



**MARUZANETE PEREIRA DE MELO**

**ESPÉCIES BIOLÓGICAS E FILOGENÉTICAS  
DO COMPLEXO *Fusarium fujikuroi***

**LAVRAS – MG  
2014**

**MARUZANETE PEREIRA DE MELO**

**ESPÉCIES BIOLÓGICAS E FILOGENÉTICAS DO COMPLEXO**  
*Fusarium fujikuroi*

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

Orientador

Dr. Ludwig H. Pfenning

**LAVRAS – MG**  
**2014**

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

Melo, Maruzanete Pereira de.

Espécies biológicas e filogenéticas do complexo *Fusarium fujikuroi* / Maruzanete Pereira de Melo. – Lavras : UFLA, 2014.

131 p. : il.

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

Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning.

Bibliografia.

1. *Brachiaria*. 2. *Cajanus cajan*. 3. *Crotalaria*. 4. *Musa*. 5. *Saccharum*. 6. Doença de planta. 7. Filogenia multigênica. 8. Marcadores morfológicos. 9. *Mating population*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.43

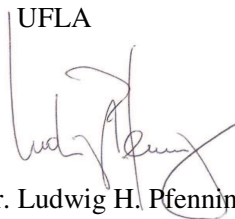
**MARUZANETE PEREIRA DE MELO**

**ESPÉCIES BIOLÓGICAS E FILOGENÉTICAS DO COMPLEXO**  
*Fusarium fujikuroi*

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

APROVADA em 8 de setembro 2014

Dr. Cristiano Souza Lima	UFC
Dr. José Aires Ventura	INCAPER
Dr. Flávio H.V. Medeiros	UFLA
Dra. Maria Alves Ferreira	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 Fitopatologia, por me permitirem cursar o doutorado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

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

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia / Fitopatologia, pelos ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Maria Alves Ferreira, Dr. Cristiano Souza Lima, Dr. José Aires Ventura, Dr. Flávio H.V. Medeiros, pela participação e valiosas sugestões.

À equipe do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos do DFP, pela colaboração na realização do trabalho e momentos de descontração, especialmente ao Dr. Lucas M. Abreu, à Dra. Sarah da Silva Costa Guimarães e a Elaine Aparecia Guimarães pelo auxílio em várias atividades.

Muito obrigado!

## RESUMO GERAL

Um grupo de espécies denominado na literatura internacional como complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* - FFSC deriva do extinto nome *Fusarium moniliforme* e da antiga Seção Liseola. Atualmente compreende mais de 50 espécies, as quais são definidas por marcadores morfológicos, por barreira reprodutiva (*mating populations* – MP's) e filogenia molecular. Muitas das espécies do complexo são importantes patógenos de plantas cultivadas e algumas são produtoras de micotoxinas. Nas duas décadas passadas, um considerável número de novas espécies foi descrito formalmente, enquanto outras ainda continuam pouco conhecidas, inclusive no Brasil. O objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade de espécies do FFSC, que ocorre em associação com plantas como *Crotalaria*, *Cajanus*, *Musa*, *Brachiaria* e *Saccharum* e caracterizá-las de acordo com conceitos atuais de espécie morfológica, biológica e filogenética. Em todos os estudos, os isolados obtidos de material vegetal foram avaliados por meio de análises filogenéticas das regiões gênicas *EF-1 $\alpha$* , *tub2* e *RPB2*, testes de compatibilidade sexual, marcadores morfológicos e testes de patogenicidade. No primeiro estudo (Capítulo 1) foi testada a hipótese que o agente etiológico da murcha de *Crotalaria* fosse *Fusarium udum*, já que em 1934 foi descrito *F. udum* f. sp. *crotalariae*. Isolados de *Crotalaria* do Brasil agruparam com isolados de *Cajanus* da Índia e África em um clado único na análise Bayesiana das três regiões gênicas. Em cruzamentos, isolados do Brasil e da Índia formaram peritécios férteis. Em testes de patogenicidade, os isolados avaliados causaram murcha em *Crotalaria ochroleuca*. Marcadores morfológicos, tanto da fase sexuada como da fase assexuada, conferem com descrições originais do patógeno. Os resultados obtidos permitiram concluir que o agente etiológico da murcha de *Crotalaria* e de *Cajanus* é *F. udum*. A espécie representa uma nova *mating population* no complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* - FFSC. Esse é o primeiro relato da espécie para o Brasil, viabilizando a diagnose correta e o monitoramento da doença no futuro. No Capítulo 2, isolados provenientes de sementes assintomáticas de *Brachiaria* spp. e plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) com sintoma de “*pokkah boeng*” foram caracterizados por marcadores morfológicos, cruzamentos em laboratório, análises filogenéticas e testes de patogenicidade. Em *Brachiaria* spp. foram identificadas as espécies *F. andiyazi*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum*, *F. verticillioides* e ainda duas novas linhagens do FFSC pertencentes ao clado africano. Em cana-de-açúcar os isolados avaliados agruparam com isolados de referência em um único clado e formaram peritécios férteis quando cruzados com os isolados testadores de *F. sacchari*. As espécies associadas a *Brachiaria* causaram podridão de colmo em milho, sorgo e milheto. Espécies de *Brachiaria* podem representar um potencial reservatório de inóculo das espécies de *Fusarium* patogênicas ao

milho, sorgo e milho. A doença da podridão da coroa da banana (Capítulo 3) é observada eventualmente no Brasil, entretanto não existem informações consistentes sobre a sua etiologia. Os isolados provenientes do Brasil agruparam com isolados de referência de *F. musae* em um único clado. Quando cruzados entre si e com isolados de referência de *F. musae*, formaram peritécios férteis. Na avaliação de oito genótipos de bananeira, inoculados com *F. musae*, a doença foi induzida em todos, sendo que três demonstraram algum nível de resistência. Outras espécies identificadas em associação foram *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. equiseti* e *F. camptoceras*, no entanto a patogenicidade em bananas não foi comprovada. Esse é o primeiro relato de *F. musae* no Brasil, viabilizando a correta diagnose do patógeno, o futuro monitoramento da doença e o desenvolvimento de programas dirigidos de melhoramento. Além da caracterização dos agentes etiológicos de doenças, foram geradas evidências que espécies forrageiras podem abrigar espécies conhecidas como importantes patógenos de grandes culturas e produtores de micotoxinas. Esse aspecto deve ser explorado no futuro de forma mais abrangente e com grande atenção. Talvez o aspecto mais relevante seja a observação que a diversidade de espécies de *Fusarium* que ocorrem no Brasil como patógenos de plantas e como endófitos é bem maior que se imagina.

Palavras-chave: *Brachiaria*. *Cajanus cajan*. *Crotalaria*. *Musa*. *Saccharum*. Doença de planta. Filogenia multigênica. Marcadores morfológicos. *Mating population*.

## GENERAL ABSTRACT

### **Biological and phylogenetic species within the *Fusarium fujikuroi* species complex**

A group of species known as *Fusarium fujikuroi* species complex - FFSC derives from the now extinct name *Fusarium moniliforme* and the former Section Liseola. There are about 50 distinct species accepted in the FFSC, defined by morphological markers, mating populations and multigene phylogenetic analyses. Many of these species are pathogens of important crop plants and some are mycotoxin producers. During the last two decades, a considerable number of new species have been formally described, whereas other lineages continue poorly understood, inclusively in Brazil. The objective of this study was to evaluate the diversity of species of the FFSC that occur in association with plants like *Cajanus*, *Crotalaria*, *Brachiaria*, *Musa*, and *Saccharum*, and characterize isolates according to modern concepts of morphological, biological and phylogenetic species delimitation. In all studies, the isolates were characterized by phylogenetic analyses of the three-locus dataset, *EF-1 $\alpha$* , *tub2* and *RPB2*, sexual crossing, morphology, and pathogenicity tests. In the first part (Chapter 1) the hypothesis was tested that the etiological agent of wilt on *Crotalaria* is *Fusarium udum*, as in 1934 the name *F. udum* f. sp. *crotalariae* was applied. Isolates from *Crotalaria* from Brazil group with isolates obtained from *Cajanus* in India and Africa in a unique clade in a Bayesian analysis of sequences from three gene regions. In laboratory crosses isolates from Brazil and India produce fertile perithecia. In pathogenicity tests all evaluated isolates induced symptoms in plants of *Crotalaria ochroleuca*. Morphological markers of the sexual and asexual phase are in accordance with the original descriptions of the pathogen. Based on these results it is concluded that the causal agent of *Fusarium* wilt on *Crotalaria* and *Cajanus* is *F. udum*. The species represent a new, distinct mating population within the FFSC. This is the first report of this species in Brazil and may contribute to the correct diagnosis and monitoring of the disease. In Chapter 2, isolates obtained from symptomless seeds of *Brachiaria* spp. and sugar-cane plants (*Saccharum officinarum*) showing symptoms of “pokkah boeng” were characterized by morphological markers, laboratory crosses, multi-gene phylogenetic analyses and pathogenicity tests. On *Brachiaria* the species *F. andiyazi* *F. proliferatum*, *F. thapsinum*, *F. verticillioides* were identified, and still two new distinct lineages belonging to the African clade of the FFSC. In the case of sugar-cane the isolates studied grouped together with reference material in a unique clade and formed fertile perithecia when crossed with known tester strains of *Fusarium sacchari*. The species isolated from *Brachiaria* spp. caused rot on stems of maize, sorghum and millet. Species from *Brachiaria* may act as a



potential reservoir of inoculum of species which cause disease on maize, sorghum and millet. Crown rot of banana (Chapter 3) can eventually be observed in Brazil, nevertheless, no consistent information about its etiology is available. Isolates from Brazil grouped with reference isolates of *Fusarium musae* in a unique clade. When crossed with itself and with reference strains of *F. musae*, the production of fertile perithecia was observed. Selected isolates were inoculated in eight different varieties of banana and induced disease in all of them. Indeed, three genotypes showed some resistance to the pathogen. Other species associated to bananas were identified, like *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. equiseti* and *F. camptoceras*, but its pathogenicity was not confirmed. This is the first report of *F. musae* in Brazil. The findings will contribute to the correct identification of the pathogen, the future monitoring of the disease and the development of breeding programs searching for resistant varieties. Besides the characterization of the pathogens, evidence was generated that grasses may harbor species which are known as pathogens of important crops and mycotoxin producers. This issue should be investigated in the future with attention under a wider angle. Probably the most relevant aspect of this study was the observation that the diversity of *Fusarium* species in Brazil occurring as pathogens or endophytes is much bigger as initially expected.

Keywords: *Brachiaria*. *Cajanus cajan*. *Crotalaria*. *Musa*. *Saccharum*. Endophytes. Mating population. Morphological markers. Multigene phylogeny. Plant disease.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> Introdução geral.....	13
<b>1</b> INTRODUÇÃO.....	13
<b>2</b> ESTADO DA ARTE.....	15
<b>2.1</b> O gênero <i>Fusarium</i> .....	15
<b>2.2</b> Histórico da taxonomia do complexo de espécies <i>Fusarium fujikuroi</i> - FFSC.....	15
<b>2.3</b> Conceito de espécie morfológica .....	16
<b>2.4</b> Conceito de espécie biológica .....	17
<b>2.5</b> Conceito de espécie filogenética .....	18
<b>2.6</b> Doenças causadas por espécies do FFSC .....	18
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	21
<b>CAPÍTULO 2</b> Epitificação de <i>Fusarium udum</i> e caracterização como nova espécie biológica do complexo <i>Fusarium fujikuroi</i> .....	25
<b>1</b> INTRODUÇÃO.....	28
<b>2</b> MATERIAL E MÉTODOS .....	30
<b>2.1</b> Obtenção de isolados .....	30
<b>2.2</b> Caracterização morfológica .....	30
<b>2.3</b> Extração de DNA.....	31
<b>2.4</b> Identificação de <i>mating type</i> e indução da fase sexuada .....	31
<b>2.5</b> Análise filogenética.....	32
<b>2.6</b> Teste de patogenicidade .....	34
<b>3</b> RESULTADOS .....	36
<b>3.1</b> Isolados obtidos .....	36
<b>3.2</b> Características morfológicas do anamorfo .....	42
<b>3.3</b> Indução da fase sexuada.....	43
<b>3.5</b> Características morfológicas do teleomorfo .....	44

3.6 Análise filogenética.....	46
3.7 Teste de patogenicidade .....	49
3.6 Indicação do epítipo .....	51
4 DISCUSSÃO .....	52
REFERÊNCIAS.....	56
<b>CAPÍTULO 3</b> Espécies do complexo <i>Fusarium fujikuroi</i> associadas a <i>Brachiaria</i> spp. e <i>Saccharum officinarum</i> no Brasil .....	63
1 INTRODUÇÃO.....	66
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	68
2.1 Obtenção de isolados .....	68
2.2 Caracterização morfológica .....	68
2.3 Extração de DNA.....	69
2.4 Identificação de mating type e indução da fase sexuada .....	69
2.5 Análise filogenética.....	71
2.6 Genotipagem do potencial micotoxigênico .....	72
2.7 Teste de patogenicidade .....	72
3 RESULTADOS .....	74
3.1 Obtenção de isolados .....	74
3.2 Análises filogenéticas.....	74
3.3 Caracterização morfológica .....	78
3.4 Identificação de mating type e indução da fase sexuada .....	82
3.5 Genotipagem do potencial micotoxigênico .....	85
3.6 Teste de patogenicidade .....	85
4 DISCUSSÃO .....	87
REFERÊNCIAS.....	90
<b>CAPÍTULO 4</b> <i>Fusarium musae</i> agente etiológico da podridão da coroa em frutos de banana no Brasil .....	93
1 INTRODUÇÃO.....	96

<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>98</b>
<b>2.1 Obtenção dos isolados .....</b>	<b>98</b>
<b>2.2 Caracterização morfológica .....</b>	<b>98</b>
<b>2.3 Extração de DNA.....</b>	<b>99</b>
<b>2.4 Identificação de mating type e indução da fase sexuada .....</b>	<b>99</b>
<b>2.5 Análise filogenética.....</b>	<b>101</b>
<b>2.6 Genotipagem do potencial micotoxigênico .....</b>	<b>102</b>
<b>2.7 Avaliação da susceptibilidade de cultivares de bananeira a <i>F. musae</i>. 103</b>	
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>104</b>
<b>3.1 Caracterização morfológica .....</b>	<b>107</b>
<b>3.2 Identificação de mating type e indução da fase sexuada .....</b>	<b>108</b>
<b>3.3 Análise filogenética.....</b>	<b>110</b>
<b>3.4 Genotipagem do potencial micotoxigênico .....</b>	<b>110</b>
<b>3.5 Avaliação da susceptibilidade de cultivares de bananeira a <i>F.</i> <i>musae</i> .....</b>	<b>111</b>
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>114</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>122</b>
<b>5 CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>126</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>127</b>



## CAPÍTULO 1 Introdução geral

### 1 INTRODUÇÃO

O termo "*Gibberella fujikuroi species complex*" (GFSC) refere-se a um grupo monofilético que corresponde em grande parte à antiga seção *Liseola*, mas que também acomoda espécies originalmente classificadas em outras seções de *Fusarium* (Nirenberg & O'Donnell, 1998; O'Donnell et al., 1998, 2000; Geiser et al., 2005). Atualmente, com a nova proposta de nomenclatura "Um fungo, um nome", esse complexo passou a ser denominado *Fusarium fujikuroi species complex* - FFSC (Geiser et al., 2013).

Conceitos de espécie baseados em dados químicos, biológicos, moleculares ou características de patogenicidade levaram a grandes modificações na delimitação das espécies pertencentes ao FFSC (Kvas et al., 2009). O'Donnell et al. (1998) levantaram a hipótese sobre a filogeografia de subgrupos dentro do FFSC, identificando três grupos maiores de espécies com provável origem nos continentes americano, africano e asiático, de acordo com a origem das plantas hospedeiras.

O conceito de espécie biológica também foi aplicado com sucesso para superar limitações na identificação de espécies do FFSC. Treze espécies biológicas isoladas geneticamente, denominadas *mating populations* A a M foram identificadas no FFSC por meio de cruzamentos em laboratório (Leslie, 1991; Leslie & Summerell, 2006; Lima et al., 2012). Isolados testadores, representando cada uma das espécies biológicas, estão disponíveis e podem ser utilizados em procedimento de identificação.

O FFSC engloba importantes patógenos de plantas. Um deles é *Fusarium udum*, associado a *Cajanus cajan* e espécies de *Crotalaria*, causando

murcha em diversos países da África e Índia (Kannaiyan et al. 1984). Outras espécies como *F. thapsinum*, *F. nygamai*, *F. andiyazi*, *F. verticillioides* e *F. proliferatum* são associadas à podridão de colmo e espiga em sorgo, milho e milheto (Leslie et al., 2005b). Estas espécies também podem ser encontradas em gramíneas da vegetação natural como endófitos (Leslie et al., 2004a). *Fusarium sacchari* tem sido relatado em cana-de-açúcar causando uma doença denominada “Pokkah boeng” (Leslie & Summerell, 2006). Várias espécies de *Fusarium* também estão associadas a doenças pós-colheita, como em frutos de banana, onde causam uma doença conhecida como podridão da coroa (Hirata et al., 2001).

Nos trópicos, especificamente no Brasil, ocorrem muitas espécies do FFSC, embora a identificação seja em muitos casos duvidosa, devido ao uso apenas do conceito morfológico. Portanto, propomos relatar e caracterizar algumas das espécies filogenéticas e biológicas do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* FFSC associadas a plantas cultivadas no Brasil.

## 2 ESTADO DA ARTE

### 2.1 O gênero *Fusarium*

A descrição original do gênero *Fusarium* data de 1908. As principais características são a formação de conídios alongados, fusiformes, com vários septos (Gerlach & Nirenberg, 1982). *Fusarium* é o terceiro gênero de fungos com maior número de espécies que podem causar doenças em plantas, humanos e animais domésticos além de produzirem uma ampla gama de toxinas e metabólitos secundários que estão associados a doenças de plantas, mas podem também causar danos a saúde de homens e animais (Goldschmied et al., 1993; Leslie & Summerell, 2006).

Espécies de *Fusarium* foram responsáveis pela ocorrência de fenômenos sociais importantes como o surto do mal do Panamá, onde o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* devastou vários plantios de banana na América central na década de 1960 (Ploetz, 1990). Epidemias de podridão de espiga de trigo e aveia ocorreram no meio oeste americano, causando perdas de milhões de dólares para produtores dos Estados Unidos (Windels, 2000).

### 2.2 Histórico da taxonomia do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* - FFSC

O termo "*Gibberella fujikuroi species complex*", atualmente denominado "*Fusarium fujikuroi species complex*" refere-se ao táxon monofilético que corresponde principalmente à seção *Liseola*, mas que também acomoda espécies originalmente classificadas em outras seções de *Fusarium* (Nirenberg & O'Donnell, 1998; O'Donnell et al., 1998, 2000; Geiser et al., 2005, 2013). A Seção *Liseola* foi estabelecida para acomodar espécies caracterizadas pela produção de macroconídios em esporodóquios ou pionotos, microconídios em



falsas cabeças e/ou cadeias e que não produzem clamidósporos (Leslie & Summerell, 2006).

