egito, Sudão, Suazilândia e Uganda), das Américas (Brasil, EUA e México) e da Ásia (Israel, Malásia e Paquistão), estando presente em praticamente todos os lugares onde a mangueira é cultivada (Ploetz, 1994; Anjos et al., 1998; Freeman et al., 1999; Noriega-Cantú et al., 1999; Steenkamp et al., 2000a; Ploetz, 2001; Terao et al., 2001; Britz et al., 2002). No Brasil, foi relatada nos estados da Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo e no Distrito Federal (Santos et al., 1983; Cunha et al., 2000; Lima et al., 2004).

2.2 Sintomatologia e epidemiologia

O termo “malformação” refere-se ao crescimento anormal de inflorescências e ramos vegetativos. Normalmente, a mangueira produz flores andrógenas e hermafroditas em sua inflorescência, mas, quando afetada pela malformação floral, ocorre aumento da proporção e tamanho de flores andrógenas em detrimento das hermafroditas. As panículas infectadas são transformadas numa massa compacta de flores estéreis com brácteas grandes e eixos, principais e secundários, curtos, espessos e anormalmente ramificados (Figura 3.1, capítulo 3). No caso da malformação vegetativa, os sintomas são caracterizados por ramos apicais e laterais produzindo brotos malformados com internódios curtos e folhas pequenas e recurvadas (Figura 3.1, capítulo 3). Os sintomas de malformação vegetativa aparecem principalmente em plantas jovens, enquanto que os de malformação floral são observados com maior frequência em plantas adultas, na fase de florescimento. Após a florada, as inflorescências com malformação permanecem na planta como massas enegrecidas e podem servir como fonte de inóculo para novas infecções (Kumar et al., 1993; Noriega-Cantú et al., 1999; Cunha et al., 2000; Ploetz, 2001).

No Egito, em 1998, nas regiões de El Giza, Ismailia e Sharkaia, a incidência de malformação variou de 20% a 100%, enquanto que a severidade variou de 5% a 60% (Ploetz et al., 2002).

No México, em estudos comparativos de três sistemas de manejo (manejo integrado, manejo com uso de alta tecnologia e manejo com uso de baixa tecnologia) em pomares de mangueira da região de Guerrero, observou-se que o manejo integrado, com a remoção e queima de ramos apresentando malformação e aplicação de fungicidas protetores e acaricidas, foi o método que mais contribuiu para a redução do progresso da malformação em um período de avaliação de 2 anos, com aumento no rendimento por árvore de 51%, comparado com alta tecnologia e 71%, comparado com baixa tecnologia. Foi observado

também que os fatores ambientais influenciaram a incidência da doença, especialmente por um provável efeito na dispersão do inóculo. Utilizando armadilhas na altura das copas de mangueiras constatou-se que a incidência de malformação correlacionou-se positivamente com a quantidade de macroconídios de *Fusarium* capturados e a velocidade do vento, enquanto que houve correlação negativa com a temperatura máxima média diária, temperatura média por hora e número médio de horas com umidade relativa acima de 60%. De modo geral, concluiu-se que a maior densidade de esporos ocorreu durante a estação chuvosa no período da manhã, quando as condições ambientais foram velocidade do vento (1,5 m/s), umidade relativa (92% a 94%) e temperatura (16°C a 17,5°C) (Noriega-Cantú et al., 1999).

Resultados semelhantes a estes foram também observados em estudos realizados na Índia, onde a maior densidade de esporos de *Fusarium* foi observada nas condições de temperatura variando entre 8°C e 27°C e umidade de 85% (Kumar et al., 1993; Noriega-Cantú et al., 1999). Por outro lado, de acordo com Ploetz (2001), os sintomas de malformação são mais severos em regiões áridas, como no Egito.

Baseando-se nos estudos epidemiológicos realizados na região de Guerrero, México, foi sugerido um provável ciclo para a doença na região estudada: i) após a coleta de frutos, entre junho e novembro, ocorre a emissão de brotos novos que são extensivamente colonizados por *Fusarium*, no meristema apical; ii) os primeiros sintomas podem ser visíveis entre outubro e novembro, em meristemas novos, ocorrendo nesta fase o pico de incidência da malformação floral, segundo os autores o período de incubação do fungo é de 2 a 5 meses; iii) nos meses de dezembro e janeiro ocorre a florada da mangueira e, concomitantemente, um novo pico de malformação floral, principalmente em janeiro; iv) entre janeiro e fevereiro, dá-se o segundo fluxo vegetativo e o terceiro pico de incidência concentra-se entre fevereiro e março; v) as

inflorescências e os ramos vegetativos malformados secam até que condições favoráveis, como alta umidade favorecida pelas chuvas e maior velocidade dos ventos, promovem a dispersão do fungo para meristemas novos, produzidos após a colheita dos frutos, iniciando um novo ciclo de infecção (Noriega-Cantú et al., 1999).

No Brasil, em pomares comerciais da região do sub-médio São Francisco, no ano de 1996, a malformação foi constatada em aproximadamente 30% das áreas, com incidência de até 100% em determinados pomares, enquanto que, nos pomares do estado da Bahia, a incidência de malformação floral foi de 54% em 1998 (Tavares & Lima, 1997; Sao Jose et al., 2000).

2.3 Etiologia da malformação da mangueira

Embora a malformação da mangueira tenha sido constatada há mais de um século, a sua etiologia ainda não foi completamente esclarecida (Freeman et al., 1999). O ácaro dos brotos da manga (*E. mangiferae*) e os desbalanços hormonais foram apontados como estando possivelmente envolvidos na dispersão e desenvolvimento da doença. Entretanto, o agente etiológico é uma ou várias espécies com características morfológicas de *F. subglutinans* (Wollenweber & Reinking) Nelson, Toussoun & Marasas, como definido por Nelson e colaboradores em 1983, aqui denominado de *F. subglutinans sensu lato* (Ploetz, 2001; Nelson et al., 1983). *Fusarium subglutinans sensu lato* caracteriza-se por apresentar microconídios unicelulares em abundância, produzidos somente em falsas cabeças na extremidade de conidióforos, ramificados ou não, presença de polifálides e ausência de clamidósporos. Este fungo, anteriormente considerado uma variedade de *Fusarium moniliforme* Sheldon, foi elevado ao nível de espécie por Nelson et al. (1983), com base no tipo de conidiogênese, sempre em falsas cabeças e nunca em cadeias de microconídios, como ocorre em *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg.

Os postulados de Koch foram completados, pela primeira vez, para esta doença em 1966, utilizando-se isolados identificados como *F. subglutinans sensu lato* (Summanwar et al., 1966). No entanto, outros fatores foram, e ainda estão sendo, considerados como causas da malformação: vírus, ácaros, problemas nutricionais, distúrbios fisiológicos ou hormonais, fitoplasmas e fatores desconhecidos (Ploetz, 2001).

A associação de *F. subglutinans sensu lato* com a malformação foi corroborada em vários países, como Egito, Israel, África do Sul e Estados Unidos, entre outros (Ploetz, 2001) e também no Brasil (Anjos et al., 1998; Terao et al., 2001).

Em estudos realizados em Israel, em 1999, com isolados de *F. mangiferae* (sin. *F. suglutinans sensu lato*) transformados com o gene que codifica a proteína β -glucuronidase, foi possível acompanhar a colonização dos tecidos de inflorescências e gemas que, depois, desenvolveram os sintomas típicos de malformação floral e vegetativa (Freeman et al., 1999). *Fusarium mangiferae* é uma espécie filogenética com características de *F. subglutinans sensu lato*, que foi descrita em 2002, com base em estudos de seqüências parciais dos genes que codificam a histona-H3 e a β -tubulina. A partir destes estudos, foi também descrita a espécie filogenética *F. sterilihyphosum* (Steenkamp et al., 2000a; Britz et al., 2002).

Em estudos realizados na África do Sul com isolados de *Fusarium* sp. da Malásia, Britz et al. (2002) observaram que os mesmos pertenciam a um taxon diferente de *F. mangiferae* e *F. sterilihyphosum*. Já em outro estudo, *Fusarium proliferatum* foi encontrado associado à malformação na Malásia, além de *F. mangiferae* (Leslie, 1995; Britz et al., 2002).

Fusarium decemcellulare Brick, *Fusarium oxysporum* (Schlechtendahl) Snyder & Hansen e *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg já foram relatados em associação com a malformação da mangueira, porém, os postulados

de Koch não foram satisfatoriamente completados para nenhuma destas espécies (Santos et al., 1983; Leslie, 1995; Noriega-Cantú et al., 1999; Ploetz, 2001). Relatos de *F. moniliforme*, *Fusarium sacchari* (E. J. Butler) W. Gams e *F. subglutinans sensu lato* devem ser analisados com precaução, pois, nos últimos anos, houve mudanças na nomenclatura de espécies do gênero *Fusarium*, priorizando uma classificação filogenética, ou seja, que reflita a história evolucionária do gênero (Leslie, 1995; O'Donnell et al., 1998, 2000; Summerell et al., 2003).

2.4 Mating types e mating populations ou espécies biológicas

Para alcançar um rearranjo genético em um ciclo sexual, eucariotos passam pelos processos de acasalamento (*mating*) e meiose. Em ascomicetos heterotálicos, diferentes tipos de acasalamento (*mating types*) garantem que o acasalamento só é possível entre dois indivíduos de tipos opostos. Desse modo, as *mating populations* (MP) são um meio artificial de limitar as dificuldades que surgem na identificação, quando distintas entidades biológicas são morfologicamente muito similares, como é o caso no gênero *Fusarium* da seção *Liseola*. Estas distinções podem ser muito importantes, mesmo se a recombinação sexual é rara em condições de campo, porque elas podem prover úteis diagnósticos *in vitro* e um meio de avaliar o nível de troca genética que pode ocorrer (Leslie, 1995; Steenkamp et al., 2000b; Leslie et al., 2001).

Primers de PCR (reação em cadeia da polimerase) foram desenvolvidos a partir da clonagem e seqüenciamento da região MAT de *Neurospora crassa* Shear & B.O. Dodge para facilitar a determinação de *mating types* em espécies do complexo *Gibberella fujikuroi*, evitando-se o trabalho laborioso de numerosos cruzamentos em laboratório, testando várias condições de temperatura, luminosidade, nutrição e de receptividade do micélio. Neste caso, o pareamento é realizado somente entre *mating types* opostos, reduzindo pela

metade o número de cruzamentos a serem realizados (Covert et al., 1999; Kerényi et al., 1999, 2004; Steenkamp et al., 2000b).

Mating populations são espécies biológicas definidas pela capacidade de produzirem cruzamentos férteis entre membros de uma mesma MP e esterilidade sempre que são cruzados membros de duas MPs diferentes (Leslie et al., 2001). Estas podem também possuir padrões distintos de isoenzimas e AFLP (polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados) e seqüências nucleotídicas distintas para os genes *28S* e *mtSSU rDNA*, *calmodulina*, *histona-H3*, *fator de alongação-1 α* e *β -tubulina*, podendo diferir na sua habilidade geral em sintetizar metabólitos secundários, e na sua sensibilidade a agentes antifúngicos, tais como benomil e higromicina B (O'Donnell et al., 1998, 2000; Zeller et al., 2003). Dentro de uma MP, os indivíduos podem ser distinguidos com base na sua habilidade em formar heterocário entre si, ou seja, teoricamente, cada indivíduo gerado na reprodução sexuada, em fungos heterotáticos, pode pertencer a um grupo de compatibilidade vegetativa (VCG) diferente. Esta característica poligênica é utilizada no estudo da estrutura de algumas populações de fungos. Em alguns casos, isolados patogênicos parecem ser clones limitados a uma cultura e ou região geográfica. Mais comumente, entretanto, ocorre significativa variabilidade genética, o que indica a ocorrência de recombinação no campo (Leslie, 1995; Huss et al., 1996; Carlile et al., 2001).

2.5 Conceitos de fertilidade e genes regulando a troca genética no complexo *Gibberella fujikuroi*

A maior parte dos trabalhos de compatibilidade sexual em *Fusarium* do complexo *G. fujikuroi* utiliza a metodologia de cruzamento estabelecida por Klittich e Leslie (1988), com algumas variações, em que um meio de cultura à base de cenoura e ágar é utilizado para o crescimento dos isolados a serem cruzados. O cruzamento é realizado pela adição de suspensão de conídios do

parental masculino sobre a cultura representativa do parental feminino (Leslie, 1995; Covert et al., 1999; Britz et al., 2002). O papel dos isolados é invertido em cruzamentos recíprocos, para avaliar a fertilidade de ambos os parentais. Os cruzamentos são considerados férteis quando membros da mesma MP, mas de *mating types* opostos, *MAT-1* e *MAT-2*, se cruzam, e ascósporos podem ser observados exsudando de peritécios. Os isolados férteis somente como parental masculino são designados como parental feminino estéril, enquanto que isolados que servem como parental masculino ou feminino são designados hermafroditas. A viabilidade dos ascósporos é determinada riscando-se uma porção do cirro de ascósporos em 2% de ágar-água e avaliando-se a percentagem de germinação determinada após 24 horas (Kuhlman, 1982; Klaasen & Nelson, 1996; Klittich et al., 1997; Britz et al., 1999).

As MPs conhecidas do complexo *G. fujikuroi* são todas heterotáticas, com um mecanismo básico de um *locus MAT* e dois idiomorfos, *MAT-1* ou *MAT-2*, ou seja, seqüências não relacionadas presentes no mesmo *locus* do genoma. No complexo *G. fujikuroi*, o *MAT-2* contém 1 gene (*MAT-2-1*, com aproximadamente 3.824 pb = 223 aa), enquanto que o *MAT-1* contém 3 genes (*MAT-1-1*, com 382 aa; *MAT-1-2*, com 433 aa e *MAT-1-3*, com 174 aa), totalizando 4.605 pb. Possivelmente, a proteína codificada pela ORF (*open read frame*) *MAT-2-1* se liga em seqüências de DNA as quais possuem a região *HMG-box* (*high mobility group-box*), tendo papel na formação do ascósporo e determinação da especificidade no acasalamento. Já no idiomorfo *MAT-1*, o gene *MAT-1-1* possui similaridade com a proteína $\alpha 1$ de *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen; o gene *MAT-1-2* tem certa similaridade com a proteína SMR1 de *Podospora anserina* (Rabenh.) Niessl e a proteína A2 de *N. crassa*, e o gene *MAT-1-3* possui alguma similaridade com a proteína SMR2 de *P. anserina* e a proteína A3. As proteínas A2 e A3 possuem função não definida, mas, acredita-se que estão envolvidas na regulação do desenvolvimento sexual

após a fertilização (Glass & Kuldau, 1992; Leslie, 1995; Nelson, 1996; Turgeon, 1998; Kerényi et al., 1999; Carlile et al., 2001).

Este sistema é comum em muitas espécies de ascomicetos, sendo *Cochliobolus heterostrophus* (Drechsler) Drechsler e *N. crassa* os exemplos mais conhecidos. Além do heterotalismo do complexo *G. fujikuroi*, outros sistemas de acasalamento existem em Ascomicetos. Uma espécie é considerada homotálica quando uma cultura monospórica que dispõe de somente um núcleo é capaz de produzir esporos sexuados por autofecundação, ex. *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter, *Gibberella zea* Schwein (Petch) e *Haematonectria haematococca* (Berkeley & Broome) Samuels & Nirenberg. No caso do heterotalismo desbalanceado de *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spald. & H. Schrenk, um isolado pode se comportar como homotálico e heterotálico, simultaneamente. Os fungos pseudomotálicos possuem todos os mecanismos genéticos para funcionarem como heterotálicos, mas desenvolveram mecanismos, como o controle espacial da meiose e bloqueio à recombinação, os quais permitem a eles funcionarem como homotálicos (Klittich & Leslie, 1988; Sutton, 1992; Leslie, 1995; Carlile et al., 2001).

A importância do estabelecimento de testadores para a indução da reprodução sexuada em laboratório é de grande valia na geração posterior de uma base de conhecimento sobre a genética da espécie fúngica e, em consequência, para o desenvolvimento de técnicas avançadas, tanto para a detecção do patógeno antes do plantio quanto para estudos de resistência e melhoramento genético. Além disso, o uso de testadores para a identificação de isolados do campo consiste em um método prático e que não requer altos investimentos e nem alta tecnologia, como, por exemplo, o sequenciamento de genes. A técnica de cruzamento com testadores pode ser usada em laboratórios básicos de fitopatologia e microbiologia. Testadores são isolados que apresentam alta fertilidade como fêmea, dos dois *mating types* (*MAT-1* e *MAT-*

2), e que representam uma espécie biológica de *Gibberella-Fusarium* do complexo *G. fujikuroi* (Leslie, 1995; Jurgenson et al., 2002; Summerell et al., 2003).

2.6 Influência da temperatura no ciclo sexual de *Gibberella*

A temperatura parece ter papel fundamental na reprodução sexuada dentro do complexo *G. fujikuroi*. Isso foi observado para cinco espécies de *Gibberella* Sacc., tendo, em quatro dessas, temperaturas menores que 25°C tido influência positiva na frequência de formação de peritécios ou na liberação de ascósporos. *Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell possui um ótimo de temperatura para a reprodução sexual entre 15°C e 20°C, não tendo sido produzidos peritécios viáveis a 25°C (Covert et al., 1999). Em *G. fujikuroi* (Sawada) Ito, maior quantidade de peritécios é formada a 20°C do que em 25°C, porém, nenhum é produzido a 15°C ou 30°C (Hsieh et al., 1977). Em *Gibberella pulicaris* (Fr.) Sacc., o peritécio não produz ascósporos se exposto a um ciclo alternado de 12 horas a 20°C e 12 hora a 25°C, somente se for mudado para 15°C (Desjardins & Beremand, 1987). Em *G. zeae*, a liberação de ascósporos ocorre na condição de 17°C, no entanto, a temperatura ótima para a formação de peritécios é de 28,5°C (Tschanz et al., 1976). Já em *Gibberella baccata* (Wallr.) Sacc. ocorre boa produção de peritécios a temperaturas entre 20°C e 25°C (Afanide et al., 1976).

2.7 O complexo *Gibberella fujikuroi* de *Fusarium*

Em vários estudos independentes realizados entre 1998 e 2005, foram descritas 35 espécies filogenéticas pertencentes ao complexo *G. fujikuroi* (CGF) de *Fusarium*. Além das espécies descritas, foram detectadas mais 19 espécies filogenéticas em vários hospedeiros, exceto em *Mangifera* spp. O CGF se sobrepõe à Seção *Liseola* do gênero *Fusarium* e é considerado um grupo

monofilético. A Seção *Liseola* consiste num agrupamento artificial baseado em morfologia que exclui espécies possuidoras de clamidósporos, enquanto que o CGF é um grupo filogenético, no qual estão presentes 11 espécies produtoras de clamidósporos que morfologicamente não podem pertencer à Seção *Liseola* (Nirenberg et al., 1998; Nirenberg & O'Donnell, 1998; O'Donnell et al., 1998, 2000; Aoki et al., 2001; Marasas et al., 2001; Britz et al., 2002; Zeller et al., 2003; Geiser et al., 2005; Leslie et al., 2005).

As espécies do CGF representam o melhor exemplo da concordância entre os conceitos de espécie biológica e espécies filogenéticas baseadas em filogenia de seqüências de genes (O'Donnell & Cigelnik, 1997; O'Donnell et al., 1998, 2000). As seqüências dos genes *28S rDNA*, *mtSSU rDNA*, *calmodulina*, *histona-H3*, *fator de alongação-1 α* e *β -tubulina* são comprovadamente úteis para a reconstrução da filogenia do CGF e também fornecem informações sobre a estrutura populacional em nível subespecífico, o que pode ser observado pela variação em sítios ao longo das seqüências de cada gene. O'Donnell et al. (1988) levantaram hipótese sobre a filogeografia do CGF, identificando três grupos de espécies com provável origem nos continentes africano, americano e asiático. Adicionalmente, determinadas regiões destes genes podem, no futuro, ser utilizadas na síntese de *primers* específicos para a detecção de patógenos pertencentes ao CGF antes da exteriorização dos sintomas da doença. Desse modo, evita-se o transporte dos patógenos para novas áreas, visto que acredita-se que o período de incubação, no caso específico da malformação da mangueira, pode se estender por meses, até a exteriorização dos sintomas da doença (Noriega-Cantú et al., 1999; Ploetz, 2001; Zheng & Ploetz, 2002).

Onze espécies biológicas ou *mating populations* (MP A até MP J, a espécie biológica *Gibberella indica* B. Rai & R.S. Upadhyay ainda não foi adicionada a esta série) que correspondem a onze espécies filogenéticas de *Gibberella-Fusarium* estão inseridas dentro do CGF (Leslie, 1995; O'Donnell et

al., 1998, 2000; Nirenberg & O'Donnell, 1998; Samuels et al., 2001; Zeller et al., 2003; Leslie et al., 2005; Lepoint et al., 2005). De acordo com O'Donnell et al. (1998), a grande distância genética entre as espécies biológicas do CGF é um indicio de que estas estão reprodutivamente isoladas por muito tempo.

As espécies do CGF são responsáveis pela produção de vários metabólitos secundários, tais como as micotoxinas fumonisinas, moniliformina e beauvericina (Leslie, 1995; Nirenberg & O'Donnell, 1998; Desjardins, 2003) e por causarem doenças, como o estiolamento (*bakanae*), em plantas de arroz induzido pelo fitormônio giberelina produzido por *Fusarium fujikuroi* Nirenberg MP C; gomose do abacaxizeiro, causada por *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell; podridão de colmo e de espigas de milho, causadas principalmente por *F. verticillioides* MP A e *F. subglutinans* MP E, cancro em *Pinus* spp. causado por *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell MP H, podridão da cana-de-açúcar, causada por *F. sacchari* MP B e, a malformação da mangueira, *M. indica*, que pode ser causada por espécies de *Fusarium* com características de *F. subglutinans sensu lato* (Freeman et al., 1999, Britz et al., 2002).

Dentre as espécies do CGF estritamente anamórficas, ou seja, aquelas que não possuem a fase teleomórfica descrita, encontra-se *F. mangiferae* e *F. sterilihyphosum*, que estão associadas à malformação da mangueira, com a etiologia da malformação floral e vegetativa da mangueira já confirmada para a primeira espécie. Estas só podem ser separadas com segurança com base na comparação de seqüências gênicas ou padrões de AFLP, pois o marcador morfológico que as separa, a hifa estéril espiralada, não é constante em *F. sterilihyphosum*. No entanto, suspeita-se que esta doença seja, na verdade, causada por diferentes espécies filogenéticas e ou biológicas de *Fusarium* (Freeman et al., 1999, Britz et al., 2002; Steenkamp et al., 2000a; Zeller et al., 2003; Lima et al., 2005).

2.8 Isolamento e preservação de espécies de *Fusarium*

O isolamento, a primeira etapa na caracterização de *Fusarium* spp., deve ser realizado em meio de cultura contendo antibiótico para evitar a contaminação com bactérias (Summerell et al., 2003). Geralmente utiliza-se sulfato de estreptomicina e kanamicina para inibir o crescimento, tanto das bactérias gram-negativas como das gram-positivas (Nelson et al., 1983). Deve-se transferir o isolado para um meio apropriado, como o SNA (ágar pobre em nutrientes sintéticos), para que o mesmo retome o crescimento normal antes de fazer o isolamento monospórico. No caso de se possuir um micromanipulador adequado, pode-se fazer o isolamento monospórico diretamente a partir do crescimento fúngico sobre o substrato original. A seguir, o isolado deve ser preservado, o mais breve, em uma coleção de culturas de referência que utilizará métodos de preservação que garantirão a manutenção das características originais do fungo por tempo prolongado. Atualmente, o método mais utilizado para a preservação de culturas puras de *Fusarium* é o de criopreservação a -70°C. No entanto, outros métodos podem ser utilizados com eficiência. Dentre eles, estão a preservação em solo autoclavado, Castellani, sílica gel e liofilização (Castellani, 1939, 1967; Boesewinkel, 1976; Azevedo, 1991; Smith & Onions, 1994).

2.9 Caracterização morfológica de espécies de *Fusarium*

No início de todo estudo, deve ser feita a caracterização morfológica dos isolados de *Fusarium* a serem utilizados. Os principais manuais de identificação de *Fusarium* são baseados em caracteres morfológicos e podem ser utilizados para a identificação das espécies mais comuns (Gerlach & Nirenberg, 1982; Nelson et al., 1983). Numa caracterização morfológica de *Fusarium*, os meios PDA (ágar, dextrose e batata) e OA (ágar e aveia), são utilizados para avaliar a

taxa de crescimento das colônias, pigmentação da colônia e formação do micélio aéreo. Em SNA, com pedaço de papel de filtro, são observadas as características micromorfológicas, como a presença ou não e cor de esporodóquios; frequência, tamanho, formato e origem de microconídios e macroconídios; tipos de fiálides, presença ou não de clamidósporos, presença ou não de microconídios em falsas cabeças e presença ou não de hifa estéril espiralada. As características do isolado devem ser registradas em uma ficha, a qual será utilizada futuramente ao se depositar o mesmo em uma coleção de culturas (Nelson et al., 1983; Nirenberg & O'Donnell, 1998; Pfenning & Silva, 1999; Summerell et al., 2003).

