



KEDMA DA SILVA MATOS

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES
FILOGENÉTICAS E BIOLÓGICAS DO
COMPLEXO *Fusarium solani* - FSSC NO BRASIL**

LAVRAS - MG

2014

KEDMA DA SILVA MATOS

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES FILOGENÉTICAS E BIOLÓGICAS DO
COMPLEXO *Fusarium solani* – FSSC NO BRASIL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Ludwig H. Pfenning

Coorientadora

Dra. Sarah da Silva Costa Guimarães

LAVRAS – MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Matos, Kedma da Silva.

Diversidade de espécies filogenéticas e biológicas do complexo
Fusarium solani-fssc no Brasil / Kedma da Silva Matos. – Lavras :
UFLA, 2014.

81 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning.

Bibliografia.

1. Patógeno. 2. Filogenia molecular. 3. Homotalismo. 4.
Heterotalismo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.4

KEDMA DA SILVA MATOS

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES FILOGENÉTICAS E BIOLÓGICAS DO
COMPLEXO *Fusarium solani* – FSSC NO BRASIL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 8 de abril de 2014.

| | |
|----------------------------|-------|
| Dr. Eduardo Alves | UFLA |
| Dr. Lucas Magalhães Abreu | UFLA |
| Dr. Paulo Cezar Ceresini | UNESP |
| Dra. Rosane Freitas Schwan | UFLA |

Dr. Ludwig H. Pfenning
Orientador

LAVRAS – MG

2014

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por ter guiado meus caminhos durante esses anos.

À Universidade Federal de Lavras, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e ao Departamento de Fitopatologia, por me permitirem cursar o doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Dr. Ludwig H. Pfenning, pela orientação, amizade e confiança.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pelos ensinamentos e por terem confiado em mim.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Eduardo Alves, Dr. Lucas M. Abreu, Dr. Paulo C. Ceresini e Dra. Rosane F. Schwan, pela participação e valiosas sugestões.

Aos meus pais, Marilene e Antonio, e a toda minha família, por todo amor, carinho e confiança ao longo desses anos em que estivemos longe.

Aos amigos do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos/DFP, pelos momentos de descontração e colaboração na realização do trabalho. Agradecimento especial à Dra. Sarah e ao técnico do laboratório Edinho, pelo apoio e preciosas ajudas.

A todos os amigos de Lavras com quem tive a oportunidade de conviver e compartilhar momentos especiais durante todos esses anos.

Ao Raphael H. Siqueira, por toda a ajuda, a atenção e o carinho.

A todos que contribuíram com essa realização pessoal e profissional.

Muito obrigada!

RESUMO GERAL

O complexo *Fusarium solani* (FSSC) é representado por cerca de 60 espécies filogeneticamente distintas. Neste estudo, pretendeu-se investigar as seguintes questões: Quantas linhagens filogenéticas já identificadas no FSSC estão presentes em uma coleção de 52 isolados de várias origens geográficas, de diferentes plantas e do solo no Brasil? Existem linhagens filogenéticas ainda não identificadas? O uso do conceito filogenético e biológico, quando complementado, pode ajudar na definição de espécies no FSSC para os isolados avaliados? Os objetivos foram: i. verificar a diversidade de espécies do FSSC no país por meio de análises filogenéticas das regiões gênicas *RPB2* e *EF-1 α* ; ii. desenvolver *primers* para determinar o *mating type* dos isolados do FSSC e iii. identificar a presença de espécies biológicas dentre os isolados estudados por meio de cruzamentos em laboratório. No presente estudo, 37 isolados do Brasil foram agrupados em 12 linhagens filogenéticas distintas do Clado 3 do FSSC, sendo, para 10 linhagens, registros inéditos. *F. keratoplasticum* foi previamente registrada no Brasil em associação com a micose superficial em humanos e foi reencontrada neste estudo associada à pimenta-do-reino. As linhagens FSSC 5, FSSC 7, FSSC 9, FSSC 20 e FSSC 34 foram representadas por isolados de várias plantas e solo, embora tenham sido descritas, inicialmente, em associação com humanos e animais. Nove isolados homotáticos agruparam-se em três linhagens filogenéticas distintas: FSSC 8 (clado *Neocosmospora*), FSSC 21 (*F. striatum*) e FSSC 33 e são associados a material vegetal. Espécies biológicas foram identificadas por meio de *primers* desenvolvidos no presente estudo para determinar o *mating type* para as espécies do FSSC. Após a determinação dos *mating types*, isolados da mesma linhagem filogenética foram submetidos a cruzamentos em laboratório. Duas linhagens filogenéticas identificadas também representam distintas espécies biológicas: na FSSC 23 (MP-II, f. sp. *batatas*), cruzamentos férteis foram obtidos entre isolados do Brasil de pimenta-do-reino e isolado da MP-II, sendo o primeiro relato dessa MP no país, e FSSC 31, que representa uma espécie filogenética e biológica que causa doença na pimenta-do-reino. Em duas MPs conhecidas (MP-IV, f. sp. *xanthoxyli*) e (MP-V, *F. petroliphilum*) foram determinados os *mating types* dos isolados testadores, por meio dos *primers* desenvolvidos no estudo e cruzamentos férteis foram obtidos entre eles. Nova MP foi identificada entre isolados patogênicos à soja. Nos isolados homotáticos, ocorreu amplificação de ambos os idiomorfos. No Brasil existe grande diversidade de linhagens filogenéticas e biológicas do FSSC associadas a plantas economicamente importantes.

Palavras-chave: Filogenia molecular. *Mating populations*. Idiomorfos. Heterotalismo. Homotalismo.

GENERAL ABSTRACT

The *Fusarium solani* species complex (FSSC) is represented by around 60 species phylogenetically distinct. Through these studies we intended to investigate: (i) how many phylogenetic lineages, already identified in the FSSC, are present in a collection of 52 isolates from various geographical origins, different plants and soils of Brazil? (ii) are there phylogenetic lineages not identified yet? (iii) from the assessed strains, the usage of phylogenetic and biological concepts, when complemented, may help in the identification of species in the complex? These studies aimed to: (i) verify the diversity of species of the complex in Brazil through phylogenetic analysis based on *RPB2* and *EF-1 α* datasets; (ii) to develop primers for identification the mating types of the isolates in FSSC; and (iii) identify the presence of biological species among studied isolates by crossing in the laboratory. Thirty-seven isolates from Brazil were grouped in 12 distinct phylogenetic lineages of the clade 3 in the FSSC, of which 10 lineages are unpublished records. *F. keratoplasticum* has already been reported in Brazil in association with superficial mycosis in humans and was found in this study in association with black pepper. The lineages FSSC 5, FSSC 7, FSSC 9, FSSC 20 and FSSC 34 were represented by isolates obtained from various plants and soils, although they have already been described in association with humans and animals. Nine homothallic isolates are associated with plant material and were grouped in three distinct phylogenetic lineages: FSSC 8 (*Noecosmospora* clade), FSSC 21 (*F. striatum*) and FSSC 33. Biological species were identified by developed primers in the present study to determine the mating type for the species of FSSC. After determination of mating type, isolates of the same phylogenetic lineage were subjected to the crossing in the laboratory. Two phylogenetic lineages identified also represented distinct biological species: (i) in the FSSC 23 (MP-II, f.sp. *batatas*), fertile crossings were obtained among isolates of black pepper from Brazil and isolate of MP-II, being the first report of that MP in the country; and (ii) FSSC 31 represents a phylogenetic and biological specie which causes disease in black pepper. From two known MP, MP-IV, f.sp. *xanthoxyli* and MP-V, *F. petroliphilum*, were determined the mating types of the isolates tester by developed primers in this study and, fertile crossings were obtained among them. A novel MP was identified among isolates pathogenic of soybean. From homothallic isolates was amplified both idiomorphs. There is in Brazil a wide diversity of biological and phylogenetic lineages of the FSSC associated with economically important plants.

Keywords: Molecular phylogeny. Mating populations. Idiomorphs. Heterothallism. Homothallism.

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|-----------|
| | CAPÍTULO 1..... | 8 |
| 1 | INTRODUÇÃO GERAL..... | 8 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 12 |
| 2.1 | Histórico e diversidade de espécies no complexo <i>Fusarium solani</i>.. | 12 |
| 2.2 | Nomenclatura da fase sexuada no FSSC..... | 14 |
| 2.3 | <i>Mating type</i> e o conceito da espécie biológica no FSSC..... | 15 |
| 2.4 | <i>Primers</i> para identificação de <i>mating types</i>no FSSC..... | 17 |
| | REFERÊNCIAS | 19 |
| | CAPÍTULO 2 Diversidade de espécies filogenéticas do complexo de espécies <i>Fusarium solani</i> que ocorrem no Brasil..... | 23 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 25 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 28 |
| 2.1 | Isolados | 28 |
| 2.2 | Extração de DNA e amplificação por PCR..... | 28 |
| 2.3 | Sequenciamento e análises filogenéticas | 37 |
| 3 | RESULTADOS..... | 39 |
| 4 | DISCUSSÃO..... | 49 |
| | REFERÊNCIAS | 55 |
| | CAPÍTULO 3 <i>Primers</i> para determinação de <i>Mating types</i> e identificação de espécies biológicas no complexo de espécies <i>Fusarium solani</i>..... | 59 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 61 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 63 |
| 2.1 | Isolados | 63 |
| 2.2 | Extração de DNA..... | 63 |
| 2.3 | Desenvolvimento dos <i>primers</i> para amplificação do idiomorfo <i>MAT</i>..... | 63 |
| 2.4 | Especificidade dos <i>primers</i> e otimização da PCR..... | 72 |
| 2.5 | Determinação de <i>mating type</i> por PCR | 73 |
| 2.6 | Indução da fase sexuada..... | 73 |
| 3 | RESULTADOS..... | 75 |
| 3.1 | Desenvolvimento de <i>primers</i> para a determinação dos <i>mating types</i> no FSSC | 75 |
| 3.2 | Determinação de <i>mating type</i> por PCR | 77 |
| 3.3 | Identificação de espécies biológicas no FSSC | 78 |
| 4 | DISCUSSÃO..... | 79 |
| | REFERÊNCIAS | 83 |

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O *Fusarium solani species complex*, ou FSSC, compreende espécies de patógenos associados a várias doenças em plantas economicamente importantes, como soja, feijão, pimenta-do-reino e ervilha, entre outras. Existem também patógenos de humanos e de animais, espécies produtoras de toxinas, endófitas e saprófitas (MATUO; SNYDER, 1973; O'DONNELL, 2000; ZHANG et al., 2006).

Muitas espécies e populações do FSSC foram identificadas primeiramente com o nome *F. solani* e, posteriormente, classificadas em *formae speciales*, com base na patogenicidade específica à determinada planta. No entanto, o conceito de espécie baseado somente em caracteres morfológicos não reflete a real diversidade de espécies e populações nesse complexo (BAAYEN et al., 2000; O'DONNELL, 2000). Conhecimentos gerados durante as últimas décadas, por meio de filogenia molecular e conceitos biológicos, permitiram uma definição mais precisa no sistema de identificação das espécies do FSSC (MATUO; SNYDER, 1973; O'DONNELL, 2000).

Existem, no complexo *F. solani*, diversas espécies biológicas e filogenéticas distintas, distribuídas em três clados (MATUO; SNYDER, 1973; O'DONNELL, 2000). O Clado 1 é representado por isolados da Nova Zelândia; o Clado 2 é formado por patógenos associados à soja e ao feijão provenientes da América do Sul e da Ásia e o Clado 3, mais diverso, é composto por patógenos de várias plantas cultivadas e espécies de ambiente hospitalar da África, Ásia e América do Sul (O'DONNELL, 2000). Atualmente, existem cerca de 60 espécies filogenéticas no FSSC, algumas delas definidas também como espécies biológicas ou *mating populations* (MP) (NALIM et al., 2011; O'DONNELL et al., 2008; ZHANG et al., 2006).

Em estudos baseados em genotipagem de multilocus evidenciou-se a diversidade de haplótipos que foram designados por meio de polimorfismo de nucleotídeos (CHANG et al., 2006; O'DONNELL et al., 2008; ZHANG et al., 2006). No intuito de avaliar as relações evolutivas dos isolados do FSSC de humanos, ambiente hospitalar, animais, plantas e solo, quatro grandes grupos foram identificados nas análises filogenéticas. Em todos os grupos foi observada a inespecificidade de hospedeiro (ZHANG et al., 2006).

Em 2005 e 2006, vários surtos de ceratite, inflamação ocular, ocorreram em várias cidades dos EUA e foram associados ao uso de solução de lentes de contato. *F. solani* foi identificado, em 70% dos casos, como agente causal (CHANG et al., 2006). Diante desse fato, diversos outros trabalhos foram realizados com o foco principal em isolados do FSSC associados a micoses (O'DONNELL et al., 2008; SHORT et al., 2011).

No complexo *F. solani* existem 39 linhagens filogenéticas identificadas no Clado 3, as quais recebem a denominação FSSC mais um número correspondente à linhagem (CHANG et al., 2006; O'DONNELL et al., 2008; SHORT et al., 2011). Desse total, somente seis foram formalmente descritas: *Fusarium petroliphilum* (FSSC 1), *Fusarium keratoplasticum* (FSSC 2), *Fusarium falciforme* (FSSC 3+4), *Fusarium lichenicola* (FSSC 16), *Fusarium ambrosium* (FSSC 19) e *Fusarium striatum* (FSSC 21) (GADD; LOOS, 1947; SHERBAKOFF, 1915; SHORT et al., 2013; SUMMERBELL; SCHROERS, 2002).

O conhecimento da diversidade de espécies do FSSC no Brasil é limitado. De todas as linhagens filogenéticas identificadas, apenas para quatro delas há o registro no país: *Fusarium keratoplasticum*, "*Fusarium falciforme*" FSSC 3+4, FSSC 31(f. sp. *piperis*) e FSSC 35 (*Fusarium* sp.). Com execução da linhagem FSSC 31, representada por um isolado do Brasil de *Piper nigrum*,

todas as outras linhagens são representadas exclusivamente por isolados associados à micose, em diferentes países (O'DONNELL et al., 2008).

Além do uso de filogenia com a análise de vários genes, outra abordagem, como o uso do conceito biológico e de *primers* para determinar *mating types*, pode ser utilizada no processo de identificação de espécies em populações de fungos em que marcadores morfológicos são escassos ou inexistentes, como ocorre no FSSC (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

No FSSC existem espécies heterotáticas; reprodução sexual ocorre entre isolados de *mating types* opostos (*MAT-1* e *MAT-2*) e, em espécies homotáticas, reprodução sexual ocorre a partir de um único isolado, pois os *mating types* coexistem no mesmo genoma (LESLIE; SUMMERELL, 2006; YUN et al., 2000). No Clado 3 do FSSC foram identificadas MPs por meio de cruzamentos no laboratório, denominadas de MP-I a MP-VII (MATUO; SNYDER, 1973), entre isolados de *F. keratoplasticum* e entre isolados de *F. petroliphilum*, anteriormente denominada MP-V (MEHL; EPSTEIN, 2007; SHORT et al., 2013). No Clado 2, cruzamentos entre isolados de *Fusarium tucumaniae* (COVERT et al., 2007).

Primers degenerados foram desenvolvidos para determinar *mating type* para várias espécies do gênero *Fusarium* (KERÉNYI et al., 2004). Esses *primers* foram testados com isolados do FSSC, entretanto, amplificaram somente o idiomorfo *MAT-2*. O desenho de *primers* específicos para determinar *mating type* no FSSC pode auxiliar estudos de indução da fase sexuada em laboratório e identificar novas espécies biológicas. Além disso, o conceito biológico pode complementar estudos com morfologia e filogenia molecular nesse complexo.

A diversidade de espécies no FSSC pode ser muito maior, principalmente nos trópicos, do que já foi relatada até o momento. A identificação correta dos patógenos de plantas, de animais ou de humanos, do

FSSC, e sua biologia reprodutiva são importantes para fornecer subsídios para o manejo de doenças.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico e diversidade de espécies no complexo *Fusarium solani*

O complexo *Fusarium solani*, ou FSSC (teleomorfo *Haematonectria* ou *Neocosmospora*) (NALIM et al., 2011; ROSSMAN et al., 1999), é composto por diversas espécies importantes, como patógenos de várias plantas cultivadas, patógenos de humanos e de animais, e algumas espécies produtoras de toxinas, endófitas e sapróbias (NALIM et al., 2011; O'DONNELL, 2000; ZHANG et al., 2006). As populações do FSSC são responsáveis por várias doenças em plantas economicamente importantes, como podridão vermelha da raiz na soja, podridão radicular no feijão, fusariose na pimenta-do-reino e na ervilha, podridão seca e murcha em batata-doce, entre outras. A diversidade das populações é evidenciada pela quantidade de *formae speciales* conhecidas, que representam várias espécies biológicas e filogenéticas distintas (O'DONNELL, 2000; O'DONNELL et al., 2008).

O conceito de espécie baseado, principalmente, em caracteres morfológicos, patogenicidade e *formae speciales*, pode não refletir a diversidade real de espécies e populações no FSSC. Além disso, pode omitir as relações filogenéticas, a distribuição geográfica e a variedade de hospedeiro (O'DONNELL et al., 2008, 2010). Existem fortes evidências de que, em regiões tropicais e subtropicais do Brasil e de outros países, pode existir um número considerável de novas espécies (O'DONNELL et al., 2010).

O FSSC é composto por, aproximadamente, 60 espécies filogeneticamente distintas, distribuídas em três clados (NALIM et al., 2011; O'DONNELL et al., 2008; ZHANG et al., 2006): o Clado 1, composto por isolados da Nova Zelândia; o Clado 2, formado por isolados associados à síndrome da morte súbita da soja (SDS) e à podridão da raiz do feijão, provenientes da América do Sul e da Ásia, e o Clado 3, composto por patógenos

de outras plantas e de espécies de importância clínica, encontradas na África, na Ásia e na América do Sul (O'DONNELL, 2000).

A diversidade de espécies no FSSC foi analisada, incluindo, além de patógeno de plantas, isolados provenientes de solo, associados a infecções humanas e a ambiente hospitalar. Foram identificados quatro grupos, denominados de Grupo 1 a 4. Todos os grupos foram representados por membros do FSSC que causam infecções em humanos e em plantas, demonstrando a inespecificidade de hospedeiro. Apenas os Grupos 1 e 2 foram definidos como linhagens filogenéticas com alto suporte (ZHANG et al., 2006).

Entre os anos de 2005 e 2006, surtos de ceratite foram registrados em diferentes cidades dos EUA, relacionados com contaminação de solução de lentes de contato. *F. solani* foi identificada como agente causal em 70% dos casos analisados. No mesmo estudo foram realizadas análises de genotipagem de multilocus e identificadas sete espécies filogenéticas no FSSC e diferentes haplótipos encontrados a partir de polimorfismo de nucleotídeos. Nomenclatura foi proposta para as linhagens, sendo utilizado o nome FSSC mais o número que corresponde à espécie (ex: FSSC 1). Para cada haplótipo é utilizado um número, que corresponde à espécie e uma letra minúscula, à sequência tipo (ex: 1a, 1b, 1c) (CHANG et al., 2006).