Booth (1971) reavaliou as espécies da Seção *Liseola*, e *F. moniliforme* var. *subglutinans* foi separado de *F. moniliforme* devido à ausência de microconídios em cadeias e a presença de polifialídes. Gerlach & Nirenberg (1982) expandiram o número de espécies na seção *Liseola* para 10 membros e propuseram o nome mais antigo *F. verticillioides* para uma parte das espécies conhecidas como *F. moniliforme*.

Nelson et al. (1983) aceitaram quatro espécies na seção *Liseola*, incluindo “*F. moniliforme*” e outras espécies com produção de microconídios em cadeias. *F. proliferatum* foi separado devido à presença de polifialídes. *F. moniliforme* var. *subglutinans* foi re-classificado como *F. subglutinans* e *F. anthophilum*, reconhecidos como espécies que produzem microconídios de formato napiforme. Nos últimos 20 anos, *F. globosum* (Rheeder et al., 1996), *F. nisikadoi* (Nirenberg & Aoki, 1997) e *F. miscanthi* (Gams et al., 1999) foram identificados como membros da Seção *Liseola*, com produção de microconídios em cadeias. *F. moniliforme* é um nome que tem sido utilizado para numerosas espécies do GFCS, no entanto é recomendado que a comunidade científica não utilize mais este nome (Seifert et al., 2003). O FFSC é hoje composto por mais de 60 espécies biológicas e filogenéticas formalmente descritas (Kvas et al., 2009).

### **2.3 Conceito de espécie morfológica**

A taxonomia de *Fusarium* envolve três conceitos, o da espécie morfológica, da espécie biológica e da espécie filogenética. A identificação morfológica ainda é utilizada, porém, existem situações em que baseado apenas nos marcadores morfológicos não é possível distinguir as espécies com acurácia.

Exemplo importante que ilustra esta situação é o caso “*F. moniliforme*”, que com a aplicação dos conceitos de espécie biológica e filogenética foi desmembrado em várias diferentes espécies (Leslie et al., 2001; O’Donnell et al., 1998).

O macroconídio é um marcador importante na caracterização, existindo diferenças na forma e tamanho. Membros das espécies do FFSC possuem macroconídios com 3-5 septos, geralmente a célula pé é pouca evidente, assim como a célula apical (Leslie & Summerell, 2006). Os macroconídios produzidos no esporodóquio tendem a ser mais uniformes, enquanto os produzidos no micélio aéreo possuem formas variadas. Microconídios e clamidósporos também são importantes na definição de espécie morfológica. A forma dos microconídios é a principal característica a ser observada, porém uma mesma cultura pode produzir microconídios com mais de uma forma. Este é o caso de algumas espécies do FFSC que produzem microconídios globosos. Além destes marcadores mencionados, outros caracteres secundários como pigmentação do meio e taxa de crescimento são importantes (Leslie & Summerell, 2006).

#### **2.4 Conceito de espécie biológica**

O conceito de espécie biológica tem sido aplicado amplamente para as espécies pertencentes à Seção *Liseola*. As três primeiras espécies biológicas da seção *Liseola* foram descritas por Hsieh et al. (1977) e, a seguir, várias outras foram definidas (Leslie, 1991). *F. thapsinum* foi reconhecido como uma distinta mating population dentro de “*F. moniliforme*” (Klittich & Leslie, 1992) e depois elevado à categoria de espécie (Klittich et al., 1997). O emprego do conceito de espécie biológica também foi importante na definição de *F. subglutinans* var. *sacchari* como espécie *F. sacchari* mating population B (Leslie et al., 2005a).

O conceito de espécie biológica também foi importante para a descrição de *F. nygamai* (Klaasen & Nelson, 1996) e *F. circinatum* (Britz et al., 1999, 2002). Existe o relato da produção de peritécios férteis entre os cruzamentos das mating populations C e D e provavelmente não existe uma barreira reprodutiva completa para essas espécies (Leslie et al., 2004b). *F. musae*, *F. temperatum* e *F. tuiense* são novas espécies pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* e em suas respectivas descrições foi usado o conceito de espécie biológica com a descrição formal da fase sexuada (teleomorfo) (Van Hove et al., 2011; Scaufaire et al., 2010; Lima et al., 2012).

## **2.5 Conceito de espécie filogenética**

A aplicação do conceito de espécie filogenética é hoje comum e a base conceitual consolidada e amplamente aceita (Taylor et al., 2000). O *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC) é um grupo monofilético diverso de aproximadamente 50 linhagens, sendo que muitas espécies ainda permanecem desconhecidas (O'Donnell et al., 2013). Baseado na origem biogeográfica este complexo foi subdividido em três subclados, referidos como africano asiático e americano. Estudos filogenéticos realizados por Geiser et al. (2005) evidenciam que *F. udum* e *F. xylarioides* também pertencem a esse complexo. As espécies do FFSC são responsáveis por produzirem micotoxinas e outros metabólitos secundários (Leslie et al., 2005b).

## **2.6 Doenças causadas por espécies do FFSC**

O complexo FFSC abriga várias importantes espécies que são patógenos de plantas cultivadas (Aoki et al., 2014). *F. udum* é o agente causal de murcha em *Cajanus cajan* e espécies de *Crotalaria*. A infecção ocorre no início do

estádio de plântulas e geralmente os sintomas não são visíveis neste estágio (Hillocks et al., 2000). Os sintomas iniciais observados são perda da turgidez e clareamento intervenal das folhas. A folha apresenta clorose leve e algumas vezes apresenta crestamento antes do murchamento da planta. As plantas infectadas manifestam sintomas de clorose e murcha 4-6 semanas após o plantio. As características iniciais dos sintomas internos são escurecimento do xilema seguido pela presença de estrias marrons, além disso, é comum a presença de plantas com murchas laterais. Em *Crotalaria* não existe uma descrição detalhada sobre a sintomatologia da murcha, apenas sabe-se que plantas com sintomas apresentam porte reduzido (Armstrong & Armstrong, 1951).

Este fungo é prevalente na Índia, porém está presente em alguns países do leste da África e Malawi causando perdas acima de 50% na produção. Também está presente em Bangladesh, Indonésia, Nepal, Venezuela, Trindade e Tobago (Kannaiyan et al., 1984). Na província de Zambesia em Moçambique ocorreu um surto da doença (Gwata et al., 2006). Além dos países africanos este fungo foi registrado recentemente em Barbados em *Cajanus* (Lamontagne-Godwin et al., 2012). Esporadicamente observa-se *F. udum* f. sp. *crotalariae* em alguns locais como Índia, Estados Unidos e em países africanos, no entanto, existem poucos estudos sobre este patossistema.

Após a descoberta da fase sexual de *F. udum*, duas fases do ciclo da doença tem sido sugeridas. Em ambas as fases da doença, o fungo ocorre intercelularmente e intracelularmente. No caso do estado assexual, clamidósporos servem como estruturas de sobrevivência por longos períodos. As sementes foram consideradas um meio eficiente de disseminação de *F. udum* por longas distâncias e para novas áreas.

Em associação com gramíneas cultivadas ocorrem diversas espécies como *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* e *F. temperatum*, causando podridão de colmo e espiga (Leslie & Summerell, 2006;

Scauflaire et al., 2010). Em sorgo são encontradas as espécies *F. thapsinum*, *F. andiyazi*, *F. nygamai* e *F. verticillioides* (Leslie et al., 2005b). Várias espécies de *Fusarium* foram encontradas em gramíneas selvagens na Austrália e nos Estados Unidos (Leslie et al., 2004a; Walsh et al., 2010). Os autores mencionam que estes fungos sobrevivem nas gramíneas como endófitos, mas podem ser uma ameaça para as gramíneas cultivadas em função de representar reservatório de inóculo. Em cana-de-açúcar existe uma importante doença conhecida como “pokkah boeng”. *Fusarium sacchari* é associado a esta doença, mas ocasionalmente esses sintomas podem ser observados também em milho e sorgo (Leslie et al., 2005a; Petrovic et al., 2013).

Espécies de *Fusarium* também estão associadas a doenças pós- colheita. Algumas espécies de *Fusarium* foram observadas em cargas transportadas da América Central para os centros consumidores. Estes fungos possuem características de endófitos, manifestando-se no início da maturação. *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. musae*, *F. semitectum* e *F. camptoceras* foram isolados de frutos com podridão de coroa. Além de interferirem na qualidade dos frutos estes fungos podem produzir micotoxinas (Hirata et al., 2001; Moretti et al., 2004; Van Hove et al., 2011).

## REFERÊNCIAS

- Aoki T, O'Donnell K, Geiser DM (2014) Systematics of key phytopathogenic species in *Fusarium*: current status and future challenges. *Journal General Plant Pathology* 80:189-201.
- Armstrong JK, Armstrong GM (1951) Physiological races of the croton wilt *Fusarium*. *Phytopathology* 41:714-721.
- Booth C (1971) The genus *Fusarium* Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey.
- Britz H, Coutinho TA, Wingfield MJ, Marasas WFO, Gordon TR (1999) *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* represents a distinct mating population in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Applied and Environmental Microbiology* 65:1198-1201.
- Britz H, Coutinho TA, Wingfield MJ, Marasas WFO (2002) Validation of the description of *Gibberella circinata* and morphological differentiation of the anamorph *Fusarium circinatum*. *Sydowia* 54:9–22.
- Gams W, Klammer M, O'Donnell K (1999) *Fusarium miscanthi* sp. nov. from *Miscanthus* litter. *Mycologia* 91:263-268.
- Geiser DM, Lewis Irelly ML, Hakiza G, Juba JH, Miller SA (2005). *Gibberella xylarioides* (anamorph: *Fusarium xylarioides*), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is previously unrecognized member of the *Gibberella fujikuroi* complex. *Mycologia* 97:191-201.
- Geiser DM et al. (2013) One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. *Phytopathology* 103:400-408.
- Gerlach W, Nirenberg H (1982) The genus *Fusarium* - A pictorial atlas. Biologische Bundesanstalt Berlin. 406 p.
- Goldschmied RA, Friedman AJ, Block CS (1993) *Fusarium* spp. isolated from non-ocular sites: a 10 year experience at an Israeli general hospital. *Journal of Mycologie Medicale* 3:99-102.
- Gwata ET, Silim SN, Mgonja M (2006) Impact of new source of resistance to *Fusarium* wilt in pigeonpea. *Journal of Phytopathology* 154:62-64.

Hillocks RJ, Minja E, Silim SN, Subrahmanyam P (2000) Diseases and pests of Pigeonpea in eastern Africa. *International Journal of Pest Management* 46:7-18.

Hirata T, Kimishima E, Aoki T, Nirenberg HI, O'Donnell K (2001) Morphological and molecular characterization of *Fusarium verticillioides* from rotten banana imported into Japan. *Mycoscience* 42:155-166.

Hsieh WH, Smith SN, Snyder WC (1977) Mating groups in *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 67:1041-1043.

Kannaiyan J, Nene YL, Reddy MV, Ryan JG, Raju TN (1984) Pre-valence of pigeonpea diseases associated with crop losses in Asia, Africa and Americas. *Tropical Pest Management* 30:62-71.

Klaasen JA, Nelson PE (1996) Identification of a mating population, *Gibberella nygamai*, sp. nov., within the *Fusarium nygamai* anamorph. *Mycologia* 88:965-969.

Klittich CJR, Leslie JF (1992) Identification of a second mating population within the *Fusarium moniliforme* anamorph of *Gibberella fujikuroi*. *Mycologia* 84:541-547.

Klittich CJR, Leslie JF, Nelson PE, Marasas WFO (1997) *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): New species in section *Liseola* from sorghum. *Mycologia* 89: 643-652.

Kvas M, Marasas WFO, Wingfield BD, Wingfield MJ, Steenkamp ET (2009) Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Diversity* 34:1-21.

Lamontagne-Godwin J, Reeder R, Buddie AG, Janes M (2012) First confirmed report of *Gibberella indica* on *Cajanus cajan* in Barbados, Lesser Antilles. *New Diseases Reports* 26:10.

Leslie JF (1991). Mating populations in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* seção *Liseola*). *Phytopathology* 81:1058-1060.

Leslie JF, Zeller KA, Summerell BA (2001) Icebergs and species in populations of *Fusarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59:107-117.

Leslie JF, Zeller KU, Logrieco A, Mulè G, Moretti A, Ritiene A (2004a) Species diversity of and toxin production by *Gibberella fujikuroi* species complex strains isolated from native prairie grasses in Kansas. *Applied and Environmental Microbiology* 70:2254-2262.

Leslie JL, Zeller KA, Wohler M, Summerell BA (2004b) Interfertility of two mating populations in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *European Journal Plant Pathology* 110:611-618.

Leslie JF, Summerell BA, Bullock S, Doe FJ (2005a) Description of *Gibberella sacchari* and neotypification of its anamorph *Fusarium sacchari*. *Mycologia* 97:718-724.

Leslie JF, Zeller K, Lamprecht S, Rheeder JP, Marasas WFO (2005b) Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from sorghum and millet. *Phytopathology* 95:275-283.

Leslie JF, Summerell BA (2006) *The Fusarium laboratory manual*. Sydney. Blackwell. 388p.

Lima CS, Pfenning LH, Costa SS, Abreu LM, Leslie JF (2012) *Fusarium tuiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. *Mycologia* 104: 408-419.

Moretti A, Mulè G, Susca A, Gonzalez-Jaén MT, Logrieco A (2004) Toxin profile, fertility and AFLP analysis of *Fusarium verticillioides* from banana fruits. *European Journal Plant Pathology* 110:601-609.

Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO (1983) *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. University Park, Pennsylvania: Pennsylvania State University Press. 193p.

Nirenberg HI, Aoki T (1997) *Fusarium nisikadoi*, a new species from Japan. *Mycoscience* 38:329-333.

Nirenberg HI, O'Donnell K (1998) New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:434-458.

O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg HI (1998) Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:465-493.



O'Donnell K, Nirenberg HI, Aoki T, Cigelniki EA (2000) Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41:61-78.

O'Donnell K, Rooney AP, Proctor RH, Brown DW, McCormick S. P., Ward TJ, ... & Geiser DM (2013) Phylogenetic analyses of *RPB1* and *RPB2* support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genetics and Biology* 52:20-31.

Petrovic T, Burgues LW, Cowie I, Warren RA, Harvey PR (2013) Diversity and fertility of *Fusarium sacchari* from wild rice (*Oryza australiensis*) in northern Australia, and pathogenicity tests with wild rice, rice, sorghum and maize. *European Journal Plant Pathology* 136:773-788.

Ploetz RC (1990). *Fusarium* wilt of banana. APS Press, St. Paul MN.

Rheeder JP, Marasas WFO, Nelson PE (1996). *Fusarium globosum*, new species from corn in southern Africa. *Mycologia* 88: 509-513.

Scauflaire J, Gourgue M, Munaut G (2010) *Fusarium temperatum*, sp. nov. from maize, an emergent species closely related to *Fusarium subglutinans*. *Mycologia* 103:586-597.

Seifert KA, Aoki T, Baayen RP, Brayford D, Burgess LW, Chulze S, ... & Waalwijk C (2003) The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. *Mycological Research* 107:643-644.

Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31:21-32.

Van Hove F, Waalwijk C, Logrieco A, Munaut F, Moretti A (2011) *Gibberella musae* (*Fusarium musae*) sp. nov., a recently discovered species from banana is sister to *F. verticillioides*. *Mycologia* 103:570-585.

Walsh JL, Laurence MH, Liew ECY, Sagalang AE, Burguess LW, Summerell BA, Petrovic T (2010) *Fusarium*: two endophytic novel species from tropical grasses of northern Australia. *Fungal Diversity* 44:149-159.

Windels CE (2000) Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. *Phytopathology* 90:17-21.

**CAPÍTULO 2 Epitificação de *Fusarium udum* e caracterização como nova espécie biológica do complexo *Fusarium fujikuroi***

Manuscrito preparado para submissão à revista Mycological Progress  
(JCR 2013: 1,543)

## RESUMO

*Fusarium udum* é o agente etiológico de murcha em feijão guandu (*Cajanus cajan*) em regiões tropicais. A fase sexuada foi registrada na natureza associada a caules de *Cajanus* na Índia e denominada *Gibberella indica*. No Brasil, pode-se observar uma murcha em *Crotalaria* e o aparecimento de peritécios negros, característicos de fase sexuada das espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* - FFSC, em campo. Nesse estudo foi testada a hipótese que o agente etiológico da murcha de *Crotalaria* seja *F. udum*, já que em 1934 foi descrito *F. udum* f. sp. *crotalariae*. Isolados obtidos de material vegetal com sintoma de murcha foram avaliados por meio de análises filogenéticas das regiões *EF-1α*, *tub2* e *RPB2*, testes de compatibilidade sexual, marcadores morfológicos e teste de patogenicidade. Isolados de *Crotalaria* do Brasil agruparam com isolados de *Cajanus* da Índia e África em um clado único na análise Bayesiana das três regiões gênicas. Em cruzamentos, isolados do Brasil e da Índia formaram peritécios férteis. Em testes de patogenicidade, os isolados avaliados causaram murcha em *Crotalaria ochroleuca*. Marcadores morfológicos, tanto da fase sexuada como da fase assexuada, conferem com descrições originais do patógeno. Os resultados obtidos permitiram concluir que o agente etiológico da murcha de *Crotalaria* e de *Cajanus* é *F. udum*. A espécie representa uma nova *mating population* no complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* - FFSC. Um isolado de referência da Índia é indicado como epítipo, já que material original não é mais disponível. Esse é o primeiro relato da espécie para o Brasil, viabilizando o futuro monitoramento da doença.

Palavras-chave: *Cajanus*. *Crotalaria*. Doença de planta. Filogenia multigênica. Mating population.

## ABSTRACT

### **Epitypification of *Fusarium udum* and characterization as a mating population within the *Fusarium fujikuroi* species complex**

*Fusarium udum* is the causal agent of a wilt disease on pigeon pea (*Cajanus cajan*) in tropical regions. The sexual stage of this fungus was observed growing on stems of *Cajanus* in India and formally described as *Gibberella indica*. In Brazil, a wilt disease was observed on *Crotalaria* with the formation of black perithecia in the field, typical for species of the *Fusarium fujikuroi* species complex- FFSC. In this study the hypothesis was tested that the causal agent of wilt on *Crotalaria* is *F. udum*, as in 1934 the name *F. udum* f. sp. *crotalariae* was applied. Isolates obtained from diseased *Crotalaria* plants were characterized by means of phylogenetic analyses of the regions *EF-1 $\alpha$* , *tub2* and *RPB2*, laboratory crosses, morphological markers and pathogenicity tests. Isolates from *Crotalaria* from Brazil grouped with isolates from *Cajanus* from India and Africa in the same clade, according to a Bayesian analysis of the three gene regions. Isolates from Brazil and from India intercrossed and formed fertile perithecia. In pathogenicity tests, all evaluated isolates induced wilt symptoms in inoculated plants of *Crotalaria ochroleuca*. Morphological markers of the sexual and asexual stage are in accordance with the original descriptions of the taxon. The results clearly indicate the causal agent of *Fusarium* wilt on *Crotalaria* and *Cajanus* is *F. udum*. The species represent a distinct mating population of the FFSC. An isolate from India is indicated as epitype, as original material is no longer available. This is the first report of *F. udum* in Brazil, allowing for correct diagnosis and monitoring of this wilt disease.