2.10 Caracterização molecular de espécies de *Fusarium*

O conceito utilizado para definir a maioria das espécies fúngicas baseia-se em caracteres fenotípicos, embora haja concordância geral de que o conceito de espécie biológica (CEB) é apropriado para fungos e deve ser aplicado quando possível. Infelizmente, muitos fungos não podem ser cultivados e mesmo poucos podem ter a compatibilidade sexual induzida em laboratório. Porém, com a análise cladística e um número quase ilimitado de caracteres conseguidos pelo seqüenciamento de DNA amplificado por PCR, surgiu uma alternativa ao CEB que é o conceito de espécie filogenética (CEF); no caso do CGF, os dois conceitos podem ser combinados e, sempre que possível, acompanhados de caracteres fenotípicos que diferenciem espécies (Taylor et al., 1999; Taylor et al., 2000; Steenkamp et al., 2002).

Dois pontos importantes a serem considerados são: i) das espécies do CGF, somente 10 podem ser identificadas pelo CEB e ii) a facilidade com que fungos mitospóricos e meiospóricos podem ser integrados em uma árvore filogenética utilizando o CEF (Taylor et al., 1999). No entanto, a identificação pelo CEB deve ser priorizada sempre que possível (Leslie, 1995; Leslie et al., 2001; Summerell et al., 2003).

A caracterização molecular de fungos pode ser realizada pelo uso de técnicas de *fingerprinting*, ou analisando-se seqüências nucleotídicas.

2.10.1 Identificação de espécies do complexo *Gibberella fujikuroi* por AFLP e outras técnicas de *fingerprinting*

A técnica de AFLP consiste basicamente na utilização de enzimas de restrição, uma de corte raro e outra de corte freqüente, para cortar o DNA total em fragmentos de diversos tamanhos que são posteriormente aplicados por PCR e resolvidos em um gel desnaturante de poliacrilamida (Vos et al., 1995). O padrão de bandas formado, o *fingerprinting*, é utilizado para gerar uma matriz de '0' e '1' que é, então, analisada para o cálculo das similaridade genéticas, usualmente pelo método UPGMA (agrupamento de pares não ponderados com base na média aritmética) com o cálculo do coeficiente de Dice (Nei, 1972). O padrão complexo de bandas geradas pela técnica de AFLP pode ser reproduzido com exatidão. Além disso, o grande número de marcadores dispersos permite uma análise estatística robusta e uma ampla amostragem do genoma (Marasas et al., 2001). Os marcadores AFLP podem ser utilizados com sucesso no estudo da estrutura populacional e na identificação de espécies biológicas do CGF, tendo sido definido que isolados de uma mesma espécie biológica devem compartilhar, no mínimo, de 65% a 70% de similaridade genética (Leslie et al., 2001; Marasas et al., 2001; Zeller et al., 2003). Por outro lado, os isolados que compartilharem 40% ou menos de similaridade são de espécies diferentes. No caso das *mating populations* C e D, foi observado um nível intermediário de similaridade, 50% a 55%, o que se explica pela interfertilidade em cruzamentos entre alguns isolados das duas espécies (Leslie et al., 2001, 2004).

Fusarium konzum Zeller, Summerell & Leslie MP I apresenta entre 50% a 60% de similaridade dos padrões de AFLP com o grupo formado por *Fusarium anthophilum* (A. Braun) Wollenweber e *Fusarium succisae* (Schröter)

Saccardo que são as espécies mais próximas, enquanto que, dentre os isolados de *F. konzum*, a similaridade é de, no mínimo, 73% (Zeller et al., 2003). Em outro estudo foi mostrado que *Fusarium andiyazi* Marasas, Rheeder, Lamprecht, Zeller & Leslie apresentou a maior percentagem de similaridade com a espécie *Fusarium thapsinum* Klittich, Leslie, Nelson & Marasas MP F, no entanto, a similaridade genética entre os isolados de *F. andiyazi* foi de, no mínimo, 85% (Marasas et al., 2001). Já é conhecida a utilidade de marcadores AFLP na separação de espécies fúngicas (Tredway et al., 2000; Zeller et al., 2003) e na definição de *formae speciales* de *F. oxysporum* (Baayen et al., 2000).

Em estudo realizado por Leslie (1995), observou-se que *F. subglutinans sensu lato* isolado de mangueira e *F. sacchari* MP B possuem perfis isoenzimáticos similares. Como base nos conhecimentos atuais, estes isolados de mangueira representam a espécie *F. mangiferae*, que agrupa próximo de *F. sacchari* em filogenias de genes (O'Donnell et al., 1998, 2000). Isolados de *F. subglutinans sensu lato* associados ao *Pinus*, milho, abacaxizeiro, cana-de-açúcar e mangueira foram separados utilizando-se a técnica baseada em PCR-RFLP (PCR – polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) (Steenkamp et al., 1999).

Em trabalho realizado por Zheng & Ploetz (2002), no qual foram incluídos três isolados de malformação do Brasil, mostrou-se, por meio de perfis de RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), VCGs e um *primer* desenhado para *F. subglutinans sensu lato* da mangueira, que os isolados brasileiros eram distintos dos demais. Por estar em um VCG isolado, VCG 7, os isolados do Brasil poderiam ser de uma população restrita ao país. Entretanto, o número de isolados utilizado, três, foi muito pequeno para se fazer qualquer inferência com relação às populações de *Fusarium* associadas com a malformação da mangueira no Brasil. Os autores sugeriram que os isolados brasileiros poderiam ser de *F. sterilihyphosum*, por terem apresentado hifa estéril

espiralada, porém, os isolados do Brasil possuíam padrões de RAPD completamente diferentes dos isolados de outros países e não ocorreu amplificação com o *primer* desenhado pelos autores para identificar *F. subglutinans sensu lato* associados com a malformação da mangueira, enquanto que os isolados de outros países foram confirmados (Zheng & Ploetz, 2002).

2.10.2 Estudos filogenéticos com base em seqüências de DNA

Seqüências de genes conservados que codificam proteínas essenciais para a sobrevivência dos seres vivos, como as *histonas* que formam o nucleossoma e a *β -tubulina* que juntamente com a *α -tubulina* formam os microtúbulos, essenciais para a divisão celular, são exemplos de regiões de alto valor para a análise filogenética (Isenberg, 1979; Steenkamp et al., 1999; Buchanan et al., 2000; O'Donnell et al., 1998, 2000).

Genes do DNA ribossomal e mitocondrial, também são de valor para a análise filogenética embora as regiões ITS (espaçadores internos transcritos), apesar de homólogas, sejam em alguns casos xenólogas (originou-se por hibridização interespecífica) ou parálogas (originou-se por duplicação gênica) em besouros (Vogler & DeSalle, 1994), nematóides (Zijlstra et al., 1995), plantas (Wendel et al., 1995) e fungos (O'Donnell & Cigelnik, 1997), levando, nesse caso, a resultados ambíguos na análise filogenética.

A partir dos estudos realizados por O'Donnell et al. (1998, 2000) sobre a filogenia das espécies do CGF, o conceito de *F. subglutinans sensu lato*, como estabelecido por Nelson et al. (1983), foi reavaliado com várias espécies filogenéticas apresentando os mesmos marcadores morfológicos de *F. subglutinans sensu lato*. A partir de então, apenas a população associada ao milho (*Zea mays* L.), a *mating population* E, continuou sendo chamada de *F. subglutinans*, porque foi a primeira população estudada a apresentar estas características. Com isso, todas as outras espécies filogenéticas com

características morfológicas de *F. subglutinans sensu lato* passaram a ser reclassificadas, recebendo outros nomes específicos (Nirenberg & O'Donnell, 1998; O'Donnell et al., 1998, 2000; Steenkamp et al., 2000a; Britz et al., 2002).

Fusarium subglutinans sensu lato constitui parte do CGF e está associada com, pelo menos, três espécies biológicas ou *mating populations* (B, E e H) e com várias espécies anamórficas em diferentes hospedeiros como *Pinus*, milho, cana-de-açúcar, abacaxizeiro e mangueira, entre outros (Nirenberg & O'Donnell, 1998; Leslie, 1995; O'Donnell et al., 1998, 2000; Britz et al., 1999, 2002; Steenkamp et al., 2002). Mesmo que algumas das coleções de *F. subglutinans sensu lato* tenham sido recentemente elevadas ao nível de espécie, é difícil, e algumas vezes impossível, de se distinguir isolados de *F. subglutinans sensu lato* associados com diferentes hospedeiros daqueles associados com a malformação da mangueira somente por meio de caracteres morfológicos (Nirenberg & O'Donnell, 1998; O'Donnell et al., 2000; Steenkamp et al., 2000a).

Em análises de dados de seqüenciamento do gene *histona-H3*, Steenkamp et al. (2000a) observaram a existência de dois grupos filogeneticamente distintos em isolados de *F. subglutinans sensu lato* associados à malformação da mangueira em vários países. O primeiro grupo incluía 12 isolados da África do Sul, EUA e Israel, que foram agrupados no clado 3, juntamente com as *mating populations* B, C e D do CGF, e o segundo grupo incluía seis isolados da África do Sul, os quais foram posicionados no clado 1, juntamente com as *mating populations* E e H do CGF. Coincidentemente, os seis isolados da África do Sul, região de Tzaneen, residentes no Clado 1, corresponderam ao VCG 4 e ao *mating type MAT-1*, enquanto que os outros 12 isolados da África do Sul, EUA e Israel agruparam nos VCGs 3, 2 e 1, respectivamente e foram posicionados no clado 3 e apresentavam o *mating type MAT-2*.

Para confirmar a separação dos isolados em dois grupos (clados) distintos, os autores seqüenciaram porções do gene *β-tubulina* e compararam com outras seqüências de *β-tubulina* despositadas na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Na comparação com as seqüências depositadas de *β-tubulina* foi mostrado que o isolado MRC 3478, pertencente ao clado 3, possuía seqüência idêntica ao isolado NRRL 25226, que tinha sido previamente considerado por O'Donnell et al. (1998) como pertencente a uma nova espécie filogenética, residente no clado asiático e que também foi comprovado por Freeman et al. (1999) como agente etiológico da malformação floral e vegetativa da mangueira. Por outro lado, a seqüência de *β-tubulina* do isolado MRC 7877, pertencente ao clado 1, não foi idêntica a nenhuma das seqüências existentes na base de dados do NCBI, sendo então considerada única. Com isso, os autores chegaram à conclusão de que os dois grupos de isolados observados consistiam de duas novas espécies filogenéticas do CGF (Steenkamp et al., 2000a).

De acordo com Britz et al. (2002), mais investigações com isolados da América do Sul seriam requeridas para testar a hipótese de que isolados de *F. sterilihyphosum* da África do Sul originaram-se na América do Sul. Esta hipótese foi levantada pelo fato desta espécie agrupar com espécies do CGF que possuem uma origem americana hipotética. Esta hipótese foi também apoiada pelo fato de que isolados do México, que também agruparam no clado americano de O'Donnell et al. (1998), obtidos de mangueiras com malformação, possuíam características morfológicas semelhantes a *F. sterilihyphosum* (O'Donnell et al., 2000; Britz et al., 2002).

O fato de dois *taxa* terem sido encontrados associados com a malformação da mangueira enfatiza um sério problema relacionado com a etiologia dessa doença. *F. mangiferae* foi inequivocamente indicado como agente etiológico da malformação da mangueira (Freeman et al., 1999). Não há

informação se *F. sterilihyphosum* causa esta doença em mangueira, necessitando mais investigações na tentativa de solucionar esta questão (Britz et al., 2002).

Os resultados de pesquisa com malformação apresentados aqui mostram que as espécies de *Fusarium* associadas à malformação da mangueira não se restringem apenas a *F. mangiferae* e *F. sterilihyphosum*. Além disso, não há informação detalhada sobre a diversidade genética de isolados de *Fusarium* associados à malformação da mangueira na América Latina e, mais especificamente, no Brasil.

Pelo que foi mostrado, existe muita especulação com respeito à malformação da mangueira no Brasil, faltando resultados de pesquisas para esclarecer a identidade, origem, filogenia, diversidade e patogenicidade do agente etiológico, especialmente os produzidos por pesquisadores brasileiros.

3 BIBLIOGRAFIA CITADA

AFANIDE, B.; MABADEJE, S. A.; NAQVI, S. H. Z. *Gibberella baccata*, perfect state of *Fusarium lateritium* in Nigeria. **Mycologia**, New York, v. 68, n. 5, p. 1108-1111, Sept./Oct. 1976.

ANJOS, J. N.; CHARCHAR, M. J. A.; PINTO, A. C. Q.; RAMOS, V. H. V. Associação de *Fusarium sacchari* com a malformação vegetativa da mangueira. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 75-77, jan./mar. 1998.

AOKI, T.; O'DONNELL, K.; ICHIKAWA, K. *Fusarium fractiflexum* sp. nov. and two other species within the *Gibberella fujikuroi* species complex recently discovered in Japan that form aerial conidia in false heads. **Mycoscience**, Tokyo, v. 42, n. 5, p. 461-478, 2001.

AZEVEDO, J. L. Melhoramento genético e preservação de fungos utilizados no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Ed.) **Controle Biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 237-51.

BAAYEN, R. P.; O'DONNELL, K.; BONANTS, P. J. M.; CIGELNIK, E.; KROON, L. P. N. M.; ROEBROECK, E. J. A.; WAALWIJK, C. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 8, p. 891-900, Aug. 2000.

BOESEWINKEL, H. J. Storage of fungal cultures in water. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 66, n. 2, p. 183-185, Feb. 1976.

BRITZ, H.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, M. J.; MARASAS, W. F. O.; GORDON, T. R.; LESLIE, J. F. *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini* represents a distinct mating population in the *Gibberelle fujikuroi* species complex. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v. 65, n. 3, p. 1198-1201, Mar. 1999.

BRITZ, H.; STEENKAMP, E. T.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, M. J. Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 4, p. 722-730, July/Aug. 2002.

BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Biologists, 2000. 1367 p.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. Genetic variation and evolution In: **The fungi**. 2. ed. 2001. 588 p.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungal in sterile distilled water, for the researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 70, n. 8, p. 181-184, 1967.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 42, n. 225-226, 1939.

COVERT, S. F.; BRILEY, A.; WALLACE, M. M.; MCKINNEY, T. Partial *MAT-2* gene structure and the influence of temperature on mating success in *Gibberella circinata*. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 28, n. 1, p. 43-54, Oct. 1999.

CUNHA, M. N.; SANTOS FILHO, H. P.; NASCIMENTO, A. S. **Manga: fitossanidade**, Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2000. 104 p.

DESJARDINS, A. E. *Gibberella* from *A* (*venaceae*) to *Z* (*ae*). **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 04.1-04.22, 2003.

DESJARDINS, A. E.; BEREMAND, M. A genetic system for Trichothecene toxin production in *Gibberella pulicaris* (*Fusarium sambucinum*). **Phytopathology**, St. Paul, v. 77, n. 5, p. 678-683, May 1987.

FAOSTAT. Estatísticas da *Food and Agriculture Organization* das Nações Unidas. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acessos em: jan. 2006.

FERREIRA, F. R.; POSSIDIO, E. L.; SOARES, N. B.; CASTRO NETO, M. T.; PINTO, A. C. Q.; DONADIOA, L. C.; FREITAS, G. B. Germoplasma de manga no Brasil. in: SAO JOSE, A. R. **O agronegócio manga: produção e mercado**. Vitória da Conquista, Bahia: UESB/DFZ, 2002. p 111-118.

FREEMAN, S.; MAIMON, M.; PINKAS, Y. Use of GUS transformants of *Fusarium subglutinans* for determining etiology of mango malformation disease. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, n. 6, p. 456-461, June 1999.

GEISER, D. M.; IVEY, M. L. L.; HAKIZA, G.; JUBA, J. H.; MILLER, S. A. *Gibberella xylarioides* (anamorph: *Fusarium xylarioides*), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is a previously unrecognized member of the *G. fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 1, p. 191-201, Jan./Feb. 2005.

GERLACH, W.; NIRENBERG, H. **The genus *Fusarium*: a pictorial atlas**. Berlin, Germany: Biol. Bundesanst für Land-u Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, 1982. 406 p.

GLASS, N. L.; KULDAU, G. A. Mating type and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 201-224, 1992.

HSIEH, W. H.; SMITH, S. N.; SNYDER, W. C. Mating groups in *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 67, n. 8, p. 1041-1043, Aug. 1977.

HUSS, M. J.; CAMPBELL, C. L.; JENNINGS, D. B.; LESLIE, J. F. Isozyme variation among biological species in the *Gibberella fujikuroi* species complex (*Fusarium* Section *Liseola*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 10, p. 3750-3756, Oct. 1996.

ISENBERG, I. Histones. **Annual Review Biochemistry**, Palo Alto, v. 48, p. 159-191, 1979.

JURGENSON, J. E.; ZELLER, K. A.; LESLIE, J. F. Expanded Genetic Map of *Gibberella moniliformis* (*Fusarium verticillioides*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 4, p. 1972-1979, Apr. 2002.

KERÉNYI, Z.; MORETTI, A.; WAALWIJK, C.; OLÁH, B.; HORNOK, L. Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 8, p. 4419-4423, Aug. 2004.

KERÉNYI, Z.; ZELLER, K.; HORNOK, L.; LESLIE, J. F. Molecular standardization of mating type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 9, p. 4071-4076, Sept. 1999.

- KLAASEN, J. A.; NELSON, P. E. Identification of a mating population, *Gibberella nygamai* sp. nov., within the *Fusarium nygamai* anamorph. **Mycologia**, New York, v. 88, n. 6, p. 965-969, Nov./Dec. 1996.
- KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F. Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). **Genetics**, Baltimore, v. 118, n. 3, p. 417-423, Mar. 1988.
- KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F.; NELSON, P. E.; MARASAS, W. F. O. *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): a new species in section *Liseola* from sorghum. **Mycologia**, New York, v. 89, n. 4, p. 643-652, July/Aug. 1997.
- KUHLMAN, E. G. Varieties of *Gibberella fujikuroi* with anamorphs in *Fusarium* section *Liseola*. **Mycologia**, New York, v. 74, p. 756-768, 1982.
- KUMAR, J.; SINGH, U. S.; BENIWAL, S. P. S. Mango malformation: one hundred years of research. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 217-232, 1993.
- LESLIE, J. F. *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 282-291, 1995. Supplement.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S.; DOE, F. J. Description of *Gibberella sacchari* and neotypification of its anamorph *Fusarium sacchari*. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 3, p. 718-724, May/June 2005.
- LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; SUMMERELL, B. A. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, n. 3, p. 107-117, Sept. 2001.
- LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; WOHLER, M.; SUMMERELL, B. A. Interfertility of two mating populations in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 5/6, p. 611-618, June 2004.
- LEPOINT, P. C. E.; MUNAUT, F. T. J.; MARAITE, H. M. M. *Gibberella xylarioides sensu lato* from *Coffea canephora*: a new mating population in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 12, p. 8466-8471, Dec. 2005.

LIMA, C. S.; COSTA, S. S.; CAMPOS, M. A.; BARROS, D. L.; COSTA, M. C. M.; PFENNING, L. H. *Fusarium* species associated to mango malformation in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 29, p. 236, 2004. Suplemento.

LIMA, C. S.; PFENNING, L. H.; COSTA, S. S.; CAMPOS, M. A.; LESLIE, J. F. Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of *Fusarium* species associated with mango malformation. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 30, p. 74, 2005. Suplemento.

MARASAS, W. F. O.; RHEEDER, J. P.; LAMPRECHT, S. C.; ZELLER, K. A.; LESLIE, J. F. *Fusarium andiyazi* sp. nov., a new species from sorghum. **Mycologia**, New York, v. 93, n. 6, p. 1203-1210, Nov./Dec. 2001.

NEI, M. Genetic distances between populations. **American Naturalist**, Chicago, v. 106, p. 283-292, 1972.

NELSON, M. A. Mating systems in ascomycetes: a romp in the sac. **Trends in Genetics**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 69-74, Feb. 1996.

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

NIRENBERG, H. I.; O'DONNELL, K. New species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York, v. 90, n. 3, p. 434-458, May/June 1998.

NIRENBERG, H. I.; O'DONNELL, K.; KROSCHER, J.; ANDRIANAIVO, A. P.; FRANK, J. M.; MUBATANHEMA, W. Two new species of *Fusarium*: *Fusarium brevicatenulatum* from the noxious weed *Striga asiatica* in Madagascar and *Fusarium pseudoanthophilum* from *Zea mays* in Zimbabwe. **Mycologia**, New York, v. 90, n. 3, p. 459-464, May/June 1998.

NORIEGA-CANTÚ, D. H.; TÉLIZ, D.; MORA-AGUILERA, G.; RODRÍGUEZ-ALCAZAR, J.; ZAVALETA-MEJÍA, E.; OTERO-COLINAS, G.; LEE CAMPBELL, C. Epidemiology of mango malformation in Guerrero, Mexico with traditional and integrated management. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n. 3, p. 223-228, Mar. 1999.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous.

Molecular Phylogenetics and Evolution, San Diego, v. 7, n. 1, p. 103-106, Feb. 1997.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York, v. 90, n. 3, p. 465-493, May/June 1998.

O'DONNELL, K.; NIRENBERG, H. I.; AOKI, T.; CIGELNIK, E. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**, Tokyo, v. 41, n. 1, p. 61-78, 2000.

PFENNING, L. H.; SILVA, C. F. Isolamento, caracterização e identificação de espécies de *Fusarium* associados ao cafeeiro na região Sul de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 25., 1999, Franca, SP. **Anais...** Franca, SP, 1999. p. 56-58.

PLOETZ, R. C. Distribution and prevalence of *Fusarium subglutinans* in mango trees affected by malformation. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 72, n. 1, p. 7-9, Jan. 1994.

PLOETZ, R. C. Malformation: a unique and important disease of mango, *Mangifera indica* L. In: SUMMERELL, B. A.; LESLIE, J. F.; BACKHOUSE, D.; BRYDEN, W. L.; BURGESS, L. W. (Ed.). **Fusarium**: Paul E. Nelson Memorial Symposium, St. Paul, MN: APS Press, 2001. p. 233-247.

PLOETZ, R. C.; ZHENG, Q. I.; VÁSQUEZ, Á.; ABDEL-SATTAR, M. A. Current status and impact of mango malformation in Egypt. **International Journal of Pest Management**, London, v. 48, n. 4, p. 279-285, Oct./Dec. 2002.

SAMUELS, G. J.; NIRENBERG, H. I.; SEIFERT, K. A. Perithecial species of *Fusarium*. In: SUMMERELL, B. A.; LESLIE, J. F.; BACKHOUSE, D.; BRYDEN, W. L.; BURGESS, L. W. (ed.). **Fusarium**: Paul E. Nelson Memorial Symposium, St. Paul, Minnesota, USA: APS Press, 2001. p 1-14.

SANTOS, A. B.; TABOSA, S. A. S.; MENDES, R. G. P.; BRITO, P. F. A. B. Etiologia do suberbrotamento da mangueira no estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, n. 3, p. 595, out. 1983. Suplemento.

SAO JOSE, A. R.; SOUZA, S. E.; PINA, A. V.; ATAIDE, E. M. Incidence and severity of mango flower malformation in Bahia state, Brazil. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 509, p. 765-797, 2000.

SMITH, D.; ONIONS, A. H. S. **The preservation and maintenance of living fungi**. 2.ed. UK: CAB International, 1994. 122 p. (IMI Technical Handbooks, n. 1).

STEENKAMP, E. T.; BRITZ, H.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, M. J. Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 1, n. 4, p. 187-193, July 2000a.

STEENKAMP, E. T.; WINGFIELD, B. D.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, M. J.; MARASAS, W. F. O. Differentiation of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* by histone gene sequence data. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 8, p. 3401-3406, Aug. 1999.

STEENKAMP, E. T.; WINGFIELD, B. D.; COUTINHO, T. A.; ZELLER, K. A.; WINGFIELD, M. J.; MARASAS, W. O.; LESLIE, J. F. PCR-based identification of *MAT-1* and *MAT-2* in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4378-4382, Oct. 2000b.

STEENKAMP, E. R.; WINGFIELD, B. D.; DESJARDINS, A. E.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, M. J. Cryptic speciation in *Fusarium subglutinans*. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 6, p. 1032-1043, Nov./Dec. 2002.

SUMMANWAR, A. S.; RAYCHAUDHURI, S. P.; PHATAK, S. C. Association of the fungus *Fusarium moniliforme* Sheld. With themalformation in mango (*Mangifera indica* L.). **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 19, p. 227-228, 1966.

SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 2, p. 117-128, Feb. 2003.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 1-26.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; FISHER, M. C. The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 197-246, 1999.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GEISER, D. M.; HIBBETT, D. S.; FISHER, M. C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 31, n. 1, p. 21-32, Oct. 2000.

TAVARES, S. C. C. H.; LIMA, J. A. S. Isolamento do agente causal da malformação vegetativa em mangueira no Submédio São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 322, ago. 1997. Suplemento.

TSCHANZ, A. T.; HORST, R. K.; NELSON, P. E. Effect of environment on sexual reproduction of *Gibberella zeae*. **Mycologia**, New York, v. 68, p. 327-340, 1976.

TERAO, D.; OLIVEIRA, S. M. A.; TAVARES, S. C. C. H.; MENEZES, M. Identificação do agente causal da malformação floral e vegetativa da mangueira no Nordeste brasileiro. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 328-331, jul./set. 2001.

TREDWAY, L. P.; WHITE, J. F.; GAUT, B. S.; REDDY, P. V.; RICHARDSON, M. D. Phylogenetic relationships within and between *Epichloë* and *Neotyphodium* endophytes as estimated by AFLP markers and rDNA sequences. **Mycological Research**, Oxford, v. 103, n. 12, p.1593-1603, Dec. 1999.

TURGEON, B. G. Application of mating type gene technology to problems in fungal biology. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 115-137, 1998.

VOGLER, A. P.; DESALLE, R. Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle *Cicindela dorsalis*. **Molecular Biology Evolution**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 393-405, Feb. 1994.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DER LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, Nov. 1995.