Ao todo, já foram identificadas e nomeadas 39 linhagens filogenéticas no Clado 3 do FSSC, com a denominação FSSC e um número correspondente à linhagem (ex. FSSC 2) (CHANG et al., 2006; O'DONNELL et al., 2008; SHORT et al., 2011). Apenas seis linhagens foram formalmente descritas: *Fusarium petroliphilum* (FSSC 1), antiga MP-V; *Fusarium keratoplasticum* (FSSC 2); *Fusarium falciforme* (FSSC 3+4), linhagens FSSC 3 e FSSC 4, não resolvidas como espécies filogenéticas (CHANG et al., 2006; ZHANG et al., 2006) e combinadas provisoriamente com base no agrupamento dos isolados de ambas as linhagens com isolados de *Fusarium falciforme* (O'DONNELL et al.,

2008); *Fusarium lichenicola* (FSSC 16); *Fusarium ambrosium* (FSSC 19) e *Fusarium striatum* (FSSC 21) (GADD; LOOS, 1947; SHERBAKOFF, 1915; SHORT et al., 2013; SUMMERBELL; SCHROERS, 2002).

No Brasil há registro de somente quatro das 39 linhagens identificadas no FSSC: FSSC 2 (*F. keratoplasticum*), FSSC 3+4 (*F. falciforme*), FSSC 31 (*f. sp. piperis*) e FSSC 35 (*Fusarium* sp.). Todas essas linhagens são representadas exclusivamente por isolados associados a micoses em diferentes países, exceto a linhagem FSSC 31, representada por um isolado do Brasil de *Piper nigrum* (O'DONNELL et al., 2008).

2.2 Nomenclatura da fase sexuada no FSSC

Ao longo dos anos, diversos nomes foram propostos para o teleomorfo do FSSC, como *Hypomyces*, *Nectria*, *Neocosmospora* e *Haematonectria*. Análises filogenéticas utilizando sequências de DNA revelaram que '*Nectria*' *haematococca* e *Neocosmospora vasinfecta* formaram um grupo irmão de *Nectria cinnabarina*. Assim, as espécies de '*N.*' *haematococca* e de *Fusarium* (seção *Martiella*) foram incluídas no gênero *Neocosmospora* (ROSSMAN et al., 1999). No entanto, em estudos posteriores revelou-se que existiam diferenças no anamorfo e no teleomorfo dessas espécies. O anamorfo de *N. vasinfecta* foi considerado como *Acremonium*, conídios e ascósporos asseptados. Possivelmente, isolados de *Acremonium* perderam a habilidade de produzir macroconídios e ascósporos septados (O'DONNELL; GRAY, 1995). Diante disso, um novo gênero, denominado *Haematonectria*, foi proposto a partir de '*N.*' *haematococca*, caracterizado por peritécios globosos ou piriformes, ascósporos elipsoides com um septo e estriado (ROSSMAN et al., 1999).

Três espécies estão incluídas no gênero *Haematonectria*: *Haematonectria haematococca*/*F. solani*, *Haematonectria ipomoeae*/*Fusarium striatum* e *Haematonectria illudens*/*Fusarium illudens*. A reprodução sexual de

populações do FSSC pode ser heterotática ou homotática. Em *H. haematococca*, populações heterotáticas têm sido encontradas em várias plantas cultivadas e podem representar espécies distintas, principalmente devido à rápida especiação em resposta às atividades agrícolas. Em *H. ipomoeae*, são encontradas espécies homotáticas ou autoférteis e o anamorfo é denominado de *F. striatum*, que corresponde a um sinônimo de *F. Solani* (O'DONNELL, 2000; O'DONNELL; GRAY, 1995; ROSSMAN et al., 1999).

No XVIII Congresso Internacional de Botânica, realizado em Melbourne, em julho de 2011, na Austrália, foram propostas mudanças na nomenclatura dos fungos para os próximos anos, considerando “um fungo, um nome”, com o uso exclusivo do nome do anamorfo (NORVELL, 2011). Seguindo o Código Internacional de Nomenclatura (ICBN) para algas, fungos e plantas, bem como a proposta de Geiser et al. (2013), o uso do nome *Fusarium* seria adotado sem a necessidade do uso do nome do teleomorfo. A proposta seria interessante para as espécies do FSSC, diante da confusão taxonômica existente na nomenclatura da fase sexuada para esse complexo.

2.3 Mating type e o conceito da espécie biológica no FSSC

O ciclo de reprodução sexual em fungos, assim como nos demais eucariotos, passa pelos processos de acasalamento, que inclui fusão celular, fusão nuclear e meiose, para produzir descendência geneticamente recombinante (COPPIN et al., 1997). A terminologia utilizada para descrever um sistema de cruzamento entre fungos é denominada de *mating type*. Existe um loco *MAT* com dois idiomorfos *MAT-1* e *MAT-2*, que são sequências não relacionadas, presentes na mesma posição do cromossomo (LESLIE; SUMMERELL, 2006; TURGEON; YODER, 2000). Em espécies heterotáticas ou autoestéreis, a reprodução sexual é possível entre dois isolados de *mating types* opostos. Em espécies homotáticas, os dois idiomorfos coexistem no mesmo genoma,

fundidos ou diretamente ligados, e estas espécies completam o ciclo de vida a partir de um único esporo, por isso são consideradas autoférteis (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Os genes dos idiomorfos *MAT* apresentam regiões conservadas entre ascomicetos filamentosos; os componentes básicos e a função deles são constantes, embora a organização estrutural possa variar de acordo com a espécie (TURGEON; YODER, 2000). Os genes *MAT* de muitos fungos filamentosos têm sido estudados, principalmente em *Neurospora crassa*, *Podospora anserina* e patógenos de plantas como *Cochliobolus heterostropus*. O conhecimento da estrutura organizacional e da evolução do gene *MAT* em *Fusarium* ainda é limitado, sendo as espécies de *Gibberella* mais bem estudadas para esse gênero (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Espécies heterotáticas apresentam, no idiomorfo *MAT-2*, uma região conservada entre os ascomicetos, que codifica um grupo de proteínas denominado de *High mobility group* (HMG-box). O grupo de proteínas HMG-box desempenha papel importante na ascosporigênese e na determinação de cruzamentos específicos. O idiomorfo *MAT-1* é relativamente mais complexo, codifica um grupo de proteínas denominado de α -box com três transcritos (*MAT-1-1*, *MAT-1-2* e *MAT-1-3*), estando *MAT-1-1* relacionado à formação de peritécios e ascósporos, e *MAT-1-2* e *MAT-1-3* aumentam a eficiência dos cruzamentos (LESLIE; SUMMERELL, 2006; YUN et al., 2000).

O conceito biológico por meio de cruzamentos em laboratório pode ser utilizado para fornecer evidências de espécies biológicas. Espécie biológica é definida pela capacidade de produzir cruzamentos férteis somente entre isolados de uma mesma MP. Técnicas baseadas em reação em cadeia da polimerase (PCR) foram desenvolvidas para facilitar a determinação de *mating types* e, assim, evitar o trabalho laborioso de fazer numerosos cruzamentos em

laboratório. Após determinar os *mating types*, o cruzamento é realizado somente entre isolados opostos (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Experimentos de indução da fase sexuada em laboratório permitiram caracterizar distintas espécies biológicas no Clado 3 do FSSC: MP-I a MPV-II (MATUO; SNYDER, 1973); *F.solani* f. sp. *piperis* patógeno da fusariose da pimenta-do-reino; *F. keratoplasticum* e *F. petroliphilum* associadas a micoses em humanos (MEHL; EPSTEIN, 2007; SHORT et al., 2013) e, no Clado 2, *F.tucumaniae*, patógeno da SDS na soja (COVERT et al., 2007). As espécies biológicas também correspondem a espécies filogenéticas distintas.

2.4 Primers para identificação de *mating types* no FSSC

Regiões conservadas dos genes *MAT* foram utilizadas para desenvolver *primers* degenerados que podem ser utilizados para amplificar sequências de ambos os idiomorfos de muitas espécies de *Fusarium* (KERÉNYI et al., 2004; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Com o uso de *primers* degenerados, desenvolvidos para amplificar o idiomorfo *MAT-2* de vários ascomicetos, foi possível verificar uma significativa semelhança dessa região nos pirenomicetos *Neurospora crassa*, *Podospora anserina* e *N. haematococca* (ARIE et al., 1997). Esses *primers* também foram utilizados para isolados pertencentes ao *Gibberella fujikuroi species complex* (GFC). Em *Fusarium oxysporum*, outro pirenomiceto, *primers* foram desenvolvidos para amplificar o idiomorfo *MAT-1* (ARIE et al., 1999). É possível detectar genes *MAT* também em espécies que supostamente apresentam apenas reprodução assexuada, como, por exemplo, no genoma de *F. oxysporum*, os dois idiomorfos *MAT-1* e *MAT-2* estão presentes e são expressos (YUN et al., 2000). Assim, a falta de reprodução sexual não deve estar diretamente relacionada aos idiomorfos *MAT* e sim o resultado da desordem funcional dos

genes ainda não identificados que estão envolvidos na reprodução sexual bem sucedida (ARIE et al., 2000).

No complexo *G. fujikuroi* foram utilizados, inicialmente, *primers* degenerados para amplificar os idiomorfos *MAT-2* (ARIE et al., 1997) e *MAT-1* (ARIE et al., 1999, 2000). A partir das sequências obtidas, *primers* específicos foram desenvolvidos para determinar *mating type* para várias espécies biológicas do GFC (STEENKAMP et al., 2000).

Primers degenerados foram desenvolvidos para identificação de *mating type* em diversas espécies de *Fusarium* (incluindo isolados de *F. solani*) (KERÉNYI et al., 2004). Os *primers* degenerados foram testados com isolados do FSSC, em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo, e amplificaram somente o idiomorfo *MAT-2*. A funcionalidade dos *primers* pode estar relacionada com a divergência de sequência que pode ocorrer, mesmo em regiões conservadas para o gênero *Fusarium* (STEENKAMP et al., 2000), ou pelo fato de que *F. solani* não corresponde a uma única espécie. Além disso, os *primers* são degenerados, podem ter baixa homologia em relação às sequências dos isolados e não são específicos para o FSSC. Nos *primers* degenerados, durante o processo de síntese, podem ser incorporadas diferentes bases nitrogenadas em alguns sítios específicos, a fim de contemplar a sequência gênica.

Os estudos na literatura de *primers* para determinar *mating type* para isolados do FSSC são limitados. Eles poderiam auxiliar em estudos com cruzamentos em laboratório e na identificação de novas espécies biológicas.

REFERÊNCIAS

- ARIE, T. et al. Assessment of *Gibberella fujikuroi* mating type by PCR. **Mycoscience**, Tokyo, v. 40, p. 311-314, Mar. 1999.
- ARIE, T. et al. Efficient cloning of ascomycete mating type genes by PCR amplification of the conserved *MAT* HMG box. **Fungal Genetic Biology**, Orlando, v. 21, p. 118-130, Jan. 1997.
- ARIE, T. et al. Mating-type genes from asexual phytopathogenic ascomycetes *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 13, n. 12, p. 1330-1339, Sept. 2000.
- BAAAYEN, R. P. et al. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 8, p. 891-900, May 2000.
- CHANG, D. C. et al. A multistate outbreak of *Fusarium* keratitis associated with use of a new contact lens solution. **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 296, n. 8, p. 953-963, Aug. 2006.
- COPPIN, E. et al. Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 61, n. 4, p. 411-428, Dec. 1997.
- COVERT, S. F. et al. Sexual reproduction in the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium tucumaniae*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, n. 6, p. 799-807, Dec. 2007.
- GADD, C. H.; LOOS, C. A. The ambrosia fungus of *Xyleborus fornicatus* Eich. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 31, n. 1, p. 13-18, July 1947.

GEISER, D. M. et al. One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 103, n. 5, p. 400-408, 2013.

KERÉNYI, Z. et al. Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 8, p. 4419-4423, Aug. 2004.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Malden: Blackwell, 2006. 388 p.

MATUO, T.; SNYDER, W. C. Use of morphology and mating populations in the identification of formae speciales in *Fusarium solani*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 63, p. 562-565, Nov. 1973.

MEHL, H.; EPSTEIN, L. *Fusarium solani* species complex isolates conspecific with *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 2 from naturally infected human and plant tissue and environmental sources are equally virulent on plants, grow at 37°C and are interfertile. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 9, n. 9, p. 2189-2199, 2007.

NALIM, F. A. et al. New species from the *Fusarium solani* species complex derived from perithecia and soil in the Old World tropics. **Mycologia**, Lawrence, v. 103, n. 6, p. 1302-1330, Nov./Dec. 2011.

NORVELL, L. L. Fungal nomenclature-Melbourne approves a new CODE. **Micotaxon**, Ottawa, v. 116, p. 481-490, Apr./June 2011.

O'DONNELL, K. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, Lawrence, v. 92, n. 5, p. 919-938, Mar. 2000.

O'DONNELL, K. et al. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 8, p. 2477-2490, Aug. 2008.

O'DONNELL, K. et al. Soybean sudden death syndrome species diversity within north and south America revealed by multilocus genotyping. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, n. 1, p. 58-71, Jan. 2010.

O'DONNELL, K.; GRAY, L. E. Phylogenetic relationships of the Soybean Sudden Death Syndrome pathogen *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* inferred from rDNA sequence data and PCR primers for its identification. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 8, n. 5, p. 709-716, 1995.

ROSSMAN, A. Y. et al. Genera of *Bionectriaceae*, *Hypocreaceae* and *Nectriaceae* (*Hypocreales*, Ascomycetes). **Studies Mycology**, Wageningen, v. 42, p. 1-248, May 1999.

SHERBAKOFF, C. D. **Fusaria of potatoes**. Ithaca: University Agricultural Experimental Station Memoir, 1915. 68 p.

SHORT, D. P. G. et al. Phylogenetic relationships among members of the *Fusarium solani* species complex in human infections and the descriptions of *F. keratoplasticum* sp. nov. and *F. petroliphilum* stat. nov. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 53, p. 9-70, Feb. 2013.

SHORT, D. P. G. et al. Widespread occurrence of human pathogenic types of the fungus *Fusarium* detected in plumbing drains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 12, p. 4264-4272, Dec. 2011.

STEENKAMP, E. T. et al. 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. 2000.

SUMMERBELL, R. C.; SCHROERS, H. J. Analysis of phylogenetic relationship of *Cylindrocarpon lichenicola* and *Acremonium falciforme* to the *Fusarium solani* species complex and a review of similarities in the spectrum of opportunistic infections caused by these fungi. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 8, p. 2866-2875, Aug. 2002.

TURGEON, B. G.; YODER, O. C. Proposed nomenclature for mating type genes of filamentous ascomycetes. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 31, n. 1, p. 1-5, Jan. 2000.

YUN, S. H. et al. Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic and asexual *Gibberella/Fusarium* species. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 31, p. 7-20, Sept. 2000.

ZHANG, N. et al. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infection in both humans and plants are common in the environment. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 6, p. 2186-2190, June 2006.

CAPÍTULO 2

DIVERSIDADE DE ESPÉCIES FILOGENÉTICAS DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Fusarium solani* QUE OCORREM NO BRASIL

RESUMO

O presente estudo foi realizado com o objetivo de verificar a diversidade de linhagens filogenéticas do complexo de espécies *Fusarium solani* (FSSC) que ocorrem no Brasil. Foi analisado um total de 52 isolados obtidos do solo, de plantas cultivadas e nativas provenientes de diferentes estados do Brasil. Foram utilizadas, nas análises filogenéticas de máxima parcimônia e máxima verossimilhança, 52 e 48 sequências de *EF-1 α* e *RPB2*, respectivamente. Foram incluídas, ainda, na análise, 80 sequências de *EF-1 α* e 72 de *RPB2* de material de referência, representando as diferentes linhagens filogenéticas já identificadas do FSSC. As análises de ambas as regiões gênicas foram realizadas de forma individual e combinada. Os isolados provenientes do Brasil ficaram distribuídos em 12 linhagens filogenéticas distintas do Clado 3 do FSSC. Com exceção de FSSC 2 (*F. keratoplasticum*) e do FSSC 31 (f. sp. *piperis*), as outras 10 linhagens são registradas pela primeira vez para o Brasil. *F. keratoplasticum*, previamente registrada no Brasil associada à micose em humanos, é reencontrada no presente estudo, associada a *Piper nigrum*. As linhagens FSSC 5, FSSC 7, FSSC 9, FSSC 20 e FSSC 34 são associadas a diversas plantas nativas, plantas cultivadas e solo, embora tenham sido descritas em associação com humanos e animais, em diferentes países do mundo. Isolados homotáticos foram agrupados em três linhagens filogenéticas distintas, FSSC 8 (*Neocosmospora* clade), FSSC 21 (*F. striatum*) e FSSC 33 (*F. pseudoensiforme*), evidenciando que linhagens homotáticas são representadas por isolados associados, principalmente, a material de origem vegetal. Duas linhagens filogenéticas encontradas também correspondem a espécies biológicas: FSSC 23, representada por isolados de *P. nigrum* e isolados da *mating population* MP-II (f. sp. *batatas*), sendo o primeiro relato dessa MP no Brasil e FSSC 31, representada por isolados obtidos de *P. nigrum*, causando fusariose. O Brasil pode ser um importante centro de diversidade de espécies do FSSC diante da grande variedade de plantas cultivadas e nativas que podem ser encontradas no país, e o patógeno ainda é comumente denominado de *F. solani*.

Palavras-chave: Patógeno de humanos e plantas. Polimorfismo de nucleotídeos. Filogenia molecular.

ABSTRACT

The present study aimed to verify the diversity of phylogenetic lineages of the *Fusarium solani* species complex – FSSC which occur in Brazil. Were analysed 52 isolated obtained from the soil and from cultivated and wild plants from different States of Brazil. In the phylogenetic analysis Maximum parsimony and Maximum likelihood were used 52 and 48 sequences of *EF-1 α* and *RPB2*, respectively. Were also included 80 sequences of *EF-1 α* and *RPB2* 72 of reference material, representing different phylogenetic lineages identified in the FSSC. The analyses were carried out as individually and as combined dataset. Isolates from Brazil were distributed in 12 phylogenetic distinct lineages of the clade 3 of the FSSC. Ten lineages were found as the first record in Brazil, except FSSC 2 (*F. keratoplasticum*) and FSSC 31 (f.sp.*piperis*). The *F. keratoplasticum*, already recorded in Brazil in association with mycosis in humans, was found in this study in association with *Piper nigrum*. The lineages FSSC 5, FSSC 7, FSSC 9, FSSC 20 and FSSC 34 are associated with various cultivated and wild plants and the soil, although they have been described in association with human and animals in different counties in the world. Homothallic isolates were grouped in three distinct phylogenetic lineages: FFSC 8 (*Neocosmospora* clade), FFSC 21 (*F. striatum*) and FFSC 33 (*F. pseudoensiforme*), showing that homothallic lineages are represented by isolates mainly associated with plant material. Two phylogenetic lineages found in this study also correspond to biological species: (i) FSSC 23 represented by isolates of *P. nigrum* and isolates of mating population MP-II (f.sp. *batatas*), the first report of this MP in Brazil; and FSSC 31 represented by isolates that caused disease of *P. nigrum*. Brazil can be an important center of species diversity of the FSSC on the wide variety of cultivated and wild plants, where this pathogen is commonly designated “*F. solani*”.