Keywords: *Cajanus*. *Crotalaria*. Mating population. Multigene phylogeny. Wilt disease.

## 1 INTRODUÇÃO

*F. udum* Butler é o agente etiológico de murcha em *Cajanus cajan* (Butler, 1910), uma doença de grande importância na Índia e em alguns países do continente africano (Reddy et al. 1993; Kiprop et al. 2002a). A fase sexuada de *F. udum* foi encontrada em condições naturais na Índia e foi formalmente descrita como *Gibberella indica* (Rai & Upadhyay 1982). Uma murcha que ocorre em espécies de *Crotalaria* tem como agente etiológico supostamente uma forma especializada, *F. udum* var. *crotalariae*, considerada um fitopatógeno destrutivo na Índia e nos Estados Unidos (Padwick 1939; Armstrong & Armstrong 1951, Lamontagne-Godwin et al. 2012). Os nomes *F. udum* var. *cajanis* e *F. udum* var. *crotalariae* foram propostos para os patógenos, que induzem murcha em *Cajanus cajan* e *Crotalaria juncea* na Índia (Padwick 1940). *Fusarium udum* é uma espécie que apresenta grande variabilidade morfológica e compartilha ainda características morfológicas de *F. oxysporum*, como a produção de clamidósporos. Em consequência, o fungo foi agrupado na seção Elegans por Gerlach & Nirenberg (1982), enquanto Booth (1971) o acomodou na seção Lateritium. Vários outros sinônimos encontram-se listados em Gerlach & Nirenberg (1982). No Brasil, o nome *F. vasinfectum* foi inicialmente atribuído ao patógeno que causa murcha em *Crotalaria* (Joffily 1946). Entretanto, o autor relata que isolados do algodoeiro e quiabeiro causaram doença apenas nessas plantas, mas não nas espécies de leguminosas inoculadas. Já na Argentina, no mesmo ano, o patógeno foi registrado com o nome *F. oxysporum* f. *crotalariae* (Carrera 1946). Em plantas infectadas pode-se observar a formação de peritécios negros, característicos de fase sexuada das espécies do FFSC, em campo. Entretanto, não existem informações sobre a etiologia da murcha causada por *Fusarium* em espécies de *Crotalaria* no Brasil.

Análises filogenéticas mostraram que *F. udum* pertence ao clado africano do FFSC (O'Donnell et al. 1998; Geiser et al. 2005). Isolados de ambos *mating types* para estudos de compatibilidade sexual não foram indicados, mesmo com a comprovação da ocorrência da fase sexuada e da alta fertilidade da população em campo. Há evidências, portanto, que *F. udum* seja também uma espécie biológica do FFSC.

Apesar de ser uma espécie importante do FFSC causando perdas em plantios de feijão guandu e espécies de *Crotalaria*, este fungo é pouco estudado de forma sistemática e a etiologia da doença das duas plantas nunca foi esclarecida de forma conclusiva. Esse estudo tem por objetivo verificar se as marchas, que ocorrem em *Cajanus* e *Crotalaria*, tem o mesmo agente etiológico e se *F. udum* representa uma espécie filogenética e biológica distinta. Isolados do Brasil, obtidos de *Crotalaria* foram comparados com isolados provenientes de *C. cajan* e *Crotalaria* spp. de outras regiões do mundo. O nome *F. udum* é inválido já que na publicação original não foi indicada a espécie tipo. Portanto, propomos a epitipificação por meio da indicação de um isolado da Índia e a disponibilização de isolados testadores para definição da espécie biológica.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção de isolados

Isolados de *Fusarium* foram obtidos de plantas de *Crotalaria* spp. e *Cajanus cajan* com sintomas de murcha, coletadas em várias regiões do Brasil. Para o isolamento foi realizada desinfestação superficial do tecido vegetal em álcool 70%, hipoclorito de sódio 1% de cloro ativo e água esterilizada. Os explantes foram secos em papel filtro, fragmentado em várias partes e transferidos para meio de cultura extrato de malte 2% (MA2%). Os isolados foram criopreservados a -80°C, a partir de culturas monospóricas, 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 Caracterização morfológica

Os isolados foram cultivados em Batata Dextrose Agar (BDA) e incubados a 25 °C no escuro por quatro dias para observação da taxa de crescimento. Características da colônia como a formação de pigmentos e coloração das colônias foram avaliadas após 14 dias. As características micromorfológicas como a formação de esporodóquios; frequência, tamanho, formato e origem de micro- e macroconídios; tipos de fiálides; presença ou não de clamidósporos; presença ou não de microconídios em falsas cabeças e presença ou não de hifa estéril espiralada foram avaliadas em *Synthetic Nutrient-poor Agar* (SNA) + folha de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.). As placas foram incubadas a 20 °C sob fotoperíodo de 12 horas com luz branca fluorescente e após 10 a 14 dias de incubação procedeu-se a avaliação (Leslie & Summerell 2006).

### 2.3 Extração de DNA

Os fungos foram cultivados em meio líquido de extrato de malte 2% por três dias, em temperatura ambiente e sob agitação de 100 rpm. O micélio foi filtrado, macerado em nitrogênio líquido e o DNA foi extraído com o uso do kit de extração Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega Brasil, São Paulo, BR).

### 2.4 Identificação de *mating type* e indução da fase sexuada

Os idiomorfos *MAT-1* e *MAT-2* foram identificados utilizando *primers* e condições de amplificação de Steenkamp et al. (2000). O *primer* GFmat1a e GFmat1b amplifica um fragmento de 200 pb identificando o idiomorfo *MAT-1*. Com o uso do *primer* GFmat2c e GFmat2d é obtido um fragmento de 800 pb representando o idiomorfo *MAT-2*. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% com GelRed (Biotium®), com posterior visualização realizada em um transluminador. O comprimento dos fragmentos amplificados foi comparado com um marcador de comprimento de fragmentos de 1 Kb do tipo “ladder”. As reações de PCR foram repetidas duas vezes para cada isolado, sendo o *mating type* confirmado apenas quando, nas duas reações, forem obtidos os mesmos resultados.

Os cruzamentos foram realizados de acordo com a metodologia padrão para estudo de compatibilidade sexual do FFSC (Leslie & Summerell 2006). Os isolados usados como parental masculino foram cultivados em tubo de ensaio contendo meio completo e incubados a 20 °C sob fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. Os isolados usados como parental feminino foram cultivados em placas de Petri (60 X 15 mm) contendo meio cenoura ágar e incubados a 25 °C no escuro por sete dias. Após o período de incubação, foi preparada uma



suspensão de esporos do parental masculino pela adição de 1 mL de solução de Tween 80 e água estéril a 2,5% (v/v). Em seguida, a suspensão foi depositada na superfície da colônia do parental feminino e, utilizando uma alça de Drygalski, espalhada de modo a umedecer completamente o micélio. Os cruzamentos foram incubados a 20 °C, com fotoperíodo de 12 horas de luz branca fluorescente combinada com luz negra, por um período de até cinco semanas. Foram considerados férteis os cruzamentos que produziram peritécios com exsudação de ascósporos. Os cruzamentos foram repetidos três vezes, para confirmação dos resultados.

Após os cruzamentos, dois isolados de ambos *mating types* com alta capacidade de produção de peritécios foram selecionados como testadores e cruzados com isolados de outras espécies biológicas do FFSC. A viabilidade dos ascósporos foi avaliada pelo teste de germinação em água-agar 2%. Por meio de um estilete cirros de ascósporos foram coletados, depositados na superfície do meio e espalhados com alça de Drygalski, posteriormente as placas foram incubadas a 25 °C no escuro por 24 horas. Após o período de incubação a germinação dos ascósporos foi avaliada sob aumento de 40 vezes em microscópio de luz.

As estruturas da fase sexuada foram caracterizadas, realizando medição do diâmetro do peritécio, comprimento e largura dos ascos e de ascósporos e verificação do número de septos. Foram realizadas 20 medidas de cada estrutura, as quais serviram para a comparação com as outras espécies biológicas de FFSC, já descritas na literatura.

## **2.5 Análise filogenética**

A amplificação dos fragmentos parciais do gene que codifica o fator de alongação 1- $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ), a segunda maior subunidade da RNA polimerase

(*RPB2*) e o gene da  $\beta$ -tubulina (*tub2*) para os isolados de *Fusarium* obtidos foi realizada utilizando os *primers* citados na Tabela 1. As reações de PCR foram realizadas no termociclador My Cyclex<sup>TM</sup> (BIO-RAD). As condições de ciclo para *EF-1 $\alpha$*  foram: 94 °C, por 1 minuto; 34 ciclos: 94 °C, por 30 segundos, 62 °C, por 45 segundos, 72 °C, por 1 minuto; 72 °C, por 5 minutos (O'Donnell et al. 1998a). Para *RPB2*, o programa de ciclos foi: 94 °C, por 90 segundos; 40 ciclos: 94 °C, por 30 segundos; 55 °C, por 90 segundos e 1 ciclo 68 °C, por 2 minutos; 68 °C por 5 minutos (O'Donnell et al., 2008). Para *tub2* as condições de ciclo foram: 94 °C, por 1 minuto; 34 ciclos: 94 °C, por 30 segundos, 62 °C, por 45 segundos, 72 °C, por 1 minuto; 72 °C, por 5 minutos (O'Donnell & Cigelnik 1997). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium<sup>®</sup>), com posterior visualização realizada em um transluminador. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Brasil, São Paulo, BR) para posterior sequenciamento.

Os fragmentos gênicos foram sequenciados, nas direções senso e antisenso, em um sequenciador automático empresa Macrogen, USA. Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente utilizando o programa SeqAssem ver. 07/2008 (SequentiX - Digital DNA Processing, Klein Raden, Germany) (Hepperle 2011) e as sequências editadas foram comparadas com a base de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information - NCBI, por meio da ferramenta BLAST.

Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos de isolados de *Fusarium* obtidos nesse estudo foram gerados utilizando-se a ferramenta CLUSTALW (Thompson et al. 1994), implementada no programa MEGA 5. Os alinhamentos foram corrigidos manualmente. As análises filogenéticas foram realizadas pelo método de máxima parcimônia por meio do programa MEGA 5 (Tamura et al. 2011). Sequências de referência correspondentes aos genes *EF-*

1 $\alpha$ , *RPB2* e *tub 2* de espécies do FFSC previamente depositadas no GenBank, também foram acrescentadas às análises. Sequências de *F. inflexum* (NRRL 20443) foram utilizadas para formar o grupo externo.

Tabela 1 *Primers* utilizados para PCR e seqüenciamento

Locus <sup>a</sup>	Primer	Sequência obtida (pb)	Sequência (5' - 3') <sup>b</sup>	Referência
<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	EF1	502	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	O'Donnell et al. (1998)
<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	EF2		GGARGTACCAGTSATCATG	
<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	EF3		GTAAGGAGGASAAGACTCACC	
<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	EF22		AGGAACCCTTACCGAGCTC	
<i>RPB2</i>	5f2	638	GGGGWGAYCAGAAGAAGGC	O'Donnell et al. (2007)
<i>RPB2</i>	7cr		CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT	Liu et al. (1999)
<i>tub2</i>	T1	540 pb	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	O'Donnell & Cigel'nik (1997)
<i>tub2</i>	T2		TAGTGACCCTTGCCCCAGTTG	

<sup>a</sup>Fator de elongação (*EF-1 $\alpha$* ); Segunda maior subunidade da RNA polimerase (*RPB2*).  *$\beta$ -tubulina* (*tub2*); <sup>b</sup>Primer degenerado: R = A ou G; S = C ou G; W = A ou T; Y = C ou T

## 2.6 Teste de patogenicidade

Foram selecionados isolados identificados como *F. udum* por filogenia molecular e cruzamentos, CML 2554, CML 2602, CML 2608, CML 2616, representando diferentes regiões geográficas, para testar a patogenicidade em plantas de *Crotalaria ochroleuca* e *Cajanus cajan*. O inóculo foi cultivado em placas de Petri de 9 cm, contendo meio BDA, e mantidas por sete dias sob uma temperatura de 25 °C no escuro. Para a inoculação, adotou-se o seguinte procedimento: foram preparados vasos de 3 L com mistura de substrato Plantmax® e solo na proporção 1:1, previamente autoclavados. As covas de semeadura foram feitas com 2 cm de profundidade e foram adicionados discos

de micélio com aproximadamente 1 cm de diâmetro, retirados das colônias crescidas, sendo, então, cobertos com uma camada de substrato. Em seguida, foram semeadas separadamente *C. juncea* e *C. cajan*, e colocada outra camada do substrato para cobrir as sementes. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação com temperatura média de 26 °C. As avaliações foram realizadas semanalmente, durante 60 dias, sendo os estádios da doença avaliados e caracterizados. No final do experimento os caules foram seccionados para observação de colonização vascular. Após a avaliação foi realizado o reisolamento.

Como testemunha negativa plantas foram inoculadas com *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, enquanto plantas sem a presença do fungo foram cultivadas como testemunha absoluta. Para os experimentos os tratamentos (isolados) foram arranjados em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições. Para avaliação, foi realizada análise descritiva da presença ou da ausência de sintomas. O teste de patogenicidade foi realizado duas vezes em períodos diferentes.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Isolados obtidos

Foi composta uma coleção de 76 isolados de *Fusarium* obtidos de plantas de *Crotalaria ochroleuca*, *C. juncea* e *C. paulinea* coletadas nos estados de MG, RJ, BA, PE, MA, MT, PR e SC. Amostras de caules de *Crotalaria* spp. provenientes de Recife PE, Lavras MG e Seropédica RJ, que apresentavam peritécios, foram colocadas em câmara úmida e cirros de ascósporos foram transferidos para meio completo. A doença nessas plantas coletadas no campo apresentou diferentes níveis de severidade. Sintomas típicos foram evidentes no estágio de florescimento e formação das vagens e algumas amostras apresentaram nitidamente a formação de massas de esporos na superfície dos caules (Figura 2). Isolados da Índia, Estados Unidos, Alemanha, Malawi, Etiópia e África do Sul foram analisados como material de referência (Tabela 2).

Tabela 2 Isolados de *Fusarium* e sequências de isolados de referência utilizados neste estudo

CML <sup>a</sup>	Outro código <sup>a</sup>	Espécie	Hospedeiro	Origem	Isol.	MAT <sup>b</sup>	EF-1 $\alpha$ <sup>c</sup>	TUB2 <sup>d</sup>	RPB2 <sup>e</sup>
2554 M1		<i>F. udum</i>	<i>Cr. ochroleuca</i>	Lavras MG	2013	1	X	X	X
2555 M2		<i>F. udum</i>	<i>Cr. ochroleuca</i>	Lavras MG	2012	2		X	X
2593		<i>F. udum</i>	<i>Cr. ochroleuca</i>	Lavras MG	2012	ND			X
2594		<i>F. udum</i>	<i>Cr. ochroleuca</i>	Lavras MG	2012	2	X	X	X
2597		<i>F. udum</i>	<i>Cr. ochroleuca</i>	Lavras MG	2012	1		X	X
2598		<i>F. udum</i>	<i>Cr. ochroleuca</i>	Terra Roxa PR	2012	2	X	X	X
2600		<i>F. udum</i>	<i>Crotalaria</i> sp.	São Luis MA	2013	2	X	X	X
2601		<i>F. udum</i>	<i>Cr. paulinea</i>	Terra Roxa PR	2013	1	X	X	X
2602		<i>F. udum</i>	<i>Cr. paulinea</i>	Terra Roxa PR	2012	1	X	X	X
2604		<i>F. udum</i>	<i>Cr. paulinea</i>	Seropédica RJ	2012	2		X	X
2605		<i>F. udum</i>	<i>Cr. paulinea</i>	Lavras MG	2012	1	X	X	X
2607		<i>F. udum</i>	<i>Cr. ochroleuca</i>	Lavras MG	2012	2	X	X	X
2608	CMM 3104	<i>F. udum</i>	<i>Cr. paulinea</i>	Recife PE	2010	2	X	X	
2609		<i>F. udum</i>	<i>Cr. ochroleuca</i>	Lavras MG	2012	1	X	X	X
2610		<i>F. udum</i>	<i>Cr. ochroleuca</i>	Lavras MG	2012	2	X	X	
2612		<i>F. udum</i>	<i>Cr. ochroleuca</i>	Lavras MG	2012	1	X	X	X
2613		<i>F. udum</i>	<i>Cr. paulinea</i>	Seropédica RJ	2012	1	X		X
2614		<i>F. udum</i>	<i>Cr. paulinea</i>	Seropédica RJ	2012	2	X	X	X
2615		<i>F. udum</i>	<i>Cr. ochroleuca</i>	Lavras MG	2012	1	X	X	X
2616		<i>F. udum</i>	<i>Cr. paulinea</i>	Terra Roxa PR	2012	1	X	X	X
2617		<i>F. udum</i>	<i>Cr. ochroleuca</i>	Lavras MG	2013	1	X	X	X
2624		<i>F. udum</i>	<i>Cr. ochroleuca</i>	Lavras MG	2012	2	X		X
2625		<i>F. udum</i>	<i>Cr. ochroleuca</i>	Lavras MG	2012	2	X		X
2626		<i>F. udum</i>	<i>Cr. paulinea</i>	Seropédica RJ	2012	1	X	X	X

“continua”

Tabela 2 “continuação”

CML <sup>a</sup>	Outro código <sup>a</sup>	Espécie	Hospedeiro	Origem	Isol.	MAT <sup>b</sup>	EF-1 <sup>c</sup>	TUB2 <sup>d</sup>	RPB2 <sup>e</sup>
2591	ITEM 2473	<i>F. udum</i>	<i>Crotalaria</i> sp.	Flórida, EUA		2			
2592	ITEM 3586	<i>F. udum</i>	<i>Cr. juncea</i>	Índia		1	X	X	X
2645	NRRL 22949; CBS 178.32; BBA 1813	<i>F. udum</i>	desconhecido	Alemanha	1925	1	AF160 275	U3448 8	X
3240 ET	NRRL 25194; BBA 62451; CBS 747.79	<i>F. udum</i>	<i>Cajanus indicus</i>	Índia	1979	2	X	X	X
3239	NRRL 25313; BBA 64843	<i>F. udum</i>	<i>Cr. juncea</i>	Índia			X	X	X
3238	NRRL 25199; BBA 65058	<i>F. udum</i>	<i>Cajanus cajan</i>	Índia			X	X	X
3242	IMI 275452	<i>F. udum</i>	<i>Ca. cajan</i>	Malawi	1983	2	X	X	X
3241	IMI 501438	<i>F. udum</i>	<i>Ca. cajan</i>	Índia	2013	2	X	X	X
	NRRL 22540; CBS 211.58	<i>F. udum</i>	<i>Crotalaria</i> sp.	Brasil			AM295 809-1		
	NRRL 13614; CBS 738.97 T	<i>F. dlamini</i>	<i>Zea mays</i>	África do Sul			U3443 0		AF160 277