WENDEL, J. F.; SCHNABEL, A.; SEELANAN, T. An unusual ribosomal DNA sequence from *Gossypium gossypoides* reveals ancient, cryptic, intergenomic introgression. **Molecular Phylogenetics Evolution**, San Diego, v. 4, n. 3, p. 298-313, Sept. 1995.

ZELLER, K. A.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S.; LESLIE, J. F.
Gibberella konza (*Fusarium konzum*) sp. nov., a new biological species within
the *Gibberella fujikuroi* species complex from prairie grass. **Mycologia**, New
York, v. 95, n. 5, p. 943-954, Sept./Oct. 2003.

ZHENG, Q.; PLOETZ, R. Genetic diversity in the mango malformation
pathogen and development of a PCR assay. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n.
2, p. 208-216, Apr. 2002.

ZIJLSTRA, C.; LEVER, A. E. M.; UENK, B. J.; VAN SILFHOUT, C.H.
Differences between ITS regions of isolates of root-knot nematodes
Meloidogyne hapla and *M. chitwoodi*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 10, p.
1231-1237, Oct. 1995.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO AGENTE ETIOLÓGICO DA MALFORMAÇÃO DA MANGUEIRA NO BRASIL

1 RESUMO

LIMA, Cristiano Souza. **Caracterização molecular do agente etiológico da malformação da mangueira no Brasil**. 2006. p. 34-75. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de concentração em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.*

Objetivou-se, neste estudo, caracterizar isolados de *Fusarium* associados à malformação por meio de AFLP e análise de seqüências gênicas. Os primers *EcoR* I+GG/*Mse* I+CT, *EcoR* I+TT/ *Mse* I+AC and *EcoR* I+AA/*Mse* I+TT foram usados para gerar padrões de AFLP que foram utilizados no cálculo da similaridade genética (coeficiente de Dice) entre isolados de malformação da mangueira. A maioria dos isolados do Brasil formou um grupo distinto de *Fusarium sterilihyphosum* do Brasil e África do Sul (40% similaridade entre eles). A distância genética entre os dois grupos é comparável àquela entre duas espécies biológicas de *Gibberella fujikuroi* (CGF). O grupo mais distante (20% de similaridade) continha *Fusarium mangiferae* da África do Sul, Egito, Índia e EUA. Entretanto, a variação genética entre os isolados de *Fusarium* sp. do Brasil (65% a 100%) foi maior do que dentro do grupo de *F. sterilihyphosum* (~100%) e *F. mangiferae* (~100%). Representantes do grupo de *Fusarium* sp. do Brasil foram usados em comparações com 24 espécies filogenéticas do CGF por meio de AFLPs. Mais uma vez, *Fusarium* sp. do Brasil agrupou próximo a *F. sterilihyphosum* mas, em um grupo distinto. O dendrograma de AFLP para o CGF foi semelhante a filogenia de genes do CGF, mostrando que a técnica de AFLP é útil para o estudo da filogenia deste grupo. Para confirmar os resultados do AFLP, foram seqüenciadas fragmentos gênicos de β -tubulina e fator de alongação-1 α (TEF-1 α) de *Fusarium* sp. do Brasil. As seqüências obtidas variaram quanto à identidade de 98,8% a 99,8% para β -tubulina e de 99,5% a 99,8% para TEF-1 α . Isolados de *F. sterilihyphosum* do Brasil apresentaram identidade de seqüências de 100% com o holotipo desta espécie. Foram construídos alinhamentos com seqüências das espécies do CGF obtidas no *GenBank* para ambos os genes. Mais uma vez, *Fusarium* sp. do Brasil agrupou como uma espécie distinta do CGF, com suporte de 97% na análise de *bootstrap*. Portanto, *Fusarium* sp. do Brasil representa uma nova espécie do CGF.

*Comitê Orientador: Ludwig H. Pfenning (Orientador), John F. Leslie – *Kansas State University* e Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Co-orientadores)

2 ABSTRACT

LIMA, Cristiano Souza. **Molecular characterization of the etiologic agent of mango malformation in Brazil.** 2006. p. 34-75. Thesis (Doctorate in Plant Pathology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

This study was carried out with the objective to characterize molecularly the etiological agent of mango malformation through AFLP and gene sequence analyses. The primer combinations *EcoR* I+GG/*Mse* I+CT, *EcoR* I+TT/ *Mse* I+AC and *EcoR* I+AA/*Mse* I+TT were used in the AFLP analyses to generate fingerprints of isolates obtained from malformed mango tissue in Brazil and other countries. The majority of isolates from Brazil formed a group distinct from that produced by strains of other countries, being the group represented by isolates of *Fusarium sterilihyphosum* from Brazil and South Africa the closest one with 40% UPGMA similarity (Dice coefficient). This similarity is sufficient to separate to distinct biological species in the *Gibberella fujikuroi* species complex (GFC). The most distant group (20% UPGMA similarity) contained *Fusarium mangiferae* from Egypt, India, South Africa and USA. However, the genetic variation within the population of isolates from Brazil (from 65 to 100%) was larger than within *F. sterilihyphosum* (near 100%) and *F. mangiferae* (near 100%) groups. Representatives of the existing genetic variation of the group of strains from Brazil were selected to be used in comparisons with 24 phylogenetic species of the GFC by using AFLP technique. Again, *Fusarium* sp. from Brazil grouped next to *F. sterilihyphosum*, but in a distinct group. The UPGMA network generated to the GFC in this study showed to have the same topology of the gene genealogies that established the phylogenetic relationships to this group, showing that AFLP data can be used to approximate the phylogeny of the GFC. To confirm the results obtained through AFLPs, portions of the β -tubulin and translation elongation factor-1 α (TEF-1 α) genes of *Fusarium* sp. from Brazil were sequenced. The sequences obtained varied regarding the identity to each other from 98.8 to 99.8% to β -tubulin and from 99.5 to 99.8% to TEF-1 α . Isolates of *F. sterilihyphosum* from Brazil were also sequenced and had 100% identity with the holotype to this species. Sequences from other phylogenetic species of the GFC to both genes were included in an alignment of each gene separately and together. The grouping observed here was similar to that observed to the AFLP data. The bootstrap analysis supported the separation of *Fusarium* sp. from Brazil (97%) and *F. sterilihyphosum*. *Fusarium* sp. from Brazil is an undescribed species of the GFC.

*Advising Committee: Ludwig H. Pfenning (Adviser), John F. Leslie – Kansas State University and Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Co-advisers)

3 INTRODUÇÃO

A malformação é uma doença importante da mangueira, *Mangifera indica* L., em todo o mundo (Ploetz, 2001). No Brasil, no vale do São Francisco, a incidência da doença pode alcançar até 100% em alguns pomares, levando a uma perda total da produção (Tavares & Lima, 1997). Esta doença tem sido associada mais recentemente a espécies de *Fusarium* Link do complexo *Gibberella fujikuroi* (CGF), o qual é conhecido por agrupar vários patógenos importantes de plantas cultivadas (Leslie, 1995; Steenkamp et al., 2000; Britz et al., 2002; Pfenning, 2002).

As espécies do CGF podem ser diferenciadas pela técnica de AFLP (polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados), especialmente as espécies biológicas ou *mating populations* (A-I). Similaridades em padrões de AFLP acima de 65% a 70 % são encontradas para isolados pertencentes à mesma espécie (Leslie et al., 2001; Marasas et al., 2001; Zeller et al., 2003). Isolados de diferentes espécies, em geral, não compartilham mais do que 40% das bandas em um perfil de AFLP. No caso das *mating populations* C [*Gibberella fujikuroi* (Sawada) Ito] e D [*Gibberella intermedia* (Kuhlman) Samuels, Nirenberg & Seifert] ocorre um nível intermediário de similaridade nos padrões de AFLP, ou seja, 50% a 55%, mostrando que estas espécies são geneticamente próximas.

Alguns isolados de *G. fujikuroi* e *G. intermedia* podem produzir cruzamentos interespecíficos, no entanto, com a produção de um número reduzido de peritécios férteis (Leslie et al., 2001, 2004). Alguns autores sugerem que os marcadores AFLP podem ser úteis na análise da relação entre *Epichloë* (Fr.) Tul. & C. Tul. e *Neotyphodium* Glenn, C. W. Bacon & Halin (Tredway et al., 1999), *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* (Schlechtendahl) Snyder &

Hansen (Baayen et al., 2000), entre espécies do CGF (Marasas et al., 2001; Zeller et al., 2003) e na comparação entre espécies do CGF e de outras Seções do gênero *Fusarium* (Abdel-Satar et al., 2003; Phan et al., 2004). Portanto, a técnica de AFLP representa uma ferramenta valiosa que poderia ser usada para caracterizar espécies do gênero *Fusarium* associadas à malformação da mangueira, conseqüentemente, o agente etiológico da doença.

Recentemente, duas espécies novas pertencentes ao CGF, *Fusarium mangiferae* Britz, Wingfield & Marasas e *Fusarium sterilihyphosum* Britz, Marasas & Wingfield, foram descritas em associação com a malformação vegetativa e floral da mangueira: *F. mangiferae*, apresentando ocorrência generalizada em várias áreas produtoras de manga do mundo e *F. sterilihyphosum*, restrita à África do Sul (Britz et al., 2002). *Fusarium mangiferae* e *F. sterilihyphosum* podem ser diferenciados com base em análises de seqüências parciais dos genes *histona-H3*, *β -tubulina*, *fator de alongação-1 α* (*TEF-1 α*), *28S* e *mtSSU rDNA*, e *calmodulina*, e pela presença de uma estrutura no micélio denominada de hifa estéril espiralada, presente apenas em *F. sterilihyphosum* (O'Donnell et al., 2000; Steenkamp et al., 2000; Britz et al., 2002). *Fusarium mangiferae* é apontado como o principal agente etiológico da malformação em vários países dos continentes africano, americano e asiático (Freeman et al., 1999).

Foi mostrado, por meio de padrões de RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), que isolados de *Fusarium* obtidos no Brasil, semelhantes à *F. sterilihyphosum*, possuíam padrões de bandas distintos daqueles de *F. mangiferae*. No entanto, devido ao número restrito de isolados e a não comparação com representantes de *F. sterilihyphosum*, os autores não chegaram a uma conclusão sobre a identidade dos mesmos (Zheng & Ploetz, 2002). No México, também existem relatos de isolados de *Fusarium* que possuem hifa

estéril espiralada, contudo, sem a existência de estudos conclusivos sobre a identidade destes isolados (Noriega-Cantú et al., 1999; Britz et al., 2002).

Embora *F. sterilihyphosum* tenha sido relatado na África do Sul e, recentemente, no Brasil, associado à malformação, ainda não se sabe o papel desta espécie na etiologia da doença (Britz et al., 2002; Lima et al., 2004a). Além disso, é possível que outras espécies venham a ser descobertas associadas à mangueira com malformação, caso estudos mais apurados sejam realizados, usando material vegetal de países/regiões produtoras com associação de técnicas moleculares.

Em virtude da inexistência de estudos de caracterização molecular de populações de espécies de *Fusarium* associadas à malformação da mangueira no Brasil, foi realizado este estudo com o objetivo de avaliar a diversidade genética de espécies de *Fusarium* associadas à malformação da mangueira no Brasil e em outros países produtores de manga, por meio das análises de AFLP e seqüenciamento dos genes *β -tubulina* e *fator de alongação-1 α* .

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolamento e estudos morfológicos

Todos os isolados utilizados neste estudo foram purificados por meio de cultivo monospórico a partir de culturas típicas do gênero *Fusarium*, crescidas a partir do isolamento de tecidos de mangueira desinfestados (hipoclorito de sódio 2% e etanol 70%) apresentando sintomas de malformação, inoculados em meio SNA (ágar pobre em nutrientes sintéticos). Todas as culturas monospóricas foram checadas quanto à pureza e ao crescimento vigoroso do tipo selvagem. Os isolados obtidos foram mantidos como suspensão de esporos em glicerol 15% a -70°C, no Departamento de Fitopatologia da *Kansas State University* (KSU), Manhattan, Kansas, EUA, e em água destilada esterilizada a 10°C no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil (Tabela 2.1).

As características morfológicas chave foram observadas após 10 a 14 dias nas culturas fúngicas crescidas em SNA a 23°C sob luz fluorescente branca junto à luz negra, na câmara incubadora e a 25°C em PDA (ágar, dextrose e batata) no escuro, adaptado de Britz et al. (2002).

A diversidade de padrões de AFLP foi estimada entre os isolados do Brasil e isolados de *F. mangiferae* e *F. sterilihyphosum* obtidos de outros países (Tabela 2.1) e entre espécies filogenéticas do CGF. As análises de AFLP foram iniciadas comparando-se os isolados do Brasil com *F. mangiferae*, que também está associado à malformação e com *F. sterilihyphosum*. Em uma análise separada foram comparados representantes da diversidade do grupo de isolados do Brasil, *F. mangiferae*, *F. sterilihyphosum*, com 22 espécies do CGF (Tabela 2.2).

TABELA 2.1 Isolados de *Fusarium* obtidos de *Mangifera indica* L. utilizados neste estudo. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Espécie^a	Mating type^b	Fertilidade^c	Sintoma / Variedade^d	Origem geográfica^e	Número de acesso^f	Fonte^g
<i>F. mangiferae</i>	MAT-2	NF	<i>M. Indica</i>	ÍNDIA	CML 406=BBA 69662	H Nirenberg
<i>F. mangiferae</i>	MAT-2	NF	<i>M. Indica</i>	ÍNDIA	CML 407=BBA 70826	H Nirenberg
<i>F. mangiferae</i>	MAT-2	NF	<i>M. Indica</i>	EGITO	CML 409=BBA 70896	H Nirenberg
<i>F. mangiferae</i>	MAT-2	NF	<i>M. Indica</i>	ÁFRICA DO SUL	CML 412=MRC 2730 ex paratipo	WFO Marasas
<i>F. mangiferae</i>	MAT-2	NF	<i>M. Indica</i>	ISRAEL	CML 413= KSU 11781= MRC 8432 ex holotipo	JF Leslie
<i>F. mangiferae</i>	MAT-2	NF	<i>M. Indica</i>	EUA, Flórida	KSU 4079	JF Leslie
<i>F. mangiferae</i>	MAT-2	NF	<i>M. Indica</i>	EGITO	KSU 4374	JF Leslie
<i>F. mangiferae</i>	MAT-2	NF	<i>M. Indica</i>	EGITO	KSU 4700	JF Leslie
<i>F. mangiferae</i>	MAT-2	NF	<i>M. Indica</i>	EGITO	KSU 4701	JF Leslie
<i>F. mangiferae</i>	MAT-2	NF	<i>M. Indica</i>	EGITO	KSU 4702	JF Leslie
<i>F. mangiferae</i>	MAT-2	NF	<i>M. Indica</i>	EGITO	KSU 4703	JF Leslie
<i>F. mangiferae</i>	MAT-2	NF	<i>M. Indica</i>	EGITO	KSU 4704	JF Leslie
<i>F. mangiferae</i>	MAT-2	NF	<i>M. Indica</i>	EGITO	KSU 4705	JF Leslie
<i>F. mangiferae</i>	MAT-2	NF	<i>M. Indica</i>	EGITO	KSU 4706	JF Leslie
<i>F. mangiferae</i>	MAT-2	NF	<i>M. Indica</i>	EGITO	KSU 4707	JF Leslie
<i>F. mangiferae</i>	MAT-2	NF	<i>M. Indica</i>	EGITO	KSU 4708	JF Leslie
<i>F. mangiferae</i>	MAT-2	NF	<i>M. Indica</i>	EGITO	KSU 4709	JF Leslie
<i>F. mangiferae</i>	MAT-2	NF	<i>M. Indica</i>	EGITO	KSU 4710	JF Leslie
<i>F. mangiferae</i>	MAT-2	NF	<i>M. Indica</i>	EGITO	KSU 4711	JF Leslie
<i>F. oxysporum</i>	NT	NT	<i>M. Indica</i>	MÉXICO	CML 541	GM Aguilera

...continua...

TABELA 2.1, Cont.

<i>F. cf. pseudocircinatum</i>	MAT-1	NT	MF/ nd	BRASIL, CE, Fortaleza	CML 270	CS Lima 2003
<i>F. semitectum</i>	ND	NT	SS	BRASIL, MG, Araxá	CML 347	CS Lima 2003
<i>F. semitectum</i>	ND	NT	SS	BRASIL, MG, São Bento Abade	CML 348	CS Lima 2003
<i>F. semitectum</i>	ND	NT	SS	BRASIL, MG, St. A. do Amparo	CML 398	CS Lima 2004
<i>F. sterilihyphosum</i>	MAT-1	NF	MV/ND	BRASIL, MG, Ijaci	CML 280	CS Lima 2003
<i>F. sterilihyphosum</i>	MAT-1	NF	MF/ND	BRASIL, MG, Itumirim	CML 282	CS Lima 2003
<i>F. sterilihyphosum</i>	MAT-1	NF	MF/ND	BRASIL, SP, Piracicaba	CML 283	CS Lima 2003
<i>F. sterilihyphosum</i>	MAT-1	NF	MF/ND	BRASIL, MG, Lavras	CML 401	CS Lima 2004
<i>F. sterilihyphosum</i>	MAT-1	NF	<i>M. Indica</i>	ÁFRICA DO SUL	CML 414=MRC 2802 ex holotipo	WFO Marasas
<i>F. sterilihyphosum</i>	MAT-1	NF	<i>M. Indica</i>	ÁFRICA DO SUL	CML 415= KSU 11782= MRC 8101 ex paratipo	WFO Marasas
<i>F. sterilihyphosum</i>	MAT-1	NF	<i>M. Indica</i>	ÁFRICA DO SUL	KSU 11783= MRC 8095 ex paratipo	JF Leslie
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-2	ND	MF/ND	BRASIL, MG, Lavras	CML 258	CS Lima 2002
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-2	H	MF/ND	BRASIL, MG, Uberlândia	CML 259	CS Lima 2002
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-2	H	MF/ND	BRASIL, MG, Uberlândia	CML 260	CS Lima 2002
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-2	H	MF/ND	BRASIL, MG, Uberlândia	CML 261	CS Lima 2002
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-2	H	MF/ND	BRASIL, MG, Lavras	CML 262	CS Lima 2002
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-1	H	MF/Palmer	BRASIL, MG, Uberlândia	CML 263	CS Lima 2002
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-2	H	MF/Atkins	BRASIL, MG, Uberlândia	CML 264	CS Lima 2002
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-2	H	MF/Keitt	BRASIL, MG, Uberlândia	CML 265	CS Lima 2002
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-2	H	MF/Vandik	BRASIL, MG, Uberlândia	CML 266	CS Lima 2002
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-2	H	MF/ND	BRASIL, SP, Jaguariúna	CML 267	CS Lima 2002

...continua...

TABELA 2.1, Cont.

<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-2	ND	MV/ND	BRASIL, MG, Passos	CML 269	CS Lima 2002
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-2	ND	MV/ND	BRASIL, MG, Lavras	CML 275	CS Lima 2003
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-2	ND	MF/ND	BRASIL, MG, Eloi Mendes	CML 278	CS Lima 2003
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-1	ND	MF/ND	BRASIL, MG, São João Del Rei	CML 279	CS Lima 2003
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-1	ND	MF/ND	BRASIL, MG, Caxambu	CML 281	CS Lima 2003
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-2	M	MF/ND	BRASIL, MT, Rondonópolis	CML 345	CS Lima 2003
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-2	ND	MF/ND	BRASIL, BA, Livramento	CML 346	CS Lima 2003
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-2	ND	MF/ND	BRASIL, BA, Livramento	CML 349	CS Lima 2003
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-1	ND	MF/ND	BRASIL, MT, Várzea Grande	CML 350	CS Lima 2003
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-1	H	MF/ND	BRASIL, CE, Cruz	CML 381	CS Lima 2004
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-2	M	MF/ Atkins	BRASIL, MG, Nova Porteirinha	CML 382	CS Lima 2004
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-2	M	MF/ Atkins	BRASIL, MG, Nova Porteirinha	CML 383	CS Lima 2004
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-2	M	MF/ Vandik	BRASIL, MG, Nova Porteirinha	CML 384	CS Lima 2004
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-2	M	MF/ Vandik	BRASIL, MG, Nova Porteirinha	CML 385	CS Lima 2004
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-2	ND	MF/ Atkins	BRASIL, CE, Almofala	CML 386	CS Lima 2004
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-1	H	MF/ Atkins	BRASIL, PE, Petrolina	CML 387	CS Lima 2004
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-2	ND	MF/ Haden	BRASIL, BA, Juazeiro	CML 388	CS Lima 2004
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-1	ND	MF/ Atkins	BRASIL, BA, Juazeiro	CML 389	CS Lima 2004
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-1	ND	MF/ Atkins	BRASIL, PE, Petrolina	CML 390	CS Lima 2004
<i>Fusarium</i> sp. ¹	MAT-1	ND	MF/ND	BRASIL, MG, Lavras	CML 397	CS Lima 2004

...continua...

TABELA 2.1, Cont.

<i>Fusarium</i> sp. ²	MAT-1	NF	MF/ND	BRASIL, SP, Jaguariúna	CML 268	CS Lima 2002
<i>Fusarium</i> sp. ²	ND	NT	MV/ND	BRASIL, CE, Pentecoste	CML 271	CS Lima 2003
<i>Fusarium</i> sp. ²	MAT-2	NF	MF/ND	BRASIL, ES, Brejetuba	CML 272	CS Lima 2003
<i>Fusarium</i> sp. ²	MAT-2	NF	MF/ND	BRASIL, MG, Janaúba	CML 273	CS Lima 2003
<i>Fusarium</i> sp. ²	MAT-2	NF	MF/ND	BRASIL, MG, Perdões	CML 274	CS Lima 2003
<i>Fusarium</i> sp. ²	MAT-2	NF	MF/ND	BRASIL, RJ, Barra Mansa	CML 276	CS Lima 2003
<i>Fusarium</i> sp. ²	MAT-2	NF	MF/ND	BRASIL, RJ, Barra Mansa	CML 277	CS Lima 2003
<i>Fusarium</i> sp. ²	MAT-1	NF	MF/ND	BRASIL, CE, Tururu	CML 379	CS Lima 2004
<i>Fusarium</i> sp. ²	MAT-1	NF	MF/ND	BRASIL, CE, Pentecoste	CML 380	CS Lima 2004
<i>Fusarium</i> sp. ²	MAT-2	NF	MF/ND	BRASIL, CE, Cruz	CML 391	CS Lima 2004
<i>Fusarium</i> sp. ²	MAT-1	NF	MF/ND	BRASIL, MG, Nova Porteirinha	CML 396	CS Lima 2004
<i>Fusarium</i> sp. ²	ND	NT	MV/ND	BRASIL, MG, Guidoal	CML 399	CS Lima 2004
<i>Fusarium</i> sp. ²	ND	NF	<i>M. Indica</i>	ISRAEL	CML 408=BBA 70829	H Nirenberg
<i>Fusarium</i> sp. ²	MAT-1	NF	<i>M. Indica</i>	MÉXICO	CML 410=BBA 71281	H Nirenberg
<i>Fusarium</i> sp. ²	MAT-1	NF	<i>M. Indica</i>	MÉXICO	CML 411=BBA 71282	H Nirenberg
<i>Fusarium</i> sp. ²	NT	NT	MV/Atkins	BRASIL, PE, Petrolina	CML 531	DB Lopes 2003
<i>Fusarium</i> sp. ²	NT	NT	MF/Atkins	BRASIL, PE, Petrolina	CML 532	DB Lopes 2004
<i>Fusarium</i> sp. ²	NT	NT	MF/Atkins	BRASIL, PE, Petrolina	CML 533	DB Lopes 2004
<i>Fusarium</i> sp. ²	NT	NT	MF/Atkins	BRASIL, PE, Petrolina	CML 534	DB Lopes 2004
<i>Fusarium</i> sp. ²	NT	NT	MF/Kent	BRASIL, PE, Petrolina	CML 535	DB Lopes 2004
<i>Fusarium</i> sp. ²	NT	NT	MV/ND	BRASIL, PE, Petrolina	CML 536	DB Lopes 2004
<i>Fusarium</i> sp. ²	NT	NT	SS/Kent	BRASIL, PE, Petrolina	CML 537	DB Lopes 2004
<i>Fusarium</i> sp. ²	NT	NT	MF/Atkins	BRASIL, PE, Petrolina	CML 538	DB Lopes 2004
<i>Fusarium</i> sp. ²	NT	NT	MF/Atkins	BRASIL, PE, Petrolina	CML 539	DB Lopes 2005

...continua...

TABELA 2.1, Cont.

<i>Fusarium</i> sp. ²	NT	NT	<i>M. Indica</i>	MÉXICO	CML 540	GM Aguilera
<i>Fusarium</i> sp. ²	MAT-2	NT	<i>M. Indica</i>	MALÁSIA	KSU 4376	JF Leslie
<i>Fusarium</i> sp. ²	MAT-1	NT	<i>M. Indica</i>	MALÁSIA	KSU 4377	JF Leslie
<i>Fusarium</i> sp. ²	MAT-2	NT	<i>M. Indica</i>	MALÁSIA	KSU 4378	JF Leslie
<i>Fusarium</i> sp. ²	MAT-1	NT	<i>M. Indica</i>	MALÁSIA	KSU 4379	JF Leslie
<i>Fusarium</i> sp. ²	MAT-2	NT	<i>M. Indica</i>	MALÁSIA	KSU 4380	JF Leslie
<i>Fusarium</i> sp. ²	MAT-1	NT	<i>M. Indica</i>	MALÁSIA	KSU 4381	JF Leslie
<i>Fusarium</i> sp. ²	MAT-1	NT	<i>M. Indica</i>	MALÁSIA	KSU 4382	JF Leslie
<i>Fusarium</i> sp. ²	MAT-2	NT	<i>M. Indica</i>	MALÁSIA	KSU 4383	JF Leslie
<i>Fusarium</i> sp. ²	MAT-2	NT	<i>M. Indica</i>	MALÁSIA	KSU 4384	JF Leslie
<i>Fusarium</i> sp. ²	ND	NT	<i>M. Indica</i>	EGITO	KSU 4699	JF Leslie

^a *Fusarium* sp.¹ refere-se à nova espécie biológica/filogenética de *Fusarium* associada à malformação da mangueira no Brasil. *Fusarium* sp.² refere-se aos isolados não estudados em detalhe neste estudo.