Keywords: Pathogen of humans and plants. Nucleotides polymorphism. Molecular phylogeny.

1 INTRODUÇÃO

O *Fusarium solani species complex*, ou FSSC, corresponde a, aproximadamente, 60 espécies filogenéticas, distribuídas em três clados (NALIM et al., 2011; O'DONNELL et al., 2008; ZHANG et al., 2006). O mais diverso é o Clado 3, composto por patógenos de várias plantas, de humanos e de animais, além de espécies endófitas e sapróbias encontradas na África, na Ásia e na América do Sul (O'DONNELL, 2000). O Clado 1 é definido por alguns isolados da Nova Zelândia, enquanto o Clado 2 é formado por patógenos de soja e feijão que ocorrem nas Américas e na Ásia.

No FSSC ocorrem espécies heterotálicas e homotálicas, bem como as que não têm reprodução sexual conhecida (O'DONNELL, 2000). *Mating populations* (MP), ou espécies biológicas no FSSC, foram definidas na década de 1970 (MATUO; SNYDER, 1973), e foram, posteriormente, confirmadas também como distintas espécies filogenéticas (O'DONNELL, 2000). No Clado 3 foram encontradas espécies biológicas por meio de cruzamentos em laboratório: MP-I a MP-VII, cada uma supostamente associada a um determinado hospedeiro (MATUO; SNYDER, 1973); MP-V foi, posteriormente, nomeada de *Fusarium petroliphilum* e *Fusarium keratoplasticum*, associada a micoses em humanos (SHORT et al., 2013). No Clado 2, *Fusarium tucumaniae*, agente etiológico da síndrome da morte súbita (SDS) na soja, foi reconhecido como espécie biológica (COVERT et al., 2007).

Inicialmente, a diversidade de espécies e formas dentro do FSSC foi estudada em material proveniente de plantas (MATUO; SNYDER, 1973; O'DONNELL, 2000) e, posteriormente, também com isolados provenientes de solo e associados a humanos (O'DONNELL et al., 2008; ZHANG et al., 2006). Com base em polimorfismo de nucleotídeos, vários haplótipos foram definidos (CHANG et al., 2006; O'DONNELL et al., 2008; ZHANG et al., 2006). A

nomenclatura proposta para cada haplótipo consiste em um número que corresponde à espécie acompanhada de uma letra minúscula, que é a sequência tipo (ex: 1a, 1b, 1c) (CHANG et al., 2006).

No intuito de aumentar o entendimento sobre a diversidade de espécies no FSSC e verificar as relações filogenéticas de isolados de diferentes substratos, Zhang et al. (2006) analisaram ampla coleção de isolados provenientes de solo, plantas, humanos, animais e ambiente hospitalar. Quatro grupos foram encontrados, denominados de Grupo 1 a 4. Os grupos 1 e 2 representam espécies filogenéticas com alto suporte e os grupos 3 e 4 não receberam bom suporte. Em todos os grupos analisados foram encontrados isolados de diferentes substratos, comprovando que, no FSSC, existe inespecificidade de hospedeiro.

Em 2005 e 2006, surtos de ceratite ocorreram em várias cidades dos EUA e foram associados ao uso de solução de lentes de contato. “*F. solani*” foi identificado, em 70% dos casos, como agente causal (CHANG et al., 2006). A partir desse fato, vários outros estudos foram realizados com o objetivo de identificar quais eram os patógenos associados às micoses em humanos, já que “*F. solani*” representa um complexo de espécies (O’DONNELL et al., 2008; SHORT et al., 2011, 2013). No FSSC foram identificadas 39 linhagens filogenéticas no Clado 3. Nomenclatura foi proposta para a denominação dessas linhagens, considerando o nome FSSC para todas elas e, ainda, um número correspondente a cada linhagem (ex: FSSC 1) (CHANG et al., 2006; O’DONNELL et al., 2008; SHORT et al., 2011). De todas as linhagens identificadas, somente seis foram formalmente descritas: *Fusarium petrophilum* (FSSC 1), *Fusarium keratoplasticum* (FSSC 2), *Fusarium falciforme* (FSSC 3+4), *Fusarium lichenicola* (FSSC 16), *Fusarium ambrosium* (FSSC 19) e *Fusarium striatum* (FSSC 21) (GADD; LOOS, 1947; SHERBAKOFF, 1915; SHORT et al., 2013; SUMMERBELL; SCHROERS,

2002). No Brasil, há o registro de apenas quatro dessas 39 linhagens: *F. keratoplasticum*, “*Fusarium falciforme*” FSSC 3+4, FSSC 31(f sp. *piperis*) e FSSC 35 (*Fusarium* sp.). Com exceção da linhagem FSSC 31, representada por isolado do Brasil de *Piper nigrum*, todas as outras linhagens são representadas exclusivamente por isolados associados à micose em diferentes países (O’DONNELL et al., 2008).

No Brasil, existe uma variedade de doenças em culturas importantes que têm como agente etiológico “*F. solani*”, porém, a diversidade de espécies do FSSC no país pode ser muito maior. A identificação correta dos patógenos é fundamental para fornecer subsídios para o controle de doenças. Além disso, é importante ressaltar que, por se tratar de fungos oportunistas, eles podem causar doenças tanto em plantas como em humanos e em animais. Com o objetivo de verificar a diversidade de espécies do complexo *Fusarium solani* que ocorrem no Brasil, análises filogenéticas das regiões gênicas *RPB2* e *EF-1 α* foram realizadas com isolados de diferentes plantas cultivadas e do solo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados

No presente estudo, foram utilizados 52 isolados do FSSC, obtidos do solo, de plantas cultivadas e nativas de diferentes estados do Brasil e 80 sequências de isolados de referência, representando diferentes linhagens filogenéticas identificadas dentro do FSSC de vários países e diferentes substratos, a partir da base de dados do GenBank, do *National Center for Biotechnological Information* (NCBI), por meio da ferramenta BLAST (O'DONNELL et al., 2008) (Tabela 1). Os isolados estão preservados em microtubos e criopreservados, a -80 °C, na Coleção Micológica de Lavras (CML), Laboratório de Sistemática e Ecologia de fungos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, Minas Gerais, Brasil.

2.2 Extração de DNA e amplificação por PCR

Os isolados foram cultivados em meio completo líquido (LESLIE; SUMMERELL, 2006), incubados em um agitador (100 rpm), por três dias, à temperatura ambiente (25 °C a 28 °C). O micélio foi filtrado e a extração de DNA foi realizada através do kit Wizard® Genomic DNA *purification* (Promega do Brasil), de acordo com as especificações do fabricante. As concentrações de DNA foram estimadas utilizando-se o aparelho NanoDrop 2000 e, visualmente, em gel de agarose 1%, por comparação da intensidade de banda com um marcador de tamanho de fragmentos de 1 Kb (Invitrogen). Fragmentos dos genes fator de alongação (*EF-1 α*) e da segunda maior subunidade da RNA polimerase (*RPB2*) foram amplificados utilizando-se os *primers* listados na Tabela 2.

Tabela 1 Isolados testados com *primers* desenvolvidos para determinar o *mating type* no FSSC

| CML ^a | Outro código ^c | Espécies | Substrato | Origem ^d | Mating type ^e |
|------------------|---------------------------|---------------------|--------------------|----------------------------|--------------------------|
| 526* | MES1624 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Planaltina, DF | 1 |
| 527* | MES1497 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Planaltina, DF | 2 |
| 528* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Passo Fundo, RS | 2 |
| 575* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Planaltina, DF | 2 |
| 577* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Passo Fundo, RS | 2 |
| 691* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Araxá, MG | 2 |
| 860* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Brasil | 2 |
| 1771* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Campo Novo dos Parecis, MT | 1 |
| 1780* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Uberlândia, MG | 1 |
| 1781* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Uberlândia, MG | 1 |
| 1782* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Uberlândia, MG | 2 |
| 1829* | MES28 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Tapera, RS | 2 |
| 1830* | MES24 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Cristalina, GO | 1 |
| 1833* | MES13 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Campo Mourão, PR | 1 |
| 1836* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Guarapuava, PR | 2 |
| 1837* | MES 01 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Brasília, DF | 1 |
| 1839* | MES 60 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Patrocínio, MG | 1 |
| 1987* | MES730 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Chapadão do Sul, MS | 2 |
| 1988* | MES 732 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Chapadão do Sul, MS | 1 |
| 1989* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Guarapuava, PR | 2 |
| 1990* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Guarapuava, PR | 2 |

Tabela 1, continuação

| CML ^a | Outro código ^c | Espécies | Substrato | Origem ^d | Mating type ^e |
|------------------|---------------------------|---------------------|--------------------|----------------------|--------------------------|
| 1991* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Lunardelli, PR | 2 |
| 1992* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Lunardelli, PR | 1 |
| 1993* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Marinalva, PR | 1 |
| 1994* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | São João do Ivaí, PR | 1 |
| 1995* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Marinalva, PR | 2 |
| 1996* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | São João do Ivaí, PR | 1 |
| 1997* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Castro, PR | 1 |
| 1998* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Castro, PR | 2 |
| 1999* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Castro, PR | 1 |
| 2000* | MES34 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Carambeí, PR | 2 |
| 2001* | MES 64 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Palmeira, PR | 2 |
| 2002* | MES73 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Faxinal, PR | 2 |
| 2003* | MES722 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Londrina, PR | 1 |
| 2004* | MES723 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Campo Mourão, PR | 1 |
| 2005* | MES724 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Ubiratã, PR | 1 |
| 2007* | MES735 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Ivaiporã, PR | 1 |
| 2009* | MES728 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Passo Fundo, RS | 1 |
| 2010* | MES741 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Passo Fundo, RS | 1 |
| 2011* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Montividiu, GO | 1 |
| 2012* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Rio Verde, GO | 2 |
| 2014* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Montividiu, GO | 1 |
| 2015* | MES 721 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Brasília, DF | 1 |
| 2016* | MES 02 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Brasília, DF | 1 |

Tabela 1, continuação

| CML ^a | Outro código ^c | Espécies | Substrato | Origem ^d | Mating type ^e |
|------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| 2020* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Maracaju, MS | 2 |
| 2021* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Marapuã, MS | 1 |
| 2023* | MES720 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | São Gotardo, MG | 1 |
| 2022* | MES 05 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Patos de Minas, MG | 1 |
| 2028* | MES27 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Brasília, DF | 1 |
| 1245 | | <i>Fusarium</i> sp. | Solo/ <i>Glycine max</i> | Montividiu, GO | 1 |
| 2025 | JEM 3582 | <i>Fusarium</i> sp. | Solo/ <i>Glycine max</i> | Unaí, MG | 2 |
| 581* | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 5 | <i>Chrysanthemum</i> sp. | Holambra, SP | 2 |
| 1842* | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 5 | <i>Cyrtopodium cardiochilum</i> | Viçosa, MG | 2 |
| 52 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Solanum tuberosum</i> | Sta Rita de Caldas, MG | 2 |
| 73 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Solanum tuberosum</i> | Espírito Santo de Dourado, MG | 1 |
| 45 | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 9 | <i>Solanum tuberosum</i> | Santa Rita de Caldas, MG | 2 |
| 46 ^b | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Solanum tuberosum</i> | Santa Rita de Caldas, MG | |
| 52 | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 9 | <i>Solanum tuberosum</i> | Santa Rita de Caldas, MG | 2 |
| 53 | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 38 | <i>Solanum tuberosum</i> | Santa Rita de Caldas, MG | 1 |
| 55* | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 5 | <i>Solanum tuberosum</i> | Santa Rita de Caldas, MG | 1 |
| 50 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Solanum tuberosum</i> | Muzambinho, MG | 1 |
| 60 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Solanum tuberosum</i> | Alfenas, MG | 2 |
| 64 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Solanum tuberosum</i> | Alfenas, MG | 2 |
| 65* | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 5 | <i>Solanum tuberosum</i> | Alfenas, MG | 1 |
| 89 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Solanum tuberosum</i> | Argentina | 1 |
| 576 ^b | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Gossypium</i> sp. | Planaltina, DF | |
| 580 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Gossypium hirsutum</i> | MS | 1 |

Tabela 1, continuação

| CML ^a | Outro código ^c | Espécies | Substrato | Origem ^d | Mating type ^e |
|-------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 214* | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 5 | <i>Passiflora edulis</i> | Carmo da Cachoeira, MG | 2 |
| 613 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Passiflora edulis</i> | Rio de Janeiro, RJ | 2 |
| 2183 ^b | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Passiflora edulis</i> | Jaíba, MG | |
| 1346 ^b | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Passiflora edulis</i> | Alemanha | |
| 2172 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Passiflora edulis</i> | Seb. da Laranjeira, BA | 1 |
| 2174 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Passiflora edulis</i> | Seb. da Laranjeira, BA | 1 |
| 2176 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Passiflora edulis</i> | Seb. da Laranjeira, BA | 2 |
| 2177 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Passiflora edulis</i> | Espinosa, MG | 1 |
| 2178 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Passiflora edulis</i> | Espinosa, MG | 1 |
| 2182 | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 20 | <i>Passiflora edulis</i> | Jaíba, MG | 2 |
| 2184 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Passiflora edulis</i> | Januária, MG | 2 |
| 2185 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Passiflora edulis</i> | Jaíba, MG | 2 |
| 2192 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Passiflora edulis</i> | Sebastião Laranjeiras, BA | 1 |
| 1834 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Viçosa, MG | 1 |
| 1835 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Viçosa, MG | 2 |
| 2043* | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 5 | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Sebastião Laranjeiras, BA | 1 |
| 2046* | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 5 | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Patos de Minas, MG | 1 |
| 2047* | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 5 | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Lavras, MG | 1 |
| 2186* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Valença, BA | 2 |
| 2187* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Valença, BA | 1 |
| 2188* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Valença, BA | 1 |
| 2189* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Valença, BA | 1 |
| 2190* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Valença, BA | 2 |
| 2191* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Taperoá, BA | 2 |

Tabela 1, continuação

| CML ^a | Outro código ^c | Espécies | Substrato | Origem ^d | Mating type ^e |
|-------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|
| 2201* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Ituberá, BA | 1 |
| 2205* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Ituberá, BA | 1 |
| 2207* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Taperoá, BA | 2 |
| 2209* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Taperoá, BA | 1 |
| 2210* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Taperoá, BA | 1 |
| 2211* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Taperoá, BA | 1 |
| 2220* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Porto Grande, AP | 1 |
| 2364* | CMM3618 | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Baião, PA | 1 |
| 2357* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Castanhal, PA | 1 |
| 2365* | CMM3617 | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Baião, PA | 1 |
| 2464* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Linhares, ES | 2 |
| 2465* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Jaguaré, ES | 2 |
| 2466* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Jaguaré, ES | 2 |
| 2350* | | f. sp. <i>batatas</i> FSSC 23 | <i>Piper nigrum</i> | Tomé-Açú, PA | 1 |
| 2355* | | f. sp. <i>batatas</i> FSSC 23 | <i>Piper nigrum</i> | Tomé-Açú, PA | 2 |
| 2361 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Piper nigrum</i> | Tomé-Açú, PA | 2 |
| 2194 ^b | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Piper nigrum</i> | Nilo Peçanha, BA | |
| 2195 | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 9 | <i>Piper nigrum</i> | Ituberá, BA | 2 |
| 2196 | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 34 | <i>Piper nigrum</i> | Ituberá, BA | 2 |
| 2199 | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 9 | <i>Piper nigrum</i> | Ituberá, BA | 2 |
| 2204 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Piper nigrum</i> | Ituberá, BA | 1 |
| 2214 | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 20 | <i>Piper nigrum</i> | Taperoá, BA | 2 |
| 2219 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Piper nigrum</i> | Taperoá, BA | 2 |
| 2291 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Piper nigrum</i> | Sooretama, ES | 1 |

Tabela 1, continuação

| CML ^a | Outro código ^c | Espécies | Substrato | Origem ^d | Mating type ^e |
|------------------|---------------------------|--|-----------------------|---------------------------|--------------------------|
| 2297 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Piper nigrum</i> | Sooretama, ES | 1 |
| 2348 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Piper nigrum</i> | Tomé-Açú, PA | 2 |
| 2301 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Piper nigrum</i> | Sooretama, ES | 1 |
| 2302 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Piper nigrum</i> | Sooretama, ES | 1 |
| 2305 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Piper nigrum</i> | Jaguaré, ES | 1 |
| 2361 | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 20 <i>F. keratoplasticum</i> | <i>Piper nigrum</i> | Tomé-Açú, PA | 2 |
| 2193 | | FSSC 2 | <i>Piper nigrum</i> | Nilo Peçanha, BA | 2 |
| 2463 | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 20 | <i>Piper arboreum</i> | Belém, PA | 2 |
| 185 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Coffea arabica</i> | Lavras, MG | 2 |
| 217* | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 5 | <i>Coffea arabica</i> | Machado, MG | 1 |
| 220 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Coffea arabica</i> | Lavras, MG | 2 |
| 223 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Coffea arabica</i> | Brasil | 2 |
| 230 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Coffea arabica</i> | Brasil | 1 |
| 377 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Coffea arabica</i> | Viçosa, MG | 2 |
| 758 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Coffea arabica</i> | Santa Rita do Sapucaí, MG | 2 |
| 763 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Coffea arabica</i> | Santa Rita do Sapucaí, MG | 2 |
| 1137 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Citrus</i> sp. | Cordeirópolis, SP | 1 |
| 1139 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Citrus</i> sp. | Barretos, SP | 1 |
| 1141 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Citrus</i> sp. | Barretos, SP | 1 |
| 1142 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Citrus</i> sp. | Barretos, SP | 2 |
| 1147 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Citrus</i> sp. | Barretos, SP | 1 |
| 1149 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Citrus</i> sp. | Barretos, SP | 2 |
| 1151 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Citrus</i> sp. | Barretos, SP | 2 |