“continua”

Tabela 2 “continuação”

CML <sup>a</sup>	Outro código <sup>a</sup>	Espécie	Hospedeiro	Origem	Isol.	MAT <sup>b</sup>	EF-1 <sup>c</sup>	TUB2 <sup>d</sup>	RPB2 <sup>e</sup>
	NRRL 20433; CBS 716.74 T	<i>F. inflexum</i>	<i>Vicia faba</i>	Alemanha			U3443 5	JX1715 83	AF008 479
	NRRL 13448; CBS 749.97 T	<i>F. nygamai</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	Austrália			U3442 6	EF4701 14	AF160 273
	NRRL 52712	<i>F. udum</i>	Inseto	Etiópia			JF7407 90-1		JF741 116-1
	NRRL 52706	<i>F. udum</i>	Inseto	Etiópia					JF741 114-1
	NRRL 25486; CBS 258.52 T	<i>F. xylerioides</i>	<i>Coffea robusta</i>	Uganda			AY707 136.1	AY707 118-1	JX171 630-1
	NRRL 25059 T M2	<i>F. musae</i>	<i>Musa</i> sp.	Honduras			FN545 368	FN552 108	FN552 086
	FGSC 7303	<i>F. verticillioides</i>	<i>Zea mays</i>	Indiana, EUA			FN543 60	FN552 100	FN552 078
262	NRRL 53984 T	<i>F. tupiense</i>	<i>Mangifera indica</i>	Brasil			DQ452 859	DQ 445781	X
3060	NRRL 13309; CBS 402.97; KSU 10769 T	<i>F. acutatum</i>	desconhecido	India					

“continua”



Tabela 2 “continuação”

CML <sup>a</sup>	Outro código <sup>a</sup>	Espécie	Hospedeiro	Origem	Isol.	MAT <sup>b</sup>	EF-1 <sup>c</sup>	TUB2 <sup>d</sup>	RPB2 <sup>e</sup>
3243	IMI 205517	<i>F. acutatum</i>	<i>Caj. indicus</i>	India	1976	1	X		X
	NRRL 13308	<i>F. acutatum</i>	desconhecido	India			AF160 276	U3448 6	n.t.
	NRRL 13566	<i>F. fujikuroi</i>	<i>Oryza sativa</i>	Taiwan			U3441 5	JX1715 70	AF160 279
1063	NRRL 25295 T	<i>F. guttiforme</i>	<i>Ananas comosus</i>	Brasil			X	X	
	NRRL 22945 T	<i>F. ananatum</i>	<i>Ananas comosus</i>	Brasil			U3442 0	JX1716 18	AF160 297
	NRRL 22902	<i>F. oxysporum</i>	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	EUA			U3442 4		AF160 312
	NRRL 13617 T	<i>F. phyllophilum</i>	<i>Dracaena deremensis</i>	Itália			U3443 2	XX	AF160 274
	NRRL 22944	<i>F. proliferatum</i>	<i>Cattleya</i> sp.	Alemanha			U3441 6	JX1716 17	AF160 280
	NRRL 13999	<i>F. sacchari</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	India			U3441 4	JX1715 80	AF160 278
	NRRL 22016	<i>F. subglutinans</i>	<i>Zea mays</i>	EUA			U3441 7	JX1715 99	AF160 289
	NRRL 22045	<i>F. thapsinum</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	África do Sul			U3441 8	JX1716 00	AF160 270

“continua”

Tabela 2 “conclusão”

<b>CML<sup>a</sup></b>	<b>Outro código<sup>a</sup></b>	<b>Espécie</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Origem</b>	<b>Isol.</b>	<b>MAT<sup>b</sup></b>	<b>EF-1α<sup>c</sup></b>	<b>TUB2<sup>d</sup></b>	<b>RPB2<sup>e</sup></b>
405	NRRL 25331 T	<i>F. circinatum</i>	<i>Pinus radiata</i>	EUA			U6154 7	JX1716 23	AF160 295
	MRC 8544	<i>F. konzum</i>	<i>Sorghastrum nutans</i>	EUA			EU220 234		EU22 0235

<sup>a</sup>Código dos isolados: **CML**, Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil; **CBS**, *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Utrecht, Holanda; **ITEM**, Agri-Food Toxicogenic Fungi Culture Collection, Institute of Sciences of Food Production, Bari, Itália; **BBA**, Julius Kühn-Institute, Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics, Berlin & Braunschweig, Germany; **IML**, CABI Bioservices, Egham, Surrey, UK; **NRRL**, Northern Regional Research Laboratory, Peoria IL, EUA; **MRC**, Medical Research Council, Tygerberg, África do Sul, **FGSC**, Fungal Genetics Stock Center, School of Biological Sciences, University of Missouri, Kansas City MO, EUA; **CMM**, Coleção de Fungos Fitopatogênicos, Maria Menezes, UFRPE, Recife, Brasil. <sup>b</sup>MAT - *Mating type* dos isolados identificados por PCR. *MAT-1* = 1; *MAT-2* = 2. <sup>c</sup>Sequências do gene *tef-1α* obtidas do GenBank, NCBI. <sup>d</sup>Sequências do gene *tub2* obtidas do GenBank, NCBI. <sup>e</sup>Sequências do gene *RPB2* obtidas do GenBank, NCBI.

### 3.2 Características morfológicas do anamorfo

Todos os isolados avaliados apresentaram características típicas de *F. udum*. Foi verificada uma grande variação na pigmentação e no aspecto do micélio como a presença de crescimento abundante, crescimento ralo e alguns isolados com característica de crescimento pionotal. Em relação à coloração das colônias, os isolados apresentaram inicialmente coloração branca tornando-se salmão, alaranjada violeta ou azul. A taxa de crescimento micelial varia de 1.5 mm/dia a 4.2 mm/dia (Figura 1). Dos 76 isolados analisados 15 produziram microescleródios em grande quantidade em meio de cultura BDA. Os clamidósporos possuem formato globoso, são formados nas hifas ou suas extremidades, em grupos ou em cadeias, são unicelulares ou bicelulares, com paredes duplas e verrugosas.

Em meio de cultura CLA, os isolados produziram fiálides curtas, eventualmente pouco ramificadas. Os microconídios são agregados em falsas cabeças, apresentando formato fusiforme a reniforme com presença de 0-2 septos. Em cultura pionotal os microconídios apresentam morfologia variável, principalmente na célula apical que é curvada. Os isolados possuem uma alta capacidade de produção de esporodóquio em fragmentos de folhas de cravo, mas também na superfície do meio SNA pode ser observada a produção de esporodóquio. Os macroconídios produzidos em fragmentos de folhas de cravo possuem formato falcado com presença de 3-5 septos, no entanto, raramente foi observada a presença de macroconídios com 5 septos. A célula apical do macroconídio é pouco pronunciada, assim como a célula pé. Já os macroconídios produzidos no micélio aéreo possuem morfologia muito variável, com 3-7 septos, célula apical fortemente curvada e célula pé evidente. Para aqueles isolados com característica pionotal, foram observadas estas mesmas características no macroconídio (Figura 4).

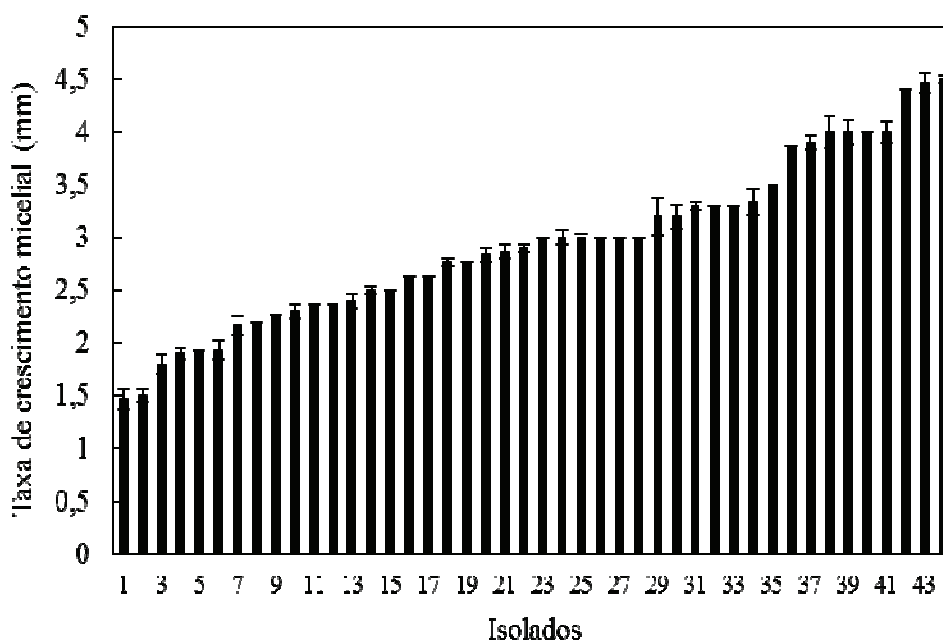


Figura 1 Taxa de crescimento micelial de isolados de *F. udum* cultivados em BDA a 25°C no escuro por 4 dias.

### 3.3 Indução da fase sexuada

De dez isolados que tiveram o *mating type* identificado, cinco foram *MAT-1* e cinco foram *MAT-2*. Esses isolados, quando cruzados entre si, formaram protoperitécios após sete dias, após 15 dias foram observados peritécios e a exsudação de cirros de ascósporos foi observada a partir de 21 dias. A seguir, os isolados com mais alta fertilidade, CML 2554 (*MAT-1*) e CML 2555 (*MAT-2*), foram selecionados como testadores.

Após a obtenção de isolados testadores foram realizados 152 cruzamentos com os demais isolados. Vinte e oito isolados produziram peritécios quando cruzados com o testador *MAT-2* e 37 isolados produziram peritécios quando cruzados com o testador *MAT-1*. Observou-se que isolados produtores de microscleródios apresentaram alta fertilidade. Os isolados do

Brasil foram compatíveis com os isolados de *Crotalaria juncea* provenientes da Índia (NRRL 25313, ITEM 3586) e de *Cajanus cajan* oriundos de Malawi (IMI 275452) e Índia (NRRL 25194, NRRL 25199), formando peritécios férteis. Não ocorreu a formação de peritécios no cruzamento entre os testadores de *F. udum* com as espécies biológicas do FFSC *F. verticillioides*, *F. sacchari*, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. thapsinum*, *F. circinatum*, *F. xylarioides*, *F. tupiense* e *F. musae*. Nos cruzamentos entre os testadores das espécies biológicas, realizado como controle, houve formação de peritécios férteis. Os cruzamentos realizados entre os testadores de *F. udum* e dois isolados de *F. acutatum* (NRRL 13309 e IMI 205517) também não produziram peritécios.

### 3.5 Características morfológicas do teleomorfo

Os peritécios obtidos de caules apresentaram formato obpiriforme a piriforme, com uma base estromática evidente, parede verrugosa, 220-180  $\mu\text{m}$ , com coloração violeta escuro em KOH, tornando-se vermelho em ácido láctico. Os ascos são unitunicados com oito ascósporos. Os ascósporos são elipsóides a fusiformes, com 1-3 septos, 5-2 x 2-1  $\mu\text{m}$  (Figura 4). Os peritécios produzidos em condições de laboratório são superficiais, agregados ou solitários, não apresentando base estromática, com formato obovóide 360-420  $\mu\text{m}$  de altura, 330-380  $\mu\text{m}$  de largura. Os ascos possuem oito ascósporos, com 1-2 septos, raramente observa-se a presença de dois septos, com presença de uma leve constrição nos septos. Ascósporos obtidos de cruzamentos assim como de substrato natural germinaram em SNA, produzindo culturas típicas de *F. udum*.

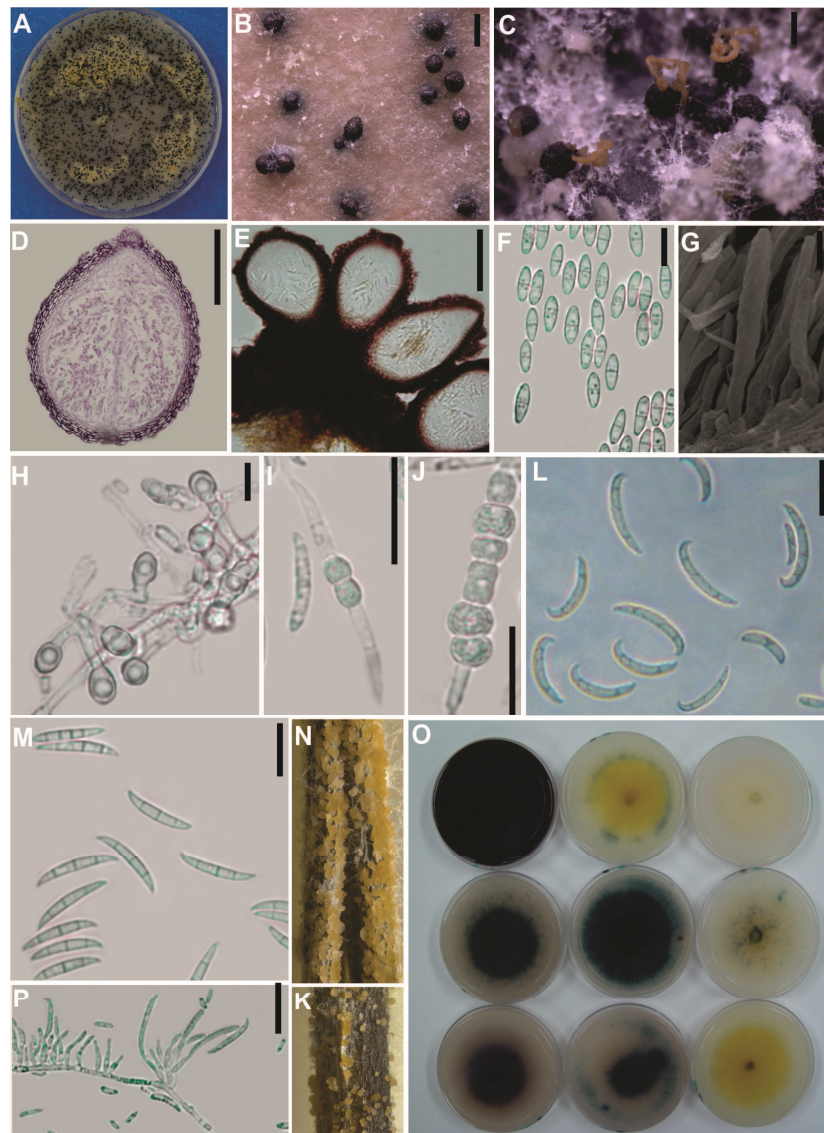


Figura 2 *Fusarium udum*. A-B. cultura pura com peritécios; C. peritécios exsudando ascósporos; D-E. seção transversal de peritécios; F. ascósporos; G. ascos; H, I, J. clamidósporos; L macroconídios formados em micélio aéreo; M. macroconídios formados em esporodóquio; N-K. esporodóquios; O. culturas em BDA; P. monofiálides e microconídios.

### 3.6 Análise filogenética

Árvores filogenéticas foram geradas para cada região genômica, *EF 1- $\alpha$* , *tub2* e *RPB2* em separado (ver Anexos), e para a combinação das regiões *EF 1- $\alpha$*  e *tub2* (Figura 2) e na combinação das três regiões *EF 1- $\alpha$* , *tub2* e *RPB2*, (Figura 3). Para as árvores geradas das sequências combinadas pelas análises de Máxima Parcimônia (MP) os isolados de *Cajanus cajan* e *Crotalaria* spp. formaram um clado único com isolados de referência da Índia, Malawi e “Alemanha”, tendo como grupo irmão *F. phyllophilum* e *F. xylarioides*.