^b Idiomorfos de *mating type* identificados por PCR. ND= não definido; NT= não testado.

^c Fertilidade dos isolados testados. H= hermafrodita; ND= não definida; NF= não fértil; NT= não testado; M= fêmea estéril.

^d MF= malformação floral; MV= malformação vegetativa; ND= não definido; SS= inflorescência sem sintoma.

^e BA= isolados do estado da Bahia, Brasil; CE= isolados do estado do Ceará, Brasil; MG= isolados do estado de Minas Gerais, Brasil; MT= isolados do estado de Mato Grosso, Brasil; PE= isolados do estado de Pernambuco, Brasil; SP= isolados do estado de São Paulo, Brasil.

^f Abreviações das coleções de culturas: BBA= *Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft*, Berlin, Alemanha; CML= Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; KSU= *Kansas State University*, Departamento de Fitopatologia, Manhattan, Kansas, EUA; MRC= *Medical Research Council*, Tygerberg, África do Sul; NRRL= *Northern Regional Research Laboratory*, Peoria, Illinois, EUA.

^g Pesquisadores que nos enviaram isolados.

TABELA 2.2 Espécies de *Fusarium* do complexo *Gibberella fujikuroi* utilizadas nas análises de AFLP. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Espécie	MP ^a	Mating type ^b	Número de acesso ^c	Fonte ^d
<i>F. acutatum</i>			KSU 10769=MRC 7544	JF Leslie
<i>F. andiyazi</i>			KSU 10771= MRC 6123	JF Leslie
<i>F. begoniae</i>			KSU 10767=MRC 7542	JF Leslie
<i>F. brevicatenuatum</i>			KSU 10756=MRC 7531	JF Leslie
<i>F. bulbicola</i>			KSU 10759	JF Leslie
<i>F. circinatum</i>	MP H	MAT-1	KSU 10847	JF Leslie
<i>F. circinatum</i>	MP H	MAT-2	KSU10850	JF Leslie
<i>F. concentricum</i>			KSU 10765=MRC 7540	JF Leslie
<i>F. denticulatum</i>			KSU 10763=MRC 7538	JF Leslie
<i>F. fujikuroi</i>	MP C	MAT-1	KSU 1993	JF Leslie
<i>F. fujikuroi</i>	MP C	MAT-2	KSU 1995	JF Leslie
<i>F. guttiforme</i>			KSU10764=MRC 7539	JF Leslie
<i>F. lactis</i>			KSU 10757=MRC 7532	JF Leslie
<i>F. napiforme</i>			KSU 5015	JF Leslie
<i>F. nygamai</i>	MP G	MAT-1	KSU 5111	JF Leslie
<i>F. nygamai</i>	MP G	MAT-2	KSU 5112	JF Leslie
<i>F. proliferatum</i>	MP D	MAT-2	KSU 4853	JF Leslie
<i>F. proliferatum</i>	MP D	MAT-1	KSU 4854	JF Leslie
<i>F. pseudoanthophilum</i>			KSU 10755=MRC 7530	JF Leslie
<i>F. pseudocircinatum</i>			KSU 10761=MRC 7536	JF Leslie
<i>F. pseudonygamai</i>			KSU 10770=MRC 4012	JF Leslie
<i>F. ramigenum</i>			KSU 10769=MRC 7535	JF Leslie
<i>F. sacchari</i>	MP B	MAT-2	KSU 3852	JF Leslie
<i>F. sacchari</i>	MP B	MAT-1	KSU 3853	JF Leslie
<i>F. subglutinans</i>	MP E	MAT-1	KSU 990	JF Leslie
<i>F. subglutinans</i>	MP E	MAT-2	KSU 2192	JF Leslie
<i>F. thapsinum</i>	MP F	MAT-1	KSU 4094	JF Leslie
<i>F. thapsinum</i>	MP F	MAT-2	KSU 4093	JF Leslie
<i>F. verticillioides</i>	MP A	MAT-1	KSU 149	JF Leslie
<i>F. verticillioides</i>	MP A	MAT-2	KSU 999	JF Leslie

^a MP= *Mating populations* ou espécies biológicas de *Gibberella fujikuroi* (A-H).

^b Isolados com *mating types* determinados por PCR.

^c Abreviações das coleções de culturas: KSU= *Kansas State University*, departamento de Fitopatologia, Manhattan, Kansas, EUA; MRC= *Medical Research Council*, Tygerberg, África do Sul.

^d Pesquisador que forneceu os isolados.

4.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada por dois protocolos que renderam DNA de alta qualidade; aquele obtido pelo protocolo I foi utilizado para as análises de AFLP e o obtido pelo protocolo II, para o seqüenciamento.

4.2.1 Protocolo I

Os isolados foram cultivados em meio completo líquido (Correl et al., 1987) e incubados em agitador (150 rpm) por dois dias, em temperatura ambiente (25°C a 28°C). O micélio foi coletado e macerado em cadinho, com pistilo após o congelamento com nitrogênio líquido. A seguir, aproximadamente 150 mg de micélio triturado foram adicionados em tubo de microcentrífuga e armazenados em *deep freezer* a -70°C até a extração de DNA ser realizada. A extração de DNA foi realizada utilizando-se um protocolo baseado em CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônia) (Murray & Thompson, 1980), modificado por Kerényi et al. (1999).

No tubo contendo a amostra de micélio pulverizado, foram adicionados 700 µL de tampão CTAB (2% de CTAB, 100 mM de Tris-HCl [pH 8,0], 20 mM de EDTA, 1,4 M de NaCl) e 7 µL de 2-mercaptoetanol. A amostra foi incubada, a 65°C, por 30 minutos e, em seguida, realizou-se a extração com clorofórmio:alcool-isoamílico (24:1), quando coletou-se a fase aquosa (sobrenadante) e precipitou-se o DNA com um volume igual de isopropanol, 600 µL. Em seguida, o pélete foi dissolvido em 600 µL de tampão TE 1x (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA; pH 7,4) e extraído em seqüência com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), mais uma vez coletando o sobrenadante (500 µL). Adicionaram-se 10 µg. mL⁻¹ de RNase A e incubou-se a 37°C, por 30 minutos. A seguir, o DNA foi precipitado em 500 µL de isopropanol (2-propanol). O pélete foi lavado duas vezes com etanol gelado a 70%, seco brevemente e ressuspendido em 50 µL de tampão TE 1x. O DNA foi quantificado

utilizando-se eletroforese em gel de agarose 1% por comparação da intensidade da banda, com DNA lambda digerido de bacteriófago-*Hind* III de peso conhecido.

4.2.2 Protocolo II

O micélio para a extração de DNA foi cultivado em extrato de malte líquido (2%) em agitação (100 rpm) por dois dias na temperatura de 25°C a 28°C. Este protocolo também foi adaptado de Murray & Thompson (1980) e também é baseado em CTAB. Cerca de 150 mg de micélio macerado em cadinho com nitrogênio líquido foram suspensos em 500 µL de um tampão de extração CTAB (100 mM de Tris-HCl [pH 8,0]; 500 mM de NaCl; 50 mM de EDTA [pH 8,0]; CTAB 2%), sendo 1 µL de β-mercaptoetanol e 1 % de polivinilpirolidone (p/vol.) adicionados ao tampão de extração. O material foi incubado a 65°C por 30 minutos e, em seguida, foram adicionados 700 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante (540 µL) foi resgatado em novo tubo e adicionaram-se, mais uma vez, 700 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após a centrifugação, foram resgatados 400 µL da fase aquosa e adicionados a esta 400 µL de isopropanol. A seguir, o pélete foi lavado com etanol a 70% e ressuspendido em 80 µL de TE 1x + 10 µg. mL⁻¹ de RNase A e incubado em banho-maria a 37°C, por 30 minutos. Seguido da digestão com RNase A, adicionaram-se 8 µL de acetato de sódio 3 M [pH 5,2] e 220 µL de etanol absoluto gelado, deixando sobre refrigeração para que houvesse a maior precipitação de DNA possível. Posteriormente, realizou-se centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm. O pélete foi lavado com etanol gelado 70%, seco e ressuspendido em 50 µL de TE 1x. O DNA foi quantificado utilizando-se

eletroforese em gel de agarose 1% e quantificado por comparação da intensidade da banda com DNA lambda de peso conhecido.

4.3 Reações e análises de AFLP

Os ensaios de AFLP foram realizados no Laboratório de Genética de Fungos, da *Kansas State University*, Manhattan, Kansas, EUA. Os padrões de AFLP (Vos et al., 1995) foram gerados como descrito por Saleh et al. (2003). As combinações de *primers EcoR I+GG / Mse I+CT*, *EcoR I+TT / Mse I+AC* e *EcoR I+AA / Mse I+TT* foram utilizadas na geração dos padrões de bandas, após o passo de pré-amplificação. O DNA foi digerido por completo com as enzimas *EcoR I* e *Mse I*, e os fragmentos gerados foram ligados com adaptadores de AFLP em um único passo, por 12 horas, em temperatura ambiente (21°C a 24 °C). Os fragmentos digeridos e ligados foram diluídos com água (1:20) antes do passo da pré-amplificação. As amostras foram pré-amplificadas utilizando-se os seguintes ciclos de PCR (reação em cadeia da polimerase): 1 ciclo a 94°C por 3 minutos; 20 ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 60 segundos, e 72°C por 60 segundos; seguido por um passo final de 72°C por 5 minutos; e então, mantidas a 4°C, indefinidamente.

As reações pré-amplificadas foram diluídas com água (1:50) antes da amplificação final específica de AFLP. Os *primers* da *EcoR I*, para a amplificação específica, foram marcados na região 3' com ATP γ -³³P. Para a reação específica final de AFLP, foram utilizados 1,3 μ L da reação de pré-amplificação diluída, perfazendo um volume final de 5 μ L. O programa da PCR para a amplificação de AFLP foi: 1 ciclo a 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos, e 72°C por 30 segundos; este ciclo foi seguido por 12 ciclos, nos quais a temperatura de anelamento foi reduzida a cada ciclo em 0,7°C, de 65°C até 56°C. Em seguida, foram realizados 23 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, e 72°C por 60 segundos; seguido por um passo final de 72°C

por 5 minutos; e então, mantido a 4°C, indefinidamente. Posteriormente, os fragmentos de AFLP foram separados em géis desnaturantes de poliacrilamida a 6% (solução *Long Ranger*; *FMC Scientific, Rockland, ME*) com tampão TBE 1x (100 mM de Tris base, 100 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA, pH 8,0) no gel e no tampão de corrida.

Foram aplicados 60 W de potência para as corridas dos géis, até que o marcador *xylene cyanol* (*Sigma-Aldrich, St. Louis*) corresse aproximadamente 22 cm. Em seguida, os géis foram transferidos para papel 3MW (*Midwest Scientific, Valley Park, MO*) e secos antes de serem expostos aos filmes de raios X (*Classic Blue Sensitive*; *Midwest Scientific*) por 3 a 7 dias à temperatura ambiente, para, então, serem revelados. Bandas entre 100 e 800 pares de bases em tamanho foram analisadas manualmente e uma matriz de 0 e 1 foi gerada, em que '1' correspondeu à presença do alelo (banda) e '0' representou a ausência do alelo.

Nas análises, foi considerado que as bandas de mesmo peso molecular, em diferentes isolados, eram homólogas. O método UPGMA (agrupamento de pares não ponderados com base na média aritmética) foi selecionado em análises utilizando o programa PAUP (análises filogenéticas utilizando parcimônia) 4.0 versão beta 10 (Swofford, 2000) para a construção de dendrogramas (fenogramas) dos isolados do Brasil, comparados com *F. mangiferae* e *F. sterilihyphosum*, e para determinar o número de haplotipos presentes.

Após a primeira análise, foram selecionados os isolados representando a diversidade da população do Brasil para serem utilizados em uma nova análise, comparando-os com *F. mangiferae* e *F. sterilihyphosum*, e mais 22 espécies do CGF. Para o cálculo das similaridades finais de UPGMA, foi utilizado o coeficiente de Dice (Nei, 1972) na opção de análise de agrupamento (*cluster analyses*) do programa SAS (versão 8.1, Instituto SAS, Cary, Carolina do Norte, EUA). Os dados de AFLP foram também analisados utilizando-se o método de máxima parcimônia no programa PAUP para o cálculo dos índices de

consistência e de homoplasia. Os resultados das análises foram comparados com a filogenia gerada a partir de seqüências dos genes *β-tubulina* e *fator de alongação-1α* (TEF-1α) para testar o valor filogenético das análises de dados de AFLP para o CGF. As topologias das árvores foram avaliadas por meio de análise de *bootstrap*, utilizando-se 1000 repetições.

4.4 Seqüenciamento de DNA e análises filogenéticas

Foram obtidas, da base de dados do *National Center for Biotechnological Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), seqüências de DNA de *β-tubulina* e *fator de alongação-1α* que foram previamente depositadas no *GenBank* por O'Donnell et al. (1998, 2000), Aoki et al. (2001) e Geiser et al. (2005). Os *primers* Ef-1 (senso; 5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') e Ef-2 (antisenso; 5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') foram utilizados para a amplificação de um fragmento de aproximadamente 640 bp do gene *fator de alongação-1α* de isolados do Brasil, representantes dos agrupamentos observados na análise de AFLP. Para a amplificação de um fragmento de aproximadamente 540 pb do gene *β-tubulina*, foram utilizados os *primers* T1 (senso; 5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3') e T2 (antisenso; 5'-TAGTGACCCCTGGCCCAGTTG-3'). As reações de PCR foram realizadas como descrito por O'Donnell et al. (1998) e Geiser et al. (2004) para *TEF-1α* e por O'Donnell & Cigelnik (1997) para *β-tubulina*.

Os fragmentos gênicos amplificados por PCR dos genes *β-tubulina* e *fator de alongação-1α* foram seqüenciados nas direções senso e antiseno em um seqüenciador automático MEGA BACE[®], no Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA. Os eletroferogramas gerados no seqüenciamento foram analisados visualmente com o auxílio do programa BioEdit[®] (Hall, 1999) e as

seqüências comparadas na bases de dados do NCBI por meio de BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>).

Foram gerados alinhamentos múltiplos de seqüências nucleotídicas de espécies filogenéticas do CGF, juntamente com os representantes da população de *Fusarium* do Brasil, obtidos de malformação da mangueira, utilizando-se o programa CLUSTALW (Thompson et al., 1994). Os alinhamentos foram corrigidos manualmente e as análises filogenéticas foram realizadas no programa PAUP 4.0 versão beta 10. As opções selecionadas para a análise de máxima parcimônia foram: buscas heurísticas, *tree-bisection-reconnection* (TBR), *branch swapping* e MULTREES. Cada *gap* foi considerado como um quinto caractere nas análises (*newstate*). As análises de *bootstrap* foram realizadas com 1.000 repetições. *Fusarium oxysporum* e *Fusarium inflexum* foram utilizados como *outgroup*, em todas as análises. Foram geradas árvores filogenéticas para cada gene em separado e para a combinação de *β -tubulina* com *fator de alongação-1 α* . Os alinhamentos estão disponíveis mediante requisição aos autores. As seqüências de *Fusarium* sp. e *Fusarium sterilihyphosum* do Brasil foram depositadas no GenBank, NCBI.

5 RESULTADOS

5.1 Morfologia

Foram estudados 34 isolados do Brasil e os ex-holotipos de *F. mangiferae* e *F. sterilihyphosum*. Pela comparação das características morfológicas dos isolados cultivados em SNA, sob as mesmas condições utilizadas por Britz et al. (2002), foi observado que os isolados CML 262, CML 282, CML 383, CML 385 e CML 389 possuíam hifa estéril espiralada, bem como *F. sterilihyphosum* MRC 2802, MRC 8101 e MRC 8095. Todos os outros 29 isolados do Brasil foram morfológicamente iguais a *F. mangiferae* MRC 2730 e MRC 7559. A coloração da colônia em PDA variou de branco a roxo-escuro. Os resultados dos estudos morfológicos são apresentados e discutidos em mais detalhe no capítulo 3 (Figuras 3.1 e 3.2).

5.2 Diversidade da população de *Fusarium* sp. do Brasil, determinada por AFLP

Foram analisadas 331 bandas entre 200 e 800 pb para a combinação de *primers* EGG/MCT + ETT/MAC + EAA/MTT. Na análise UPGMA, foram observados três padrões distintos de bandas que corresponderam a três grupos de isolados. O primeiro grupo continha trinta isolados, somente do Brasil, enquanto que o segundo grupo apresentou seis isolados (4 isolados do Brasil e 2 isolados de *F. sterilihyphosum* da África do Sul). Já o terceiro grupo, representado por 6 isolados da África do Sul, Egito, EUA e Índia, correspondeu à espécie *F. mangiferae*. Todos os três grupos foram fortemente apoiados na análise de *bootstrap* (100 %) (Figura 2.1).

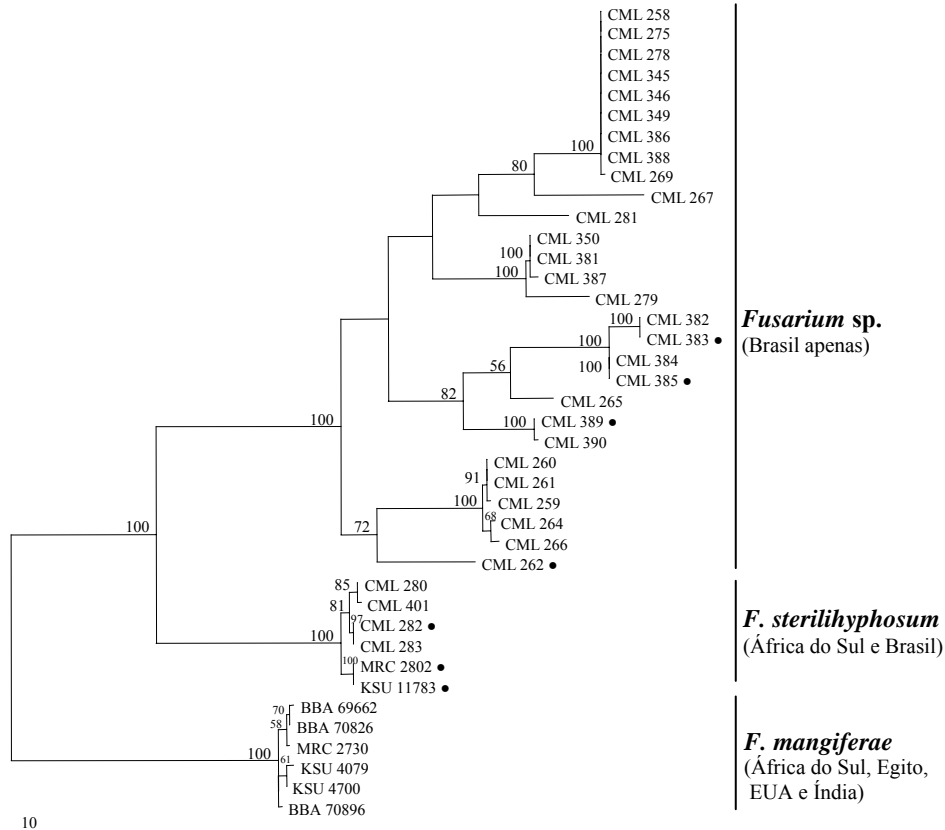


FIGURA 2.1 Análise de UPGMA para *F. mangiferae*, *F. sterilihyphosum* e *Fusarium* sp. do Brasil, com base em comparações de padrões de AFLP gerados com os pares de primers EGG-MCT, ETT-MAC e EAA-MTT. Um ponto negro ao lado do número do isolado indica a presença de hifa estéril espiralada. Bandas analisadas entre 200-800 pb (331 marcadores). Números acima dos ramos representam os valores de *bootstrap* para 1000 repetições. O número de mudanças nas bandas de AFLP é indicado pela escala na base do dendrograma. Abreviações das coleções de culturas: BBA= *Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft*; CML= Coleção Micológica de Lavras; KSU= *Kansas State University*; MRC= *Medical Research Council*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Para o cálculo da similaridade genética (coeficiente de Dice) entre os isolados do Brasil e *F. mangiferae* e *F. sterilihyphosum*, foram analisadas 215 bandas entre 200-800 pb para a combinação dos *primers* EGG/MCT + ETT/MAC. A similaridade genética total, calculada por meio do coeficiente de Dice, entre os isolados do Brasil e *F. sterilihyphosum* foi 40% e, entre os isolados do Brasil e *F. mangiferae* foi inferior a 20%. Dentro da população de isolados do Brasil, a similaridade genética variou de 65% a 100%. Foram também observados 15 haplotipos na população dos isolados de *Fusarium* sp. do Brasil, em que o haplotipo com o maior número de isolados possuiu 9 indivíduos, enquanto que os outros 14 haplotipos não continham mais do que 2 isolados cada (Figura 2.2). A grande quantidade observada de haplotipos reflete a alta variabilidade genética da população de *Fusarium* sp. do Brasil.

5.3 Avaliação da utilização de AFLP na comparação de espécies do complexo *Gibberella fujikuroi*

Nas comparações dos representantes da população do Brasil de *Fusarium* com as 24 espécies filogenéticas do CGF, incluindo-se 8 *mating populations* ou espécies biológicas, foi utilizada a combinação de *primers* EGG/MCT + ETT/MAC. Um total de 409 foi analisado entre o intervalo de 100-800 pb. Foi gerado, na análise UPGMA, um dendrograma das similaridades genéticas entre as espécies estudadas, muito semelhante à filogenia de genes obtida por O'Donnell et al. (1998, 2000). Os três grupos filogeográficos (africano, americano e asiático) observados por O'Donnell et al. (1998, 2000), foram também aqui observados. Os isolados do Brasil foram posicionados no clado americano, próximo à *F. sterilihyphosum*. Foi também observado, na análise de *bootstrap* (1.000 repetições), que todas as *mating populations* do CGF tiveram um forte suporte, bem como o grupo representante da população do Brasil e o grupo representado por isolados de *F. sterilihyphosum*.

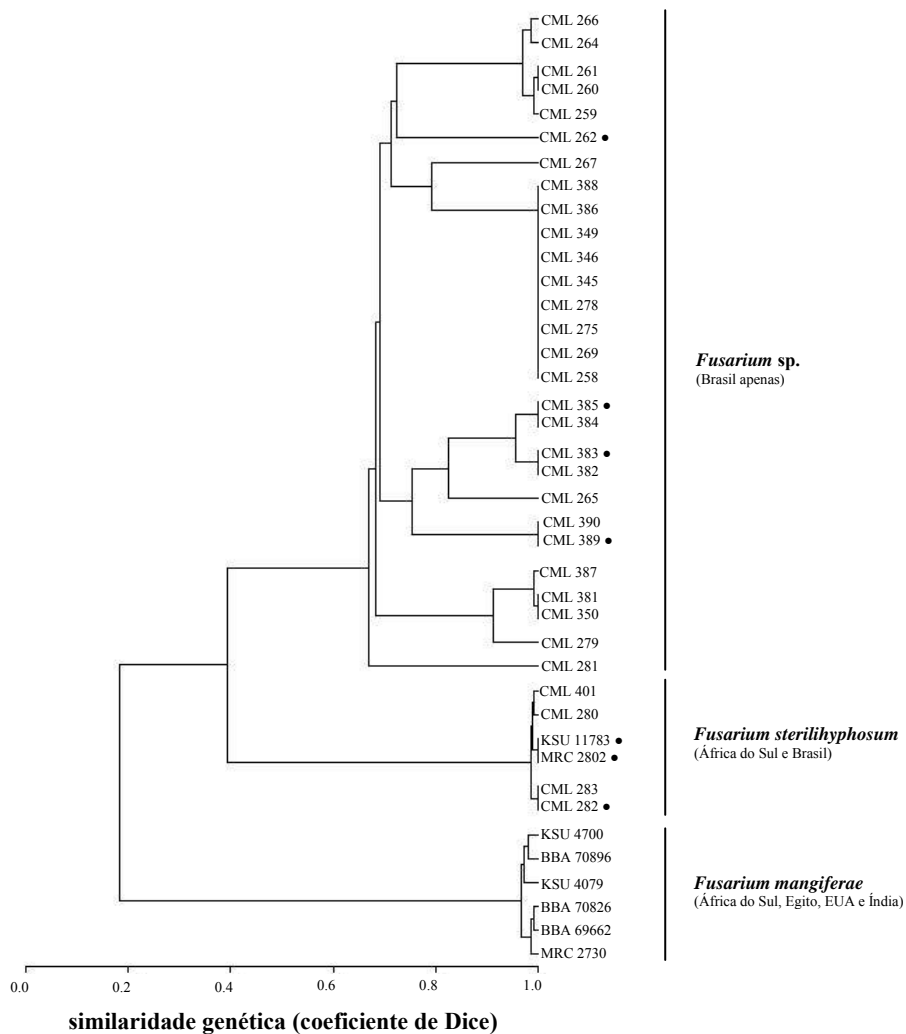


FIGURA 2.2 Dendrograma das similaridade genéticas entre *Fusarium sp.* do Brasil, *Fusarium sterilihyphosum* e *Fusarium mangiferae*. Bandas de AFLP analisadas entre 200-800 pb (215 marcadores), primers EGG-MCT e ETT-MAC. Um ponto negro ao lado do número do isolado indica a presença de hifa estéril espiralada. Abreviações das coleções de culturas: BBA= *Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft*; CML= Coleção Micológica de Lavras; KSU= *Kansas State University*; MRC= *Medical Research Council*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

O clado africano não foi apoiado pela análise de *bootstrap*, enquanto que, os clados americano e asiático, tiveram um suporte de 77% e 63%, respectivamente (Figura 2.3). É possível que um maior suporte na análise de *bootstrap* seja alcançado, se uma maior quantidade de dados de AFLP for incluída na análise e que estes dados sejam gerados a partir de bandas com maior peso molecular (entre 300 e 800 bp). Foram também observados uma alta homoplasia (HI 0,742) e um baixo índice de consistência (CI=0,258) na análise de máxima parcimônia.