Tabela 1, continuação

| CML ^a | Outro código ^c | Espécies | Substrato | Origem ^d | Mating type ^e |
|-------------------|---------------------------|--|------------------------------|------------------------|--------------------------|
| 1156 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Citrus</i> sp. | Cordeirópolis, SP | 2 |
| 1158 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Citrus</i> sp. | Barretos, SP | 1 |
| 1160 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Citrus</i> sp. | Barretos, SP | 1 |
| 1884* | NRRL 22163 | f. sp. <i>xanthoxyli</i> MP-IV | <i>Xanthoxylum piperitum</i> | Japão | 2 |
| 2230* | NRRL 22277 | f. sp. <i>xanthoxyli</i> MP-IV | <i>Xanthoxylum piperitum</i> | Japão | 1 |
| 1885 | NRRL 22586 | f. sp. <i>robiniae</i> MP-VII | <i>Roninea pseudocacia</i> | Virginia, EUA | 2 |
| 1889 | NRRL 22098 | f. sp. <i>cucurbitae</i> MP-I | <i>Cucurbita</i> sp. | EUA | 1 |
| 1883* | NRRL 22142 | <i>F. petrophilum</i> MP-V | <i>Cucurbita</i> sp. | California, EUA | 2 |
| 1895* | NRRL 22141 | <i>F. petrophilum</i> MP-V | <i>Cucurbita</i> sp. | Nova Zelândia | 1 |
| 1893 | NRRL 22230 | f. sp. <i>mori</i> MP-III | <i>Morus alba</i> | Japão | 2 |
| 2167 | NRRL 22157 | f. sp. <i>mori</i> MP-III | <i>Morus alba</i> | Japão | 2 |
| 1894* | NRRL 22400 | f. sp. <i>batatas</i> MP-II | <i>Ipomoeae batatas</i> | Carolina do Norte, EUA | 2 |
| 2169 | NRRL 22278 | f. sp. <i>pisi</i> MP-VI | <i>Pisum sativum</i> | EUA | 2 |
| 1159 ^b | | <i>Neocosmosporasp.</i> FSSC 8 | <i>Citrus</i> sp. | Barretos, SP | |
| 1242 ^b | | <i>Neocosmosporasp.</i> <i>Neocosmosporasp.</i> | Solo | Montividiu, GO | |
| 1262 ^b | | FSSC 8 | Solo | Montividiu, GO | |
| 1617 ^b | | <i>Neocosmosporasp.</i> | <i>Theobroma cacao</i> | Brasil | |
| 2232 | NRRL 22090 | <i>Nectria illudens</i> | <i>Beilschmiedia tawa</i> | Nova Zelândia | Nd |
| 2447 | | <i>F. tucumanae</i> | <i>Glycine max</i> | Guarapuava, PR | Nd |
| 2448 | | <i>F. tucumanae</i> | <i>Glycine max</i> | Guarapuava, PR | Nd |
| 2449 | | <i>F. tucumanae</i> | <i>Glycine max</i> | Guarapuava, PR | Nd |
| 2450 | | <i>F. tucumanae</i> | <i>Glycine max</i> | Guarapuava, PR | Nd |
| 2057 | | <i>F. decemcellulare</i> | <i>Theobroma cacao</i> | Ilhéus, BA | Nd |

Tabela 1, conclusão

| CML ^a | Outro código ^c | Espécies | Substrato | Origem ^d | Mating type ^e |
|------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------------|---------------------|--------------------------|
| 2254 | | <i>F. decemcellulare</i> | <i>Theobroma cacao</i> | Amazonas, AM | Nd |
| 2273 | | <i>F. decemcellulare</i> | <i>Theobroma cacao</i> | Ilhéus, BA | Nd |
| 2593 | MP59 | <i>F. udum</i> | <i>Crotalaria ochroleura</i> | Lavras, MG | Nd |
| 262 | | <i>F. tupiense</i> | <i>Mangifera indica</i> | Lavras, MG | Nd |

^aCML = Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; * Isolados utilizados nos cruzamentos; ^bHomotático; ^c MES = Micoteca Embrapa Soja, Embrapa Soja, Londrina Paraná, Brasil; JEM = Jem Análise Agrícola, Aparecida de Goiânia, Goiás, Brasil; CMM = Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos Profa. Maria Menezes; NRRL = Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, EUA; ^destados do Brasil: Amazonas - AM; Amapá - AP; Bahia - BA; Distrito Federal - DF; Espírito Santo - ES; Goiás - GO; Minas Gerais - MG; Mato Grosso - MT; Mato Grosso do Sul - MS; Pará - PA; Paraná - PR; Rio de Janeiro - RJ; Rio Grande do Sul -RS; São Paulo - SP. ^eMAT - *Mating type* dos isolados identificados por PCR. *MAT-1* = 1; *MAT-2* = 2; nd = não determinado

Tabela 2 *Primers* utilizados para PCR e sequenciamento

| Locus ^a | Primer | Sequência obtida (pb) | Sequência (5' - 3') ^b | Referência |
|--------------------|--------|-----------------------|----------------------------------|-------------------------|
| <i>EF-1α</i> | EF1 | 502 | ATGGGTAAGGARGACAAGAC | O'Donnell et al. (1998) |
| <i>EF-1α</i> | EF2 | | GGARGTACCAGTSATCATG | O'Donnell et al. (1998) |
| <i>EF-1α</i> | EF3 | | GTAAGGAGGASAAGACTCACC | O'Donnell et al. (1998) |
| <i>EF-1α</i> | EF22 | | AGGAACCCTTACCGAGCTC | O'Donnell et al. (1998) |
| <i>RPB2</i> | 5f2 | 638 | GGGGWGAYCAGAAGAAGGC | O'Donnell et al. (2007) |
| <i>RPB2</i> | 7cr | | CCCATRGCTTGYTTRCCCAT | Liu et al. (1999) |

^a Fator de alongação (*EF-1α*); Segunda maior subunidade da RNA polimerase (*RPB2*); ^b *Primer* degenerado: R = A ou G; S = C ou G; W = A ou T; Y = C ou T

As reações de PCR foram realizadas no termociclador My CyclerTM (BIO-RAD). As condições para a amplificação de *EF-1α* foram: 94 °C, por 1 minuto; 34 ciclos: 94 °C, por 30 segundos; 62 °C, por 45 segundos; 72 °C, por 1 minuto e 72 °C, por 5 minutos (O'DONNELL et al., 1998). Para *RPB2* foram: 94 °C, por 90 segundos; 40 ciclos: 94 °C, por 30 segundos; 55 °C, por 90 segundos; 68 °C, por 2 minutos e 68 °C, por 5 minutos (O'DONNELL et al., 2008). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium[®]), com posterior visualização realizada em um fotodocumentador MiniBis Pro (Uniscience). Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o kit GenElute PCR Clean-up Kit (Sigma-Aldrich) para, posteriormente, serem sequenciados.

2.3 Sequenciamento e análises filogenéticas

Os produtos da PCR das duas regiões gênicas dos isolados do FSSC foram sequenciados na Macrogen, EUA, e os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente com o auxílio do programa SeqAssem (HEPPERLE, 2004). Sequências de referência das linhagens filogenéticas do FSSC correspondentes ao fator de alongação-1α e *RPB2*, previamente depositadas no GenBank, também foram acrescentadas às análises (O'DONNELL et al., 2008). Foram utilizadas 52 e 48 sequências dos isolados do Brasil de *EF-1α* e *RPB2*,

respectivamente, e 80 sequências de *EF-1 α* e 72 sequências de *RPB2* de isolados de referência (Tabela 1). As análises filogenéticas foram realizadas de forma individual (*EF-1 α* 502 pb) e (*RPB2* 638 pb) e análises combinadas (1.140 pb) (Tabela 2). Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos foram gerados utilizando-se a ferramenta CLUSTALW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994), implementado pelo programa MEGA 5. Os alinhamentos foram corrigidos manualmente. A análise filogenética foi realizada pelo método de máxima parcimônia (*maximum parsimony* - MP) e máxima verossimilhança (*maximum likelihood* - ML), por meio do programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). Sequências de *Fusarium illudens* e *Fusarium plagianthi* foram utilizadas como *outgroup*, com base nos resultados de O'Donnell et al. (2008).

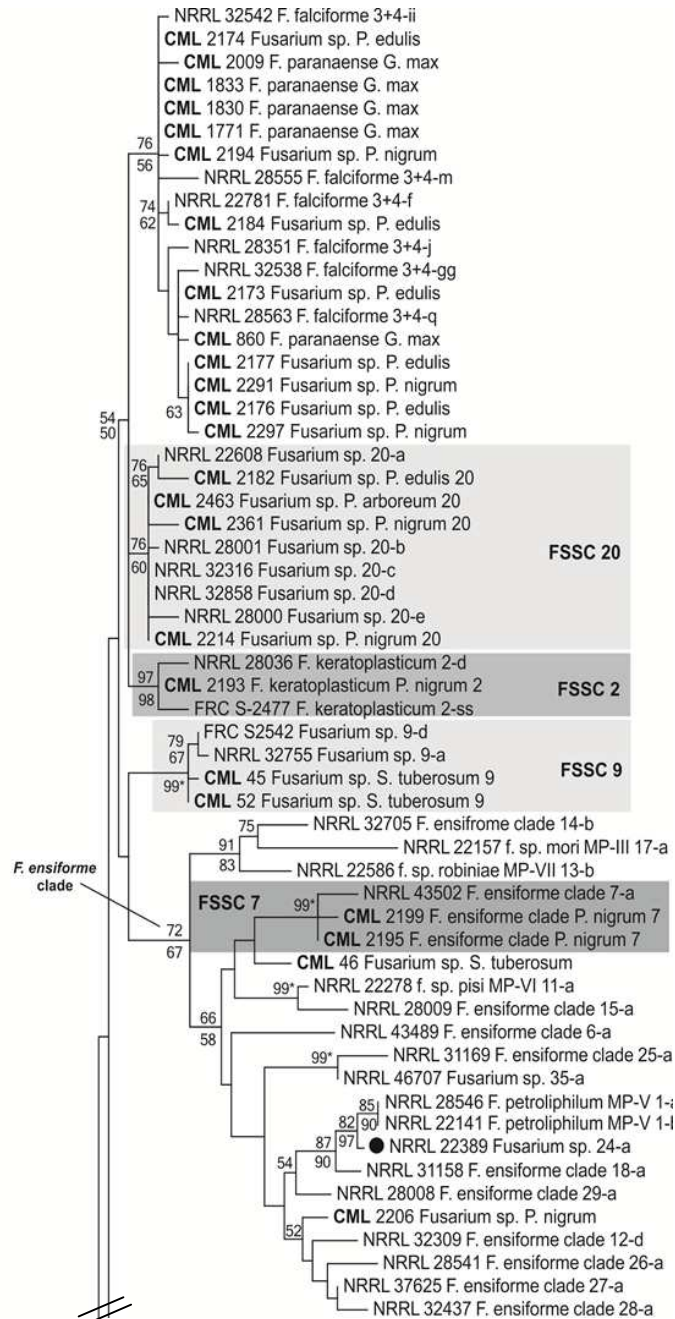
3 RESULTADOS

A diversidade de espécies do FSSC presente no Brasil foi avaliada por meio das relações filogenéticas das regiões gênicas *EF-1 α* e *RPB2*. Topologias semelhantes foram encontradas para todas as análises de MP e ML (Figura 1, 2 e 3). Nas análises combinadas foram utilizadas 120 sequências, pois algumas sequências não foram obtidas ou não estão disponíveis no GenBank. Todos os isolados avaliados do Brasil pertencem ao Clado 3 (MP e ML = 99%), com exceção do isolado CML 2448. Foram identificadas 11 linhagens filogenéticas distintas nas análises combinadas e a linhagem FSSC 38 foi identificada na análise de *EF-1 α* (Figura 1 e 2).

Três linhagens filogenéticas foram observadas com elevado suporte nas análises combinadas, 99% MP *bootstrap*. Linhagem FSSC 2 (*F. keratoplasticum*) foi representada pelos isolados CML 2193 de *Piper nigrum* e NRRL 28036 e FRC S-2477 de humanos; a linhagem FSSC 7 incluiu os isolados CML 2195 e CML 2199 de *P. nigrum* e um isolado do “*Fusarium ensiforme* clade” NRRL 28009; a linhagem FSSC 9 foi composta por CML 45 e CML 52 de *Solanum tuberosum* e FRC S2542 e NRRL 32755 associado a humanos e a animais (Figura 1).

As linhagens FSSC 5 e FSSC 20 são representadas por vários isolados do Brasil de diferentes plantas nativas e cultivadas, além de isolados de referência. A linhagem FSSC 5 inclui os isolados CML 55, CML 65, CML 214, CML 217, CML 581, CML 1842, CML 2043, CML 2046, CML 2047 e 13 isolados de referência provenientes de humanos, com exceção do isolado NRRL 22783, proveniente de animal, com valor de *bootstrap* de 95% MP (Figura 1, Tabela 1).

A linhagem FSSC 20 é composta pelos isolados CML 2182, CML 2214, CML 2361 e CML 2463 e cinco isolados de referência obtidos de humanos, com baixo valor de *bootstrap* 76% MP.



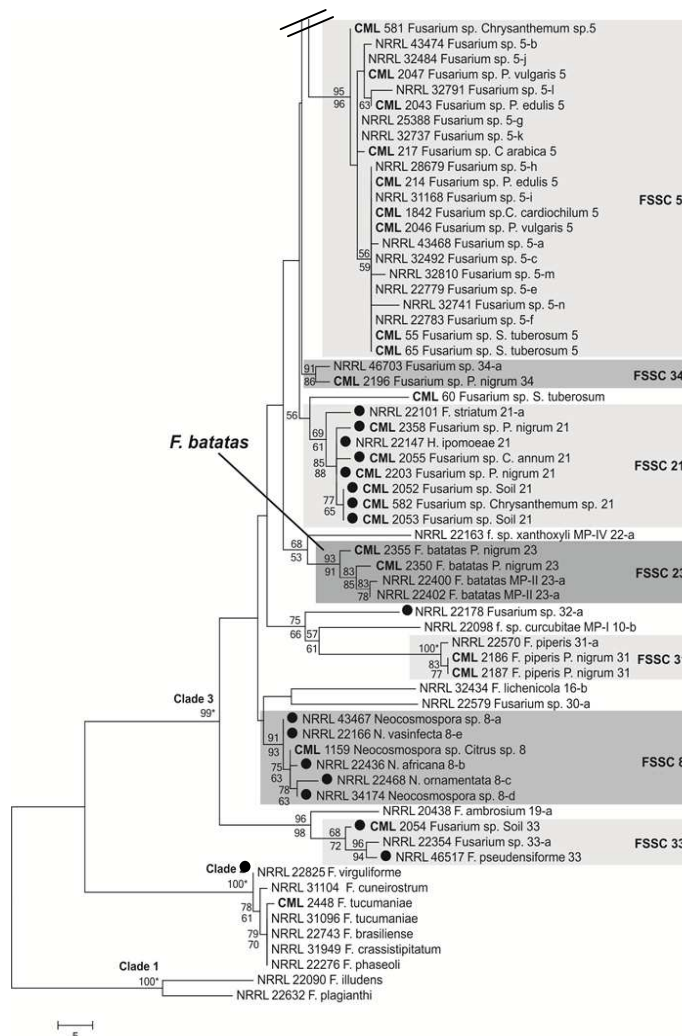
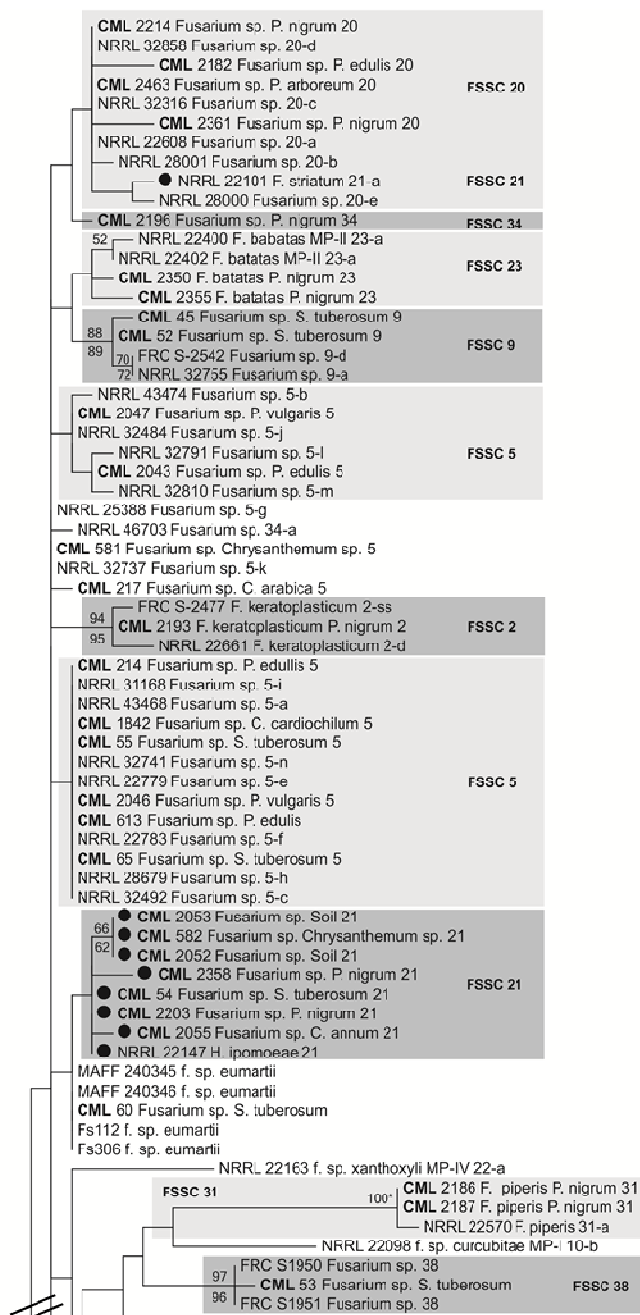


Figura 1 Árvore filogenética de máxima parcimônia das espécies do complexo *Fusarium solani*, usando seqüências combinadas de *RPB2* e *EF-1a*. *F. plagianthi* e *F. illudens* utilizados como *outgroup*. Algoritmo arábico corresponde à espécie e letra minúscula, ao haplótipo dentro do Clado 3. Sombreados cinza-claro e cinza-escuro indicam as linhagens filogenéticas em que os isolados do Brasil se encontram. Isolado homotático é indicado por um ponto negro ao lado do número. Os valores de *bootstrap*, 1.000 repetições, são indicados em porcentagem acima e abaixo dos internódios, máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (ML), respectivamente, e o asterisco representa que os valores são idênticos. Abreviações: MP-I a MP-VII - *mating populations*; f. sp. - *formae specialis*; CML - Coleção Micológica de Lavras; NRRL - Northern Regional Research Laboratory