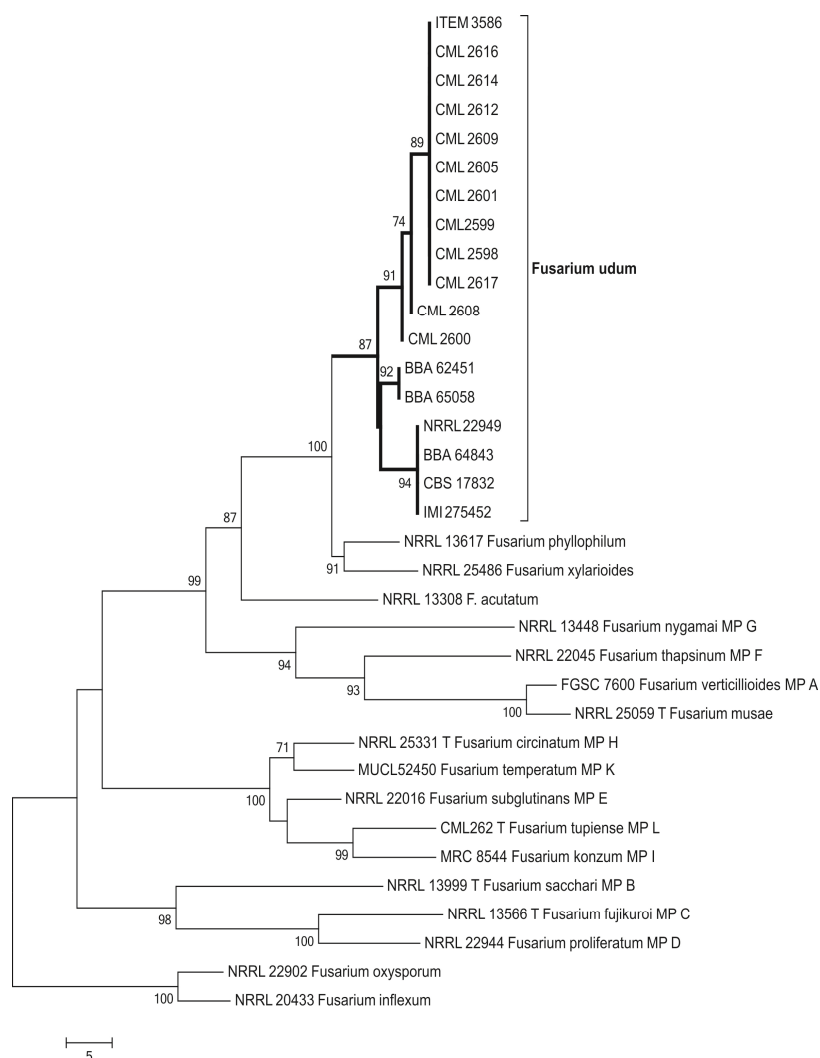


Figura 3 Análise de Máxima Parcimônia de seqüências combinadas de *EF-1α* e *tub2* das espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* species complex e isolados de *F. udum* do Brasil. O Comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore, e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos internódios. Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras; NRRL = *Northern Regional Research Laboratory*, FGSC = *Fungal Genetics Stock Center*, Missouri, Kansas City, ITEM = *Agri-Food Toxigenic Fungi Culture Collection*, Institute of Sciences of Food Production, Bari, Italy



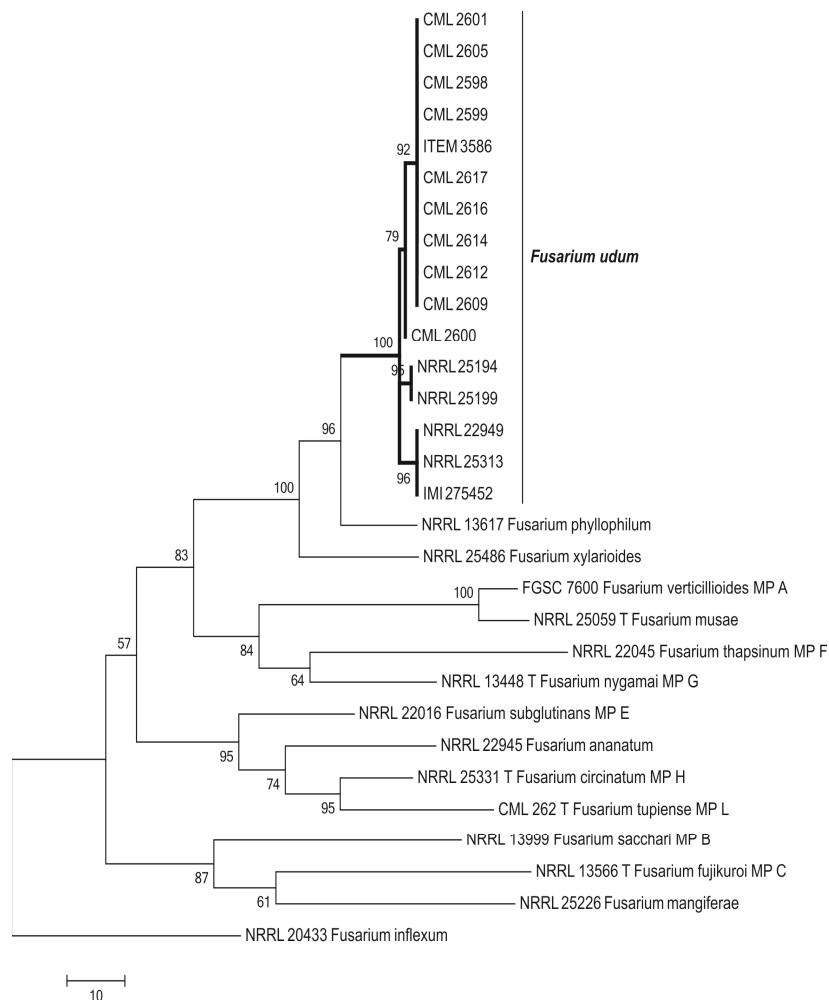


Figura 4 Análise de Máxima Parcimônia de seqüências combinadas de *EF -1 $\alpha$* , *tub2* e *RPB2* das espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* species complex e isolados de *F. udum* do Brasil. O Comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore, e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos internódios. Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras; NRRL = Northern Regional Research Laboratory, FGSC = Fungal Genetics Stock Center, Missouri, Kansas City, ITEM = Agri-Food Toxicogenic Fungi Culture Collection, Institute of Sciences of Food Production, Bari, Italy

### 3.7 Teste de patogenicidade

Todos os isolados inoculados induziram sintomas em *Crotalaria ochroleuca*, no entanto não induziram sintomas em *Cajanus cajan*. O sintoma inicial foi o amarelecimento intervenal nas folhas e em plantas com murcha severa foi observada a queda de folhas. No início da floração, as plantas tornaram-se amareladas progredindo para a murcha. No estágio de formação das vagens foi observada a morte das plantas seguida pela formação de massas de esporos nos caules. O sistema radicular das plantas inoculadas apresentou raízes com coloração escura e as raízes laterais com aspecto de dilatação e pouco desenvolvidas. Em seções de caules e raízes foi observado escurecimento dos vasos. Os sintomas foram semelhantes para as duas repetições (Figura 4).



Figura 4 Sintomas em campo e teste de patogenicidade de *F. udum* em *Crotalaria ochroleuca*; A-B-C-D. Sintomas observados em campo. E-I. Peritécios de ocorrência natural. G. Sintomas em raízes de plantas inoculadas. H. Raízes não inoculadas. J-L-M-N-O. Sintomas de murcha em plantas inoculadas.

### 3.6 Indicação do epítipo

Na descrição original da espécie *F. udum* (Butler 1910) o material tipo não foi indicado. De acordo com Padwick (1940), o material foi depositado no Herbarium Crypt. Orient. India, Nova Delhi, India. O autor comenta que faz várias tentativas de reativar material do fungo, entretanto sem sucesso, e conclui: “*There is no culture of F. udum which has descended from Butler’s type culture. The herbarium specimens are unsuitable for comparison. We are obliged to rely on his written description.*” (ibid. p. 870).

Na ocasião da descrição da fase sexuada do fungo, *Gibberella indica*, por Rai & Upadhyay (1982), a relação entre as duas fases foi comprovada e o material tipo depositado no herbário IMI (no. 231114). Entretanto, um epítipo é proposto por se tratar de isolado em boas condições, obtido também do Norte da Índia, de plantas de *Cajanus cajan* com sintoma de murcha. Baseado na caracterização filogenética, biológica, por marcadores morfológicos bem como testes de patogenicidade, designamos como epítipo a cultura CML 3240 (= NRRL 25194; BBA 62451; CBS 747.79). O epítipo é um material de referência complementar quando o tipo existente é inadequado para a correta aplicação do nome.

#### 4 DISCUSSÃO

Isolados de *F. udum* obtidos de espécies de *Crotalaria* e *Cajanus*, provenientes do Brasil, Índia, Malawi e Alemanha formaram um grupo monofilético baseado em análises de três regiões gênicas. Da mesma forma, os isolados testadores selecionados formaram peritécios férteis quando cruzados entre si e com isolados de referência. Esses resultados confirmam que o fungo associado a espécies de *Cajanus* e *Crotalaria* é *F. udum*, espécie única, definida por conceito filogenético, biológico e marcadores morfológicos.

Na avaliação das características morfológicas foi confirmada a alta plasticidade morfológica como variação no formato e tamanho dos macroconídios, que podem ser formados tanto em esporodóquios como no micélio aéreo, taxa de crescimento micelial e coloração das culturas. A presença de clamidósporos impediu que essa espécie fosse colocada em proximidade de espécies da antiga seção *Liseola*. Essas observações foram feitas por outros autores, que estudaram isolados de *F. udum* (Padwick 1940; Armstrong & Armstrong 1950; Kiprop et al. 2002a).

A variabilidade na morfologia se reflete na ambiguidade dos nomes atribuídos a esse patógeno. A sinonímia completa encontra-se listada em Gerlach & Nirenberg (1982). Enquanto em *F. xylarioides* micro- e macroconídios mostram a característica curvatura das células apical e basal, em *F. udum* apenas o macroconídio formado no micélio aéreo apresenta tal curvatura. A espécie *F. acutatum* foi descrita a partir de isolados inicialmente identificadas como *F. udum*, entretanto o macroconídio de *F. acutatum* apresenta célula apical pontiaguda (Nirenberg & O'Donnell 1998). No presente trabalho, *F. acutatum* foi confirmado como espécie irmã de *F. udum*, baseado em análise filogenética de três loci. Não existe relato de *F. acutatum* causar doença em *Cajanus* ou outra espécie cultivada. *F. udum* não apresenta marcador

morfológico que permita a sua distinção de *F. oxysporum* e *F. xylarioides* de forma segura.

No Brasil, a ocorrência de murcha em *Crotalaria* causada por *Fusarium* é conhecida desde os anos 40 (Carrera 1946; Joffily 1946). O autor Joffily obteve isolados de *Fusarium* de plantas sintomáticas de diversas espécies de *Crotalaria*, enquanto Carrera os identificou a pedido e atribuiu o nome *F. oxysporum* f. *crotalariae*. Uma dessas culturas é preservada como NRRL 22540 e uma sequência de Tef disponível (AM295809-1). O fungo observado é claramente *F. udum*. Obtivemos ainda evidências que *F. udum* esteja associado a outras espécies de leguminosas cultivadas.

Além dos marcadores morfológicos de *F. udum* serem muito semelhantes a *F. oxysporum* ambos causam doença com sintoma de murcha (Padwick 1940). Esta observação reforça a importância da identificação empregando o conceito de espécie biológica e filogenética. A presença de microescleródios não possui valor taxonômico, no entanto foi verificado nesse estudo que isolados que produzem microescleródios são altamente férteis.

Esta é primeira constatação da fase sexuada de *F. udum* associada ao gênero *Crotalaria*. A ocorrência da fase sexuada de *F. udum* em condições naturais na Índia é conhecida desde 1979 quando foi também comprovada a associação entre as formas sexuada e assexuada (Rai & Upadhyay 1982). A frequência com a qual a fase sexuada pode ser observada em associação com *Cajanus cajan* e *Crotalaria* spp. sugere que os ascósporos exercem papel importante na epidemiologia da doença. A provável reprodução sexuada em campo contribui para a variabilidade genética da espécie, como foi demonstrado em estudos sobre compatibilidade vegetativa e AFLP em uma população de *F. udum* no Quênia obtida de *Cajanus cajan* (Kiprop et al. 2002a, b). A relação equilibrada de ambos os mating types observada neste estudo, na proporção 50:50, é indício de alta fertilidade em campo.

Os cruzamentos realizados em laboratório entre os isolados do Brasil com isolados da Índia e Malawi evidenciaram que não existe barreira reprodutiva entre as populações da Ásia, África e das Américas. Neste estudo foi observado que peritécios e ascósporos produzidos nas condições de campo apresentam dimensões inferiores em relação aos produzidos *in vitro*. Essa diferença pode ser explicada pela interferência de fatores como clima, temperatura, luz e luminosidade. O mesmo fenômeno foi observado nas espécies biológicas *F. xylarioides* e *F. verticillioides* cuja fase sexuada também foi observada na natureza (Summerell et al. 1998; Lepoint et al. 2005).

A alta fertilidade dos isolados de *F. udum* observada nesse estudo permitiu a seleção de testadores para ambos os mating types. No caso de outras espécies biológicas como *F. tuiense*, *F. konzum*, *F. thapsinum*, *F. proliferatum* ou *F. circinatum* os isolados apresentaram baixa fertilidade, sendo necessária a realização de retro-cruzamentos (Leslie & Klein 1996; Britz et al. 1998; Zeller et al. 2003; Lima et al. 2012).

Nas análises filogenéticas *F. udum* posicionou-se no clado africano, assim como outras espécies produtoras de clamidósporos e pseudoclamidósporos (Geiser et al. 2005). Este fungo é endêmico na Índia e África, provavelmente foi disseminado via material vegetal para a América. O gênero *Cajanus* foi introduzido no Brasil provavelmente via rotas dos escravos procedentes da África. Já o gênero *Crotalaria* possui distribuição pantropical, tendo o Brasil e México como centro secundário. A hipótese é que o fungo foi introduzido no Brasil em associação com *Cajanus* e estabeleceu relações parasitárias com o gênero *Crotalaria*. Apesar dos isolados de *F. udum* de *Cajanus* e *Crotalaria* pertencem a uma única espécie biológica e filogenética, no teste de patogenicidade os isolados testados não induziram sintomas em plantas de *Cajanus*. Uma explicação possível é que o material vegetal usado atualmente não seja suscetível ao patógeno. Pela disponibilização da cultura CML 3240

(NRRL 25194, BBA 62451, CBS 747.79) como epítipo e dos isolados testadores (CML 2554 e CML 2555), que podem ser utilizados para identificação da espécie, espera-se um impacto positivo sobre a diagnose correta dos patógenos, o monitoramento das doenças de *Cajanus* e *Crotalaria*, o desenvolvimento de estratégias de controle e programas de melhoramento das respectivas espécies.



## REFERÊNCIAS

- Armstrong JK, Armstrong GM (1951) Physiological races of the *Crotalaria* wilt *Fusarium*. *Phytopathology* 41:714-721
- Booth C (1971) The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey
- Butler EJ (1910) The wilt disease of pigeon pea and the parasitism of *Neocosmospora vasinfectum* Smith. *Mem Dept Agric India* 9:1-64
- Carrera CJM (1946) *Fusarium oxysporum* Schl. f. *crotalariae* n.f. nuevo parasito vascular de *Crotalaria*. *Bol Soc Bras Agron* 9:242-244
- Geiser DM, Lewis Ivey ML, Hakiza G, Juba JB, Miller S (2005) *Gibberella xylarioides* (anamorph: *Fusarium xylarioides*), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is a previously unrecognized member of *G. fujikuroi* species complex. *Mycologia* 97:191-201
- Gerlach W, Nirenberg H (1982) The genus *Fusarium*. Biologische Bundesanstalt, Berlin Dahlem.
- Gwata ET, Silim SN, Mgonja M (2006) Impact of new source of resistance to *Fusarium* wilt in pigeon pea. *J Phytopath* 154:62-64
- Hepperle D (2004) SeqAssem©. Win32-Version. A sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Disponível em: <http://www.sequentix.de>.
- Joffily J (1946) A propósito do parasitismo do *Fusarium vasinfectum* em seis espécies do gênero *Crotalaria*. *Bol Soc Bras Agron* 9:223-237
- Kannaiyan J, Nene YL, Reddy MV, Ryan JG, Raju TN (1984) Prevalence of pigeonpea diseases and associated crop losses in Asia, Africa and the Americas. *Intern J Pest Managem* 30:62-72
- Kerényi Z, Moretti A, Waalwijk C, Oláh B, Hornok L (2004) Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. *Appl Environm Microbiol* 70:4419-4423

Kiprop EK, Baudoin JP, Mwang'ombe AW, Kimani PM, Mergeai G, Maquet A (2002a) Characterization of Kenyan isolates of *Fusarium udum* from pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) by cultural characteristics, aggressiveness and AFLP analysis. *J Phytopath* 150:517-525

Kiprop EK, Mwang'ombe AW, Baudoin JP, Kimani PM, Mergeai G (2002b) Cultural characteristics, pathogenicity and vegetative compatibility of *Fusarium udum* isolates from pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) in Kenya. *Eur J Pl Pathol* 108:147-154

Klittich CJR, Leslie JF, Nelson PE, Marasas WFO (1997) *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): a new species in section *Liseola* from sorghum. *Mycologia* 89:643-652

Kvas M, Marasas WFO, Wingfield BD, Wingfield MJ, Steenkamp ET (2009) Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fung Div* 34:1-21

Lamontagne-Godwin J, Reeder R, Buddie AG, James M (2012) First confirmed report of *Gibberella indica* on *Cajanus cajan* in Barbados, Lesser Antilles. *New Dis Rep* 26:10

Lepoint PC, Munaut FT, Maraite HM (2005) *Gibberella xylarioides* sensu lato from *Coffea canephora*: a new mating population in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Appl Environm Microbiol* 71:8466-8471

Leslie JL, Summerell BA (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell, Ames IA, USA

Leslie JL, Zeller KA, Wohler M, Summerell BA (2004) Interfertility of two mating populations in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Eur J Pl Path* 110:611-618

Liu YJ, Whelen S, Hall BD (1999) Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol Biol Evol* 16:1799-1808

Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO (1983) *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania

- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RD (1998a) Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Nat Acad Sci USA* 95:2044-2049
- O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg HI (1998b) Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:465-493
- O'Donnell K, Sarver BAJ, Brandt M, Chang DC, Noble-Wang J, Park BJ, Sutton DA, Benjamin L, Lindsley M, Padhye A, Geiser DM, Ward TJ (2007) 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. *J Clin Microbiol* 45:2235-2248
- O'Donnell K, Sutton DA, Fothergill A, McCarthy D, Rinaldi MG, Brandt ME, Zhang N, Geiser DM (2008) Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *J Clin Microbiol* 46:2477-2490
- Padwick GW (1939) The genus *Fusarium*. I. Known occurrence in India. *Ind J Agr Sci* 9:171-184
- Padwick GW (1940) The genus *Fusarium*. IV. Infection and cross infection tests with isolates from cotton (*Gossypium* sp.), pigeon pea (*Cajanus cajan*) and sunn-hemp (*Crotalaria juncea*). *Ind J Agr Sci* 10:707-715
- Rai B, Upadhyay RS (1982) *Gibberella indica*: the perfect state of *Fusarium udum*. *Mycologia* 94:343-346
- Reddy MV, Subrahmanyam P, Likoswe AA, Saka VW, Msuku WAB (1993) Survey of pigeonpea diseases in Malawi. *Intern Pigeonpea Newsl* 15:24-25
- Steenkamp ET, Wingfield BD, Coutinho TA, Zeller KA, Wingfield MJ, Marasas WFO, Leslie JF (2000) PCR-based identification of MAT-1 and MAT-2 in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Appl Environm Microbiol* 66:4378-4382
- Summerell BA, Burgess LW, Bullock S, Backhouse D, Tric ND (1998) Occurrence of perithecia of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*) on maize stubble in northern Vietnam. *Mycologia* 90:890-895

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stercher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22:4673-4680