Para o cálculo das similaridades genéticas no CGF, foram analisadas 202 bandas entre o intervalo de 300 a 800 pb para a combinação dos *primers* EGG/MCT + ETT/MAC. A similaridade genética como um todo entre todas as espécies do CGF, incluindo a população do Brasil, variou de 25% a 58%. Na comparação global, as espécies *Fusarium subglutinans* (Wollenweber & Reinking) Nelson, Toussoun & Marasas MP E e *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell MP H foram as mais similares geneticamente (Figura 2.4).

5.4 Análise das seqüências de DNA

Baseando-se nos resultados da análise de AFLP, foram seqüenciados fragmentos dos genes que codificam a β -tubulina e o TEF-1 α para três isolados (CML 262, CML 345 e CML 389) representantes da variação genética existente na população do Brasil, de isolados obtidos de malformação da mangueira e um isolado (CML 283) representando o alelo seqüenciado que foi o mesmo para os quatro isolados de *F. sterilihyphosum* do Brasil. As seqüências dos dois genes para os isolados do Brasil foram comparadas com seqüências depositadas no GenBank por meio de BLAST, em que *F. sterilihyphosum* foi a espécie com maior identidade de seqüências.

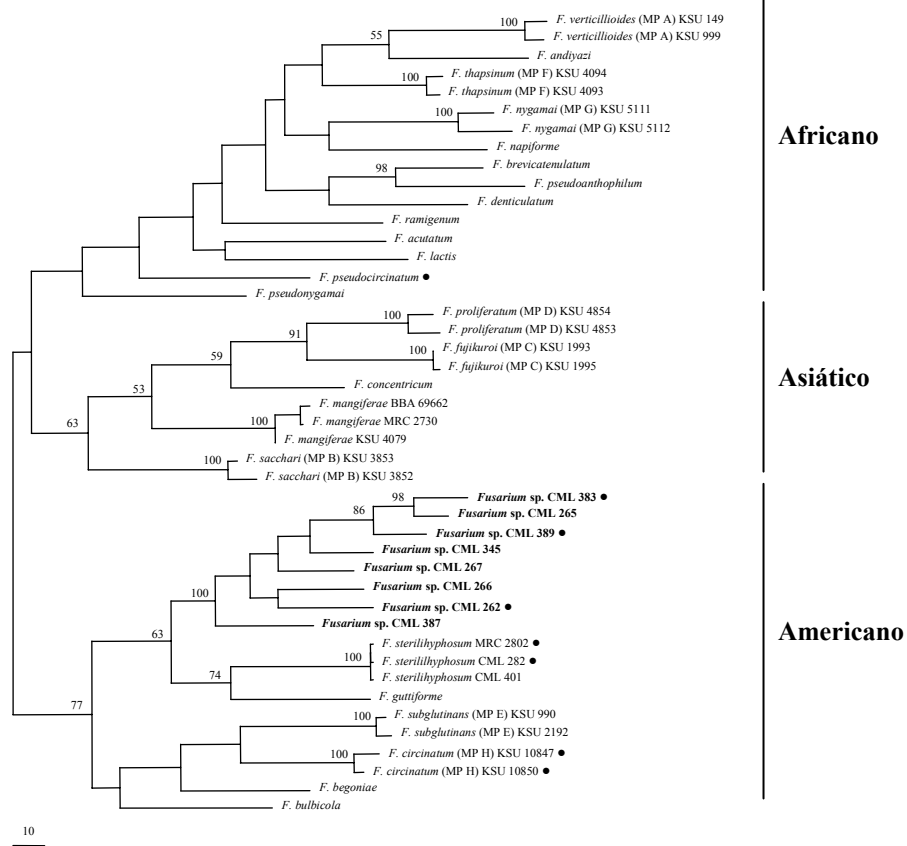


FIGURA 2.3 Análise de UPGMA para *Fusarium* sp. do Brasil (negrito) e espécies do complexo *Gibberella fujikuroi*, com base em comparações de padrões de AFLP dos primers EGG-MCT e ETT-MAC. Um ponto negro ao lado do número do isolado indica a presença de hifa estéril espiralada. Números acima dos ramos representam os valores de *bootstrap* para 1.000 repetições. O número de mudanças nas bandas de AFLP é indicado pela escala na base do dendrograma. Bandas analisadas entre 100-800 pb (490 marcadores). As barras à direita indicam os três grandes clados do complexo *Gibberella fujikuroi*: americano, asiático e africano. MP= *Mating populations* (A-H). Abreviações das coleções de culturas: BBA= *Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft*; CML= Coleção Micológica de Lavras; KSU= *Kansas State University*; MRC= *Medical Research Council*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

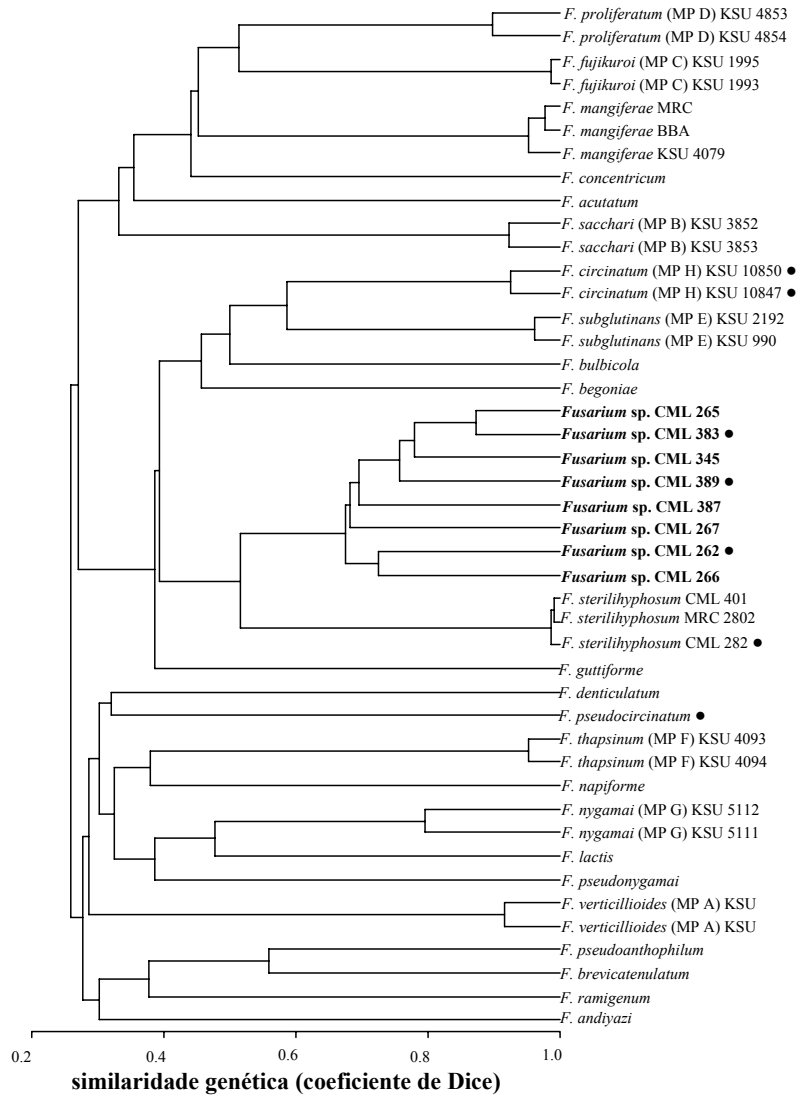


FIGURA 2.4 Dendrograma das similaridades genéticas entre *Fusarium* sp. do Brasil (negrito) e espécies do complexo *Gibberella fujikuroi*. Bandas de AFLP analisadas entre 300-800 pb (202 marcadores), *primers* EGG-MCT e ETT-MAC. Um ponto negro ao lado do número do isolado indica a presença de hifa estéril espiralada. MP= *Mating populations* (A-H). Abreviações das coleções de culturas: BBA= *Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft*; CML= Coleção Micológica de Lavras; KSU= *Kansas State University*; MRC= *Medical Research Council*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Os fragmentos seqüenciados de *β -tubulina* apresentaram comprimento de ~540 pb, para todos os isolados. A identidade de nucleotídeos entre as seqüências dos isolados CML 262, CML 345 e CML 389 variou de 98,8% a 99,8%. A seqüência do isolado CML 283 foi 100% idêntica a *F. sterilihyphosum* MRC 8101. Já a seqüência do isolado CML 262 foi a que teve a menor identidade com a de *F. sterilihyphosum* (98,5%), enquanto que a maior identidade foi observada com o isolado CML 389 (99,4%).

Foram seqüenciados segmentos de ~640 pb de comprimento do gene *TEF-1 α* a partir do DNA dos isolados. A identidade de seqüências entre os isolados CML 262, CML 345 e CML 389 variou de 99,5% a 99,8%. O isolado CML 283 apresentou seqüência idêntica (100%) a *F. sterilihyphosum* NRRL 25623. A seqüência do isolado CML 389 teve maior identidade com *F. sterilihyphosum* NRRL 25623 (99,5%), enquanto que a seqüência do isolado CML 345 teve a menor identidade (99,2%).

5.5 Filogenia dos isolados obtidos de mangueiras no Brasil

Seqüências de *β -tubulina* e *TEF-1 α* dos isolados CML 262, CML 283, CML 345 e CML 389 foram inseridas em um alinhamento com as espécies filogenéticas do CGF e analisadas pelo método de máxima parcimônia. Na análise das seqüências de *β -tubulina*, as buscas heurísticas identificaram 143 árvores de máxima parcimônia, das quais foi selecionada apenas uma que mais se aproximava da filogenia do CGF (em geral, as árvores diferiram sutilmente apenas em ramos que não foram apoiados na análise de *bootstrap*) (Figura 2.5). Já na análise das seqüências do *TEF-1 α* , foram geradas 128 árvores de máxima parcimônia, das quais foi selecionada apenas uma, seguindo-se o mesmo critério citado anteriormente (Figura 2.6). Em trabalhos anteriores foi mostrado que os dois genes podem ser combinados.

Árvore de MP para β -tubulina

551 caracteres
 1 de 143 árvores
 Comprimento 206
 CI 0,835
 RI 0,929
 HI 0,165

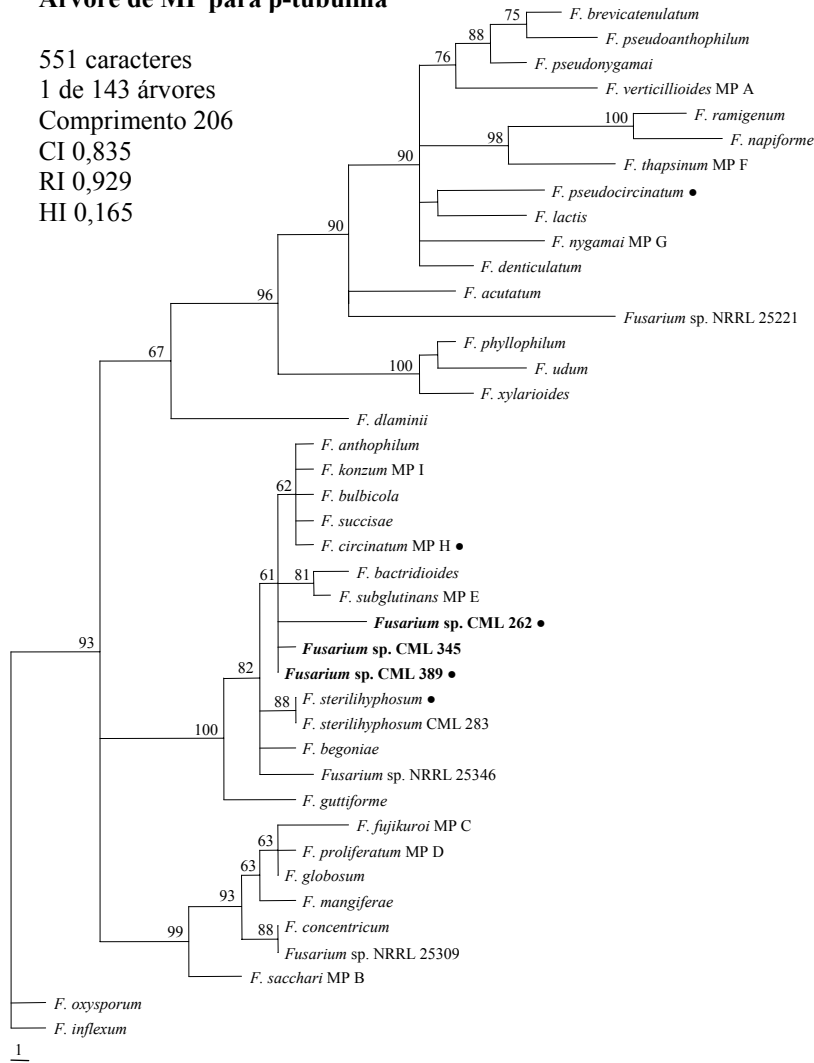


FIGURA 2.5 Árvore filogenética de máxima parcimônia para o gene β -tubulin de espécies do complexo *Gibberella fujikuroi*, incluindo isolados de malformação da mangueira do Brasil (em negrito). Um ponto negro ao lado do número do isolado indica a presença de hifa estéril espiralada. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de *bootstrap* (1000 repetições) são indicados em porcentagem nos internódios. Esta árvore tem como raiz *F. oxysporum* e *F. inflexum*. MP= *Mating populations* (A-I). Abreviações das coleções de culturas: CML= Coleção Micológica de Lavras; NRRL= *Northern Regional Research Laboratory*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Árvore de MP para TEF-1 α

698 caracteres
 1 de 128 árvores
 Comprimento 688
 CI 0,584
 RI 0,771
 HI 0,416

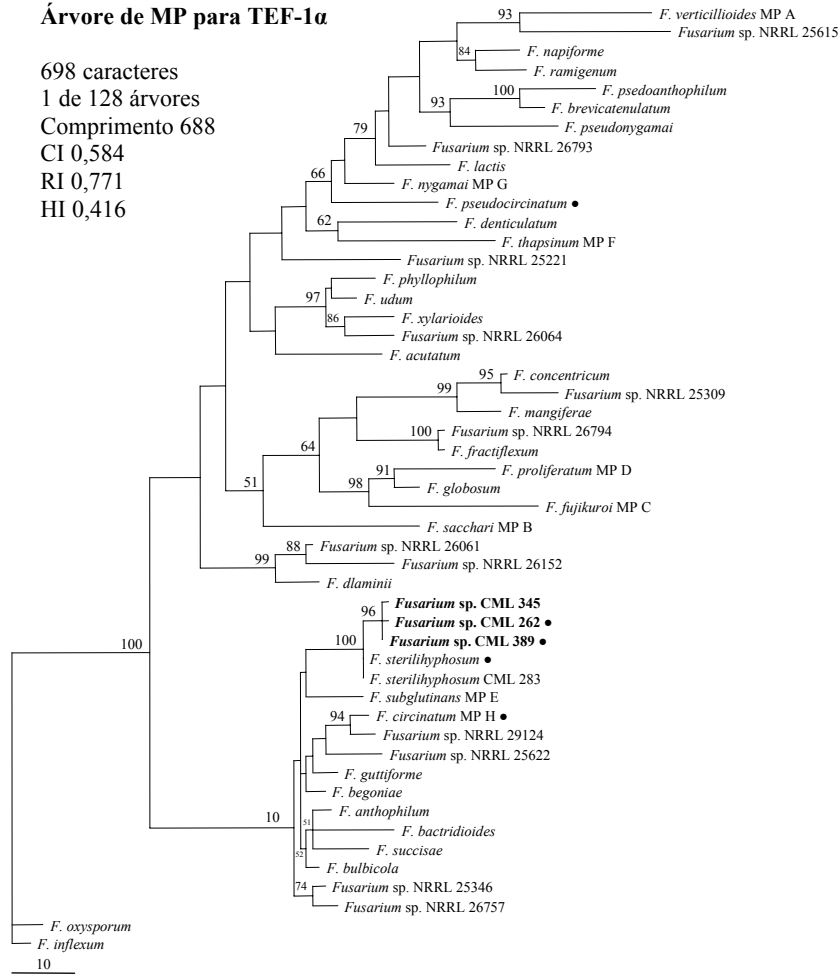


FIGURA 2.6 Árvore filogenética de máxima parcimônia de *TEF-1 α* de espécies do complexo *Gibberella fujikuroi*, incluindo isolados de *Fusarium* sp. do Brasil (negrito). Um ponto negro ao lado do número do isolado indica a presença de hifa estéril espiralada. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) indicados em porcentagem nos internódios. Esta árvore tem como raiz *F. oxysporum* e *F. inflexum*. MP= *Mating populations* (A-H). Abreviações das coleções de culturas: CML= Coleção Micológica de Lavras; NRRL= *Northern Regional Research Laboratory*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Em ambas as árvores selecionadas para os dois genes em estudo, os isolados CML 262, CML 345 e CML 389 se posicionaram em um grupo filogeneticamente distinto, enquanto que o isolado CML 283 agrupou com *F. sterilihyphosum* em outro grupo também filogeneticamente distinto. Nas análises de *bootstrap* da árvore de β -*tubulina*, o grupo representado pela espécie *F. sterilihyphosum* recebeu um suporte de 88%. Entretanto, o grupo representado pelos isolados CML 262, CML 345 e CML 389 não teve suporte na análise de *bootstrap*. Na análise de *bootstrap* para o gene *TEF-1 α* , o grupo dos isolados da população de *Fusarium* sp. do Brasil (CML 262, CML 345 e CML 389) recebeu um suporte de 96%, porém, o grupo representado por *F. sterilihyphosum* não foi apoiado.

De modo geral, o agrupamento observado para ambos os genes foi muito similar. Devido a isso, as seqüências dos genes β -*tubulina* e *TEF-1 α* foram agrupadas em um único alinhamento. O alinhamento combinado foi então analisado utilizando-se o critério de máxima parcimônia, resultando em duas árvores quase idênticas, das quais foi selecionada uma (Figura 2.7). A árvore selecionada apresentou alta resolução e, claramente, separou a nova espécie do Brasil (isolados CML 262, CML 345 e CML 389) em um grupo com suporte de 97%, na análise de *bootstrap* e a espécie *F. sterilihyphosum* agrupou juntamente com o isolado CML 283 em outro grupo apoiado em 91% na análise de *bootstrap*. Nenhuma das espécies filogenéticas de O'Donnell et al. (1998, 2000) agrupou com a espécie do Brasil, sendo *F. sterilihyphosum* a espécie mais próxima e compartilhando o mesmo ancestral mais recente. Estes resultados estão de acordo com os resultados da análise de AFLP. Em todas as análises, os isolados de *Fusarium* sp. do Brasil agruparam no clado americano de O'Donnell et al. (1998, 2000) e as relações filogenéticas no CGF foram reproduzidas de acordo como descrito pelos autores acima citados.

Árvore de MP para EF-1 α + β -tubulina

1252 caracteres
 1 de 2 árvores
 Comprimento 816
 CI 0,659
 RI 0,804
 HI 0,341

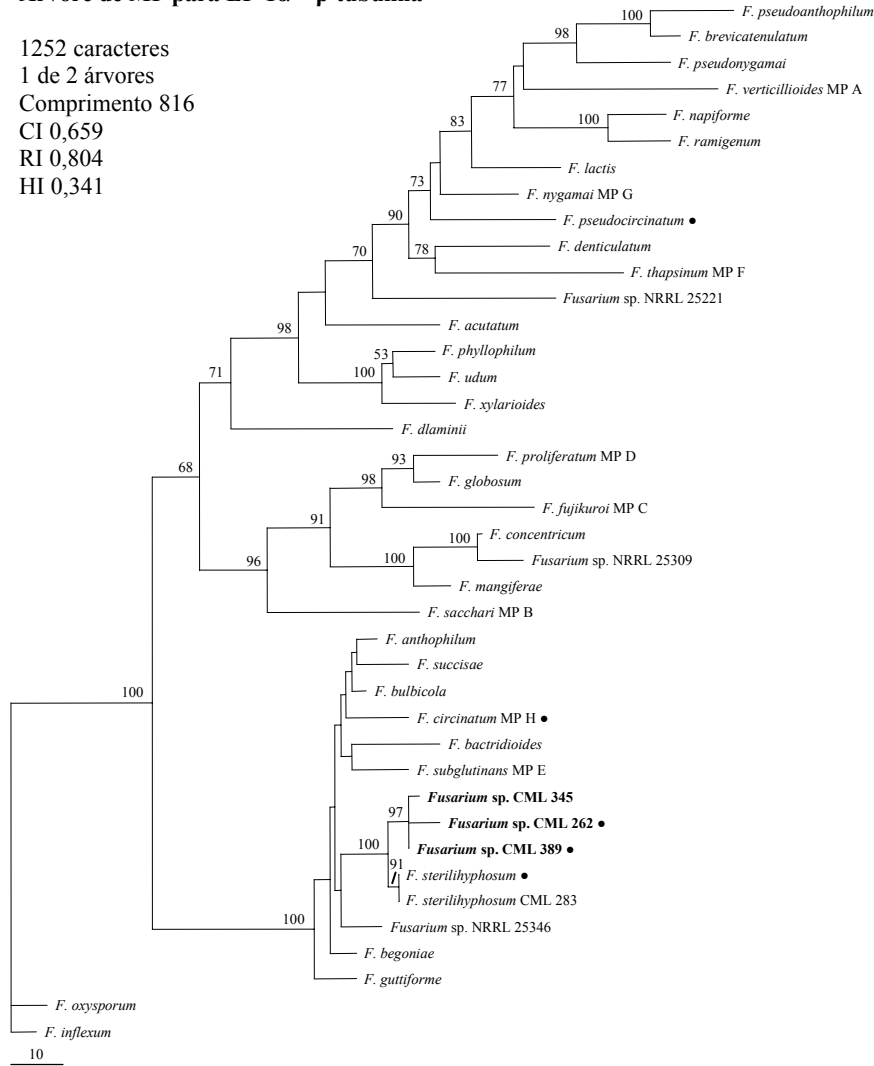


FIGURA 2.7 Árvore filogenética de máxima parcimônia de seqüências combinadas de β -tubulina e TEF-1 α de espécies do complexo *Gibberella fujikuroi* e *Fusarium* sp. do Brasil (negrito). Um ponto negro ao lado do número do isolado indica a presença de hifa estéril espiralada. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) indicados nos internódios. Esta árvore tem como raiz *F. oxysporum* e *F. inflexum*. MP= *Mating populations* (A-H). Abreviações das coleções de culturas: CML= Coleção Micológica de Lavras; NRRL= *Northern Regional Research Laboratory*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

6 DISCUSSÃO

Este trabalho tem o mérito de descrever o primeiro relato da caracterização molecular de isolados de *Fusarium* associados à malformação da mangueira no Brasil. Os resultados geraram informações que embasaram a identificação e descrição de uma nova população associada à malformação da mangueira no Brasil (Capítulo 3 desta tese).

Com a descrição de *F. mangiferae* e *F. sterilihyphosum* como espécies novas do CGF, com *F. mangiferae* associado à malformação da mangueira em vários países produtores de manga e a hipótese de que *F. sterilihyphosum* poderia estar presente nas Américas (O'Donnell et al., 2000; Britz et al., 2002; Zheng & Ploetz, 2002), houve a necessidade de se analisar, por meio de técnicas avançadas de sistemática de fungos, a população de *Fusarium* associada à malformação da mangueira no Brasil. O objetivo foi definir qual o agente causal da malformação nas áreas produtoras, visto que, até então, os nomes aqui descritos como agentes etiológicos desta doença, *Fusarium sacchari* (E. J. Butler) W. Gams e *F. subglutinans*, foram aplicados com base apenas em morfologia.

Por meio de caracterização morfológica, de uma coleção de isolados das mais diferentes localidades do Brasil, foi observado que alguns deles possuíam hifa estéril espiralada, como previamente relatado (Zheng & Ploetz, 2002). Entretanto, a grande maioria dos isolados recuperados de ramos vegetativos e inflorescências de mangueira, no Brasil, não possuíam hifa estéril espiralada e foram identificados como sendo da espécie *F. mangiferae*. Para confirmar as identificações morfológicas, foi então seqüenciada parte dos genes da histona-H3 e β -tubulina de alguns isolados com e sem a hifa estéril espiralada (dados não mostrados, Lima et al., 2004b). Surpreendentemente, os isolados

previamente identificados morfológicamente como sendo *F. mangiferae* e *F. sterilhyphosum* agruparam juntos em uma árvore filogenética gerada pelo método de máxima parcimônia. No entanto, o grupo representado pelos isolados do Brasil formaram um grupo próximo, mas distinto do holótipo de *F. sterilhyphosum* MRC 2802. Com isso, foi necessário a utilização de mais uma técnica de caracterização de populações para reforçar a hipótese de que a maioria dos isolados do Brasil pertencem a uma nova espécie filogenética do CGF. Desse modo, foi utilizada a técnica de AFLP, considerada uma ferramenta eficiente na separação de espécies do CGF (Marasas et al., 2001; Zeller et al., 2003; Leslie et al., 2001), com o objetivo de definir as relações genéticas entre a população de isolados do Brasil e *F. mangiferae* e *F. sterilhyphosum*, bem como entender a sua estrutura populacional.