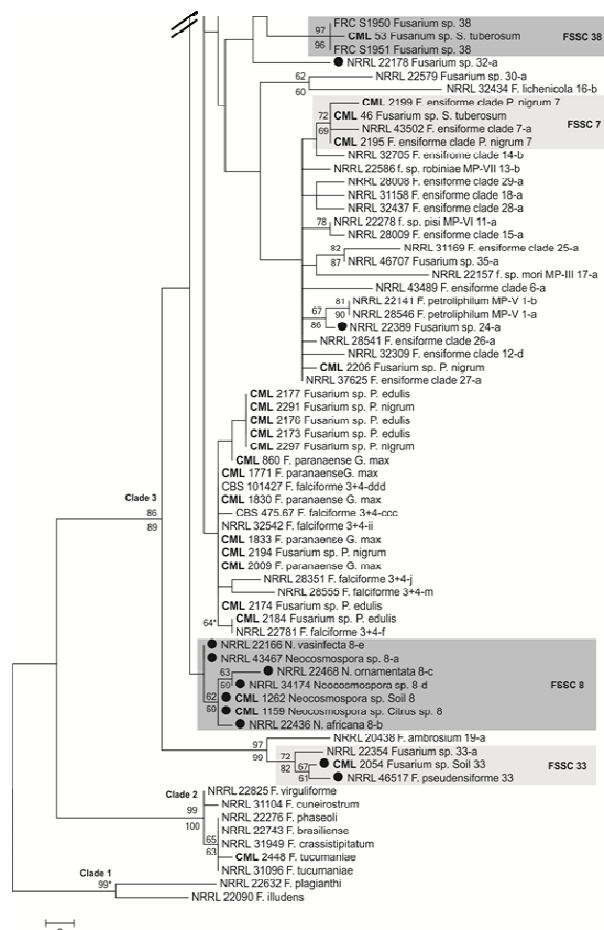
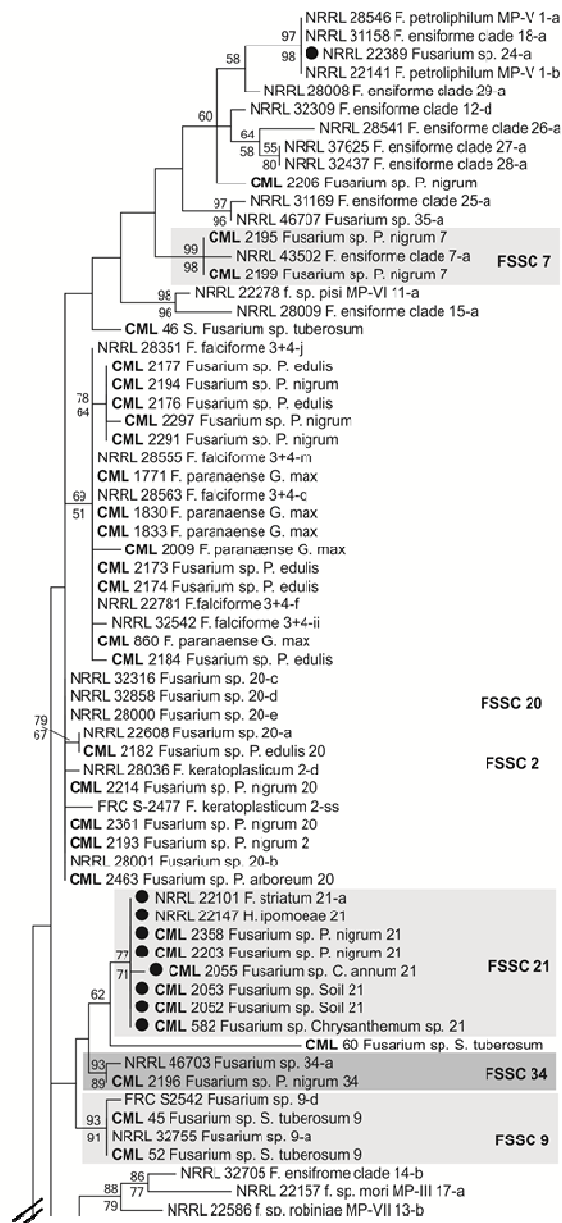


Figura 2 Árvore filogenética de máxima parcimônia das espécies do complexo *Fusarium solani*, usando sequências de *EF-1a*. *F. plagianthi* e *F. illudens*, utilizados como *outgroup*. Algarismo arábico corresponde à espécie e letra minúscula, ao haplótipo dentro do Clado 3. Sombreados cinza-claro e cinza-escuro indicam as linhagens filogenéticas em que os isolados do Brasil se encontram. Isolado homotático é indicado por um ponto negro ao lado do número. Os valores de *bootstrap*, 1.000 repetições, são indicados em porcentagem acima e abaixo dos internódios, máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (ML), respectivamente, e asterisco representa que os valores são idênticos. Abreviações: MP-I a MP-VII - *mating populations*; f. sp. - *formae specialis*; CML - Coleção Micológica de Lavras; NRRL - Northern Regional Research Laboratory; MAFF - Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries; FRC - Fusarium Research Center; CBS - Centraal Bureau voor Schimmelcultures-Fungal Biodiversity Center



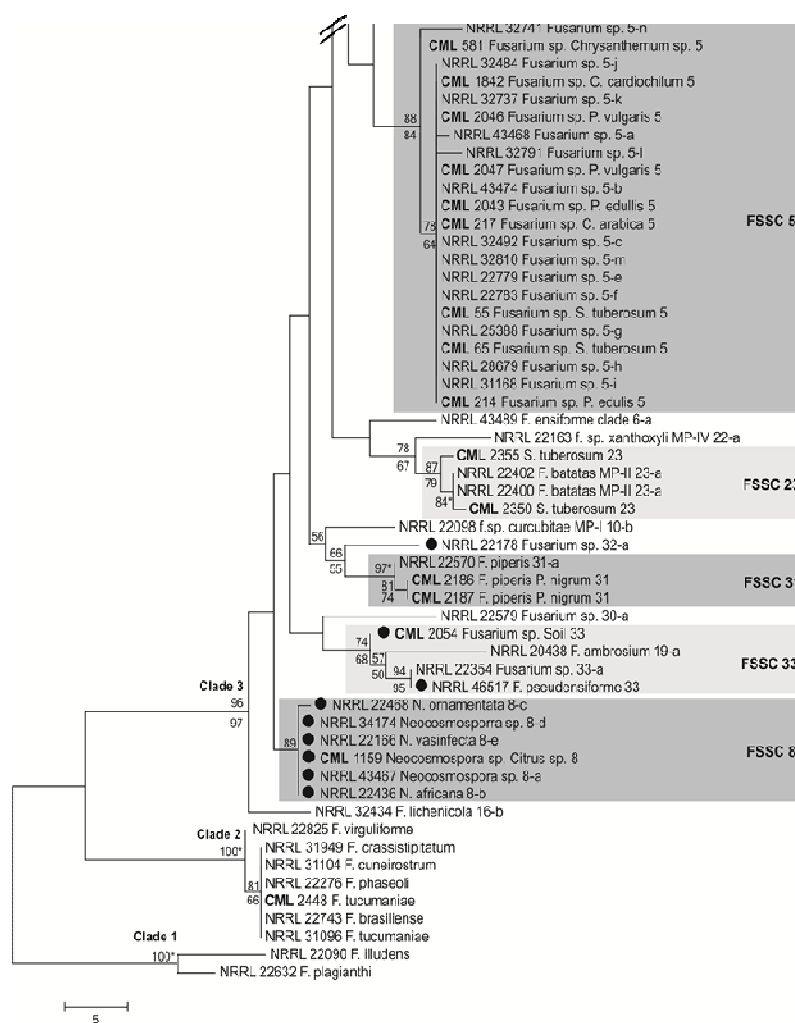


Figura 3 Árvore filogenética de máxima parcimônia das espécies do complexo *Fusarium solani* usando seqüências de *RPB2*. *F. plagianthi* e *F. illudens* utilizados como *outgroup*. Algarismo arábico corresponde à espécie e letra minúscula, ao haplótipo dentro do Clado 3. Sombreados cinza-claro e cinza-escuro indicam as linhagens filogenéticas em que os isolados do Brasil se encontram. Isolado homotípico é indicado por um ponto negro ao lado do número. Os valores de *bootstrap*, 1.000 repetições, são indicados em porcentagem acima e abaixo dos internódios, máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (ML), respectivamente, e asterisco representa que os valores são idênticos. Abreviações: MP-I a MP-VII - *mating populations*; f. sp. - *formae specialis*; CML - Coleção Micológica de Lavras; NRRL - Northern Regional Research Laboratory

A linhagem FSSC 34 inclui apenas dois isolados, CML 2196 de *P. nigrum* e NRRL 46703 de nematoide com suporte de 91% MP *bootstrap* (Figura 1). A linhagem FSSC 38 foi identificada na análise de *EF-1 α* com alto suporte de 97% MP *bootstrap* e é formada pelo isolado CML 53 de *S. tuberosum* e dois isolados do solo, FRC S1950 e FRC S1950, para os quais existem apenas sequências de *EF-1 α* (Figura 2).

Os isolados identificados como homotáticos (Ver capítulo 2) estão presentes em três linhagens filogenéticas distintas, FSSC 8 (clado *Neocosmospora*), FSSC 21 (*F. striatum*) e FSSC 33. A linhagem FSSC 8 é formada pelos isolados CML 1159 de *Citrus* sp. e CML 1262 do solo juntamente com outros cinco isolados de referência do gênero *Neocosmospora* provenientes de humano, solo, amendoim e nematoide, com 91% MP *bootstrap* nas análises combinadas (Figuras 1 e 2).

Outras duas linhagens homotáticas foram identificadas, embora com baixo suporte: a linhagem FSSC 21, composta por oito isolados do Brasil de diversas plantas cultivadas e do solo CML 582, CML 2052, CML 2053, CML 2055, CML 2203 e CML 2358, e os isolados de referência *Haematonectria ipomoeae* NRRL 22147, de *Passiflora edulis* e *Fusarium striatum* NRRL 22101, de *Solanum tuberosum* com 69% MP *bootstrap*. Linhagem FSSC 33 é formada pelo isolado CML 2054 de solo e isolados encontrados em casca de árvore, *Fusarium pseudoensiforme* NRRL 46517 e *Fusarium* sp. NRRL 22354, com 68% MP de *bootstrap* (Figura 1).

Duas linhagens filogenéticas também correspondem a distintas espécies biológicas (ver capítulo 2). A linhagem FSSC 23 inclui dois isolados de *P. nigrum* do Brasil, CML 2350 e CML 2355, e dois isolados de f. sp. *batatas* MP-II, NRRL 22400 e NRRL 22402, com 93% MP de *bootstrap*. A linhagem FSSC 31 é composta somente por isolados de *P. nigrum*, CML 2186, CML 2187 e f. sp. *piperis* NRRL 22570 com elevado suporte 100% MP *bootstrap*. O isolado

previamente identificado como *Fusarium tucumaniae*, CML 2448 de *G. max*, é o único isolado do Clado 2 do FSSC, representado por patógenos da soja. Outros 15 isolados pertencem ou a linhagens com alta diversidade, ainda indefinidas, como FSSC 3+4 “*F. falciforme*” ou “*Fusarium ensiforme* clade”, ou não foi possível associá-los a linhagens previamente identificadas (Figura 1).

4 DISCUSSÃO

Com o objetivo de aumentar a base de conhecimento sobre a diversidade de espécies do FSSC que ocorrem no Brasil, 52 isolados de diferentes substratos e origens geográficas foram analisados quanto à posição filogenética dentro do complexo *F. solani*. O total de 12 linhagens filogenéticas foi identificado no Clado 3 do FSSC com elevado valor de bootstrap (> 90% MP), exceto as linhagens FSSC 20, FSSC 21 e FSSC 33 (Figura 1 e 2). Com exceção de FSSC 2 (*F. keratoplasticum*) e de FSSC 31 (f. sp. *piperis*), as outras 10 linhagens são registradas pela primeira vez no Brasil e somente duas delas, FSSC 2 e FSSC 21, foram formalmente descritas, denominadas de *F. keratoplasticum* (SHORT et al., 2013) e *F. striatum* (SHERBAKOFF, 1915).

A linhagem FSSC 2 (*F. keratoplasticum*) foi previamente registrada no Brasil associada à micose em humanos (O'DONNELL et al., 2008; ZHANG et al., 2006) e foi reencontrada, no presente estudo, associada a *P. nigrum* (Figura 1). *Fusarium keratoplasticum* representa uma espécie filogenética e biológica distinta no FSSC, associada a infecções em humanos e animais, presente na Ásia, na África do Norte, nas Américas, na Europa e na Oceania (SHORT et al., 2013; ZHANG et al., 2006). Outra espécie biológica e filogenética do FSSC, *F. petroliphilum*, conhecida como f. sp. *cucurbitae* MP-V, patógeno de cucurbitáceas (MATUO; SNYDER, 1973; MEHL; EPSTEIN, 2007), posteriormente foi detectada também em ambiente hospitalar e formalmente descrita como espécie do FSSC (SHORT et al., 2013; ZHANG et al., 2006). A provável fonte de inóculo para esses patógenos encontrados em diferentes ambientes pode ser por meio de fonte de água, como, por exemplo, encanamentos de pia, chuveiro e esgoto (MEHL; EPSTEIN, 2008).

A existência da linhagem FSSC 34, proposta por O'Donnell et al. (2008), baseados em um único isolado da Espanha obtido de nematoide, foi

comprovada por mais um isolado do Brasil de *P. nigrum*. Esse fato comprovou que as coletas ainda podem ser consideradas limitadas.

A linhagem FSSC 7, associada à infecção em humanos nos EUA (CHANG et al., 2006), também está presente no Brasil, associada a *P. nigrum*. Essa linhagem pertence ao “*F. ensiforme* clade”, um clado heterogêneo proposto por Nalim et al. (2011), que abrange, ainda, *F. ensiforme*, *mating populations* MP-III, MP-V (*F. petroliophilum*), MP-VI e MP-VII, representando diferentes *formae speciales* (MATUO; SNYDER, 1973) e outros isolados não identificados. A linhagem filogenética FSSC 9, conhecida por isolados de humanos e animais nos EUA (O’DONNELL et al., 2007; SHORT et al., 2011), é relatada no estudo associada a *S. tuberosum* (Figura 1).

As linhagens FSSC 5, inicialmente representada por isolados de humanos nos EUA, Nova Zelândia, Índia e Cuba, e FSSC 20, associada a humanos nos EUA (O’DONNELL et al., 2008) e a solo no Sri Lanka (NALIM et al., 2011), foram agrupadas com isolados de diversas plantas cultivadas e nativas, como *Passiflora edulis*, *P. nigrum*, *Piper arboreum*, *S. tuberosum*, *Chrysanthemum* sp., *Cyrtopodium cardiochilum*, *Phaseolus vulgaris* e *Coffea arabica*. Ambas as linhagens não foram formalmente descritas e são relatadas pela primeira vez no Brasil em associação com plantas economicamente importantes. A capacidade desses fungos oportunistas de se adaptar a diferentes ambientes pode refletir sua diversidade metabólica e plasticidade genética (COLEMAN et al., 2009).

Os isolados homotáticos deste estudo foram agrupados em três distintas linhagens: FSSC 8 (clado *Neocosmospora*), FSSC 21 e FSSC 33. Isolados homotáticos do Brasil, provenientes de *Citrus* sp. e de solo, agruparam com isolados da linhagem FSSC 8 provenientes de humano, solo, amendoim e nematoide dos EUA, África do Sul e Guiana (O’DONNELL et al., 2008) (Figura 1 e 2). O gênero *Neocosmospora* foi proposto por Smith, em 1899.

Neocosmospora vasinfecta, espécie tipo, é homotática e considerada patogênica a diversas plantas, causando podridão de raiz e caule (CANNON; HAWKSWORTH, 1984; PAN et al., 2010). Atualmente, há 13 espécies e variedades descritas, a maioria delas identificada como homotática e encontrada no solo como sapróbias ou patógenos de plantas (CANNON; HAWKSWORTH, 1984; ROSSMAN et al., 1999). Baseando-se em filogenia, espécies de *Neocosmospora* formam a linhagem FSSC 8. Mudança de nomenclatura recente propõe o nome *Fusarium neocosmosporiellum*, em substituição a *N. vasinfecta* (GEISER et al., 2013).

A linhagem filogenética homotática FSSC 21, encontrada neste estudo, é formada por sete isolados associados a várias plantas, *S. tuberosum*, *P. nigrum*, *Chrysanthemum* sp., *Capsicum annuum* e solo de diferentes estados brasileiros, além de um isolado de “*F. striatum*” de *S. tuberosum*, do Panamá e um isolado de “*H. ipomoeae*”, de *Passiflora edulis*, na Alemanha. Um isolado homotático do Brasil proveniente do solo agrupou com dois isolados provenientes de casca de árvore do Sri Lanka, *F. pseudoensiforme* e *Fusarium* sp. FSSC 33 (Figura 1). A linhagem FSSC 33 forma um grupo irmão da linhagem FSSC 19 (*F. ambrosium*), espécie morfológicamente distinta, associada a besouros, no Sri Lanka e na Índia (GADD; LOOS, 1947). *Fusarium pseudoensiforme* é uma espécie homotática e agrupa junto à linhagem FSSC 33 (NALIM et al., 2011). Esta espécie ocorre no Brasil, representada por um isolado também homotático, obtido do solo. Os resultados observados nesse estudo evidenciam que as linhagens FSSC 8, FSSC 21 e FSSC 33, representadas por isolados homotáticos, ocorrem em associação com material vegetal, exceto um isolado da linhagem FSSC 8 associado a humano (O’DONNELL et al., 2008). De acordo com os resultados obtidos, a hipótese é a de que os isolados homotáticos não apresentam capacidade para ocasionar micoses superficiais em humanos. Provavelmente, esses isolados são menos tolerantes a altas temperaturas.

Duas linhagens filogenéticas identificadas no estudo também representam distintas espécies biológicas no FSSC: a linhagem FSSC 23, representada por isolados de *Ipomoea batatas* e de *P. nigrum*, e a linhagem FSSC 31, composta por isolados de *P. nigrum*. A denominação *F. solani* f. sp. *batatas*, considerada como patógeno específico de batata-doce, foi atribuída por McClure (1951). A espécie biológica, ou *mating population* dessa *formae specialis*, foi denominada de MP-II, por Matuo e Snyder (1973) e, posteriormente, confirmada como espécie filogenética (O'DONNELL, 2000). Cruzamentos férteis foram encontrados entre os isolados do Brasil da pimenta-do-reino e o isolado NRRL 22400, que representa um dos testadores da MP-II (MATUO; SNYDER, 1973). Esse é o primeiro relato dessa *mating population* no país (ver capítulo 2). Os isolados foram sexualmente compatíveis e são associados à pimenta e à batata-doce, como é o caso também de *F. petroliophilum*, que corresponde à antiga MP-V do FSSC, que é uma espécie patogênica a cucurbitáceas e a humanos (MATUO; SNYDER, 1973; MEHL; EPSTEIN, 2007; SHORT et al., 2013). A partir desses resultados, a linhagem FSSC 23 representa uma espécie filogenética e biológica distinta no FSSC.

A linhagem FSSC 31 foi identificada, por O'Donnell (2000), a partir de um único isolado do Brasil de *P. nigrum*. Nesse estudo, outros dois isolados associados a *P. nigrum* foram observados nessa linhagem. Resultados obtidos pelo nosso grupo de trabalho identificaram ainda outros 20 isolados que agruparam nessa linhagem. O *mating type* dos isolados foi determinado por meio de *primers* desenvolvidos para o FSSC (ver capítulo 2) e cruzamentos férteis foram observados entre eles. A linhagem FSSC 31 representa uma nova espécie filogenética e biológica no FSSC que causa fusariose na pimenta-do-reino, e será descrita como "*Fusarium piperis*" (Figura 1). A linhagem filogenética FSSC 38, encontrada por Nalim et al. (2011), tem isolados exclusivamente do solo provenientes do Sri Lanka e da Austrália. No entanto, com os resultados

encontrados, é possível verificar que essa linhagem também está presente no Brasil, associada a *S. tuberosum* (Figura 2).

Nas análises filogenéticas individuais e combinadas, alguns isolados estão presentes no FSSC 3+4 (Figura 1, 2 e 3). As linhagens indefinidas FSSC 3 e FSSC 4 foram provisoriamente agrupadas por O'Donnell et al. (2008), pois formaram um clado junto com o isolado tipo de *F. falciforme*, introduzido como membro do FSSC a partir de *Acremonium falciforme* (SUMMERBELL; SCHROERS, 2002). *Fusarium falciforme* é comumente associado às infecções oculares em humanos e, provavelmente, as causas dessas infecções podem estar diretamente ligadas a resíduos vegetais e de solo (ZHANG et al., 2006). Nesse clado heterogêneo, existem os isolados associados à soja que representam uma nova espécie filogenética identificada em estudos anteriores pelo grupo de trabalho. O *mating type* dos isolados foi determinado e cruzamentos férteis foram encontrados entre eles (ver capítulo 2). Essa espécie filogenética também corresponde a uma espécie biológica que causa podridão vermelha de raiz na soja e que será formalmente descrita como *Fusarium paranaense*. Com base nas regiões gênicas analisadas no presente estudo, o polimosfismo não foi suficiente para separar esses isolados.