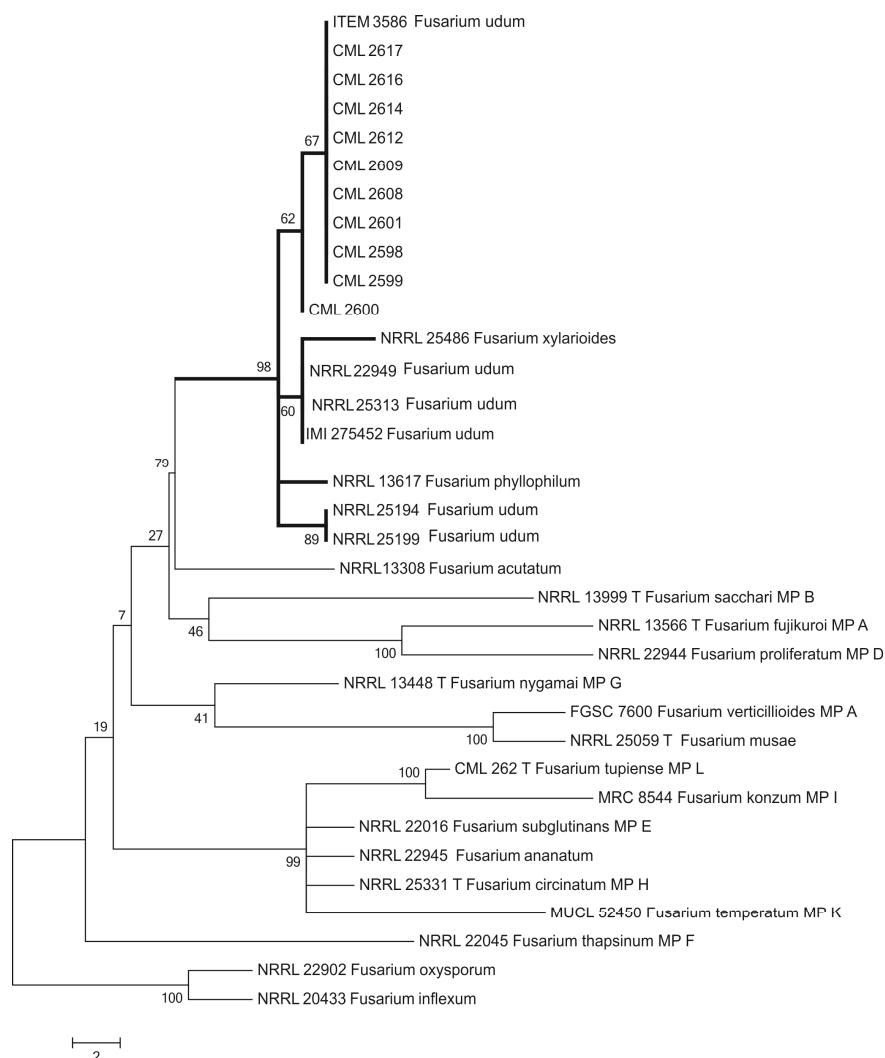


Figura 5 Análise de Máxima Parcimônia de seqüências combinadas de *EF -1 $\alpha$*  das espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* species complex e isolados de *F. udum* do Brasil. O Comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore, e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos internódios. Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras; NRRL = *Northern Regional Research Laboratory*, FGSC = *Fungal Genetics Stock Center*, Missouri, Kansas City, ITEM = *Agri-Food Toxigenic Fungi Culture Collection*, Institute of Sciences of Food Production, Bari, Italy

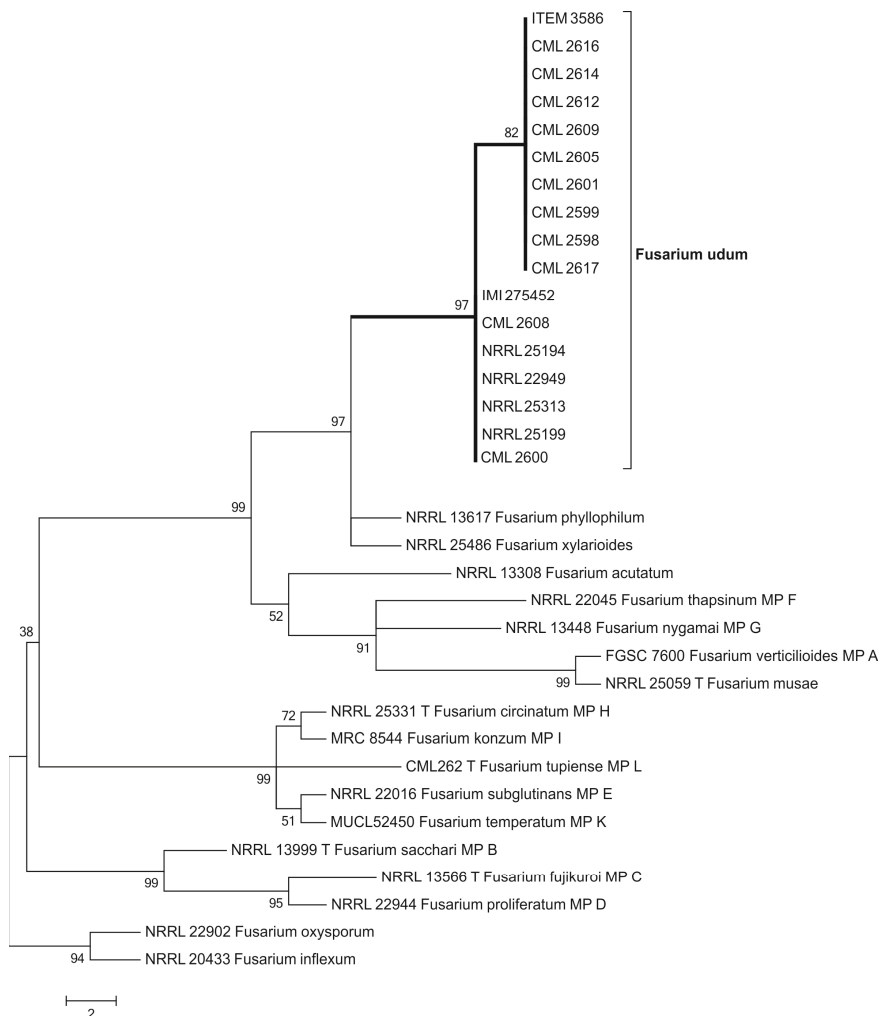


Figura 6 Análise de Máxima Parcimônia de seqüências combinadas de *tub2* das espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* species complex e isolados de *F. udum* do Brasil. O Comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore, e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos internódios. Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras; NRRL = *Northern Regional Research Laboratory*, FGSC = Fungal Genetics Stock Center, Missouri, Kansas City, ITEM = Agri-Food Toxigenic Fungi Culture Collection, Institute of Sciences of Food Production, Bari, Italy

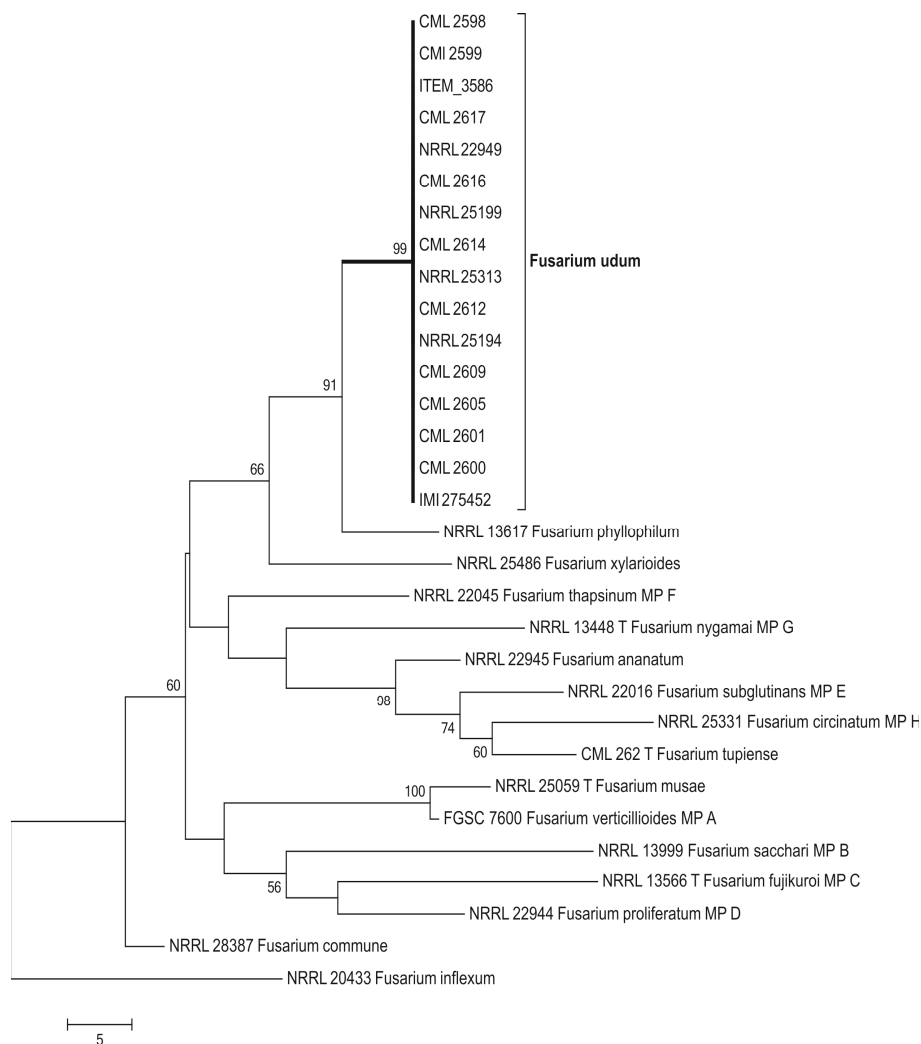


Figura 7 Análise de Máxima Parcimônia de seqüências combinadas de *RPB2* das espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* species complex e isolados de *F. udum* do Brasil. O Comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore, e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos internódios. Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras; NRRL = *Northern Regional Research Laboratory*, FGSC = *Fungal Genetics Stock Center*, Missouri, Kansas City, ITEM = *Agri-Food Toxigenic Fungi Culture Collection*, Institute of Sciences of Food Production, Bari, Italy

**CAPÍTULO 3** Espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* associadas a *Brachiaria* spp. e *Saccharum officinarum* no Brasil



## RESUMO

Diversas espécies de *Fusarium* são encontradas em associação a gramíneas da vegetação natural e cultivadas como endófitos ou causando podridão de colmo. Algumas dessas espécies são conhecidas por produzirem importantes micotoxinas. Baseado em análises filogenéticas, cruzamentos em laboratório, caracterização morfológica, e teste de patogenicidade, isolados provenientes de sementes assintomáticas de *Brachiaria* spp. e de cana-de-açúcar com sintoma de “*pokkah boeng*” foram caracterizados aplicando os conceitos de espécie filogenética e biológica. Foram identificadas as espécies *F. andiyazi*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum*, *F. verticillioides* e ainda duas novas linhagens do FFSC pertencentes ao clado africano associadas a *Brachiaria* spp. Em cana-de-açúcar os isolados avaliados agruparam com os isolados de referência em um único clado e formaram peritécios férteis quando cruzados com os isolados testadores de *F. sacchari*. As espécies encontradas em *Brachiaria* causaram podridão de colmo em milho, sorgo e milheto. *Brachiaria* spp. podem representar um potencial reservatório de inóculo das espécies de *Fusarium* patogênicas ao milho, sorgo e milheto.

Palavras-chave: *Poaceae*. Cana-de-açúcar. Filogenia multigênica. Fungos endófitos. Hospedeiros alternativos. *Mating population*.

**ABSTRACT****Species of the *Fusarium fujikuroi* species complex FFSC associated with *Brachiaria* spp. and *Saccharum officinarum* in Brazil**

Several *Fusarium* species can be found in association with grasses from the natural vegetation and also cultivated species as endophytes or pathogens causing stem rot. Some of these species are also known as important mycotoxin producers. Isolates obtained from symptomless seeds of *Brachiaria* spp. and sugar cane plants (*Saccharum officinarum*) showing symptoms of “pokkah boeng” were characterized by morphological markers, laboratory crosses, phylogenetic analyses using fragments of the genes encoding elongation factor 1 $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ) and pathogenicity tests. On *Brachiaria* were identified the species *F. verticillioides*, *F. thapsinum*, *F. proliferatum*, *F. andiyazi* and still two new distinct lineages belonging to the African clade of the FFSC. Isolates from sugar-cane grouped together with reference material in a unique clade and formed fertile perithecia when crossed with known tester strains of *Fusarium sacchari*. The species isolated from *Brachiaria* spp. caused rot on stems of maize, sorghum and millet. Species of *Brachiaria* may act as a potential reservoir of inoculum of species which cause disease on maize, sorghum and millet.

**Keywords:** *Poaceae*. Alternative hosts. Endophytes. *Mating population*. Multigene phylogeny. Sugar cane.

## 1 INTRODUÇÃO

Um dos primeiros estudos que relacionam *Fusarium* com gramíneas nativas foi realizado por Burgess & Summerell (1992). Estes estudos demonstraram a existência de ampla gama de espécies de *Fusarium* como endófitos ou como patógenos latentes. *Fusarium gaditjirrii*, *F. beomiforme*, *F. babinda*, *F. aywerte* e *F. nurragi* foram descritos em associação com gramíneas nativas (Nelson et al., 1987; Summerell et al., 1995; Walsh et al., 2010). *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. konzum* e *F. thapsinum* podem ser isolados de gramíneas não cultivadas e produzem diversas micotoxinas. Por essa razão considera-se a possibilidade de gramíneas como elementos da vegetação natural pudessem funcionar como reservatórios de inóculo de espécies patógenos de plantas e produtoras de micotoxinas (Leslie et al., 2004). *F. konzum*, espécie conhecida apenas na América do Norte foi descrita associada a plantas do gênero *Andropogon* e *Sorghastrum* (Zeller et al., 2003). *F. fujikuroi*, agente etiológico de “*bakanae*” em arroz foi isolado em plantas aquáticas do gênero *Echinochloa*. Curiosamente, essas plantas foram coletadas em áreas com cultivo de arroz (Carter et al., 2008). Na Austrália existem áreas extensas de *Oryza australienses* e um levantamento evidenciou que *F. sacchari* foi a espécie predominante. Estes mesmos isolados de *O. australienses* foram patogênicos a milho, arroz e sorgo sendo uma ameaça para as gramíneas cultivadas no norte da Austrália (Petrovic et al., 2013).

“*Pokkah boeng*” é uma importante doença da cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) conhecida principalmente na Ásia. As plantas com sintomas apresentam deformação no topo, devido à atuação do fungo na região meristemática. Várias espécies do FFSC foram associadas a esta doença. No entanto, grande parte da literatura menciona que o agente etiológico de “*pokkah boeng*” seja *F. sacchari* (Siti Nordahliawate et al., 2008). Embora o Brasil seja

um dos maiores produtores de cana-de-açúcar, a ocorrência de *F. sacchari* como agente de “*pokkah boeng*” ainda não foi formalmente registrado. Até o momento na literatura brasileira é encontrado “*F. moniliforme*” como o agente dessa doença na cultura. No entanto, este nome está em desuso, devido ao desmembramento em várias espécies filogenéticas e biológicas (O’Donnell et al., 1998). Na Ásia foi confirmada a associação de *F. proliferatum*, *F. sacchari*, *F. subglutinans* e *F. verticillioides* com sintomas dessa doença (Hsuan et al., 2011).

Devido à existência de várias espécies de *Fusarium* associadas a gramíneas não cultivadas, propõe-se averiguar a presença de membros do FFSC associados ao gênero *Brachiaria* e *Saccharum officinarum* e comprovar por inoculações que estas plantas podem atuar como reservatórios de espécies patogênicas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção de isolados

Isolados de espécies de *Brachiaria* foram obtidos a partir de sementes aparentemente saudáveis, que foram submetidas a desinfestação superficial em álcool 70%, hipoclorito de sódio 1%, água destilada esterilizada e posteriormente trituradas. Em seguida, os fragmentos foram depositados em meio de cultura extrato de malte 2% (MA2). Os isolados de cana-de-açúcar foram obtidos de colmo de plantas com sintomas de “*pokkah boeng*”, que também foram submetidos à desinfestação superficial e em seguida foram fragmentados e transferidos para meio de cultura MA2. Foram incluídos na análise também isolados de referência de espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* (FFSC) disponíveis na Coleção Micológica de Lavras CML, Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA). Culturas monospóricas dos isolados obtidos foram preservadas em microtubos e armazenadas a 10°C, no escuro e criopreservadas em suspensão de esporos com 15% glicerina a -80°C na Coleção Micológica de Lavras CML.

### 2.2 Caracterização morfológica

Os isolados foram cultivados em meio batata dextrose ágar (BDA) e incubados a 25°C no escuro por quatro dias para observação da taxa de crescimento e morfologia da colônia. Após a avaliação estas placas foram retornadas para a mesma condição de incubação e após 14 dias foi avaliada a coloração das colônias. As características micromorfológicas como a presença ou não e cor de esporodóquios; frequência, tamanho, formato e origem de microconídios e macroconídios; tipos de fiálides; presença ou não de

clamidósporos presença ou não de microconídios em falsas cabeças e presença ou não de hifa estéril espiralada, foram avaliadas em *synthetic nutrient-poor agar* (SNA) + folha de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.). As placas foram incubadas a 20°C sob fotoperíodo de 12 horas com luz branca fluorescente e após 10 a 14 dias de incubação procedeu-se à avaliação (Leslie & Summerell, 2006).

### **2.3 Extração de DNA**

Os fungos foram cultivados em meio líquido à base de extrato de malte 2% por três dias em temperatura ambiente e sob agitação de 100 rpm. O micélio foi filtrado, macerado em nitrogênio líquido e o DNA foi extraído com o uso do kit de extração Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega Brasil, São Paulo, BR).

### **2.4 Identificação de mating type e indução da fase sexuada**

Os idiomorfos *MAT-1* e *MAT-2* foram identificados utilizando *primers* e condições de amplificação de Steenkamp et al. (2000). O *primer* GFmat1a e GFmat1b amplifica um fragmento de 200 pb identificando o idiomorfo *MAT-1*. Com o uso do *primer* GFmat2c e GFmat2d é obtido um fragmento de 800 pb representando o idiomorfo *MAT-2*. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% com GelRed (Biotium®), com posterior visualização realizada em um transluminador. O comprimento dos fragmentos amplificados foi comparado com um marcador de comprimento de fragmentos de 1 Kb do tipo “ladder”. As reações de PCR foram repetidas duas vezes para cada isolado, sendo o *mating type* confirmado apenas quando, nas duas reações, fossem obtidos os mesmos resultados.

Isolados obtidos de *Brachiaria* spp. e cana-de-açúcar foram cruzados com isolados testadores de *mating types* opostos das espécies *F. verticillioides*, *F. thapsinum*, *F. proliferatum* e *F. sacchari* (Tabela 1). Isolados da mesma espécie, obtidos de *Brachiaria* spp. e cana-de-açúcar, foram também cruzados entre si para confirmação da espécie biológica

Os cruzamentos foram realizados de acordo com metodologia padrão para estudo de compatibilidade sexual no FFSC (Leslie & Summerell, 2006). Os isolados usados como parental masculino foram cultivados em tubo de ensaio contendo meio completo e incubados a 20°C sob fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. Os isolados usados como parental feminino foram cultivados em placas de Petri (60 X 15 mm) contendo meio cenoura ágar e incubados a 25°C no escuro por sete dias. Após o período de incubação, foi preparada uma suspensão de esporos usando o parental masculino pela adição de 1 mL de solução de Tween 80 e água destilada esterilizada a 2,5% (v/v). Em seguida, a suspensão foi depositada na superfície da colônia do isolado usado como parental feminino e por meio de uma alça de Drigalski, espalhado de modo a umedecer completamente o micélio. Os cruzamentos foram incubados a 20°C, com fotoperíodo de 12 horas de luz branca fluorescente combinada com luz negra, por um período de até cinco semanas. Foram considerados férteis os cruzamentos que produziram peritécios com exsudação de ascósporos. Os cruzamentos foram repetidos três vezes para confirmação dos resultados.