No estudo de AFLPs foram também incluídos 17 isolados da África do Sul, Egito, EUA e Índia. Como resultado, não foi observada correlação entre a presença de hifa espiralada e os agrupamentos de AFLP; também não foi observada correlação entre subgrupos de isolados e localização geográfica dentro do Brasil, o que pode ser explicado pelo fato de as espécies de *Fusarium* associadas com a malformação serem supostamente disseminadas pelo transporte de material vegetal entre as regiões produtoras (Ploetz, 2001). Na análise de AFLP, os isolados do Brasil foram divididos em dois grupos: em um grupo, estavam presentes quatro isolados do Brasil (identificados como *F. sterilhyphosum*), juntamente como holótipo de *F. sterilhyphosum* MRC 2802 da África do Sul; e, no outro grupo, 30 isolados do Brasil. Em um terceiro grupo se posicionou o paratipo de *F. mangiferae* MRC 2730 da África do Sul, juntamente com isolados provenientes do Egito, EUA e Índia (identificados como *F. mangiferae*). Os três grupos identificados foram fortemente apoiados pela análise de *bootstrap* (100% de suporte) e pela análise de agrupamento utilizando o coeficiente de Dice (similaridade genética máxima de 40%).

A similaridade genética de 40% observada entre *Fusarium* sp. do Brasil e *F. sterilihyphosum* é suficiente para a separação de duas espécies biológicas do CGF (Leslie et al., 2001; Zeller et al., 2003). Vários subgrupos foram observados dentre os isolados do Brasil, mas, a similaridade genética mínima foi de 65% enquanto que a máxima foi de 100%. Esta faixa está de acordo com Leslie et al. (2001), que estabeleceram que a similaridade de bandas de AFLP dentro de uma espécie do CGF deve ser de, no mínimo, 65% a 70%. Estes resultados mostram que a nova espécie associada à malformação no Brasil possui maior variação genética do que aquela encontrada em *F. mangiferae* e *F. sterilihyphosum* (Figura 2.2). É possível que esta variação seja devido às grandes dimensões geográficas e diferentes microclimas existentes no Brasil, aliados à reprodução sexuada. Entretanto, apesar do tamanho da amostra ser grande em comparação com a maioria dos estudos já realizados com *Fusarium*, em termos de genética de populações é pequena para provar a existência de grupos clonais localizados.

Na outra análise de AFLP, utilizando representantes de *Fusarium* sp. do Brasil, juntamente com 24 espécies do GFC, foi mostrado que as espécies mais próximas da espécie do Brasil são: *F. sterilihyphosum* e *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell. Outro resultado interessante foi que o dendrograma gerado pelo método UPGMA foi muito semelhante à filogenia do CGF gerada a partir da análise combinada de cinco genes (O'Donnell et al., 1998, 2000). Os cladogramas asiático e americano tiveram o suporte de 63% e 77% na análise de *bootstrap*, respectivamente, enquanto que o clado africano não recebeu suporte. É possível que o suporte do dendrograma, gerado a partir dos dados de AFLP, seja aumentado na análise de *bootstrap*, pelo uso de uma quantidade maior de dados na análise, como é feito para as genealogias de genes quando se necessita de uma maior resolução (O'Donnell et al., 1998, 2000; Geiser et al., 2005). Foi observada alta homoplasia e baixo índice de consistência quando os dados de

AFLP foram analisados pelo método de máxima parcimônia. Baayen et al. (2000) utilizaram AFLPs e análise filogenética dos genes *TEF-1 α* e *mtSSU rDNA*, no estudo de *formae speciales* de *F. oxysporum*, agentes causais de murcha e podridão em várias plantas cultivadas. Estes pesquisadores observaram, também, um baixo índice de consistência na análise de máxima parcimônia dos dados de AFLP; no entanto, o dendrograma gerado foi muito semelhante e com resolução superior à árvore gerada pela análise combinada dos genes *TEF-1 α* e *mtSSU rDNA*. Baayen et al. (2000) sugeriram que, ao se combinar um método como o AFLP, o qual faz uma amostragem dos *loci* em todo o genoma do organismo, com genealogias de genes, os agrupamentos observados provavelmente irão refletir medições independentes da história evolucionária dos organismos em estudo.

Para complementar os resultados obtidos na análise de AFLP, foram seqüenciados fragmentos das seqüências dos genes *β -tubulina* e *TEF-1 α* de isolados representativos da espécie do Brasil e um isolado, dos quatro isolados de *F. sterilihyphosum* do Brasil. As seqüências dos três isolados selecionados representaram três alelos distintos, identificados dentre os isolados de *Fusarium* sp. do Brasil, mostrando que esta espécie também é variável nas seqüências de *β -tubulina* e *TEF-1 α* . Os quatro isolados de *F. sterilihyphosum* do Brasil apresentaram seqüências idênticas. A análise combinada de *β -tubulina* e *TEF-1 α* mostrou que *Fusarium* sp. do Brasil corresponde a um espécie irmã de *Fusarium sterilihyphosum* e que as duas apresentam o mesmo ancestral mais recente, com um forte suporte na análise de *bootstrap*. A árvore filogenética das seqüências combinadas de *β -tubulina* e *TEF-1 α* (Figura 2.7), teve a mesma topologia do dendrograma da análise UPGMA dos dados de AFLP (Figura 2.3), mostrando que a análise de dados de AFLP pode ser combinada à genealogia de genes, para estudos de espécies do CGF.

Marasas et al. (2001) foram os primeiros a observar a utilidade dos dados de AFLP para estudar espécies do CGF, em um grupo com 26 espécies e, posteriormente, Zeller et al. (2003) estudaram 11 espécies. Tanto a árvore de AFLP quanto a árvore de genes posicionaram *Fusarium* sp. do Brasil no clado americano de O'Donnell et al. (1998, 2000). Possivelmente, esta espécie nova deve ter evoluído no continente americano. Entretanto, para se provar esta hipótese seria necessário coletar isolados de *F. subglutinans sensu lato* de diversas plantas nativas do continente americano e encontrar, dentre eles, representantes desta espécie. Outra possibilidade, menos provável, é a de que *Fusarium* sp. do Brasil tenha vindo junto com germoplasma de mangueira nas várias introduções ocorridas no Brasil ao longo do tempo. A mangueira, *M. indica*, apresenta duas raças: a Indiana e a Filipínica; plantas da raça Filipínica foram introduzidas no Brasil pela primeira vez no século XVI, enquanto que plantas da raça Indiana, cultivares 'Haden' e 'Tommy Atkins', foram introduzidas recentemente, em 1931 e 1970, respectivamente, vindas da Flórida, EUA (Ferreira et al., 2002).

7 CONCLUSÕES

Nas condições da realização do trabalho, concluiu-se o seguinte:

1. *Fusarium* sp. do Brasil corresponde a uma espécie filogenética ainda não relatada do complexo *Gibberella fujikuroi*;
2. os dados de AFLP são úteis no estudo de espécies do complexo *Gibberella fujikuroi*;
3. a hifa estéril espiralada não deve ser utilizada como caráter diferencial em *Fusarium sterilihyphosum* e *Fusarium* sp. do Brasil;
4. *Fusarium sterilihyphosum* é relatado pela primeira vez no Brasil.

8 BIBLIOGRAFIA CITADA

ABDEL-SATAR, M. A.; KHALIL, M. S.; MOHMED, I. N.; ABD-ELSALAM, K. A.; VERREET, J. A. Molecular phylogeny of *Fusarium* species by AFLP fingerprint. **African Journal of Biotechnology**, Abraka, v. 2, n. 3, p. 51-55, 2003.

AOKI, T.; O'DONNELL, K.; ICHIKAWA, K. *Fusarium fractiflexum* sp. nov. and two other species within the *Gibberella fujikuroi* species complex recently discovered in Japan that form aerial conidia in false heads. **Mycoscience**, Tokyo, v. 42, n. 5, p. 461-478, 2001.

BAAYEN, R. P.; O'DONNELL, K.; BONANTS, P. J. M.; CIGELNIK, E.; KROON, L. P. N. M.; ROEBROECK, E. J. A.; WAALWIJK, C. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 8, p. 891-900, Aug. 2000.

BRITZ, H.; STEENKAMP, E. T.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, M. J. Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 4, p. 722-730, July/Aug. 2002.

CORRELL, J. C.; KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F. Nitrate non-utilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. **Phytopathology**, St. Paul, v. 77, n. 12, p. 1640-1646, Dec. 1987.

FERREIRA, F. R.; POSSIDIO, E. L.; SOARES, N. B.; CASTRO NETO, M. T.; PINTO, A. C. Q.; DONADIOA, L. C.; FREITAS, G. B. Germoplasma de manga no Brasil. In: SAO JOSE, A. R. **O agronegócio manga: produção e mercado**. Vitória da Conquista, Bahia: UESB/DFZ, 2002. p 111-118.

FREEMAN, S.; MAIMON, M.; PINKAS, Y. Use of GUS transformants of *Fusarium subglutinans* for determining etiology of mango malformation disease. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, n. 6, p. 456-461, June 1999.

GEISER, D. M.; IVEY, M. L. L.; HAKIZA, G.; JUBA, J. H.; MILLER, S. A. *Gibberella xylarioides* (anamorph: *Fusarium xylarioides*), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is a previously unrecognized member of the *G.*

fujikuroi species complex. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 1, p. 191-201, Jan./Feb. 2005.

GEISER, D. M.; JIMENEZ-GASCO, M. M.; KANG, S.; MAKALOWSKA, I.; VEERARAGHAVAN, N.; WARD, T. J.; ZHANG, N.; KULDAU, G. A.; O'DONNELL, K. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 5/6, p. 473-479, June 2004.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/Me/XP/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, p. 95-98, 1999.

KERÉNYI, Z.; ZELLER, K.; HORNOK, L.; LESLIE, J. F. Molecular standardization of mating type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 9, p. 4071-4076, Sept. 1999.

LESLIE, J. F. *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. S282-S291, 1995. Supplement.

LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; SUMMERELL, B. A. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, n. 3, p. 107-117, Sept. 2001.

LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; WOHLER, M.; SUMMERELL, B. A. Interfertility of two mating populations in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 5/6, p. 611-618, June 2004.

LIMA, C. S.; CAMPOS, M. A.; COSTA, S. S.; BARROS, D. L.; COSTA, M. C. M.; PFENNING, L. H. Morphological and molecular characterization of *Fusarium mangiferae* and *Fusarium sterilihyphosum* from Brazil. IV CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 2004, Ouro Preto. **Anais...** Ouro Preto, Brasil: Sociedade Brasileira de Micologia, 2004a. p. 60.

LIMA, C. S.; COSTA, S. S.; CAMPOS, M. A.; BARROS, D. L.; COSTA, M. C. M.; PFENNING, L. H. *Fusarium* species associated to mango malformation in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. S236, 2004b. Suplemento.

MARASAS, W. F. O.; RHEEDER, J. P.; LAMPRECHT, S. C.; ZELLER, K. A.; LESLIE, J. F. *Fusarium andiyazi* sp. nov., a new species from sorghum. **Mycologia**, New York, v. 93, n. 6, p. 1203-1210, Nov./Dec. 2001.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 8, n. 19, p. 4321-4325, Oct. 1980.

NEI, M. Genetic distances between populations. **American Naturalist**, v. 106, p. 283-292, 1972.

NORIEGA-CANTÚ, D. H.; TÉLIZ, D.; MORA-AGUILERA, G.; RODRÍGUEZ-ALCAZAR, J.; ZAVALETA-MEJÍA, E.; OTERO-COLINAS, G.; LEE CAMPBELL, C. Epidemiology of mango malformation in Guerrero, Mexico with traditional and integrated management. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n. 3, p. 223-228, Mar. 1999.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York, v. 90, n. 3, p. 465-493, May/June 1998.

O'DONNELL, K.; GIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 7, n. 1, p. 103-106, Feb. 1997.

O'DONNELL, K.; NIRENBERG, H. I.; AOKI, T.; CIGELNIK, E. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**, Tokyo, v. 41, n. 1, p. 61-78, 2000.

PFENNING, L. H. O Gênero *Fusarium*: novas tendências na sistemática e patossistemas emergentes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. S21-S23, 2002. Suplemento

PHAN, H. T.; BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S.; LIEW, E. C. Y.; SMITH-WHITE, J. L.; CLARKSON, J. R. *Gibberella gaditjirrii* (*Fusarium gaditjirrii*) sp. nov., a new species from tropical grasses in Australia. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 50, n. 1, p. 261-272, 2004.

PLOETZ, R. C.; Malformation: a unique and important disease of mango, *Mangifera indica* L. In: SUMMERELL, B. A.; LESLIE, J. F.; BACKHOUSE,

D.; BRYDEN, W. L.; BURGESS, L. W. **Fusarium**: Paul E. Nelson Memorial Symposium, St. Paul, MN: APS Press, 2001. p. 233-247.

SALEH, A. A.; ZELLER, K. A.; ISMAEL, A-S. M.; FAHMY, Z. M.; EL-ASSIUTY, E. M.; LESLIE, J. F. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) diversity in *Cephalosporium maydis* from Egypt. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 7, p. 853-859, July 2003.

STEENKAMP, E. T.; BRITZ, H.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, M. J. Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 1, n. 4, p. 187-193, July 2000.

SWOFFORD, D. L. **PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods)**. Version 4.0b10, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. 2000.

TAVARES, S. C. C. H.; LIMA, J. A. S. Isolamento do agente causal da malformação vegetativa em mangueira no Submédio São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. S322, 1997. Suplemento.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, Nov. 1994.

TREDWAY, L. P.; WHITE, J. F.; GAUT, B. S.; REDDY, P. V.; RICHARDSON, M. D. Phylogenetic relationships within and between *Epichloë* and *Neotyphodium* endophytes as estimated by AFLP markers and rDNA sequences. **Mycologia Research**, Oxford, v. 103, n. 12, p.1593-1603, Dec. 1999.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DER LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, Nov. 1995.

ZELLER, K. A.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S.; LESLIE, J. F. *Gibberella konza* (*Fusarium konzum*) sp. nov., a new biological species within the *Gibberella fujikuroi* species complex from prairie grass. **Mycologia**, New York, v. 95, n. 5, p. 943-954, Sept./Oct. 2003.

ZHENG, Q.; PLOETZ, R. Genetic diversity in the mango malformation pathogen and development of a PCR assay. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 208-216, Apr. 2002.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E PATOGÊNICA DO AGENTE ETIOLÓGICO DA MALFORMAÇÃO DA MANGUEIRA

1 RESUMO

LIMA, Cristiano Souza. **Caracterização biológica e patogênica do agente etiológico da malformação da mangueira**. 2006. p. 76–109. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.*

Fusarium sp. do Brasil é uma espécie filogenética do complexo *Gibberella fujikuroi* (CGF). Neste estudo objetivou-se i. determinar se esta nova espécie filogenética é sexualmente compatível e reprodutivamente isolada de *Fusarium mangiferae* e *Fusarium sterilihyphosum*, duas espécies descritas recentemente a partir de malformação da mangueira; ii. descrever *Gibberella* sp./*Fusarium* sp. do Brasil e iii. testar os postulados de Koch para *Fusarium* sp. do Brasil e *F. sterilihyphosum*. *Primers* específicos que amplificam os genes *MAT-1* e *MAT-2* de espécies do CGF foram utilizados para determinar os *mating types* dos isolados utilizados neste estudo. Dentre os isolados de *Fusarium* sp. do Brasil foi possível identificar os dois *mating types*, enquanto que os isolados de *F. mangiferae* possuíram apenas o *mating type* *MAT-2* e isolados de *F. sterilihyphosum* foram do *mating type* *MAT-1*. Os cruzamentos foram realizados de acordo com metodologia já estabelecida para o GFC. Trinta e dois cruzamentos entre isolados de *Fusarium* sp. do Brasil produziram peritécios férteis, enquanto que cruzamentos com *F. sterilihyphosum* e *F. mangiferae* não produziram peritécios. Nos cruzamentos entre *F. sterilihyphosum* e *F. mangiferae*, nenhum peritécio foi observado. *Gibberella* sp. do Brasil apresentou peritécio solitário, às vezes agregado, verrugoso e azul escuro, contendo ascos cilíndricos com 6 a 8 esporos e ascósporos com 1-3 septos. *Fusarium* sp. do Brasil apresenta microconídio produzido em falsas cabeças, polifiálides, hifa estéril espiralada em alguns isolados, ausência de clamidósporos, macroconídio com 3-5 septos e cor da colônia, variando de branco a violeta-escuro. *Fusarium* sp. do Brasil não pode ser separado de *F. sterilihyphosum* apenas por morfologia, mas sim por meio de cruzamentos. *Fusarium* sp. do Brasil e *F. sterilihyphosum* foram patogênicos a mudas de mangueira produzindo sintomas típicos de malformação após a inoculação.

*Comitê Orientador: Ludwig H. Pfenning (Orientador), John F. Leslie – *Kansas State University* e Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Co-orientadores)

2 ABSTRACT

LIMA, Cristiano Souza. **Biological and pathogenic characterization of the etiologic agent of mango malformation.** 2006. p. 76–109. Thesis (Doctorate in Plant Pathology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Fusarium sp. from Brazil is a phylogenetic species of the *Gibberella fujikuroi* complex (GFC). The aim of this study was i. to determine if this new phylogenetic species is sexually compatible and reproductively isolated from *Fusarium mangiferae* and *Fusarium sterilihyphosum*, two recently described species associated with mango malformation; ii. to describe *Gibberella* sp./*Fusarium* sp. from Brazil; and iii. to test Koch's Postulate to *Fusarium* sp. from Brazil and *F. sterilihyphosum*. Specific primers developed to amplify the *MAT-1* and *MAT-2* genes in the GFC were used to determine the mating types of strains used in this study. Within the isolates of *Fusarium* sp. from Brazil, it was possible to identify both mating types, while *F. mangiferae* isolates had only the *MAT-2* mating type and isolates of *F. sterilihyphosum* had only the *MAT-1* mating type. Crosses were done according to a methodology already established to study biological species of the GFC. Thirty two crosses between isolates of *Fusarium* sp. from Brazil produced fertile perithecia with oozing ascospores, while crosses with *F. sterilihyphosum* and *F. mangiferae* did not produce perithecia. In the crosses between *F. sterilihyphosum* and *F. mangiferae* no perithecia was observed as well. The *Gibberella* perithecia produced in the crosses of isolates of *Fusarium* sp. from Brazil were solitary, sometimes aggregated, warty and blue-black; with cylindrical asci 6 to 8 spored; and ascospores 1-3 septated. *Fusarium* sp. from Brazil presents microconidia borne in false heads, polyphialides, coiled sterile hyphae in some isolates, no chlamydospores, macroconidia 3-5 septate. The colony coloration varies from white do dark-purple. *Fusarium* sp. from Brazil cannot be separated from *F. sterilihyphosum* by using only morphology but can be successfully distinguished through crossing. *Fusarium* sp. from Brazil and *F. sterilihyphosum* were pathogenic to mango plantlets producing typical malformation symptoms after inoculation.

*Advising Committee: Ludwig H. Pfenning (Adviser), John F. Leslie – Kansas State University and Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Co-advisers)

3 INTRODUÇÃO

Uma grande diversidade de espécies de *Fusarium* Link do complexo *Gibberella fujikuroi* (CGF) está presente nos trópicos, com muitas espécies ainda para serem descobertas associadas às plantas cultivadas, bem como plantas da vegetação natural (Phan et al., 2004). No Brasil, as atividades agrícolas se expandem cada vez mais em áreas novas, como a região amazônica, de modo que espécies, ao perderem o seu nicho natural, podem se adaptar a plantas cultivadas como novos patógenos. A mangueira, *Mangifera indica* L., é cultivada em praticamente todas as áreas tropicais e subtropicais do mundo, e o Brasil se destaca como um dos maiores produtores e exportadores do seu fruto (FAOstat, 2006). Várias espécies da Seção *Liseola* de *Fusarium* já foram relatadas em associação à malformação floral e vegetativa da mangueira (Santos et al., 1983; Leslie, 1995; Noriega-Cantú et al., 1999; Britz et al., 2002). Por outro lado, *Gibberella intermedia* (Kuhlman) Samuels, Nirenberg & Seifert foi a única espécie biológica que já foi relatada em associação com esta doença, na Malásia (Leslie, 1995). No entanto, o papel desta espécie na malformação da mangueira ainda não foi testado.

Estudos de compatibilidade sexual, com a identificação de *mating types* por PCR, foram realizados com *Fusarium mangiferae* Britz, Wingfield & Marasas e *Fusarium sterilihyphosum* Britz, Marasas & Wingfield, porém, sem sucesso (Steenkamp et al., 2000a; Britz et al., 2002). Entretanto, outras espécies de *Gibberella* Sacc., como *Gibberella konza* Zeller, Summerell & Leslie e *Gibberella gaditjirii* Phan, Burgess & Summerell, foram descritas utilizando com sucesso a técnica de identificação de *mating types* por PCR (Zeller et al., 2003; Phan et al., 2004). A vantagem da utilização de PCR para a identificação de *mating types* em espécies fúngicas heterotálicas reside na redução pela

metade do número de cruzamentos necessários em um estudo de compatibilidade sexual (Kerényi et al., 1999, 2004; Steenkamp et al., 2000b).

Alguns estudos evidenciam que as populações de *Fusarium* associadas à malformação da mangueira nas Américas, incluindo o Brasil, são diferentes daquelas observadas em outros países, onde esta doença também é importante, como a África do Sul, Egito, Índia, Israel e Malásia (Noriega-Cantú et al., 1999; Britz et al., 2002; Ploetz et al., 2002; Zheng & Ploetz, 2002).

No México, foram detectadas populações de *Fusarium* que apresentam hifa estéril espiralada, porém, no presente estudo, foi observado, por meio de AFLP e seqüenciamento, que isolados desta população não agrupam com o holotipo de *F. sterilihyphosum*. Outra população que apresenta clamidósporos também foi relatada associada à malformação neste país (Noriega-Cantú et al., 1999; Britz et al., 2002). Na Malásia, encontra-se presente uma população que possui macroconídio com tamanho inferior ao de *F. mangiferae* e *F. sterilihyphosum* (Britz et al., 2002). Em estudo realizado na Flórida, EUA, incluindo três isolados do Brasil, juntamente com isolados de vários países, foi mostrado por meio de RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) e VCG (grupos de compatibilidade vegetativa) que os isolados do Brasil representam uma população geneticamente distinta de *F. mangiferae* e *F. sterilihyphosum* (Zheng & Ploetz, 2002).

O presente estudo foi realizado com o objetivo de caracterizar uma população distinta do CGF, Seção *Liseola* associada à malformação da mangueira no Brasil, por meio de morfologia e compatibilidade sexual, e testar a patogenicidade de isolados selecionados de *Fusarium* spp. em mudas de mangueira.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolamento e preservação das culturas

De todos os isolados utilizados neste estudo foram realizados cultivos monospóricos a partir de uma cultura típica do gênero *Fusarium* obtida a partir de tecidos de mangueira desinfestados (hipoclorito de sódio 2% e etanol 70%) apresentando sintomas de malformação floral e vegetativa, inoculados em meio SNA (ágar pobre em nutrientes sintéticos). Em quase todos os isolamentos realizados, o material vegetal enfermo produziu apenas culturas de *Fusarium*. As culturas monospóricas foram avaliadas quanto à pureza e ao crescimento vigoroso do tipo selvagem. Os isolados obtidos foram mantidos como suspensão de esporos em 15% glicerol a -70°C no Departamento de Fitopatologia da *Kansas State University, Manhattan, Kansas*, EUA e em água destilada esterilizada a 10°C no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil (Tabela 2.1, capítulo 2).

4.2 Caracterização morfológica

4.2.1 Fase anamórfica

A caracterização morfológica seguiu o protocolo de Pfenning & Silva (1999), adaptado de Nelson et al. (1983), Nirenberg (1990), Nirenberg & O'Donnell (1998) e Britz et al. (2002).

Foram estudados 30 isolados da população do Brasil, 6 isolados de *F. sterilihyphosum* (incluindo o holotipo), 2 isolados de *F. mangiferae* (incluindo o holotipo), 1 isolado de *F. sacchari* MP B (KSU 3852), 1 isolado de *F. subglutinans* MP E (KSU 990), 1 isolado de *F. circinatum* MP H (KSU 10850) e 1 isolado de *F. guttiforme* (KSU 10764).

Os isolados foram inoculados nos meios OA (ágar e aveia), PDA (ágar, dextrose e batata) e SNA. Em OA e PDA, foi avaliada a taxa de crescimento, a pigmentação da colônia e a formação do micélio aéreo, após incubação no escuro a 25°C. A medição do diâmetro das colônias foi realizada após 7 dias de incubação, com os valores transformados em mm . dia⁻¹. Em SNA, após 10 a 14 dias de incubação a 23°C, com fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente + luz negra e 12 horas no escuro, foram observadas as características micromorfológicas, como a presença ou não e cor de esporodóquios; frequência, tamanho, formato e origem de microconídios e macroconídios; tipos de fíalides, presença ou não de clamidósporos, presença ou não de microconídios em falsas cabeças e presença ou não de hifa estéril espiralada. Na caracterização inicial, onde foi utilizada a temperatura de incubação de 23°C para SNA e 25°C para OA e PDA, foram utilizados apenas isolados da população do Brasil, *F. sterilihyphosum* e *F. mangiferae*. Já os isolados restantes, foram incluídos apenas na medição da taxa de crescimento a 20°C. Foram tomadas as medições das estruturas vegetativas e reprodutivas (30x para cada isolado) e comparadas com descrições na literatura (Gerlach & Nirenberg, 1982; Nelson et al. 1983; Nirenberg & O'Donnell, 1998; Britz et al., 2002).