Surtos de ceratite associados ao uso de solução para lentes de contato ocorreram, entre os anos 2005 e 2006, nos EUA. Por meio de uma ampla investigação epidemiológica e análises filogenéticas, isolados do tipo “*F. solani*” foram identificados, em 70% dos casos, como agentes causais e a provável fonte de contaminação considerada foi material vegetal ou solo (CHANG et al., 2006). A partir disso, vários estudos foram realizados para verificar a diversidade de espécies no FSSC envolvendo, principalmente, isolados de humanos (O'DONNELL et al., 2007, 2008). No presente estudo, uma amostra de isolados do FSSC associados a plantas nativas ou cultivadas e solo foi analisada, no intuito de aumentar a base de conhecimento sobre a diversidade de espécies do

FSSC a partir de outros substratos que não fossem de humanos. Os resultados comprovam que o Brasil pode ser considerado um importante centro de diversidade de espécies nesse complexo, de acordo com a enorme variedade de plantas que existem no país, algumas delas de grande importância econômica, em que o patógeno, muitas vezes, ainda é denominado de *Fusarium solani*.

O uso de estudos de filogenia molecular com base em concordância de genes é importante para auxiliar estudos de taxonomia, principalmente em complexos de espécies que compartilham características morfológicas, como é o caso do complexo *F. solani*. Muitas linhagens encontradas no FSSC precisam ser formalmente descritas, pois, entre as 39 linhagens conhecidas na literatura, somente *F. ambrosium*, *F. striatum*, *F. falciforme*, *F. lichenicola*, *F. petroliphilum* e *F. keratoplasticum* foram descritas (GADD; LOOS, 1947; SHERBAKOFF, 1915; SHORT et al., 2013; SUMMERBELL; SCHROERS, 2002). Diante da grande diversidade filogenética que existe no Clado 3 do FSSC, é importante considerar que muitos isolados associados a plantas, a animais e a solo podem ter o potencial para causar infecções oportunistas em pessoas que apresentem deficiência imunológica (O'DONNELL et al., 2008). Além disso, a identificação correta dos agentes etiológicos é fundamental para fornecer subsídios para programas de melhoramento de germoplasma vegetal e para o controle de doenças.

REFERÊNCIAS

CANNON, P. F.; HAWKSWORTH, L. A revision of the genus *Neocosmospora* (Hypocreales). **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 82, n. 4, p. 673-688, 1984.

CHANG, D. C. et al. A multistate outbreak of *Fusarium* keratitis associated with use of a new contact lens solution. **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 296, n. 8, p. 953-963, Aug. 2006.

COLEMAN, J. J. et al. The genome of *Nectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 5, n. 8, p. 1-14, Aug. 2009.

COVERT, S. F. et al. Sexual reproduction in the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium tucumaniae*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, n. 6, p. 799-807, Dec. 2007.

GADD, C. H.; LOOS, C. A. The ambrosia fungus of *Xyleborus fornicatus* Eich. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 31, n. 1, p. 13-18, July 1947.

GEISER, D. M. et al. One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 103, n. 5, p. 400-408, 2013.

HEPPERLE, D. **SeqAssem©**: a sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Win32-Version. Klein Raden: Sequentix, 2004. Disponível em: <<http://www.sequentix.de>>. Acesso em: 13 jan. 2014.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Malden: Blackwell, 2006. 388 p.

LIU, Y. J. et al. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 16, n. 12, p. 1799-1808, 1999.

MATUO, T.; SNYDER, W. C. Use of morphology and mating populations in the identification of formae speciales in *Fusarium solani*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 63, p. 562-565, Nov. 1973.

MCCLURE, T. T. *Fusarium* foot rot of sweet-potato sprouts. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 41, p. 72-77, 1951.

MEHL, H.; EPSTEIN, L. *Fusarium solani* species complex isolates conspecific with *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 2 from naturally infected human and plant tissue and environmental sources are equally virulent on plants, grow at 37°C and are interfertile. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 9, n. 9, p. 2189-2199, 2007.

MEHL, H.; EPSTEIN, L. Sewage and community shower drains are environmental reservoirs of *Fusarium solani* species complex group 1, a human and plant pathogen. **Environmental Microbiology**, Wageningen, v. 10, n. 1, p. 219-227, 2008.

NALIM, F. A. et al. New species from the *Fusarium solani* species complex derived from perithecia and soil in the Old World tropics. **Mycologia**, Lawrence, v. 103, n. 6, p. 1302-1330, Nov./Dec. 2011.

O'DONNELL, K. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, Lawrence, v. 92, n. 5, p. 919-938, Mar. 2000.

O'DONNELL, K. et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, n. 8, p. 2044-2049, Dec. 1998.

O'DONNELL, K. et al. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic fusaria, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 7, p. 235-2248, July 2007.

O'DONNELL, K. et al. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. **Journal of Clinical Microbiology**, Whashington, v. 46, n. 8, p. 2477-2490, Aug. 2008.

PAN, R. et al. First report of peanut foot rot caused by *Neocosmospora vasinfecta* in mainland China. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 59, n. 6, p. 1172-1175, July 2010.

ROSSMAN, A. Y. et al. Genera of *Bionectriaceae*, *Hypocreaceae* and *Nectriaceae* (*Hypocreales*, Ascomycetes). **Studies Mycology**, Wageningen, v. 42, p. 1-248, May 1999.

SHERBAKOFF, C. D. **Fusaria of potatoes**. Ithaca: University Agricultural Experimental Station Memoir, 1915. 68 p.

SHORT, D. P. G. et al. Phylogenetic relationships among members of the *Fusarium solani* species complex in human infections and the descriptions of *F. keratoplasticum* sp. nov. and *F. petroliphilum* stat. nov. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 53, p. 9-70, Feb. 2013.

SHORT, D. P. G. et al. Widespread occurrence of human pathogenic types of the fungus *Fusarium* detected in plumbing drains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 12, p. 4264-4272, Dec. 2011.

SUMMERBELL, R. C.; SCHROERS, H. J. Analysis of phylogenetic relationship of *Cylindrocarpon lichenicola* and *Acremonium falciforme* to the *Fusarium solani* species complex and a review of similarities in the spectrum of opportunistic infections caused by these fungi. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 8, p. 2866-2875, Aug. 2002.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, p. 2731-2739, May 2011.

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

ZHANG, N. et al. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infection in both humans and plants are common in the environment. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 6, p. 2186-2190, June 2006.

CAPÍTULO 3

PRIMERS PARA DETERMINAÇÃO DE *MATING TYPES* E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES BIOLÓGICAS NO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Fusarium solani*

RESUMO

Primers para a amplificação específica dos idiomorfos *MAT-1* e *MAT-2* em espécies do complexo *Gibberella fujikuroi* que pertencem ao gênero *Fusarium* estão disponíveis na literatura, mas não geram produtos de PCR, quando usados em isolados do complexo de espécies *Fusarium solani*. Este estudo foi realizado com os objetivos de desenvolver *primers* para determinar o *mating type* em isolados do FSSC e identificar espécies biológicas em uma coleção de isolados do FSSC que ocorrem no Brasil. As sequências da região conservada do idiomorfo *MAT-1* de *Nectria haematococca* MP-VI disponível no *Joint Genome Institute- JGI* foram analisadas e utilizadas para construir os *primers* para este idiomorfo. Para o idiomorfo *MAT-2* foram utilizados, inicialmente, *primers* degenerados descritos na literatura para sequenciar essa região. A partir de regiões únicas conservadas de isolados do FSSC, foram desenvolvidos *primers* para esse idiomorfo. Os *primers* desenvolvidos amplificam com sucesso fragmentos de 200 e 212 bp de *MAT-1* e *MAT-2*, respectivamente, de isolados que pertencem ao Clado 3. Os *mating types* de 146 isolados foram determinados, resultando em 75 *MAT-1* e 71 *MAT-2*. Em isolados homotáticos, ocorreu a amplificação de ambos os idiomorfos. Após a determinação dos *mating types*, isolados que pertencem à mesma linhagem filogenética foram submetidos a cruzamentos em laboratório: FSSC 5, FSSC 23, FSSC 31, isolados associados a soja e isolados testadores da MP-IV (*F. solani* f. sp. *xanthoxyli*) e MP-V (*F. petroliphilum*), totalizando 84 isolados. Cruzamentos férteis foram obtidos entre isolados testadores das MPs conhecidas do FSSC, MP-IV e MP-V, validando os *primers* desenvolvidos. Cruzamentos férteis foram observados entre isolado testador da MP-II (*F. solani* f. sp. *batatas*) com dois isolados da pimenta-do-reino, sendo o primeiro relato dessa MP no Brasil. Duas novas MPs foram identificadas entre isolados patogênicos à soja e entre isolados de *F. solani* f. sp. *piperis* da pimenta-do-reino.

Palavras-chave: *Mating populations*. Heterotalismo. Idiomorfo *MAT-1* e *MAT-2*.

ABSTRACT

Primers to specific amplification of the idiomorphs *MAT-1* and *MAT-2* in the species of the *Gibberella fujikuroi* species complex which belong to the genus *Fusarium* are available in the literature, but do not generate PCR product when used for isolates of the *Fusarium solani* species complex. This study aimed to develop primers to determine the mating type for isolates of the FSSC, and to identify biological species in a collection of isolates of the FSSC which occur in Brazil. Sequences of the conserved region of the idiomorph *MAT-1* of *Nectria haematococca* MP-VI available in the *Joint Genome Institute* - JGI were analysed and used to develop primers for this idiomorph. For the idiomorph *MAT-2* were firstly used degenerated primers described in the literature for this gene region. Then, from conserved single regions of isolates of the FSSC were developed primers for this idiomorph. All the primers in this study amplified successfully fragments of *MAT-1* (200bp) and *MAT-2* (212bp) of isolates that belong to the clade 3. Mating types of 146 isolates were determined, resulting in 75 *MAT-1* and 71 *MAT-2*. For homothallic isolates, occurred the amplification of both idiomorphs. After determining the mating types, a total of 84 isolates which belong to the same phylogenetic lineage were submitted to crossing in the laboratory: FSSC 5, FSSC 23, FSSC 31, isolates associated with soybean and isolates tester of MP-IV (*F. solani* f.sp. *xanthoxyli*) and MP-V (*F. petrophilum*). Fertile crossings were obtained among isolates tester of known MP of the FSSC, MP-IV and MP-V, validating the primers in this study. Besides, fertile crossings were found among isolates tester of MP-II (*F. solani* f.sp. *batatas*) with two isolates from black pepper, being the first report of that MP in Brazil. Two novel MP were identified among pathogenic isolates of soybean, and among isolates of *F. solani* f.sp. *pipers* from black pepper.

Keywords: Mating population. Heterothallism. *MAT-1* and *MAT2* idiomorphs.

1 INTRODUÇÃO

O complexo de espécies *Fusarium solani* compreende, atualmente, cerca de 60 espécies filogenéticas, algumas delas definidas também como espécies biológicas, ou *mating populations* (NALIM et al., 2011; O'DONNELL et al., 2008; ZHANG et al., 2006).

No FSSC existem espécies heterotáticas e homotáticas, bem como as que não possuem reprodução sexual conhecida (O'DONNELL, 2000). Em espécies heterotáticas, o ciclo sexuado pode ser induzido em laboratório entre isolados de *mating types* opostos, *MAT-1* e *MAT-2*. Em espécies homotáticas, o ciclo sexual ocorre a partir de um isolado monospórico. Os dois idiomorfos *MAT* coexistem no mesmo genoma, fundidos ou diretamente ligados (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Em experimentos de indução da fase sexuada em laboratório com isolados do FSSC foram encontradas várias espécies biológicas. No Clado 3 foram encontradas sete espécies biológicas designadas de MP-I a MP-VII (MATUO; SNYDER, 1973), entre isolados de *F. keratoplasticum* e entre isolados de *F. petroliphilum* MP-V (MEHL; EPSTEIN, 2007; SHORT et al., 2013). No Clado 2, *Fusarium tucumaniae*, patógeno da síndrome da morte súbita (SDS) na soja, foi definida também como *mating population* (COVERT et al., 2007).

O uso de *primers* para determinar *mating types* e cruzamentos em laboratório podem evidenciar a identificação de espécies biológicas em populações de fungos nas quais marcadores morfológicos são escassos ou inexistentes (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Estudos baseados em determinação de *mating type* e cruzamentos têm sido utilizados para delimitar espécies dentro de *Gibberella fujikuroi species complex* (GFC). O complexo é composto por distintas espécies filogenéticas e biológicas que antes eram desconhecidas por causa da semelhança morfológica,

denominadas apenas como *Fusarium moniliforme*. Atualmente, existem pelo menos 13 MPs bem caracterizadas no GFC (KVAS et al., 2009; LESLIE; SUMMERELL, 2006; LIMA et al., 2012). *Primers* foram desenvolvidos para determinar o *mating type* no complexo *G. Fujikuroi* e auxiliar na identificação de espécies biológicas (STEENKAMP et al., 2000).

Alguns isolados do FSSC foram utilizados em trabalhos nos quais *primers* degenerados foram desenvolvidos para determinar *mating type* em *Neurospora crassa* (ARIE et al., 1997) e em outras espécies de *Fusarium* com teleomorfo em *Calonectria*, *Gibberella* e *Nectria* (KERÉNYI et al., 2004). Todos esses *primers* foram testados em isolados do FSSC, mas somente o idiomorfo *MAT-2* foi amplificado por meio dos *primers* de Kerényi et al. (2004).

O desenho de *primers* para determinar *mating type* no FSSC pode auxiliar estudos de indução da fase sexuada e identificar novas espécies biológicas, assim como no complexo *G. fujikuroi*. De acordo com a diversidade de espécies existentes no FSSC que causam doenças em várias plantas de importância agrícola, principalmente na região tropical e subtropical, há fortes evidências de que um número considerável de novas espécies ainda pode ser encontrado nos trópicos, inclusive no Brasil (O'DONNELL, 2000; O'DONNELL et al., 2008). O presente estudo foi realizado com o objetivo de desenvolver *primers* para determinar *mating type* e identificar a presença de espécies biológicas em uma coleção de isolados do FSSC obtidos de diferentes espécies de plantas cultivadas e do solo no Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados

Os isolados do complexo *Fusarium solani* utilizados no presente estudo foram obtidos de diferentes substratos e regiões geográficas do Brasil, incluindo sequências de isolados de referência (Tabela 1). Os isolados estão preservados em microtubos e criopreservados, a -80 °C, na Coleção Micológica de Lavras (CML), Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, Minas Gerais, Brasil.

2.2 Extração de DNA

Os isolados foram cultivados em meio completo líquido (LESLIE; SUMMERELL, 2006), incubados em um agitador (100 rpm), por três dias, em temperatura ambiente (25 °C a 28 °C). O micélio foi filtrado e a extração de DNA foi realizada com o emprego do kit Wizard® Genomic DNA *purification* (Promega do Brasil), de acordo com as condições do protocolo. As concentrações de DNA foram estimadas visualmente em gel de agarose 1%, por comparação da intensidade de banda com um marcador de comprimentos de fragmentos de 1 Kb (Invitrogen).

2.3 Desenvolvimento dos *primers* para amplificação do idiomorfo *MAT*

Sequências da região conservada do idiomorfo *MAT-1* do isolado NRRL 44580 *Nectria haematococca* MP-VI foram obtidas da base de dados Joint Genome Institute - JGI (2013). Estas sequências foram alinhadas e comparadas com sequências de *primers* degenerados, previamente descritos para o idiomorfo *MAT-1* e com sequências *MAT-1* de outras espécies de *Fusarium*. Sequências da região conservada do idiomorfo *MAT-2* de isolados do FSSC foram inicialmente obtidas a partir do uso de *primers* degenerados (KERÉNYI et al., 2004).

Tabela 1 Isolados testados com *primers* desenvolvidos para determinar o *mating type* no FSSC

| CML ^a | Outro código ^c | Espécies | Substrato | Origem ^d | Mating type ^e |
|------------------|---------------------------|---------------------|--------------------|----------------------------|--------------------------|
| 526* | MES1624 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Planaltina, DF | 1 |
| 527* | MES1497 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Planaltina, DF | 2 |
| 528* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Passo Fundo, RS | 2 |
| 575* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Planaltina, DF | 2 |
| 577* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Passo Fundo, RS | 2 |
| 691* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Araxá, MG | 2 |
| 860* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Brasil | 2 |
| 1771* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Campo Novo dos Parecis, MT | 1 |
| 1780* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Uberlândia, MG | 1 |
| 1781* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Uberlândia, MG | 1 |
| 1782* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Uberlândia, MG | 2 |
| 1829* | MES28 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Tapera, RS | 2 |
| 1830* | MES24 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Cristalina, GO | 1 |
| 1833* | MES13 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Campo Mourão, PR | 1 |
| 1836* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Guarapuava, PR | 2 |
| 1837* | MES 01 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Brasília, DF | 1 |
| 1839* | MES 60 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Patrocínio, MG | 1 |
| 1987* | MES730 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Chapadão do Sul, MS | 2 |
| 1988* | MES 732 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Chapadão do Sul, MS | 1 |
| 1989* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Guarapuava, PR | 2 |
| 1990* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Guarapuava, PR | 2 |

Tabela 1, continuação

| CML ^a | Outro código ^c | Espécies | Substrato | Origem ^d | Mating type ^e |
|------------------|---------------------------|---------------------|--------------------|----------------------|--------------------------|
| 1991* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Lunardelli, PR | 2 |
| 1992* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Lunardelli, PR | 1 |
| 1993* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Marinalva, PR | 1 |
| 1994* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | São João do Ivaí, PR | 1 |
| 1995* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Marinalva, PR | 2 |
| 1996* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | São João do Ivaí, PR | 1 |
| 1997* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Castro, PR | 1 |
| 1998* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Castro, PR | 2 |
| 1999* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Castro, PR | 1 |
| 2000* | MES34 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Carambeí, PR | 2 |
| 2001* | MES 64 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Palmeira, PR | 2 |
| 2002* | MES73 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Faxinal, PR | 2 |
| 2003* | MES722 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Londrina, PR | 1 |
| 2004* | MES723 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Campo Mourão, PR | 1 |
| 2005* | MES724 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Ubiratã, PR | 1 |
| 2007* | MES735 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Ivaiporã, PR | 1 |
| 2009* | MES728 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Passo Fundo, RS | 1 |
| 2010* | MES741 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Passo Fundo, RS | 1 |
| 2011* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Montividiu, GO | 1 |
| 2012* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Rio Verde, GO | 2 |
| 2014* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Montividiu, GO | 1 |
| 2015* | MES 721 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Brasília, DF | 1 |
| 2016* | MES 02 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Brasília, DF | 1 |