A viabilidade dos ascósporos foi avaliada pelo teste de germinação em ágar-água 2%. Utilizando um estilete cirros de ascósporos foram coletados, depositados na superfície do meio e espalhados com alça de Drigalski. Posteriormente, as placas foram incubadas a 25°C no escuro por 24 horas. Após do período de incubação, a germinação dos ascósporos foi avaliada sob aumento de 40 vezes em microscópio de luz.

As estruturas da fase sexuada foram caracterizadas, realizando medição do diâmetro do peritécio, comprimento e largura dos ascos e de ascósporos e verificação do número de septos. Foram realizadas 20 medições de cada estrutura, as quais serviram para a comparação com as outras espécies biológicas de FFSC, já descritas na literatura.

## 2.5 Análise filogenética

A amplificação do fragmento do gene que codifica o fator de alongação- $1\alpha$  (EF-1  $\alpha$ ) dos isolados foi realizada utilizando os *primers* Ef - 1 (forward; 5-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC - 3) e Ef - 2 (reverse; 5-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3) (O'Donnell et al., 1998). As reações de PCR foram realizadas no termociclador My Cycler™ (BIO-RAD), com as seguintes condições: 94°C, por 1 minuto; 34 ciclos: 94°C, por 30 segundos, 62°C, por 45 segundos, 72°C, por 1 minuto; 72°C, por 5 minutos (O'Donnell et al., 1998). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium®), com posterior visualização realizada em transiluminador. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Brasil, São Paulo, BR) e preparados para sequenciamento.

Os fragmentos gênicos foram sequenciados, nas direções senso e antisenso, em um sequenciador automático da empresa Macrogen EUA. Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente no programa SeqAssem ver. 07/2008 (SequentiX - Digital DNA Processing, Klein Raden, Alemanha) (Hepperle, 2011) e as sequências editadas foram comparadas na base de dados GenBank, National Center for Biotechnological Information - NCBI, por meio da ferramenta BLAST.



Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos dos isolados foram gerados utilizando-se a ferramenta CLUSTALW (Thompson et al., 1994), implementada pelo programa MEGA 5. Os alinhamentos foram corrigidos manualmente. A análise filogenética foi realizada pelo método de máxima parcimônia por meio do programa MEGA 5 (Tamura et al., 2011). Sequências de referência da região EF-1 $\alpha$  de espécies do FFSC, disponíveis no GenBank, foram incluídas nas análises. Sequências de *F. oxysporum* (NRRL 22902) e *F. inflexum* (NRRL 20433) foram utilizadas para formar o grupo externo.

## 2.6 Genotipagem do potencial micotoxigênico

O potencial toxigênico para a produção de fumonisinas foi determinado por meio da utilização dos *primers* VERTF-1 (5-GCGGGAATTCAAAGTGGCC-3) e VERTF-2 (5-GAGGGCGCGAAACGGATCGG-3), de acordo com Patiño et al. (2004), para todos os isolados obtidos de *Brachiaria* spp. e de cana-de-açúcar. Foi utilizado como controle positivo um isolado de *F. verticillioides* (CML 766) e como controle negativo um isolado de *F. oxysporum* (CML 880). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com GelRed (Biotium<sup>®</sup>), com posterior visualização realizada em um transiluminador.

## 2.7 Teste de patogenicidade

Para testar a patogenicidade em colmos de milho, sorgo e milheto segundo o protocolo descrito por Damicone et al. (1988) foi selecionado um isolado como representante de cada espécie ou linhagem filogenética encontrada: *F. verticillioides* (CML 3041), *F. proliferatum* (CML 3025), *F.*

*thapsinum* (CML 3039), *F. andiyazi* (CML 3042), *F. sacchari* (CML 3160), *Fusarium* sp. 1 (CML 3037) e *Fusarium* sp. 2 (CML 3032).

Sementes de milho, sorgo e milheto foram previamente submetidas a termoterapia a 40°C por 30 min, com objetivo de eliminar possíveis fungos endófitos, e a seguir semeadas em vasos perfurados com a capacidade de 5 L, com mistura de substrato Plantmax® e solo na proporção 1:1, previamente autoclavados. As plantas foram inoculadas 40 dias após o plantio. O inóculo foi produzido em placas de Petri de 9 cm, contendo meio BDA, e mantidas por sete dias sob uma temperatura de 25°C no escuro. Posteriormente, utilizou-se palitos de madeira previamente autoclavados para retirar uma porção de micélio de cada isolado que em seguida foram inseridos nos colmos das plântulas na altura de 1 cm da linha do solo e mantidos em casa de vegetação. Nas testemunhas foram inseridos palitos sem inóculo.

Após 30 dias da inoculação foi realizada a avaliação, através da secção de colmos. Foi avaliada a área lesionada, assim como os níveis de agressividade de cada isolado. Para os experimentos, os tratamentos (isolados) foram arrançados em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Os postulados de Koch foram completados por meio do reisolamento dos fungos inoculados no caule das plantas. O teste de patogenicidade foi realizado duas vezes em períodos diferentes. Os dados foram analisados utilizando-se um pacote estatístico Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados – Sisvar (Ferreira, 2000) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Obtenção de isolados

Foram obtidos 20 isolados provenientes de sementes de *Brachiaria* e oito isolados de cana-de-açúcar provenientes de plantas com sintomas de “*pokkah boeng*”, além de isolados de referência e testadores de espécies do FFSC disponíveis na Coleção Micológica de Lavras CML (Tabela 1).

#### 3.2 Análises filogenéticas

Os 17 isolados obtidos de *Brachiaria* spp., os quais foram sequenciados agruparam com isolados de referência das espécies *F. verticillioides*, *F. thapsinum*, *F. proliferatum* e *F. andiyazi*, todas do FFSC. Uma linhagem separada, *Fusarium* sp. 1, é representada por dois isolados e forma um grupo irmão com *F. denticulatum*. *Fusarium* sp. 2 é representado por três isolados e forma um grupo irmão com várias outras espécies do clado africano do FFSC (Figura 4). Todos os isolados obtidos da cana-de-açúcar agruparam com o tipo de *F. sacchari* (CML 1005) e um isolado de referência (NRRL 13999) dentro do clado asiático (Figura 5).

Tabela 1 Isolados de *Fusarium* provenientes de espécies de *Brachiaria* e da cana-de-açúcar utilizados neste estudo e sequências de referência disponíveis no GenBank utilizadas nas análises filogenéticas

CML	Outro código	Espécie	Hospedeiro	Origem	Isol.	MAT	Tef
3032	MP 192	<i>Fusarium</i> sp. 1	<i>B. decumbens</i>	Campo Grande, MS	2012	1	X
3033	MP 195	<i>F. verticillitoides</i>	<i>B. decumbens</i>	Lavras, MG	2012	2	X
3035	MP 300	<i>F. proliferatum</i>	<i>B. brizantha</i>	Campo Grande, MS	2012	1	
3036	MP 302	<i>F. proliferatum</i>	<i>B. brizantha</i>	Campo Grande, MS	2012	2	X
3037	MP 303	<i>Fusarium</i> sp. 2	<i>B. decumbens</i>	Lavras, MG	2012	1	X
3038	MP 306	<i>F. proliferatum</i>	<i>B. brizantha</i>	Lavras, MG	2013	2	X
3039	MP 309	<i>F. thapsinum</i>	<i>B. brizantha</i>	Lavras, MG	2013	1	X
3040	MP 311	<i>F. andiyazi</i>	<i>B. decumbens</i>	Lavras, MG	2013	1	X
3041	MP 312	<i>F. andiyazi</i>	<i>B. brizantha</i>	Lavras, MG	2012	2	X
3043	MP 318	<i>F. verticillitoides</i>	<i>B. brizantha</i>	Lavras, MG	2012	1	X
3044	MP 320	<i>F. andiyazi</i>	<i>B. brizantha</i>	Lavras, MG	2013	1	X
3045	MP 323	<i>F. thapsinum</i>	<i>B. decumbens</i>	Lavras, MG	2012	1	
3046	MP 324	<i>F. thapsinum</i>	<i>B. brizantha</i>	Lavras, MG	2013	1	X
3047	MP 325	<i>F. thapsinum</i>	<i>B. brizantha</i>	Rondonópolis, MT	2013	2	X
3049	MP 375	<i>Fusarium</i> sp. 2	<i>B. decumbens</i>	Rondonópolis, MT	2012	1	X
3052	MP 382	<i>F. proliferatum</i>	<i>B. decumbens</i>	Água Clara, MS	2013	2	
3056	MP 304	<i>Fusarium</i> sp. 2	<i>B. decumbens</i>	Campo Grande, MS	2012	1	X
3163	MP 193	<i>Fusarium</i> sp. 1	<i>B. decumbens</i>	Campo Grande, MS	2012	1	X
3164	MP 310	<i>F. thapsinum</i>	<i>B. brizantha</i>	Campo Grande	2013	1	X
3165	MP 313	<i>F. verticillitoides</i>	<i>B. decumbens</i>	Lavras, MG	2012	1	X
3158	MP 409	<i>F. sacchari</i>	<i>S. officinarum</i>	Cristália, MG	2014	1	X
3159	MP 411	<i>F. sacchari</i>	<i>S. officinarum</i>	Cristália, MG	2014		X
3160	MP 412	<i>F. sacchari</i>	<i>S. officinarum</i>	Cristália, MG	2014		X
3161	MP 413	<i>F. sacchari</i>	<i>S. officinarum</i>	Cristália, MG	2014		X
3205	MP 402	<i>F. sacchari</i>	<i>Bromelia balansae</i>	Cristália, MG	2014	1	
3232	MP 410	<i>F. sacchari</i>	<i>S. officinarum</i>	Cristália, MG	2014		X

“continua”

Tabela 1 “continuação”

CML	Outro código	Espécie	Hospedeiro	Origem	Isol.	MAT	Tef
3157	NRRL 13999, BBA 63340, KSU 3819, CBS 223.76, E 233	<i>F. sacchari</i>	<i>S. officinarum</i>	India	1976	1	U34414
690		<i>F. sacchari</i>	<i>S. officinarum</i>	Cerquillo, SP			X
1005	CML 768; KSU 03852, FRC M-6865, E 328, FGSC 7610 T	<i>F. sacchari</i>	<i>S. officinarum</i>	EUA		2	X
769	KSU 03853	<i>F. sacchari</i>	<i>S. officinarum</i>	EUA		1	
766	KSU 00999	<i>F. verticillioides</i>	<i>Zea mays</i>	EUA		2	
767	KSU 00149	<i>F. verticillioides</i>	<i>Zea mays</i>	EUA		1	
775	KSU 04094	<i>F. thapsinum</i>	<i>S. bicolor</i>	África do Sul		1	
774	KSU 04093	<i>F. thapsinum</i>	<i>S. bicolor</i>	África do Sul		2	
771	KSU 04854	<i>F. proliferatum</i>	<i>Zea mays</i>	EUA		1	
770	KSU 04853	<i>F. proliferatum</i>	<i>Zea mays</i>	EUA		2	
772	KSU 00990	<i>F. subglutinans</i>	<i>Zea mays</i>	EUA		1	
773	KSU 02192	<i>F. subglutinans</i>	<i>Zea mays</i>	India		2	
880		<i>F. oxysporum</i>					
	ITEM 1142	<i>F. musae</i>	<i>Musa sp.</i>	Ecuador		1	FN545376
	MUCL 43478	<i>F. verticillioides</i>	<i>Zea mays</i>	Califórnia, EUA		1	FN54356
	MUCL 43479	<i>F. verticillioides</i>	<i>Zea mays</i>	Indiana, EUA		2	FN54360
262	CML 262 T	<i>F. tuptense</i>	<i>Mangifera indica</i>	Brasil		2	DQ445781
	NRRL 13308	<i>F. acutatum</i>	desconhecido	India			U34486
	NRRL 13602	<i>F. anthophilum</i>	<i>Hippeastrum sp.</i>	Alemanha			U61541
	NRRL 25181 T	<i>F. concentricum</i>	<i>Musa sapientum</i>	Costa Rica			U61548
	NRRL 13164 T	<i>F. dlamini</i>	<i>Zea mays</i>	África do Sul			U34430
	NRRL 13566	<i>F. fujikuroi</i>	<i>Oryza sativa</i>	Taiwan			U34415
	NRRL 22945 T	<i>F. guttiforme</i>	<i>Ananas comosus</i>	Inglaterra			U34420
	NRRL 13604 T	<i>F. napiforme</i>	<i>Pennisetum typhoides</i>	África do Sul			U34428
	NRRL 13448 T	<i>F. nygamai</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	Austrália			U34426
	NRRL 22902	<i>F. oxysporum</i>	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	EUA			U34424

“continua”

Tabela 1 “conclusão”

CML	Outro código	Espécie	Hospedeiro	Origem	Isol.	MAT	Tef
	NRRL 20433	<i>F. inflexum</i>	<i>Vicia faba</i>	Alemanha			U34435
	NRRL 13617 T	<i>F. phyllophilum</i>	<i>Dracaena deremensis</i>	Itália			U34432
	NRRL 22944	<i>F. proliferatum</i>	<i>Catlexa</i> sp.	Alemanha			U34416
	NRRL 22946 T	<i>F. pseudocircinatum</i>	<i>Solanum</i> sp.	Gana			U34482
	NRRL 13592 T	<i>F. pseudonygamai</i>	<i>Pennisetum typhoides</i>	Nigéria			U34421
	NRRL 25623	<i>F. sterilityphosum</i>	<i>Mangifera indica</i>	desconhecido			AF160344
	NRRL 22016	<i>F. subglutinans</i>	<i>Zea mays</i>	EUA			U34417
	NRRL 22045	<i>F. thapsinum</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	África do Sul			U34418
	NRRL 28852	<i>F. fractiflexum</i>	<i>Cymbidium</i> sp.	Japão			AF160315
	NRRL 25300	<i>F. begoniae</i>	<i>Begonia elatior</i>	Alemanha			U61543
405	NRRL 25331	<i>F. circinatum</i>	<i>Pinus radiata</i>	EUA		I	U61547
	NRRL 13618	<i>F. bulbicola</i>	<i>Nerthe bowdenii</i>	Holanda			U61546
	NRRL 20476	<i>F. bactridoides</i>	<i>Cronartium conigenum</i>	EUA			U34434
	NRRL 13613	<i>F. succisae</i>	<i>Succisa pratensis</i>	Alemanha			U34419
	NRRL 22949	<i>F. udum</i>	desconhecido	Alemanha			U34433
	NRRL 25302	<i>F. denitculatum</i>	<i>Ipomoea batatas</i>	EUA			U61550
	NRRL 25200	<i>F. lactis</i>	<i>Ficus carica</i>	EUA			U61551
	NRRL 25446	<i>F. brevicatenulatum</i>	<i>Striga asiatica</i>	Madagascar			U61545
	NRRL 25206	<i>F. pseudoanthophilum</i>	<i>Zea mays</i>	Zimbábue			U61553
	NRRL 25208	<i>F. ramigenum</i>	<i>Ficus carica</i>	EUA			U61554
	NRRL 25226	<i>F. mangiferae</i>	<i>Mangifera indica</i>	Índia			U61639
	MRC 8544 T	<i>F. konzum</i>	<i>Sorghastrum nutans</i>	EUA			EU220234
	CBS 134430	<i>F. andiyazi</i>	Humanos (neoplasia)	Turquia			KC954401

<sup>a</sup>Código dos isolados: **CML**, Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; **ITEM**, Agri-Food Toxicogenic Fungi Culture Collection, Institute of Sciences of Food Production, Bari, Italy; **MRC**, Medical Research Council, Tygerberg, South Africa; **MUCL**, Mycothe `que de l'Universite Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium; **NRRL**, Northern Regional Research Laboratory, NCAUR, Peoria, Illinois; **FGSC**, Fungal Genetics Stock Center, School of Biological Sciences, University of Missouri, Kansas Center; **CBS**, *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Utrecht, Holanda.

<sup>b</sup>MAT: *Mating type* dos isolados identificados por PCR. MAT-1 = 1; MAT-2 = 2.

### 3.3 Caracterização morfológica

A morfologia das espécies conhecidas, *F. verticillioides*, *F. thapsinum*, *F. andiyazi* e *F. proliferatum*, foi de acordo com os marcadores descritos na literatura (Leslie & Summerell, 2006). Os isolados apresentaram microconídios formados em cadeias longas, cadeias curtas e em falsas cabeças. Os macroconídios apresentaram 3-5 septos, produzidos a partir de esporodóquio de coloração alaranjada em CLA. Em BDA as culturas apresentaram coloração violeta, salmão e alaranjada.

Foram verificadas diferenças morfológicas nas duas novas linhagens filogenéticas. A linhagem filogenética denominada *Fusarium* sp. 1 apresenta microconídios produzidos em cadeias curtas a partir de polifiálides e presença de clamidósporos em cadeias, grupos ou nas extremidades de hifas. Os clamidósporos são verrugosos e de parede dupla. Os macroconídios são produzidos em esporodóquio, apresentam 3-5 septos, com célula apical pouco evidente, medindo 22-34 x 2-4  $\mu\text{m}$ . Em BDA, as culturas apresentaram pigmentação em faixas alternadas de cor violeta. De acordo com os marcadores observados, a linhagem é semelhante a *F. nygamai*.

A linhagem filogenética denominada *Fusarium* sp. 2 apresenta microconídios com 0-1 septos produzidos em falsa cabeça em polifiálides com até três aberturas. Macroconídios são produzidos no micélio aéreo e em esporodóquio, sem diferença em formato e tamanho. Apresentam 3-5 septos, medindo 28-43 x 2-3  $\mu\text{m}$ . Foi observada a produção de clamidósporos globosos, produzidos em cadeias ou grupos. Os microconídios tem formato oval, reniforme e obvoíde, e são produzidos apenas em falsas cabeças (Figura 3). De acordo com os marcadores morfológicos observados, isolados dessa linhagem se assemelha de nenhuma das demais espécies conhecidas até o momento no FFSC.