4.2.2 Fase teleomórfica

Peritécios oriundos do cruzamento, CML 263 ♀ x CML 382 ♂, foram selecionados para representar a nova população do Brasil. As estruturas reprodutivas da fase sexuada foram montadas em uma solução de água + glicerina (50%, v/v) e levadas ao microscópio de luz para a observação das características morfológicas do peritécio, asco e ascósporos, bem como para a medição de seus comprimentos e diâmetros. Foram tomadas 30 medidas de cada estrutura, as quais serviram para a posterior comparação com as espécies de

Gibberella do CGF já descritas na literatura (Samuels et al., 2001; Zeller et al., 2003; Leslie et al., 2005).

4.3 Determinação de *mating types* por PCR

A determinação de *mating types* foi realizada no Laboratório de Genética de Fungos, da *Kansas State University*, Manhattan, Kansas, EUA, a partir de DNA fúngico extraído de acordo com protocolo padrão (Steenkamp et al., 1999). Foi feita a amplificação de um fragmento de ~ 200 pb do alelo *MAT-1* por meio dos *primers* GFmat1a (senso; 5'-GTTTCATCAAAGGGCAAGCG-3') e GFmat1b (antisenso; 5'-TAAGCGCCCTCTTAACGCCTTC-3') e um fragmento de ~ 800 pb do alelo *MAT-2* com os *primers* GFmat2c (senso; 5'-AGCGTCATTATTCGATCAAG-3') e GFmat2d (antisenso; 5'-CTACGTTGAGAGCTGTACAG-3'). As condições das reações para cada par de *primers* estão de acordo com Steenkamp et al. (2000a, b). O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% , 100 V, para a visualização dos resultados. O comprimento dos fragmentos amplificados foi estimado por comparação com um marcador de comprimentos de fragmentos *1 Kb ladder*. As reações de PCR foram repetidas duas vezes para cada isolado, sendo o *mating type* confirmado apenas quando, nas duas reações, foi obtido o mesmo resultado.

4.4 Indução da fase sexuada

A indução da fase sexuada de *Fusarium* sp. do Brasil foi realizada no Laboratório de Genética de Fungos, da *Kansas State University*, Manhattan, Kansas, EUA. Após a determinação dos *mating types* dos isolados, aqueles que apresentavam tipos opostos foram cruzados com o objetivo de verificar a fertilidade da população (Tabela 3.1). Cada isolado também foi cruzado com isolados de *F. mangiferae* e *F. sterilihyphosum*. Os cruzamentos foram realizados seguindo metodologia padrão para estudos de compatibilidade sexual

no CGF (Klittich & Leslie, 1988; Leslie, 1995), exceto que os cruzamentos foram incubados a 20°C e não 25°C, como é de costume. Esta mudança na temperatura foi devido ao fato de que *Gibberella circinata*, uma espécie filogeneticamente próxima da população do Brasil, possui maior fertilidade a 20°C, do que a 25°C (Covert et al., 1999). Os isolados do parental masculino foram cultivados em tubo de ensaio contendo meio completo, enquanto que os isolados do parental feminino foram cultivados em placas de Petri (60 x 15 mm). Os isolados masculinos foram incubados a 23°C sob 12 horas de luz fluorescente combinada com luz negra e 12 horas de escuro por 7 dias. Já os isolados do parental feminino foram incubados a 25°C no escuro por 7 dias.

Após o período de incubação, foi preparada uma suspensão de esporos do parental masculino, pela adição de 1 mL de solução de Tween 60 e água estéril a 2,5% (v/v), utilizando-se, para tal, uma pipeta Pasteur. Em seguida, a suspensão de esporos foi depositada na superfície da colônia do isolado que serviu como parental feminino e, com o auxílio de uma alça de Drigalski, espalhada de modo a umedecer completamente o micélio. O papel dos parentais foi invertido posteriormente em cruzamentos recíprocos e os isolados que produziram cruzamentos férteis, quando utilizados como parental masculino e feminino, foram considerados hermafroditas. Aqueles que produziram cruzamentos férteis somente como parental masculino foram denominados fêmeas estéreis. Os cruzamentos foram incubados a 20°C, com fotoperíodo de 12 horas de luz branca fluorescente combinada com luz negra, por um período de até oito semanas.

Foram utilizados como controles, cruzamentos entre os testadores de *Gibberella moniliformis* MP A (KSU 149, *MAT-1* x KSU 999, *MAT-2*) e *Gibberella intermedia* MP D (KSU 4853, *MAT-2* x KSU 4854, *MAT-1*). Os cruzamentos foram avaliados semanalmente. Foram considerados férteis os cruzamentos que produziram peritécios típicos de *Gibberella*, dos quais houve

exsudação de um cirro de ascósporos. Montagens dos peritécios foram realizadas a cada avaliação, para acompanhar o desenvolvimento do mesmo e para confirmar se as características morfológicas eram típicas de espécies desse gênero.

4.5. Determinação da viabilidade de ascósporos

A viabilidade dos ascósporos foi estudada pelo teste de germinação em ágar-água 2%. Com o auxílio de um estilete com ponta extremamente fina, cirros de ascósporos foram coletados e, em seguida, espalhados sobre a superfície do ágar pelo uso de uma alça de Drigalski e algumas gotas de água estéril. Posteriormente, a placa de Petri contendo os ascósporos foi incubada no escuro a 25°C por 24 horas. Após o período de incubação, foi avaliada a germinação dos ascósporos sob aumento de 40 vezes, em um microscópio de luz.

4.6 Fotodocumentação

As estruturas morfológicas das fases anamórfica e teleomórfica de *Fusarium* e *Gibberella* da mangueira foram fotografadas *in situ* e em preparações microscópicas utilizando-se uma câmara fotográfica modelo *Canon Power Shot S40*[®] acoplada ao microscópio. Da fase anamórfica foram fotografados microconídios, hifa estéril espiralada, macroconídios (conídios do esporodóquio), conidióforos e fiáles, e coloração das culturas. Para a fase teleomórfica, peritécios oriundos do cruzamento 263 ♀ x 382 ♂, selecionado para representar a nova população do Brasil, foram utilizados para fotografia. Ascos e ascósporos foram montados em água com 50% de glicerina, para serem fotografados. Peritécios inteiros foram fixados por 4 horas em temperatura ambiente em 6,5% glutaraldeído em um tampão de cacodilato de sódio 100 mM pH 7,6. A seguir, desidratados em uma série gradual de etanol e, por último,

infiltrado e embebido em resina *LR White*. Secções de 1,5 µm de espessura foram obtidas em um ultramicrotômo, secos em lâminas cobertas por poli-L-lisina e coradas com 0,5 % de azul de toluidina por 10 segundos para futura fotodocumentação.

4.7 Teste de patogenicidade de *Fusarium* spp. em mudas de mangueira

Com o objetivo de verificar os postulados de Koch para isolados selecionados de *Fusarium* spp., os isolados CML 262, 264, 282, 383, 345, 387 e 398 foram inoculados em mudas de mangueira da cultivar Tommy Atkins com 9 meses da enxertia. O experimento foi disposto em blocos casualizados num total de 5 blocos com 10 plantas cada. Em cada bloco foram colocadas plantas que estavam no mesmo estágio vegetativo, como, por exemplo, gema intumescida, brotação nova e gema dormente.

A preparação do inóculo foi realizada pelo cultivo dos isolados em tubos de ensaio contendo meio OA e incubados a 23°C por 7 dias com regime de luz de 12 horas. Após este período, foi adicionada água destilada esterilizada em cada tubo. Em seguida, a suspensão de esporos foi ajustada para 10^6 conídios . mL⁻¹.

Antes da inoculação, tecidos próximos da região meristemática de todas as mudas foram desinfestados com hipoclorito de sódio (3%) e plaqueados em meio SNA, com o objetivo de verificar a presença de *Fusarium* colonizando os tecidos das plantas de mangueira. Só foram inoculadas as mudas das quais não foi isolada nenhuma espécie de *Fusarium*. A inoculação foi realizada pela injeção, com o auxílio de uma seringa, de 20 µL de suspensão de conídios nas gemas apicais das mudas (Freeman et al., 1999). Cada isolado foi inoculado em 5 mudas. Nas plantas testemunha, foi inoculada apenas água destilada esterilizada em 5 plantas. O isolado CML 398 *Fusarium semitectum*, que é considerado um fungo não patogênico, também foi inoculado para servir como

controle negativo para a malformação, juntamente com as mudas inoculadas somente com água estéril.

Após a inoculação, as mudas foram mantidas em casa-de-vegetação com temperatura de $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ e avaliadas semanalmente quanto ao surgimento de sintomas, sendo consideradas doentes aquelas que apresentaram superbrotamento e das quais foi possível recuperar o isolado inoculado. Para tal, os tecidos doentes das mudas com e sem sintoma foram desinfestados com hipoclorito de sódio (3%) e plaqueados em SNA. Foi calculada a percentagem de incidência de malformação vegetativa e ou floral para cada isolado. Foram considerados patogênicos os isolados que produziram sintomas em, pelo menos, 20% das mudas.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização morfológica

5.1.1 Fase anamórfica

Em geral, todos os isolados apresentaram maior crescimento em meio OA, a 25°C, com os isolados de *Fusarium* da população do Brasil crescendo, em média, 12,6 mm.dia⁻¹, enquanto que *F. sterilihyphosum* cresceu, em média, 12,3 mm.dia⁻¹. Em PDA, a 25°C, a taxa de crescimento micelial foi um pouco menor, com os isolados do Brasil apresentando uma taxa de 10,8 mm.dia⁻¹, enquanto que *F. sterilihyphosum* cresceu a uma taxa menor (9,6 mm.dia⁻¹). Na temperatura de 20°C, em meio PDA, houve uma relação inversa com relação às taxas de crescimento dos isolados do Brasil (8,2 mm.dia⁻¹) e *F. sterilihyphosum* (8,9 mm.dia⁻¹), em comparação com o crescimento no mesmo meio a 25°C. Isolados de *F. mangiferae*, *F. sacchari* MP B, *F. suglutinans* MP E, *F. circinatum* MP H e *F. guttiforme*, na temperatura de 20°C, cresceram a taxas de 7,7; 10,5; 9,9; 9,9 e 7,8 mm.dia⁻¹, respectivamente.

Na caracterização morfológica em SNA a 23°C, os isolados do Brasil apresentaram macroconídios menores do que os isolados de *F. sterilihyphosum*. O comprimento dos macroconídios dos isolados do Brasil foi de 24-66 (média = 46) µm, enquanto que os de *F. sterilihyphosum* foi de 32-71 (média = 50) µm. *Fusarium mangiferae* apresentou macroconídios com 37-62 (média = 48,8) µm. Em geral, a média no comprimento dos macroconídios dos isolados do Brasil foi menor do que as médias para *F. mangiferae* e *F. sterilihyphosum*. Entretanto, nas descrições de *F. mangiferae* e *F. sterilihyphosum*, as médias no comprimento dos macroconídios foram 43,1-61,4 (média = 51,8) µm e 28,4-47,1 (média = 37,1) µm, respectivamente. Os macroconídios de *Fusarium* sp. do

Brasil e *F. sterilihyphosum* apresentaram septação variando de 3 a 5 septos, enquanto os de *F. mangiferae* apresentaram de 3 a 4 septos (Tabela 3.1).

Com respeito ao comprimento dos microconídios asseptados, os isolados de *Fusarium* sp. do Brasil apresentaram o maior comprimento [5-22 (média = 11,2) μm], seguido de *F. sterilihyphosum* [5-19 (média = 11,8) μm], e *F. mangiferae* [6-16 (média = 11,5) μm]. Os microconídios septados apresentaram de 1 a 3 septos para *Fusarium* sp. do Brasil e *F. sterilihyphosum*, e de 1 a 2 septos, para *F. mangiferae*.

As fiálides apresentaram comprimento máximo de 30 μm para as três espécies. Entretanto, o número de aberturas conidiogênicas nas fiálides foi superior a 3 somente para *Fusarium* sp. do Brasil e *F. sterilihyphosum* (Tabela 3.1).

Com relação às características morfológicas diagnósticas estabelecidas para o CGF (Nirenberg & O'Donnell, 1998), os isolados do Brasil não diferenciaram de *F. sterilihyphosum*, porém, *F. mangiferae* foi diferenciado das duas espécies por não apresentar hifa estéril espiralada e microconídios com 3 septos.

TABELA 3.1 Características morfológicas diferenciais de *Fusarium* spp. do Brasil, isoladas de tecidos de mangueira apresentando sintomas de malformação. Todas as medições estão em micrômetros (μm). UFLA, Lavras, MG, 2006.

Espécies ^e	macroconídios			microconídios asseptados		septação ^f	fiálides		abert conid ^g
	comprimento	largura	septos	comprimento	largura		comp	larg	
						máx	máx	máx	
<i>Fusarium</i> sp. ^a	24(45,6)66	2(3,1)4	3-5	5(11,2)22	2(3)4	0-3	30	3	5
<i>F. sterilihyphosum</i> ^b	32(49,7)71	2(3,1)4	3-5	5(11,8)19	2(2,8)4	0-3	30	3	4
<i>F. mangiferae</i> ^b	37(48,8)62	2(2,8)3	3-4	6(11,5)16	2(3)4	0-2	30	3	2
<i>F. mangiferae</i> ^c	43,1(51,8)61,4	1,9(2,3)3,4	3-5	4,3(9)14,4	1,7(2,4)3,3	0-1	30	3	5
<i>F. sterilihyphosum</i> ^c	28,4(37,1)47,1	2,4(3,2)4,1	3-5	4,5(8,8)14,2	1,6(2,6)3,5	0-1	30	3	>3
<i>F. semitectum</i> ^d	20(35,3)46	3(3,6)5	3-5	-	-	-	34	4	2

^a Refere-se à população distinta de *Fusarium* associada à mangueira no Brasil.

^b Refere-se aos holotipos caracterizados a 23°C em meio SNA.

^c Refere-se aos holotipos e suas características descritas em Britz et al., 2002.

^d Refere-se a *Fusarium semitectum* que foi isolado de tecidos saudáveis de inflorescências de mangueira no Brasil.

^e Todas as espécies listadas foram caracterizadas em SNA a 23°C, com fotoperíodo de 12 h luz/12h escuro, exceto para a espécie indicadas com a letra 'c'.

^f Refere-se à septação dos conídios do micélio aéreo.

^g Refere-se ao número máximo de aberturas conidiogênicas observadas nas fiálides.

Já a espécie de *Fusarium* da Malásia relatada por Britz et al. (2002) apresenta polifiálides com 3 ou menos proliferações e conidióforo crescendo apenas ereto (Tabela 3.2). As espécies de *Fusarium* mais próximas morfológicamente de *Fusarium* sp. do Brasil são: *F. sterilihyphosum*, *F. circinatum*, *F. pseudocircinatum*, *Fusarium* sp. da Malásia, *F. begoniae*, *F. concentricum*, *F. mangiferae*, *F. bulbicola*, *F. subglutinans* MP E, *F. denticulatum*, *F. sacchari* MP B, *F. guttiforme* e *F. ramigenum*. Destas, apenas *F. sterilihyphosum*, *F. circinatum* e *F. pseudocircinatum* apresentam hifa estéril espiralada (Tabela 3.2).

Foi observado que dentre os 30 isolados de *Fusarium* sp. do Brasil, apenas os isolados CML 262, 383, 385 e 389 apresentaram hifa estéril espiralada, enquanto que dos 6 isolados avaliados de *F. sterilihyphosum*, apenas os isolados CML 282, MRC 2802 e KSU 11783 apresentaram esta estrutura.

Com base em caracteres morfológicos, foi possível identificar também a espécie *Fusarium semitectum* associada a inflorescências sadias de mangueira no Brasil (Tabela 3.1). Esta espécie pode ser encontrada com alta frequência em qualquer tipo de material vegetal e é considerada não patogênica (Summerell et al., 2003).

5.1.2 Fase teleomórfica

A fase teleomórfica de *Fusarium* sp. do Brasil corresponde ao gênero *Gibberella* e suas características morfológicas foram comparadas com as outras espécies de *Gibberella* que correspondem às *mating populations* já descritas (Tabela 3.3). Com relação ao diâmetro do peritécio, a espécie mais próxima foi *G. sacchari*, entretanto, o comprimento dos ascósporos foi mais próximo daqueles de *G. konza*. A septação dos ascósporos (1-3, com 1 mais frequente) foi igual à da *G. fujikuroi* e *G. intermedia* (Tabela 3.3).

TABELA 3.2 Características morfológicas de espécies próximas a *Fusarium* sp. do Brasil. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Espécie ^a		F. sp. ¹	F. ste	F. cir	F. pcirc	F. sp. ²	F. beg	F. con	F. man	F. bul	F. sub	F. den	F. sac	F. gut	F. ram
arranjo dos conídios	falsas cabeças	+ ^c	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	cadeias curtas (<15 conídios)	- ^d	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hifa estéril espiralada		(+) ^e	(+)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
conídios do micélio aéreo	oval à alantóide e/ou fusóide	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	obovóide	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
	piriforme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-
	0-1 septo	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0-3 septos	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
conídios do esporodóquio	3 septos	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
	3-5 septos	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
conidióforos do micélio aéreo	ereto	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
	prostrado	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
	≤ 3 proliferações	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
	≥ 3 proliferações	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
Clados de O'Donnell et al., 1998 ^b		Am	Am	Am	Af	ND	Am	As	As	ND	Am	Af	As	Am	Af

^a Espécies anamórficas de *Fusarium* do complexo *G. fujikuroi*: F.sp.¹= *Fusarium* sp. do Brasil; F. ste= *F. sterilihyphosum*; F. cir= *F. circinatum*; F. pcirc= *F. pseudocircinatum*; F. sp.²= *Fusarium* sp. da Malásia relatado no estudo de Britz et al. (2002); F. beg= *F. begoniae*; F. con= *F. concentricum*; F. man= *F. manguiiferae*; F. bul= *F. bulbicola*; F. sub= *F. subglutinans* MP E; F. den= *F. denticulatum*; F. sac= *F. sacchari* MP B; F. gut= *F. guttiforme*; F. ram= *F. ramigenum*.

^b Clados filogeográficos hipotetizados a partir de filogenia de vários genes não ligados do genoma que mostram a provável origem geográfica das espécies do complexo *G. fujikuroi*: Am= clado americano; Af= clado africano; As= clado asiático. ND= as relações ainda não foram esclarecidas.

^c + indica a presença do caractere.

^d - indica a ausência do caractere.

^e (+) indica que o caractere está presente apenas em alguns isolados da espécie.

TABELA 3.3 Características morfológicas de espécies de *Gibberella* e *mating populations* do complexo *Gibberella fujikuroi*. Medidas em micrômetros (µm). UFLA, Lavras, MG, 2006.

Espécie ^a	MP ^b	Peritécios ^c	Ascósporos		
			Comprimento	Largura	Septação
<i>G. moniliformis</i>	A	228 x 460	12-23	4-6	1-4; 3 mais freqüente
<i>G. sacchari</i>	B	270 x 390	28-32	3-4,5	0-1
<i>G. fujikuroi</i>	C	140 x 300	10-20	4-7	1-3; 1 mais freqüente
<i>G. intermedia</i>	D	280 x 520	10-21	4-7	1-3; 1 mais freqüente
<i>G. subglutinans</i>	E	220 x 350	11-21	3,5-6	1-4; 1 mais freqüente
<i>G. thapsina</i>	F	180 x 480	12-22	4-8	0-3; 1 mais freqüente
<i>G. nygamai</i>	G	184 x 238	8,5-20	4-8	0-1; 1 mais freqüente
<i>G. circinata</i>	H	230 x 325	9,4-16,6	4,5-6	1-2
<i>G. konza</i>	I	360 x 780	12-18	4-7	0-1
<i>G. xylarioides</i>	J	230 x 350	9-16	4-6	1-3; 1 mais freqüente
<i>Gibberella</i> sp. ^d	K	310 x 400	12,5-17,5	5-6	1-3; 1 mais freqüente

^a Espécies biológicas de *Gibberella* do complexo *G. fujikuroi*.

^b Designação alfabética adotada para as *mating populations* do complexo *G. fujikuroi*. Indica a ordem pela qual as *mating populations* foram descritas.

^c Largura versus a altura dos peritécios.

^d *Gibberella* sp. corresponde à espécie biológica (*mating population*) associada à malformação da mangueira no Brasil.

Seguindo a chave para identificação de espécies de *Gibberella* do CGF (Samuels et al., 2001), verificou-se que *Gibberella* sp. do Brasil tem *G. circinata* como a espécie mais próxima.

5.2 Taxonomia

A seguir, são descritas as fases teleomórfica e anamórfica da população associada à malformação da mangueira no Brasil.

***Gibberella* sp.** do Brasil Figura 3.1

Teleomorfo. Peritécio superficial, solitário a agregado, formando grupos sobre uma discreta base estromática, obovóide a obpiriforme, verrugoso, 350-(360)-400 µm de altura, 310,0-(331,8)-360,0 µm de largura, não papilado, não estromático, violeta-escuro em água e em 3% KOH, tornado-se vermelho em ácido láctico 100%. Ascospores cilíndricos, ápice com anel refrativo, 6 a 8 ascóspores por asco. Ascóspores elipsóides a fusiforme, lisos, 1-3 septos, a maioria com septo médio apresentando uma leve constrição 12,5-(15,7)-17,5 x 5,0-(5,1)-6,0 µm. Espécie heterotálica, reprodutivamente isolada de espécies de *Gibberella* previamente descritas.

***Fusarium* sp.** do Brasil Figura 3.2

Anamorfo. Colônia em PDA apresentando taxa de crescimento micelial de 10,8 mm/da a 25°C; margem da colônia inteira. Micélio aéreo quase branco e, em algumas culturas, tingido pelo substrato de violeta-acinzentado, lanoso. Pigmentação branco-acinzentado à violeta-escuro no verso da placa de Petri. Protoperitécios observados em PDA, OA e cenoura-ágar em alguns isolados.

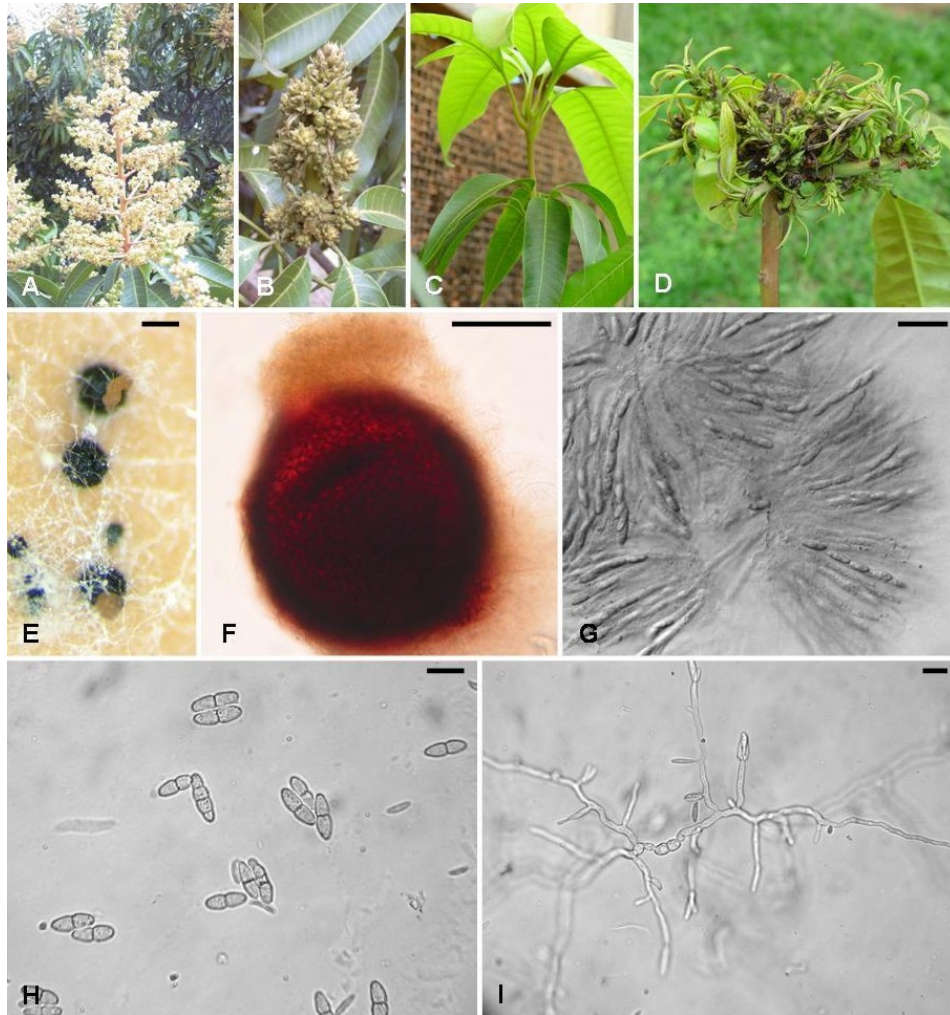


FIGURA 3.1 Malformação da mangueira (A-D); A) inflorescência sadia; B) malformação floral; C) muda sadia; D) malformação vegetativa. Características morfológicas de *Gibberella* sp. do Brasil (E-I); E) peritécios exsudando ascósporos. Barra = 300 μ m; F) peritécio de perfil. Barra = 150 μ m; G) ascos contendo ascósporos. Barra = 30 μ m; H) ascósporos. Barra = 10 μ m; I) ascósporo germinando. Barra = 15 μ m. UFLA, Lavras, MG, 2006.