Tabela 1, continuação

| CML ^a | Outro código ^c | Espécies | Substrato | Origem ^d | Mating type ^e |
|------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| 2020* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Maracaju, MS | 2 |
| 2021* | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Marapuã, MS | 1 |
| 2023* | MES720 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | São Gotardo, MG | 1 |
| 2022* | MES 05 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Patos de Minas, MG | 1 |
| 2028* | MES27 | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Glycine max</i> | Brasília, DF | 1 |
| 1245 | | <i>Fusarium</i> sp. | Solo/ <i>Glycine max</i> | Montividiu, GO | 1 |
| 2025 | JEM 3582 | <i>Fusarium</i> sp. | Solo/ <i>Glycine max</i> | Unaí, MG | 2 |
| 581* | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 5 | <i>Chrysanthemum</i> sp. | Holambra, SP | 2 |
| 1842* | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 5 | <i>Cyrtopodium cardiochilum</i> | Viçosa, MG | 2 |
| 52 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Solanum tuberosum</i> | Sta Rita de Caldas, MG | 2 |
| 73 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Solanum tuberosum</i> | Espírito Santo de Dourado, MG | 1 |
| 45 | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 9 | <i>Solanum tuberosum</i> | Santa Rita de Caldas, MG | 2 |
| 46 ^b | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Solanum tuberosum</i> | Santa Rita de Caldas, MG | |
| 52 | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 9 | <i>Solanum tuberosum</i> | Santa Rita de Caldas, MG | 2 |
| 53 | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 38 | <i>Solanum tuberosum</i> | Santa Rita de Caldas, MG | 1 |
| 55* | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 5 | <i>Solanum tuberosum</i> | Santa Rita de Caldas, MG | 1 |
| 50 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Solanum tuberosum</i> | Muzambinho, MG | 1 |
| 60 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Solanum tuberosum</i> | Alfenas, MG | 2 |
| 64 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Solanum tuberosum</i> | Alfenas, MG | 2 |
| 65* | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 5 | <i>Solanum tuberosum</i> | Alfenas, MG | 1 |
| 89 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Solanum tuberosum</i> | Argentina | 1 |
| 576 ^b | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Gossypium</i> sp. | Planaltina, DF | |
| 580 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Gossypium hirsutum</i> | MS | 1 |

Tabela 1, continuação

| CML ^a | Outro código ^c | Espécies | Substrato | Origem ^d | Mating type ^e |
|-------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 214* | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 5 | <i>Passiflora edulis</i> | Carmo da Cachoeira, MG | 2 |
| 613 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Passiflora edulis</i> | Rio de Janeiro, RJ | 2 |
| 2183 ^b | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Passiflora edulis</i> | Jaíba, MG | |
| 1346 ^b | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Passiflora edulis</i> | Alemanha | |
| 2172 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Passiflora edulis</i> | Seb. da Laranjeira, BA | 1 |
| 2174 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Passiflora edulis</i> | Seb. da Laranjeira, BA | 1 |
| 2176 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Passiflora edulis</i> | Seb. da Laranjeira, BA | 2 |
| 2177 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Passiflora edulis</i> | Espinosa, MG | 1 |
| 2178 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Passiflora edulis</i> | Espinosa, MG | 1 |
| 2182 | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 20 | <i>Passiflora edulis</i> | Jaíba, MG | 2 |
| 2184 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Passiflora edulis</i> | Januária, MG | 2 |
| 2185 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Passiflora edulis</i> | Jaíba, MG | 2 |
| 2192 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Passiflora edulis</i> | Sebastião Laranjeiras, BA | 1 |
| 1834 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Viçosa, MG | 1 |
| 1835 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Viçosa, MG | 2 |
| 2043* | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 5 | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Sebastião Laranjeiras, BA | 1 |
| 2046* | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 5 | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Patos de Minas, MG | 1 |
| 2047* | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 5 | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Lavras, MG | 1 |
| 2186* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Valença, BA | 2 |
| 2187* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Valença, BA | 1 |
| 2188* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Valença, BA | 1 |
| 2189* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Valença, BA | 1 |
| 2190* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Valença, BA | 2 |
| 2191* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Taperoá, BA | 2 |

Tabela 1, continuação

| CML ^a | Outro código ^c | Espécies | Substrato | Origem ^d | Mating type ^e |
|-------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|
| 2201* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Ituberá, BA | 1 |
| 2205* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Ituberá, BA | 1 |
| 2207* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Taperoá, BA | 2 |
| 2209* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Taperoá, BA | 1 |
| 2210* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Taperoá, BA | 1 |
| 2211* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Taperoá, BA | 1 |
| 2220* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Porto Grande, AP | 1 |
| 2364* | CMM3618 | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Baião, PA | 1 |
| 2357* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Castanhal, PA | 1 |
| 2365* | CMM3617 | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Baião, PA | 1 |
| 2464* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Linhares, ES | 2 |
| 2465* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Jaguaré, ES | 2 |
| 2466* | | f. sp. <i>piperis</i> FSSC 31 | <i>Piper nigrum</i> | Jaguaré, ES | 2 |
| 2350* | | f. sp. <i>batatas</i> FSSC 23 | <i>Piper nigrum</i> | Tomé-Açú, PA | 1 |
| 2355* | | f. sp. <i>batatas</i> FSSC 23 | <i>Piper nigrum</i> | Tomé-Açú, PA | 2 |
| 2361 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Piper nigrum</i> | Tomé-Açú, PA | 2 |
| 2194 ^b | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Piper nigrum</i> | Nilo Peçanha, BA | |
| 2195 | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 9 | <i>Piper nigrum</i> | Ituberá, BA | 2 |
| 2196 | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 34 | <i>Piper nigrum</i> | Ituberá, BA | 2 |
| 2199 | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 9 | <i>Piper nigrum</i> | Ituberá, BA | 2 |
| 2204 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Piper nigrum</i> | Ituberá, BA | 1 |
| 2214 | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 20 | <i>Piper nigrum</i> | Taperoá, BA | 2 |
| 2219 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Piper nigrum</i> | Taperoá, BA | 2 |
| 2291 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Piper nigrum</i> | Sooretama, ES | 1 |

Tabela 1, continuação

| CML ^a | Outro código ^c | Espécies | Substrato | Origem ^d | Mating type ^e |
|------------------|---------------------------|--|-----------------------|---------------------------|--------------------------|
| 2297 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Piper nigrum</i> | Sooretama, ES | 1 |
| 2348 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Piper nigrum</i> | Tomé-Açú, PA | 2 |
| 2301 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Piper nigrum</i> | Sooretama, ES | 1 |
| 2302 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Piper nigrum</i> | Sooretama, ES | 1 |
| 2305 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Piper nigrum</i> | Jaguaré, ES | 1 |
| 2361 | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 20 <i>F. keratoplasticum</i> | <i>Piper nigrum</i> | Tomé-Açú, PA | 2 |
| 2193 | | FSSC 2 | <i>Piper nigrum</i> | Nilo Peçanha, BA | 2 |
| 2463 | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 20 | <i>Piper arboreum</i> | Belém, PA | 2 |
| 185 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Coffea arabica</i> | Lavras, MG | 2 |
| 217* | | <i>Fusarium</i> sp. FSSC 5 | <i>Coffea arabica</i> | Machado, MG | 1 |
| 220 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Coffea arabica</i> | Lavras, MG | 2 |
| 223 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Coffea arabica</i> | Brasil | 2 |
| 230 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Coffea arabica</i> | Brasil | 1 |
| 377 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Coffea arabica</i> | Viçosa, MG | 2 |
| 758 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Coffea arabica</i> | Santa Rita do Sapucaí, MG | 2 |
| 763 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Coffea arabica</i> | Santa Rita do Sapucaí, MG | 2 |
| 1137 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Citrus</i> sp. | Cordeirópolis, SP | 1 |
| 1139 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Citrus</i> sp. | Barretos, SP | 1 |
| 1141 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Citrus</i> sp. | Barretos, SP | 1 |
| 1142 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Citrus</i> sp. | Barretos, SP | 2 |
| 1147 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Citrus</i> sp. | Barretos, SP | 1 |
| 1149 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Citrus</i> sp. | Barretos, SP | 2 |
| 1151 | | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Citrus</i> sp. | Barretos, SP | 2 |

Tabela 1, continuação

| CML ^a | Outro código ^c | Espécies | Substrato | Origem ^d | Mating type ^e |
|-------------------|---------------------------|--|------------------------------|------------------------|--------------------------|
| 1156 | | <i>Fusarium</i> sp. | Citrussp. | Cordeirópolis, SP | 2 |
| 1158 | | <i>Fusarium</i> sp. | Citrussp. | Barretos, SP | 1 |
| 1160 | | <i>Fusarium</i> sp. | Citrus sp. | Barretos, SP | 1 |
| 1884* | NRRL 22163 | f. sp. <i>xanthoxyli</i> MP-IV | <i>Xanthoxylum piperitum</i> | Japão | 2 |
| 2230* | NRRL 22277 | f. sp. <i>xanthoxyli</i> MP-IV | <i>Xanthoxylum piperitum</i> | Japão | 1 |
| 1885 | NRRL 22586 | f. sp. <i>robiniae</i> MP-VII | <i>Roninea pseudocacia</i> | Virginia, EUA | 2 |
| 1889 | NRRL 22098 | f. sp. <i>cucurbitae</i> MP-I | <i>Cucurbita</i> sp. | EUA | 1 |
| 1883* | NRRL 22142 | <i>F. petrophilum</i> MP-V | <i>Cucurbita</i> sp. | California, EUA | 2 |
| 1895* | NRRL 22141 | <i>F. petrophilum</i> MP-V | <i>Cucurbita</i> sp. | Nova Zelândia | 1 |
| 1893 | NRRL 22230 | f. sp. <i>mori</i> MP-III | <i>Morus alba</i> | Japão | 2 |
| 2167 | NRRL 22157 | f. sp. <i>mori</i> MP-III | <i>Morus alba</i> | Japão | 2 |
| 1894* | NRRL 22400 | f. sp. <i>batatas</i> MP-II | <i>Ipomoeae batatas</i> | Carolina do Norte, EUA | 2 |
| 2169 | NRRL 22278 | f. sp. <i>pisi</i> MP-VI | <i>Pisum sativum</i> | EUA | 2 |
| 1159 ^b | | <i>Neocosmosporasp.</i> FSSC 8 | <i>Citrus</i> sp. | Barretos, SP | |
| 1242 ^b | | <i>Neocosmosporasp.</i> <i>Neocosmosporasp.</i> | Solo | Montividiu, GO | |
| 1262 ^b | | FSSC 8 | Solo | Montividiu, GO | |
| 1617 ^b | | <i>Neocosmosporasp.</i> | <i>Theobroma cacao</i> | Brasil | |
| 2232 | NRRL 22090 | <i>Nectria illudens</i> | <i>Beilschmiedia tawa</i> | Nova Zelândia | Nd |
| 2447 | | <i>F. tucumaniae</i> | <i>Glycine max</i> | Guarapuava, PR | Nd |
| 2448 | | <i>F. tucumaniae</i> | <i>Glycine max</i> | Guarapuava, PR | Nd |
| 2449 | | <i>F. tucumaniae</i> | <i>Glycine max</i> | Guarapuava, PR | Nd |
| 2450 | | <i>F. tucumaniae</i> | <i>Glycine max</i> | Guarapuava, PR | Nd |
| 2057 | | <i>F. decemcellulare</i> | <i>Theobroma cacao</i> | Ilhéus, BA | Nd |

Tabela 1, conclusão

| CML ^a | Outro código ^c | Espécies | Substrato | Origem ^d | Mating type ^e |
|------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------------|---------------------|--------------------------|
| 2254 | | <i>F. decemcellulare</i> | <i>Theobroma cacao</i> | Amazonas, AM | Nd |
| 2273 | | <i>F. decemcellulare</i> | <i>Theobroma cacao</i> | Ilhéus, BA | Nd |
| 2593 | MP59 | <i>F. udum</i> | <i>Crotalaria ochroleura</i> | Lavras, MG | Nd |
| 262 | | <i>F. tuiense</i> | <i>Mangifera indica</i> | Lavras, MG | Nd |

^aCML = Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; * Isolados utilizados nos cruzamentos; ^bHomotático; ^c MES = Micoteca Embrapa Soja, Embrapa Soja, Londrina Paraná, Brasil; JEM = Jem Análise Agrícola, Aparecida de Goiânia, Goiás, Brasil; CMM = Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos Profa. Maria Menezes; NRRL = Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, EUA; ^destados do Brasil: Amazonas - AM; Amapá - AP; Bahia - BA; Distrito Federal - DF; Espírito Santo - ES; Goiás - GO; Minas Gerais - MG; Mato Grosso - MT; Mato Grosso do Sul - MS; Pará - PA; Paraná - PR; Rio de Janeiro - RJ; Rio Grande do Sul -RS; São Paulo - SP. ^eMAT - *Mating type* dos isolados identificados por PCR. *MAT-1* = 1; *MAT-2* = 2; nd = não determinado

Os produtos da PCR foram sequenciados e as sequências foram alinhadas e comparadas com os *primers* descritos para *MAT-2* (KERÉNYI et al., 2004) e com sequências *MAT-2* de outras espécies de *Fusarium*. Os alinhamentos das sequências nucleotídicas com os *primers* degenerados foram gerados utilizando-se o programa CLUSTALW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994), implementado pelo programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). Os *primers* foram desenvolvidos de acordo com a homologia das sequências *MAT* dos isolados do FSSC. *Primers* para determinar o idiomorfo *MAT-1* e *MAT-2* para espécies do complexo *F. solani* foram analisados por meio do software OligoAnalyzer 3.1.

2.4 Especificidade dos *primers* e otimização da PCR

Os *primers* desenvolvidos foram testados com isolados do FSSC disponíveis na CML (Tabela 1). A reação de PCR foi conduzida, inicialmente, de acordo com protocolos disponíveis na literatura (BENTLEY et al., 2008; KERÉNYI et al., 2004; LESLIE; SUMMERELL, 2006). Diferentes concentrações de $MgCl_2$ (1,0, 1,5 e 2,0) e temperaturas de anelamento (50 °C, 55 °C, 58 °C e 60 °C) foram utilizadas durante os ensaios.

Depois da otimização, a reação da PCR para *MAT-1* foi realizada com um volume final de 20 μ l contendo tampão 1 \times (Invitrogen); 1,5 mM $MgCl_2$; 0,2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, e dTTP; 0,25 μ M de cada *primer*, 1 U de *Taq* DNAPolimerase e \approx 20 ng de DNA do fungo. A reação para *MAT-2* foi realizada com volume final de 20 μ l contendo tampão 1 \times (Invitrogen); 1,5 mM $MgCl_2$; 0,5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, e dTTP; 0,25 μ M de cada *primer*, 1 U de *Taq* DNA polimerase e \approx 20 ng de DNA do fungo.

Na amplificação, a desnaturação inicial foi de 94 °C, por 30 segundos, seguida por 30 ciclos de 94 °C, por 30 segundos, temperatura de anelamento de 55 °C (*MAT-1*) e 60 °C, para (*MAT-2*) por 30 segundos, 72 °C, por 90 segundos

e extensão final de 72 °C, por 1 minuto. O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose a 1%, corado com *GelRed*TM em luz UV.

2.5 Determinação de *mating type* por PCR

O *mating type* dos isolados monospóricos foi determinado por meio da amplificação do idiomorfo *MAT-1* e *MAT-2*, utilizando os *primers forward* e *reverse*, desenvolvidos e validados para isolados do FSSC neste estudo. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1%, para a visualização dos resultados. O comprimento dos fragmentos amplificados foi comparado com um marcador DNA ladder 1 Kb.

2.6 Indução da fase sexuada

As linhagens filogenéticas do FSSC que apresentaram isolados de ambos os *mating types* (Ver Cap 1) foram selecionadas para a indução da fase sexuada entre os isolados em laboratório (FSSC 5, FSSC 23, FSSC 31 e isolados associados a soja), totalizando 84 isolados. Os cruzamentos foram realizados utilizando-se protocolo adaptado por Leslie e Summerell (2006), entre nove isolados da FSSC 5; três isolados da FSSC 23 (dois isolados do Brasil e o testador NRRL 22400 da MP-II); 19 isolados *F. solani* f. sp. *piperis*; 49 isolados associados à soja, que representam uma nova espécie filogenética no FSSC, e entre isolados testadores da MP-IV e MP-V (Tabela 1).

Cada isolado foi testado como parental masculino e como parental feminino em cruzamentos recíprocos. Os isolados de um determinado *mating type*, testados como parentais masculinos, foram cultivados em tubo de ensaio contendo meio completo e incubados, a 20 °C, sob fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. Os isolados do outro *mating type*, testados como parentais femininos, foram cultivados em placas de Petri de poliestireno (60 x 15 mm) em meio

cenoura ágar (CA), incubados a 25 °C, no escuro, por sete dias. Após o período de incubação, uma suspensão de esporos foi preparada no tubo de ensaio, pela adição de 2 mL de solução Tween 80 a 2,5% (v/v), utilizando uma pipeta de Pasteur. Em seguida, a suspensão foi transferida para uma placa contendo o isolado de *mating type* oposto e, com o auxílio de uma alça de Drigalski, espalhada de modo a umedecer completamente o micélio.

Os fungos foram incubados, a 22 °C -23 °C, com luz branca fluorescente constante, por um período de até seis semanas, e avaliados semanalmente. Cruzamentos foram considerados férteis quando produziram peritécios com exsudação de ascósporos. Os cruzamentos foram repetidos para a confirmação dos resultados. A viabilidade dos ascósporos foi analisada pelo teste de germinação em agar-água 2%. Cirros de ascósporos foram coletados com o auxílio de um estilete de ponta extremamente fina e, em seguida, espalhados sobre a superfície do ágar com uma alça de Drigalski e algumas gotas de água estéril. As placas de Petri contendo os ascósporos foram incubadas no escuro, a 25 °C, por 24 horas. Após o período de incubação, foi avaliada a germinação dos ascósporos com objetiva de 40 vezes, em microscópio de luz. Um isolado de cada *mating type* que apresentou maior fertilidade foi selecionado como testador para a espécie biológica do estudo.

3 RESULTADOS

3.1 Desenvolvimento de *primers* para a determinação dos *mating types* no FSSC

Após o alinhamento das sequências dos isolados do FSSC, as posições correspondentes à degeneração dos *primers* de Kerényi et al. (2004) foram substituídas por bases nitrogenadas, de acordo com a homologia das sequências *MAT* dos isolados do FSSC. Para o desenvolvimento dos *primers* *MAT-1*, foram realizadas quatro substituições de bases para *forward* e quatro para *reverse* (Figura 1). Para o desenvolvimento dos *primers* *MAT-2*, as sequências obtidas dos isolados do FSSC não apresentaram tamanho suficiente, quando comparadas com o *primer forward* de Kerényi et al. (2004). Por isso, uma região conservada entre os isolados foi selecionada para a construção do *primer*. Para o *primer reverse* foram realizadas cinco substituições de bases (Figura 2).