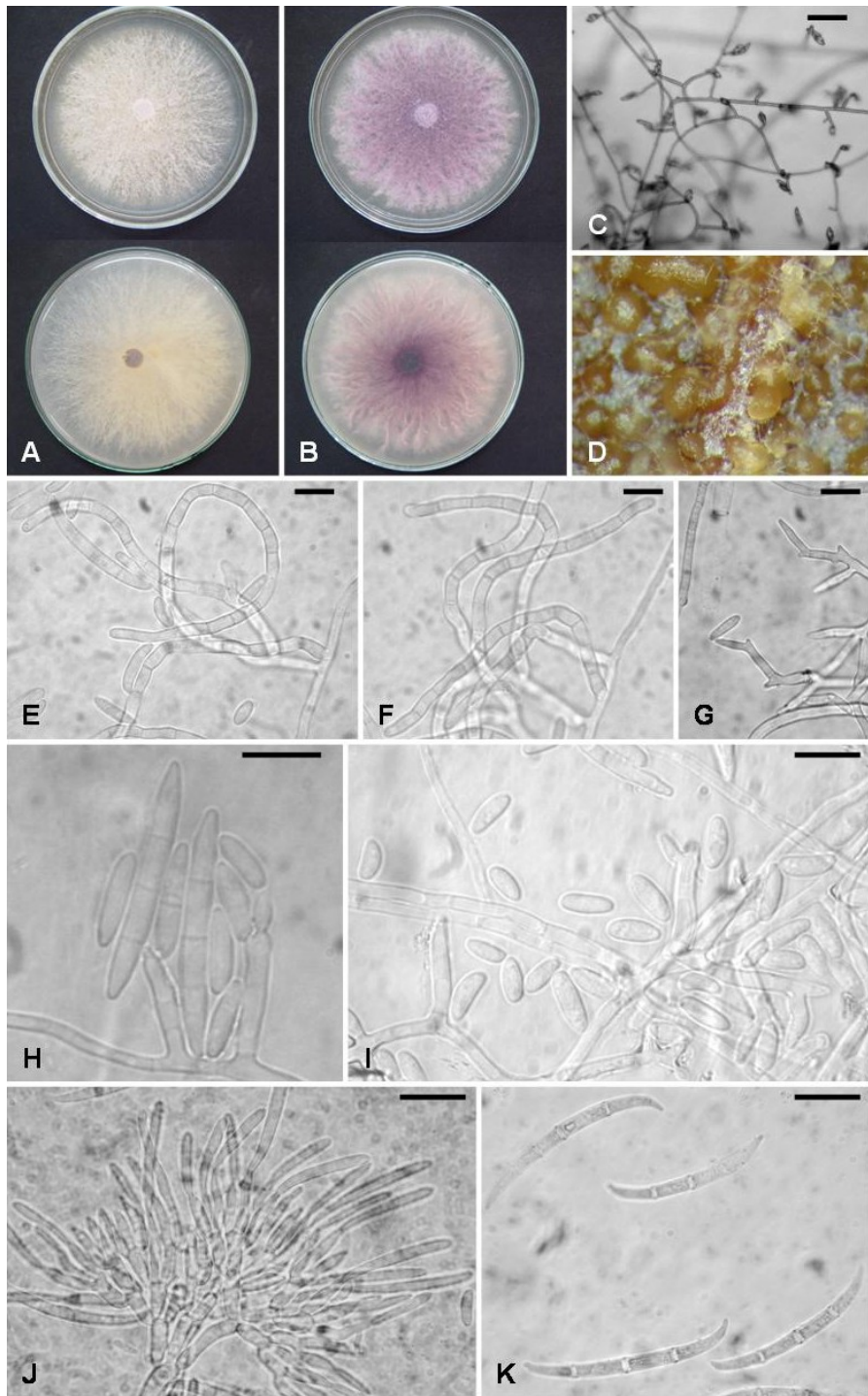


FIGURA 3.2 Características morfológicas de *Fusarium* sp. do Brasil (A-K); A e B) coloração da colônia em PDA; C) microconídios produzidos somente em falsas cabeças. Barra = 40 µm; D) esporodóquios *in situ*; E e F) hifa estéril espiralada. Barra = 10 µm; G) polifiálides no micélio aéreo. Barra = 10 µm; H e I) microconídios apresentando de 0 a 3 septos. Barra = 10 µm; J) conidióforo do esporodóquio. Barra = 15 µm; K) macroconídios. Barra = 20 µm. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Esporulação começando cedo no micélio aéreo, conídios agregados em falsas cabeças. Conidióforos eretos no micélio aéreo, ocasionalmente prostados, ramificados simpodialmente, fiálides com até 5 aberturas conidiogênicas. Hifa estéril espiralada presente em apenas algumas culturas. Conidióforos do esporodóquio verticilados. Fiálides dos conidióforos do micélio aéreo cilíndricas, mono- e polifialídicas, com até 30 µm de comprimento e 3 µm de largura. Conídios do micélio aéreo a maioria obovóides, ocasionalmente ovais a alantóides, a maioria asseptado, ocasionalmente com 1, 2 e 3 septos; 0-septado: (5,0-)7,0-11,2-14,0(-22,0) x (2,0-)3,0-3,0-3,0(-4,0) µm. Sporodóquio variando de creme a alaranjado. Macroconídios levemente afilados nas células apicais, com uma célula-pé basal, com 3-5 septos, (24,0-)40,0-45,6-45,0(-66,0) x (2,0-)3,5-3,1-3,0(-4,0) µm. Clamidósporos ausentes.

5.3 Determinação de *mating types* por PCR

A determinação dos *mating types* foi possível para a maioria dos isolados do tipo '*subglutinans*'. Dos 81 isolados estudados, 26 possuem o alelo *MAT-1* e 50 isolados o alelo *MAT-2* (Tabela 3.1). Para 3 outros isolados, não foi possível determinar o alelo de *mating*, o que pode ser explicado pela especificidade destes *primers* para espécies do CGF. Portanto, estes três isolados não devem pertencer a esse complexo. Outros dois isolados oriundos de Israel (CML 408, CML 413) tiveram os dois alelos amplificados para cada um deles.

5.4 Indução da fase sexuada

Os cruzamentos foram avaliados semanalmente quanto à formação de peritécios e exsudação de ascósporos. Após duas semanas do cruzamento, peritécios foram observados no tratamento controle e nos cruzamentos de isolados do Brasil x isolados do Brasil. Nos cruzamentos entre isolados do Brasil x *F. sterilihyphosum*, isolados do Brasil x *F. mangiferae* e *F. sterilihyphosum* x *F. mangiferae* não foi observada a formação de peritécios. A exsudação de ascósporos demorou de 3 a 5 semanas, a depender do cruzamento. No final da avaliação 32 cruzamentos distintos formaram peritécios com exsudação de ascósporos típicos do gênero *Gibberella* (Tabela 3.4). As avaliações das características morfológicas do teleomorfo observado nos cruzamentos permitiram identificá-lo como sendo do gênero *Gibberella*. Com isso, determinou-se que a população de isolados de *Fusarium* do tipo ‘*subglutinans*’ associada à malformação da mangueira no Brasil é sexualmente compatível. *F. mangiferae* e *F. sterilihyphosum* não são sexualmente compatíveis entre si e reprodutivamente isolados da população de *Fusarium* da mangueira do Brasil.

5.5 Viabilidade de ascósporos

A viabilidade de ascósporos de *Gibberella* sp. do Brasil também foi avaliada neste estudo. Após 24 horas de incubação, praticamente todos os ascósporos tinham germinado e já começavam a produzir fiálides com microconídios (Figura 3.1).

5.6 Teste de patogenicidade de *Fusarium* spp. em mudas de mangueira

As mudas de mangueira inoculadas com espécies de *Fusarium* foram avaliadas por até seis meses, que é considerado o período de incubação do agente etiológico da malformação da mangueira (Noriega-Cantú et al., 1999).

TABELA 3.4 Fertilidade de isolados de *Fusarium* sp. do Brasil. UFLA, Lavras, MG, 2006.

♀ (MAT-1) ^a	♂ (MAT-2) ^b	♀ (MAT-2) ^c	♂ (MAT-1) ^d
CML 263	x CML 382	CML 259	x CML 263
CML 381	x CML 267		CML 381
CML 387	x CML 259		CML 387
	CML 260	CML 260	x CML 381
	CML 261		CML 387
	CML 264	CML 261	x CML 263
	CML 265		CML 381
	CML 266		CML 387
	CML 267	CML 262	x CML 263
	CML 345	CML 264	x CML 263
	CML 382		CML 381
	CML 383		CML 387
	CML 384	CML 265	x CML 381
	CML 385		CML 387
		CML 266	x CML 263
			CML 381
			CML 387
		CML 267	x CML 263

^a ♀ (MAT-1) indica os isolados do *mating type* MAT-1 férteis como fêmea.

^b ♂ (MAT-2) indica os isolados do *mating type* MAT-2 férteis como macho.

^c ♀ (MAT-2) indica os isolados do *mating type* MAT-2 férteis como fêmea.

^d ♂ (MAT-1) indica os isolados do *mating type* MAT-1 férteis como macho.

Foi observado se as mudas apresentavam os sintomas típicos da malformação floral e vegetativa. No final do período de avaliação, foram realizados isolamentos dos tecidos próximos dos meristemas com o objetivo de reisolar os fungos inoculados e, assim, completar os postulados de Koch. Foram recuperadas culturas típicas para os isolados CML 262, 264, 282, 345, 383, 387 e 398. O isolado CML 383, que corresponde a *Fusarium* sp. do Brasil, causou sintomas em 60% das mudas inoculadas. Já os isolados CML 264, 345 e 387, também da mesma espécie, causaram sintomas em apenas 20% das mudas. O isolado CML 282, que corresponde a *F. sterilihyphosum*, causou sintomas de

malformação em 20% das mudas. O isolado CML 398 (*F. semitectum*), apesar de ter sido recuperado das mudas inoculadas, não causou nenhuma alteração visual na planta. Nenhuma cultura de *Fusarium* foi isolada de nenhuma das mudas utilizadas como controle negativo.

6 DISCUSSÃO

O fato de mais uma espécie de *Fusarium* ter sido detectada associada à malformação da mangueira enfatiza um problema que já vem sendo estudado desde 1891, que é a sua etiologia. Entretanto, avanços já foram alcançados em desvendar a etiologia de uma das doenças mais importantes em frutíferas tropicais (Freeman et al., 1999; Noriega-Cantú et al., 1999; Steenkamp et al., 2000a; Britz et al., 2002).

Espécies de *Fusarium* que formam conídios em falsas cabeças e que não formam clamidósporos são freqüentemente encontradas associadas a tecidos de mangueiras afetados pela malformação, seja floral ou vegetativa. Neste estudo foi observado que, na maioria dos casos, apenas culturas de *F. subglutinans sensu lato* são recuperadas no isolamento de tecidos com malformação, enquanto que, em tecidos sadios, foi observada uma variedade de fungos. Em um estudo sobre a associação de fungos endófitos a folhas de mangueira, foi mostrado que um grande número de fungos encontram-se associados a folhas de mangueira e que nenhuma espécie de *Fusarium* foi recuperada (Freire & Bezerra, 2001), indicando que possivelmente existe uma preferência de *Fusarium* spp. pela colonização de tecidos meristemáticos de mangueira. Com estas observações completa-se o primeiro dos postulados de Koch, o qual menciona que o agente etiológico de uma doença deve estar em constante associação com os sintomas da mesma.

O segundo postulado de Koch foi completado pelo freqüente isolamento de *Fusarium* sp. do Brasil e *F. sterilihyphosum* das áreas infectadas e não de tecidos sadios de mangueira. Com a inoculação e reprodução dos sintomas da malformação floral e vegetativa em mudas de mangueira completou-se o terceiro postulado de Koch para os isolados CML 262, 264, 345, 383 e 387, que

representam uma população distinta do Brasil, com o isolado CML 383 tendo causado sintomas em 60% das mudas. Testes de patogenicidade com isolados de mangueira obtidos no Brasil já foram realizados com sucesso em outros estudos (Anjos et al., 1998; Terao et al., 2001), mas, devido ao fato de não se ter tido acesso aos isolados utilizados, não se pode determinar se tratava-se de *Fusarium* sp. do Brasil, *F. sterilihyphosum* ou outra espécie filogenética e ou biológica de *Fusarium*.

É mostrado pela primeira vez um possível papel de *F. sterilihyphosum* na etiologia da malformação da mangueira, pois, o isolado CML 282 causou sintomas em 20% das mudas inoculadas no presente estudo. Ao que parece, a malformação da mangueira é causada por um complexo de espécies, pois, além de *Fusarium* sp. do Brasil e *F. sterilihyphosum*, já foi provado anteriormente que *F. mangiferae* também é capaz de induzir os sintomas típicos de malformação em mangueiras em Israel (Freeman et al., 1999). Esta resolução na detecção de espécies de *Fusarium* só foi alcançada recentemente, com técnicas modernas de biologia molecular como AFLP e seqüenciamento, e pelo uso prático do conceito de espécie biológica (Leslie, 1995; Leslie et al., 2001; O'Donnell et al., 1998, 2000; Summerell et al., 2003).

Para completar os postulados de Koch, todos os isolados supracitados foram reisolados dos tecidos de mudas apresentando sintomas típicos de malformação. Assim, completou-se o quarto e último postulado, no qual o agente etiológico deve ser reisolado da área inoculada; no caso específico da malformação, também a área onde os sintomas se manifestam.

Os marcadores morfológicos conhecidos atualmente não são suficientes para separar *Fusarium* sp. do Brasil de *F. sterilihyphosum*, embora a maioria dos isolados de *Fusarium* sp. do Brasil estudados aqui não apresentem a hifa estéril espiralada. Entretanto, foi mostrado que alguns isolados de *F. sterilihyphosum* podem não apresentar hifa estéril espiralada. Possivelmente, as duas populações

que deram origem a estas duas espécies se separaram relativamente há pouco tempo, considerando o tempo evolucionário, ou que a hifa estéril espiralada tenha surgido e desaparecido mais de uma vez.

Portanto, apesar de pequenas diferenças morfológicas entre *Fusarium* sp. do Brasil e *F. sterilihyphosum*, como, por exemplo, o macroconídio de *F. sterilihyphosum* ser maior e o crescimento em PDA maior a 20°C no escuro, alguns isolados das duas espécies se sobrepõem com relação a estas características. A dificuldade na identificação de espécies de *Fusarium* com base somente em caracteres morfológicos é um fato bem conhecido, com várias espécies filogenéticas e ou biológicas já descritas que não podem ser diferenciadas facilmente pela morfologia, ou que são idênticas (O'Donnell et al., 1998, 2000; Leslie et al., 2004). Este fato levou a sistemas de classificação para *Fusarium* que não refletem a história evolucionária deste gênero anamórfico e que, na maioria dos casos, são conflitantes, com apenas algumas espécies com marcadores morfológicos consistentes (O'Donnell et al., 1998).

Aparentemente, a taxa de cruzamento no campo para *Fusarium* sp. do Brasil, é alta, pois no presente estudo foi observado que dos 30 isolados estudados, 11 foram hermafroditas, ou seja, 36,7% (Tabela 2.1, capítulo 2). Para *G. konza*, a taxa de isolados hermafroditas para isolados do campo foi de 3,8% (Zeller et al., 2003). Esta baixa fertilidade em isolados do campo foi observada também para *G. thapsina* e *G. circinata* (Klittich et al., 1997; Britz et al., 1998). Outro indício da ocorrência de reprodução no campo consiste na grande variabilidade encontrada na população, mesmo entre isolados coletados na mesma fazenda (CML 263, 264, 265 e 266).

A forma mais eficiente de separar *Fusarium* sp. do Brasil de *F. sterilihyphosum* e *F. mangiferae* é por meio de cruzamento com os testadores de *Gibberella* sp. do Brasil, padrões de AFLP e comparação de seqüências de histona H3, β -tubulina e fator de alongação-1a. Os testadores para *Gibberella*

sp. do Brasil estão em fase de síntese e, em breve, serão disponibilizados para o público.

7 CONCLUSÕES

Nas condições da realização do trabalho, concluiu-se o seguinte:

1. *Fusarium* sp. do Brasil representa uma nova espécie biológica do complexo *Gibberella fujikuroi*, reprodutivamente isolada de *Fusarium mangiferae* e *Fusarium sterilihyphosum*;
2. *Fusarium* sp. do Brasil é agente etiológico da malformação floral e vegetativa da mangueira no Brasil;
3. *Fusarium sterilihyphosum* é patogênico à mangueira;
4. a espécie *Fusarium mangiferae* ainda não foi encontrada no Brasil.

8 BIBLIOGRAFIA CITADA

ANJOS, J. N.; CHARCHAR, M. J. A.; PINTO, A. C. Q.; RAMOS, V. H. V. Associação de *Fusarium sacchari* com a malformação vegetativa da mangueira. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 75-77, jan./mar. 1998.

BRITZ, H.; STEENKAMP, E. T.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, M. J. Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 4, p. 722-730, July/Aug. 2002.

BRITZ, H.; WINGFIELD, M. J.; COUTINHO, T. A.; MARASAS, W. F. O.; LESLIE, J. F. Female fertility and mating type distribution in a South African population of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 6, p. 2094-2095, June 1998.

COVERT, S. F.; BRILEY, A.; WALLACE, M. M.; MCKINNEY, T. Partial *MAT-2* gene structure and the influence of temperature on mating success in *Gibberella circinata*. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 28, n. 1, p. 43-54, Oct. 1999.

FAOSTAT. Estatísticas da Food and Agriculture Organization das Nações Unidas. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acessos em: jan. 2006.

FREEMAN, S.; MAIMON, M.; PINKAS, Y. Use of GUS transformants of *Fusarium subglutinans* for determining etiology of mango malformation disease. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, n. 6, p. 456-461, June 1999.

FREIRE, F. C. O.; BEZERRA, J. L. Foliar endophytic fungi of Ceará State (Brazil): a preliminary study. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 304-308, jul./set. 2001.

GERLACH, W.; NIRENBERG, H. **The genus *Fusarium*: a pictorial atlas**. Berlin, Germany: Biol. Bundesanst für Land-u Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, 1982. 406 p.

KERÉNYI, Z.; MORETTI, A.; WAALWIJK, C.; OLÁH, B.; HORNOK, L. Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. **Applied and**

Environmental Microbiology, Washington, v. 70, n. 8, p. 4419-4423, Aug. 2004.

KERÉNYI, Z.; ZELLER, K.; HORNOK, L.; LESLIE, J. F. Molecular standardization of mating type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 9, p. 4071-4076, Sept. 1999.

KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F. Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). **Genetics**, Baltimore, v. 118, n. 3, p. 417-423, Mar. 1988.

KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F.; NELSON, P. E.; MARASAS, W. F. O. *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): a new species in section *Liseola* from sorghum. **Mycologia**, New York, v. 89, n. 4, p. 643-652, July/Aug. 1997.

LESLIE, J. F. *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. S282-S291, 1995. Supplement.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S.; DOE, F. J. Description of *Gibberella sacchari* and neotypification of its anamorph *Fusarium sacchari*. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 3, p. 718-724, May/June 2005.

LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; SUMMERELL, B. A. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, n. 3, p. 107-117, Sept. 2001.

LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; WOHLER, M.; SUMMERELL, B. A. Interfertility of two mating populations in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 5/6, p. 611-618, June 2004.

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

NIRENBERG, H. I. Recent advances in the taxonomy of *Fusarium*. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 32, n. 1, p. 91-101, 1990.

NIRENBERG, H. I.; O'DONNELL, K. New species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York, v. 90, n. 3, p. 434-458, May/June 1998.

NORIEGA-CANTÚ, D. H.; TÉLIZ, D.; MORA-AGUILERA, G.; RODRÍGUEZ-ALCAZAR, J.; ZAVALETA-MEJÍA, E.; OTERO-COLINAS, G.; LEE CAMPBELL, C. Epidemiology of mango malformation in Guerrero, Mexico with traditional and integrated management. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n. 3, p. 223-228, Mar. 1999.

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

O'DONNELL, K.; NIRENBERG, H. I.; AOKI, T.; CIGELNIK, E. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**, Tokyo, v. 41, n. 1, p. 61-78, 2000.

PFENNING, L. H.; SILVA, C. F. Isolamento, caracterização e identificação de espécies de *Fusarium* associados ao cafeeiro na região Sul de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 26., 1999, Franca, SP. **Anais...** Franca, SP, 1999. p. 56-58, 1999.

PHAN, H. T.; BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S.; LIEW, E. C. Y.; SMITH-WHITE, J. L.; CLARKSON, J. R. *Gibberella gaditjirrii* (*Fusarium gaditjirrii*) sp. nov., a new species from tropical grasses in Australia. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 50, p. 261-272, 2004.

PLOETZ, R. C.; ZHENG, Q. I.; VÁSQUEZ, Á.; ABDEL-SATTAR, M. A. Current status and impact of mango malformation in Egypt. **International Journal of Pest Management**, London, v. 48, n. 4, p. 279-285, Oct./Dec. 2002.

SAMUELS, G. J.; NIRENBERG, H. I.; SEIFERT, K. A. Perithecial species of *Fusarium*. In: SUMMERELL, B. A.; LESLIE, J. F.; BACKHOUSE, D.; BRYDEN, W. L.; BURGESS, L. W. (Ed.). **Fusarium**: Paul E. Nelson Memorial Symposium, St. Paul, Minnesota, USA: APS Press, 2001. p 1-14.

SANTOS, A. B.; TABOSA, S. A. S.; MENDES, R. G. P.; BRITO, P. F. A. B. Etiologia do suberbrotamento da mangueira no estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, p. S595, 1983. Suplemento.

STEENKAMP, E. T.; BRITZ, H.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, M. J. Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 1, n. 4, p. 187-193, July 2000a.

STEENKAMP, E. T.; WINGFIELD, B. D.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, M. J.; MARASAS, W. F. O. Differentiation of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* by histone gene sequence data. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 8, p. 3401-3406, Aug. 1999.

STEENKAMP, E. T.; WINGFIELD, B. D.; COUTINHO, T. A.; ZELLER, K. A.; WINGFIELD, M. J.; MARASAS, W. O.; LESLIE, J. F. PCR-based identification of *MAT-1* and *MAT-2* in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4378-4382, Oct. 2000b.

SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 2, p. 117-128, Feb. 2003.

TERAO, D.; OLIVEIRA, S. M. A.; TAVARES, S. C. C. H.; MENEZES, M. Identificação do agente causal da malformação floral e vegetativa da mangueira no Nordeste brasileiro. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 328-331, jul./set. 2001.

ZELLER, K. A.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S. & LESLIE, J. F. *Gibberella konza* (*Fusarium konzum*) sp. nov., a new biological species within the *Gibberella fujikuroi* species complex from prairie grass. **Mycologia**, New York, v. 95, n. 5, p. 943-954, Sept./Oct. 2003.

ZHENG, Q.; PLOETZ, R. Genetic diversity in the mango malformation pathogen and development of a PCR assay. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 208-216, Apr. 2002.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho mostram claramente que a população de *Fusarium* do tipo 'subglutinans', associada à malformação da mangueira no Brasil, se divide basicamente em duas espécies: *Fusarium sterilihyphosum* Britz, Marasas & Wingfield e uma nova espécie biológica do complexo *Gibberella fujikuroi* a qual será descrita em breve em um periódico de circulação internacional. Por outro lado, não foi constatada a presença de *Fusarium mangiferae* Britz, Wingfield & Marasas dentre os 59 isolados coletados no Brasil associados à malformação da mangueira. Indicando que, possivelmente, esta espécie não está presente no país.

A síntese de isolados testadores férteis como fêmeas que servirão como representantes desta nova espécie de *Fusarium* está sendo realizada no Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos da UFLA. Os isolados testadores serão depositados em coleção pública no Brasil para serem utilizados em cruzamentos para a identificação de novos membros desta população a partir de isolados de campo. Após a definição dos isolados testadores, serão realizados novos cruzamentos para confirmar os resultados já obtidos nos Estados Unidos sobre os isolados pertencentes a esta nova espécie.

Dos isolados presentes em nossa coleção, provenientes do Brasil, 21 ainda não foram estudados em detalhes o suficiente para definir a qual espécie pertencem. Dentre eles, cinco isolados apresentam hifa estéril espiralada. Um dos isolados obtidos no Ceará agrupou próximo à *Fusarium pseudocircinatum* O'Donnell & Nirenberg e apresentou macroconídio semelhante, porém, não foi observado a produção de hifa estéril espiralada. De acordo com John F. Leslie esta espécie foi observada em mangueiras da Malásia (comunicação pessoal). Estas linhagens devem ser estudadas com mais detalhes pois podem pertencer à

populações ainda não descritas de *Fusarium*. Quando os testadores para *Gibberella* sp. do Brasil estiverem prontos, estes isolados serão testados.

Os isolados obtidos no México possuem hifa estéril espiralada, mas não agrupam com nenhuma das espécies de *Fusarium* conhecidas e nem com *Fusarium* sp. do Brasil. Já os isolados da Malásia parecem pertencer a um *taxon* distinto, como foi previamente relatado por Britz et al. (2002).