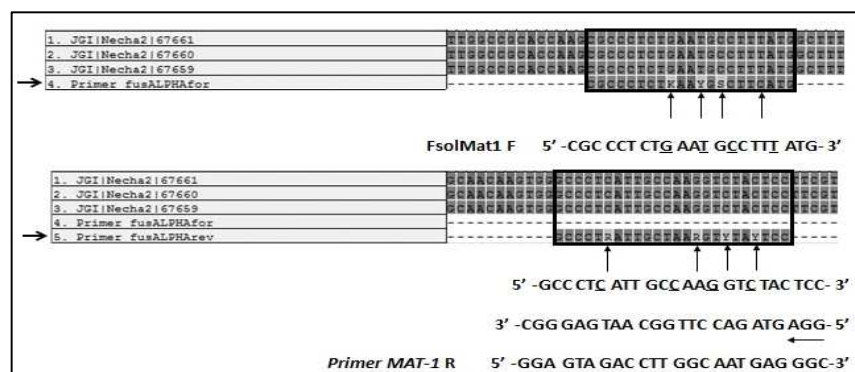


Figura 1 Desenho dos *primers* para amplificação do idiomorfo *MAT-1* para isolados do FSSC. Números de 1 a 3 correspondem às sequências *MAT-1* de *N. haematococca* MP-VI obtidas no JGI (2013); 4 e 5 *primers* degenerados *forward* e *reverse* de Kerényi et al. (2004). Para o desenho de FsolMat1F e FsolMat1R, foram realizadas quatro substituições de bases nitrogenadas nos locais específicos da degeneração

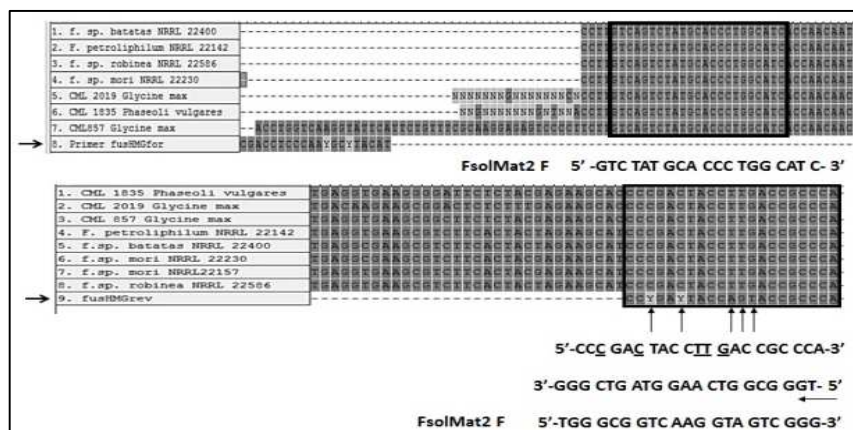


Figura 2 Desenho dos *primers* para amplificação do idiomorfo *MAT-2* para isolados do FSSC. Números de 1 a 4 correspondem às sequências de MPs identificadas no FSSC: *f. sp. batatas* MP-II, *F. petroliophilum* MP-V, *f. sp. robinea* MP-VII, *f. sp. mori* MP- III, respectivamente; de 5 a 7 sequências de isolados do FSSC depositados na Coleção Micológica de Lavras - CML; 8 *primers* degenerados *forward* e *reverse* de Kerényi et al. (2004). Para o desenho de FsolMat2F foi selecionada uma região conservada das sequências dos isolados e, para FsolMat2R, foram realizadas cinco substituições de bases nitrogenadas nos locais específicos de degeneração

Os *primers* desenvolvidos para o idiomorfo *MAT-1* foram FsolMat1F (5'-CGCCCTCTGAATGCCTTTATG-3') e FsolMat1R (5'-GGAGTAGACCTTGGCAATGAGGGC-3') e, para o idiomorfo *MAT-2* foram FsolMat2F (5'-GTCTATGCACCCTGGCATC-3') e FsolMat2R (5'-TGGGCGGTCAAGGTAGTCGGG-3'), com amplificação de 200 pb e 212 pb, respectivamente (Figura 3).

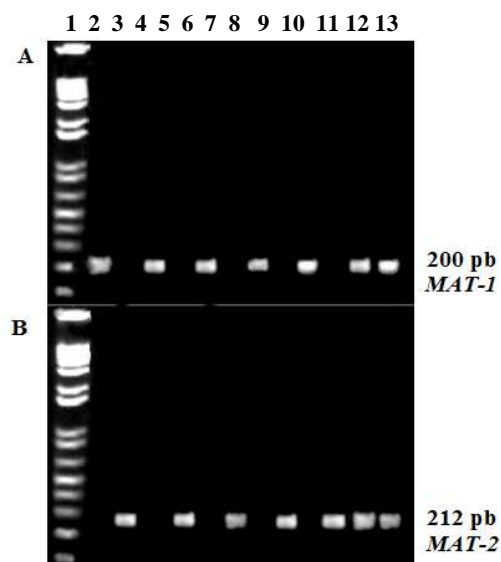


Figura 3 Amplificação dos idiormorfos *MAT-1* e *MAT-2* para MPs do FSSC. A. *Primers* FsolMat1F e FsolMat1R, 200bp. B. *Primers* FsolMat2F e FsolMat2R, 212bp. Linha 1: DNA ladder; linhas 2 e 3: MP dos isolados de soja, CML 1830, CML 860; linhas 4 e 5: MP de *f.sp. piperis*, CML 2187, CML 2186; linhas 6 e 7: MP-II, CML 2350, CML 1894 (NRRL 22400); linhas 8 e 9: MP-IV, CML 2230 (NRRL 22277), CML 1884 (NRRL 22163); linhas 10 e 11: MP-V, CML 1895 (NRRL 22141), CML 1883 (NRRL 22142); linhas 12 e 13: isolados homotáticos, CML 576, CML 2183

3.2 Determinação de *mating type* por PCR

Os *primers* desenvolvidos foram eficientes para a determinação de *mating types* em todos os isolados do FSSC do Clado 3 testados, incluindo isolados de diferentes substratos, as sete MPs descritas por Matuo e Snyder (1973) e isolados homotáticos (Tabela 1). Foram determinados os *mating types* de 146 isolados, sendo 75 *MAT-1* e 71 *MAT-2*. Nos isolados homotáticos foi possível a amplificação de ambos os idiormorfos. Para isolados do clado 2 e isolados de *F. decemcellulare*, *F. udum* e *F. tuiense*, nenhum idiormorfo foi amplificado. Somente o idiormorfo *MAT-2* foi determinado para os isolados das

linhagens FSSC 7, FSSC 9 e FSSC 20 (ver capítulo 1). As linhagens FSSC 5, FSSC 23 e FSSC 31 apresentam isolados de ambos os *mating types*.

3.3 Identificação de espécies biológicas no FSSC

Cruzamento fértil foi encontrado entre isolados de f. sp. *xanthoxyli* MP-IV (NRRL 22277, *MAT-1* com NRRL 22163, *MAT-2*) e entre isolados def. sp. *cucurbitae* MP-V (NRRL 22141, *MAT-1* com NRRL 22142, *MAT-2*). Cruzamentos férteis também foram observados em outras três linhagens: FSSC 23, FSSC 31 e entre a linhagem filogenética representada por isolados associados à soja. Na linhagem FSSC 23 f. sp. *batatas*, houve cruzamento entre isolados de *P. nigrum* CML 2350 (*MAT-1*) com CML 2355 (*MAT-2*) e CML 2350 com o testador da MP-II, NRRL 22400 (*MAT-1*). Foi observado cruzamento entre os isolados da linhagem FSSC 31, f. sp. *piperis* e entre isolados patógenos da soja. Para todas as espécies biológicas, peritécios foram observados nos cruzamentos, após duas ou três semanas de incubação e a exsudação de ascósporos ocorreu a partir da terceira semana após a formação dos peritécios. Cruzamentos férteis foram encontrados somente entre isolados de uma mesma espécie biológica, quando testados com isolados testadores de outra MP não produziram peritécios.

Em algumas linhagens identificadas no FSSC não foi possível realizar cruzamentos entre os isolados, pois apresentavam um único isolado (FSSC 2, FSSC 34 e FSSC 38) ou somente um idiomorfo identificado (FSSC 7, FSSC 9 e FSSC 20). Na linhagem FSSC, cinco isolados de ambos os *mating types* foram determinados, no entanto, não foi observada a formação de peritécios.

4 DISCUSSÃO

Primers para determinar *mating type* para espécies do FSSC foram desenvolvidos no intuito de diferenciar os isolados que podem ser utilizados em cruzamentos no laboratório e identificar espécies biológicas presentes no Brasil. Esses *primers* podem ser aplicados com sucesso na amplificação dos idiomorfos *MAT-1* e *MAT-2*, para diferentes espécies do Clado 3 do FSSC.

O conceito biológico pode ser aplicado para auxiliar na identificação de espécies morfologicamente semelhantes, como é o caso das espécies do FSSC. Espécie biológica é composta por grupo de indivíduos que podem cruzar e gerar descendentes férteis e a população é delimitada por barreira reprodutiva (LESLIE, 1995). Com os *mating types* determinados, cruzamentos são realizados somente entre isolados opostos, *MAT-1* com *MAT-2*, reduzindo tempo, meios de cultura, espaço e evita o trabalho laborioso de fazer numerosos cruzamentos, testando diferentes condições de temperatura, luminosidade, nutrição e receptividade do micélio (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

No FSSC, o primeiro relato de espécie biológica identificada por meio de cruzamentos em laboratório foi na década de 1970, com a identificação de sete MPs (MATUO; SNYDER, 1973). Somente após três décadas, novas MPs foram identificadas, entre isolados de *Fusarium tucumaniae*, *Fusarium keratoplasticum* e *Fusarium petroliphilum*, anteriormente conhecida como MP-V (COVERT et al., 2007; MEHL; EPSTEIN, 2007; SHORT et al., 2013), totalizando nove espécies biológicas. Todas as MPs do FSSC foram confirmadas como espécies filogenéticas (O'DONNELL, 2000; SHORT et al., 2013). No gênero *Fusarium*, outro complexo de espécies amplamente estudado é o *Gibberella fujikuroi species complex* (GFC). Em adição à caracterização morfológica, o conceito biológico vem sendo aplicado com sucesso para delimitar espécies dentro desse complexo. *Primers* foram desenvolvidos para o

GFC, a fim de determinar *mating type* e auxiliar na identificação de espécies biológicas (STEENKAMP et al., 2000). Existem 13 *mating populations* identificadas (KVAS et al., 2009; LESLIE; SUMMERELL, 2006; LIMA et al., 2012).

Primers degenerados desenvolvidos para identificação de *mating type* em *N. crassa* (ARIE et al., 1997) e para várias espécies de *Fusarium*, incluindo isolados de *Nectria* (KERÉNYI et al., 2004), foram utilizados pelo nosso grupo de estudo em trabalhos anteriores, na tentativa de determinar *mating type* para isolados do FSSC. No entanto, ocorreu amplificação de bandas inespecíficas e que não correspondem ao tamanho dos idiomorfos, como descrito na literatura para isolados de *Nectria* (ARIE et al., 1997). A falta de amplificação, ou amplificação de bandas inespecíficas, provavelmente, pode ser em decorrência de divergência de sequências que podem ocorrer mesmo em regiões conservadas para o gênero *Fusarium* (STEENKAMP et al., 2000) ou pelo fato de os *primers* não serem específicos para espécies do FSSC. O idiomorfo *MAT-2* foi identificado para o FSSC, quando utilizados os *primers* degenerados de Kerényi et al. (2004), mas esses *primers* também funcionaram para espécies não relacionadas ao FSSC, como *F. decemcellulare* e *Gibberella* sp. Quando utilizados os *primers* desenvolvidos no presente estudo, houve amplificação dos idiomorfos *MAT* somente para as espécies do FSSC.

Todos os isolados heterotáticos testados com os *primers* apresentaram amplificação de um ou outro *mating type*. Nos isolados homotáticos foi possível a amplificação de ambos idiomorfos, assim como foi observado em isolados homotáticos de *F. graminearum* (KERÉNYI et al., 2004). As espécies homotáticas carregam genes para ambos os *mating types* no mesmo genoma, que podem estar ligados ou não (MARTIN et al., 2011; YUN et al., 2000). Essas espécies, quando comparadas com espécies heterotáticas, podem apresentar os mesmos genes *MAT*, mas com diferença de tamanho e de bases nesses genes.

Por causa dessas diferenças, um evento raro de recombinação do genoma poderia ter convertido dois idiomorfos *MAT* de espécie heterotálica em dois idiomorfos separados ou ligados em espécie homotálica (IDNURM, 2011). Com base nisso, a hipótese é a de que o heterotalismo é a forma ancestral da reprodução sexual em fungos (LEE et al., 2003).

O teste de homotalismo pode ser realizado como complementação da técnica de determinação de *mating types*, pois isolados homotáticos podem fornecer resultado falso positivo nos cruzamentos. Na natureza, a escassez de nutrientes pode induzir o ciclo sexual (LESLIE; SUMMERELL, 2006) e, sendo assim, o teste consiste em repicar o isolado em um meio pobre em nutrientes, como *synthetic nutrient-poor agar*, ou SNA.

Nossos resultados evidenciam a validação e a importância do uso dos *primers* desenvolvidos para determinar *mating type* e identificar MPs no FSSC. Na literatura, não existem relatos dos *mating types* dos isolados de referência das MPs descritas no FSSC. Por meio dos *primers* desenvolvidos neste estudo foi possível determinar os *mating types* dos isolados representantes das sete espécies biológicas, MP-I a MP-VII, dentro do FSSC (MATUO; SNYDER, 1973). As MPs f. sp. *xanthoxily* MP-IV e *F. petroliophilum* MP-V apresentaram isolados testadores de ambos os *mating types*. Dessa forma, foi possível validar os *primers*, pois cruzamentos férteis foram encontrados entre isolados dessas duas espécies biológicas.

Cruzamentos férteis também foram encontrados entre isolado da linhagem FSSC 23 f. sp. *batatas* MP-II (MATUO; SNYDER, 1973) com isolados de *F. solani* da pimenta-do-reino, sendo o primeiro relato dessa MP no Brasil. Os isolados são sexualmente compatíveis e podem ser encontrados em ambos hospedeiros. A inespecificidade de hospedeiro também foi relatada entre isolados de *F. solani*, patógenos de humanos e isolados de f. sp. *cucurbitae* MP-V. Ambos os patógenos compreendem a mesma espécie filogenética

formalmente descrita, *F. petroliphilum* (SHORT et al., 2013), mesma espécie biológica, e são igualmente virulentos a cucurbitáceas e tolerantes à temperatura do corpo humano (MEHL; EPSTEIN, 2007). A diversidade metabólica e a plasticidade genética existentes nesses fungos podem refletir a habilidade deles em adaptar diferentes tipos de ambientes (COLEMAN et al., 2009).

Com o uso dos *primers* desenvolvidos no estudo e cruzamentos em laboratório, duas novas MPs foram identificadas para o FSSC, entre isolados patogênicos à soja e entre isolados de f. sp. *piperis* da pimenta-do-reino (FSSC 31). Ambas as espécies também correspondem a distintas espécies filogenéticas.

Na linhagem FSSC 5 não foi observada a formação de peritécios. Os isolados apresentam baixa fertilidade, o que afeta diretamente o sucesso dos cruzamentos. Além disso, as condições de incubação também influenciam os cruzamentos, como temperatura e luminosidade, e podem variar para cada espécie (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

O uso de *primers* para determinar *mating types*, além de permitir a identificação de espécies biológicas, pode auxiliar a identificar populações em campo, fornecendo um diagnóstico rápido de possível reprodução sexual. Isolados testadores para cada espécie biológica, que têm alta fertilidade de cada *mating type*, devem ser identificados e disponibilizados para serem utilizados em experimentos de cruzamentos e identificação de MPs. Os testadores das espécies biológicas encontradas no presente estudo serão disponibilizados para estudos futuros, com indução da fase sexuada no FSSC. De acordo com a diversidade de espécies encontradas no complexo *F. solani*, a aplicação do conceito biológico utilizando os *primers* desenvolvidos para o Clado 3 do FSSC e cruzamentos pode ser importante para complementar outros conceitos de espécies, como morfológico e filogenético, e a presença de novas espécies biológicas em regiões tropicais e subtropicais, inclusive no Brasil, é provável.

REFERÊNCIAS

- ARIE, T. et al. Efficient cloning of ascomycete mating type genes by PCR amplification of the conserved *MAT* HMG box. **Fungal Genetic Biology**, Orlando, v. 21, p. 118-130, Jan. 1997.
- BENTLEY, A. R. et al. Genetic structure of *Fusarium pseudograminearum* populations from the Australian grain belt. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 2, p. 250-255, Sept. 2008.
- COLEMAN, J. J. et al. The genome of *Nectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 5, n. 8, p. 1-14, Aug. 2009.
- COVERT, S. F. et al. Sexual reproduction in the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium tucumaniae*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, n. 6, p. 799-807, Dec. 2007.
- IDNURM, A. Sex and speciation: the paradox that non-recombining DNA promotes recombination. **Fungal Biology Reviews**, New York, v. 25, n. 3, p. 121-127, Oct. 2011.
- JOINT GENOME INSTITUTE. *Nectria haematococca*. Version 2.0. Disponível em: <<http://genome.jgi-psf.org/Necha2/Necha2.download.html>>. Acesso em: 10 nov. 2013.
- KERÉNYI, Z. et al. Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 8, p. 4419-4423, Aug. 2004.
- KVAS, M. et al. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 34, p. 1-21, Jan. 2009.

LEE, J. et al. Shifting fungal reproductive mode by manipulation of mating type genes: obligatory heterothallism of *Gibberella zeae*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 50, n. 1, p. 145-152, 2003.

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. **The *Fusarium* laboratory manual**. Malden: Blackwell, 2006. 388 p.

LIMA, C. S. et al. *Fusarium tuiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. **Mycologia**, Lawrence, v. 104, n. 6, p. 1408-1419, May 2012.

MARTIN, S. H. et al. Structure and evolution of the *Fusarium mating type* locus: new insights from the *Gibberella fujikuroi* complex. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 48, n. 7, p. 731-740, July 2011.

MATUO, T.; SNYDER, W. C. Use of morphology and mating populations in the identification of formae speciales in *Fusarium solani*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 63, p. 562-565, Nov. 1973.

MEHL, H.; EPSTEIN, L. *Fusarium solani* species complex isolates conspecific with *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 2 from naturally infected human and plant tissue and environmental sources are equally virulent on plants, grow at 37°C and are interfertile. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 9, n. 9, p. 2189-2199, 2007.

NALIM, F. A. et al. New species from the *Fusarium solani* species complex derived from perithecia and soil in the Old World tropics. **Mycologia**, Lawrence, v. 103, n. 6, p. 1302-1330, Nov./Dec. 2011.

O'DONNELL, K. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, Lawrence, v. 92, n. 5, p. 919-938, Mar. 2000.

O'DONNELL, K. et al. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. **Journal of Clinical Microbiology**, Whashington, v. 46, n. 8, p. 2477-2490, Aug. 2008.

SHORT, D. P. G. et al. Phylogenetic relationships among members of the *Fusarium solani* species complex in human infections and the descriptions of *F. keratoplasticum* sp. nov. and *F. petroliphilum* stat. nov. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 53, p. 9-70, Feb. 2013.

STEENKAMP, E. T. et al. PCR-based identification of MAT-1 and MAT-2 in the *Giberella fujikuroi* species complex. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4378-4382, Oct. 2000.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, p. 2731-2739, May 2011.

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

YUN, S. H. et al. Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic and asexual *Gibberella/Fusarium* species. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 31, p. 7-20, Sept. 2000.

ZHANG, N. et al. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infection in both humans and plants are common in the environment. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 6, p. 2186-2190, June 2006.