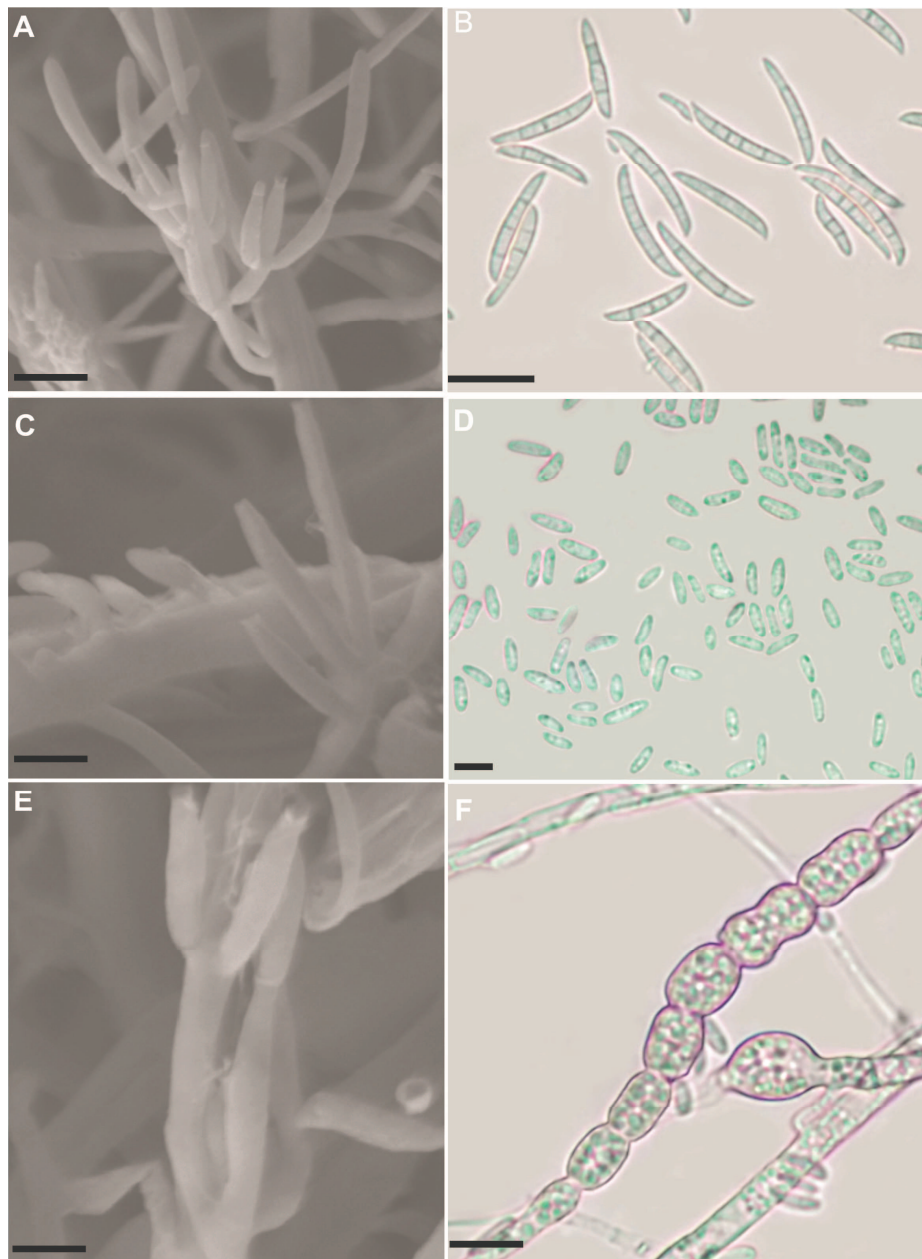


Figura 1 *Fusarium* sp. 1: A. Esporodóquio no micélio aéreo, B. Macroconídios, C-E. Monofiálides, D. Microconídios, F. Clamidósporos em cadeias.



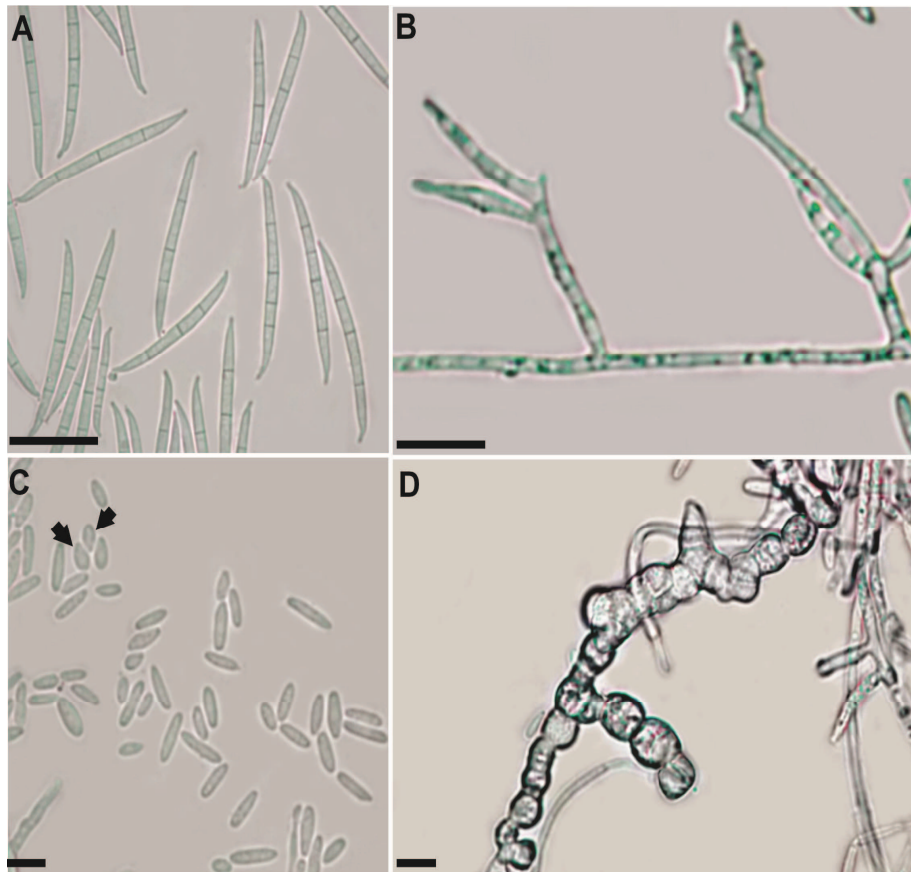


Figura 2 *Fusarium* sp. 2: A. macroconídios, B. polifíalides, C. microconídios, D. clamidósporos em cadeias.

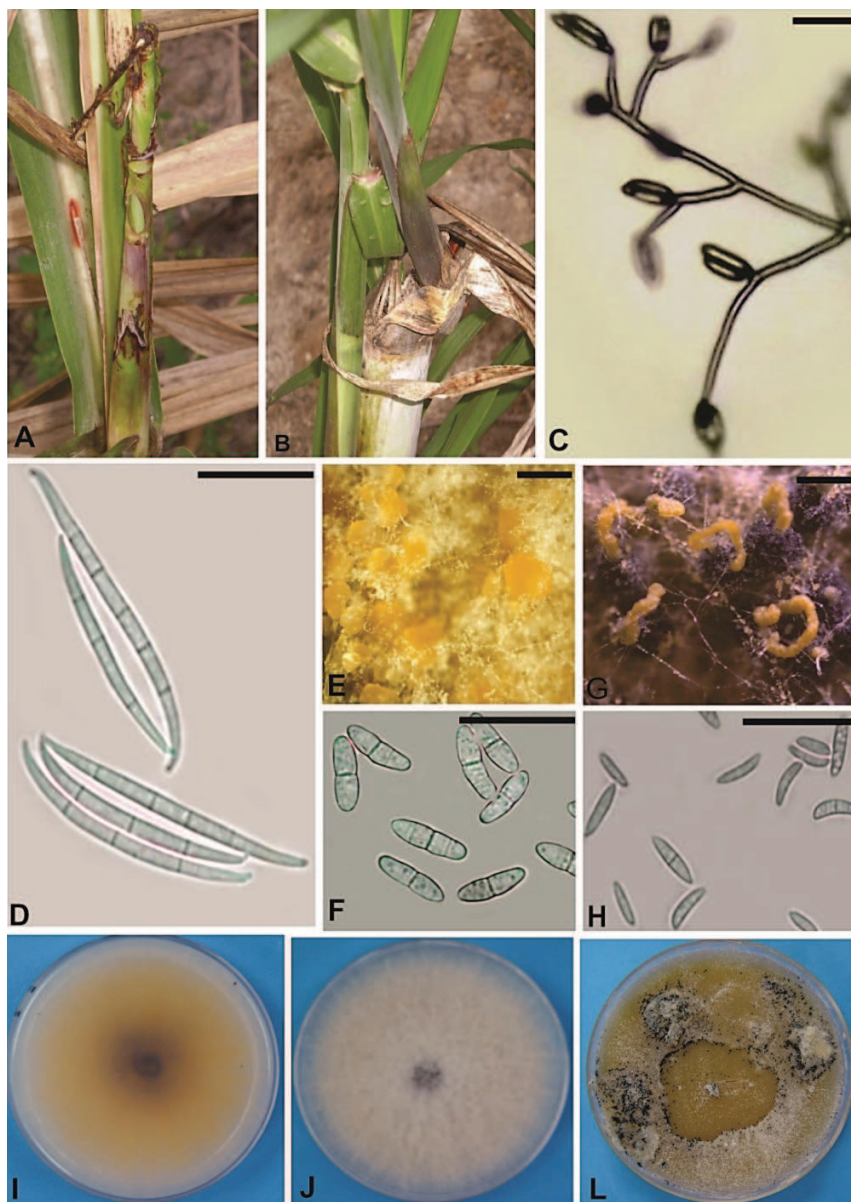


Figura 3 *Fusarium sacchari*: A-B. Sintomas de “pokkah boeng”; C. microconídios em polifiálides; D. macroconídios; E. esporodóquio; G. peritécios exsudando ascósporos; F. Ascósporos bicelulares; H. microconídios; I-J. culturas em BDA; L. Peritécios em cenoura ágar.

### 3.4 Identificação de mating type e indução da fase sexuada

Dos isolados de *Brachiaria* spp. estudados 14 foram identificados como idiomorfo *MAT-1* e seis como idiomorfo *MAT-2* (Tabela 1). Nos cruzamentos com isolados de *F. verticillioides* e de *F. thapsinum* foi observada a formação de peritécios e exsudação de ascósporos após quatro semanas de avaliação com os testadores de *F. verticillioides* (KSU 0149 e KSU 0999) e *F. thapsinum* (KSU 4093 e KSU 4094) respectivamente (Tabela 1). Os isolados de *F. sacchari* foram altamente férteis com produção de muitos peritécios e exsudação de ascósporos três semanas após o cruzamento quando cruzados com os testadores (KSU 3852 e KSU 3853). Nos cruzamentos entre os isolados *F. proliferatum* obtidos e os isolados testadores (KSU 4853 e KSU 4854) não houve formação de peritécios. Os ascósporos exsudados pelos peritécios nos cruzamentos mostraram-se viáveis, germinando após 12 horas de incubação. As avaliações das características morfológicas do teleomorfo observadas nos cruzamentos estão de acordo com as características descritas na literatura (Leslie & Summerell, 2006).

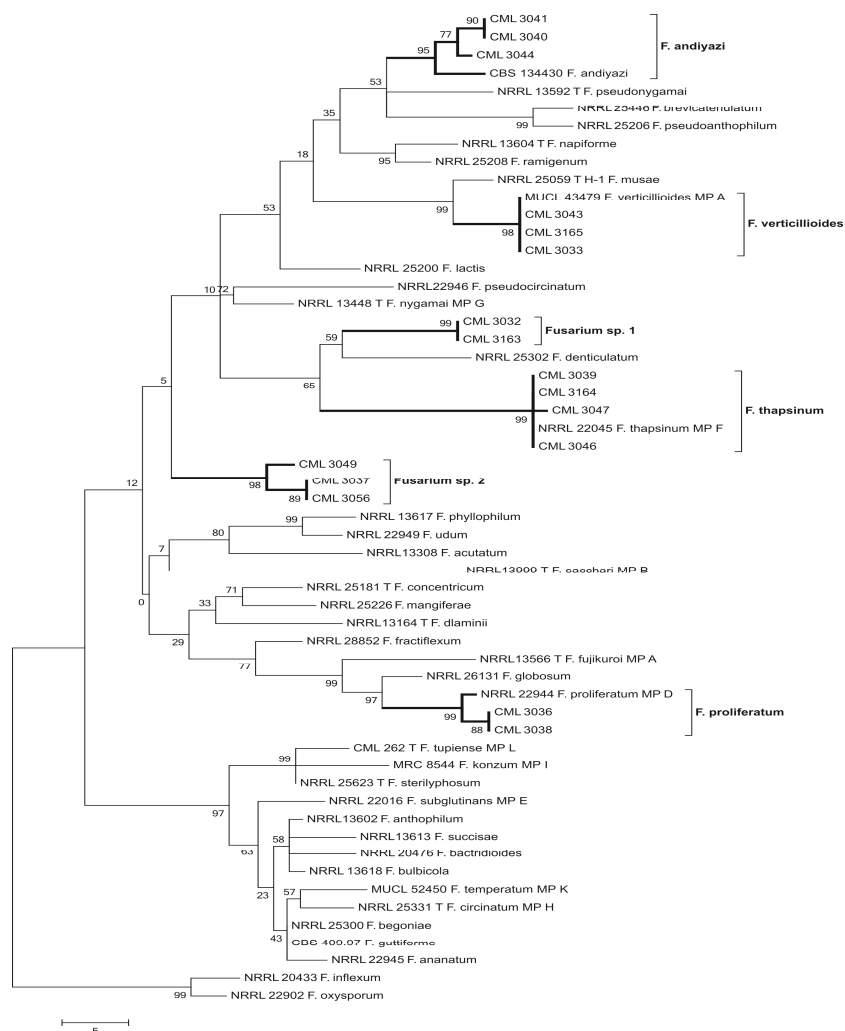


Figura 4 Análise de Máxima Parcimônia de seqüências *EF-1α* de isolados de *Brachiaria*, incluindo seqüências de material de referência do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore, e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos internódios. Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras; NRRL = Northern Regional Research Laboratory, Peoria IL, EUA; FGSC = Fungal Genetics Stock Center, Kansas City MS, EUA; CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda.



Figura 5 Análise de Máxima Parcimônia de seqüências *EF-1α* de isolados de *Saccharum officinarum*, incluindo seqüências de referência do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore, e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos internódios. Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras; NRRL = Northern Regional Research Laboratory, Peoria IL, EUA; FGSC = Fungal Genetics Stock Center, Kansas City MS, EUA; CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda.

### 3.5 Genotipagem do potencial micotoxigênico

Os *primers* VERTF-1 e VERTF-2, marcadores para síntese de fumonisina, geraram um fragmento gênico de aproximadamente 400 pb para todos os isolados de *F. verticillioides*, *F. thapsinum*, *F. proliferatum* e *F. sacchari* testados e para o isolado de *F. verticillioides* (CML 766) utilizado como controle positivo. Entretanto, não houve amplificação para o isolado de *F. oxysporum* (CML 880), utilizado como controle negativo.

### 3.6 Teste de patogenicidade

No teste de patogenicidade todos os sete isolados avaliados induziram sintomas de podridão em colmos de milho, sorgo e milheto (Figura 6). Foram observados sintomas evidentes de escurecimento no interior do colmo de todas as plantas. Todos os isolados inoculados levaram à colonização dos dutos vasculares no interior do colmo. Foi realizado o reisolamento dos isolados inoculados o que confirmou a presença de *Fusarium* em todos os colmos com sintomas de podridão.

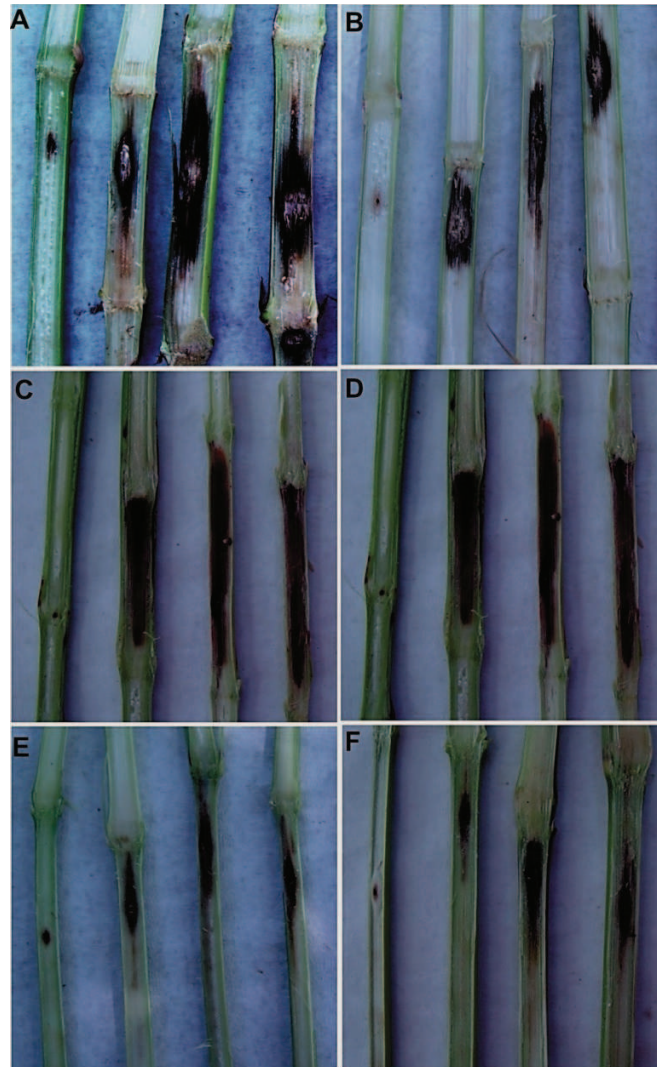


Figura 6 Teste de patogenicidade das duas novas linhagens de *Fusarium*: A. sintomas de podridão de colmo em milho, induzidos por *Fusarium* sp. 1; B. milho, *Fusarium* sp. 2; C. sorgo, *Fusarium* sp 1; D. sorgo, *Fusarium* sp. 2; E. milheto, *Fusarium* sp. 1; F. milheto, *Fusarium* sp. 2.

#### 4 DISCUSSÃO

A presença de espécies do FFSC associadas a espécies de *Brachiaria* como endófitos reforça a hipótese de que estas espécies possuem estratégias de sobrevivência em gramíneas não cultivadas. Devido ao fato destas espécies causarem podridão de colmo em milho, sorgo e milheto, fica evidente que as espécies de *Brachiaria* estão servindo como fonte de inóculo oferecendo risco para essas culturas. Nesse estudo foi verificado que *F. verticillioides* e *F. thapsinum* são as espécies que predominam em espécies de *Brachiaria* no Brasil e que *F. sacchari* está associado à cana-de-açúcar causando “*pokkah boeng*”.

A presença de quatro membros do FFSC associados a *Brachiaria* como endofíticos ou causando infecção latente sugere que estas espécies conhecidas do milho e sorgo tem espécies de *Brachiaria* como hospedeiras. A distribuição de *F. verticillioides* é ampla possuindo outros hospedeiros principalmente espécies pertencentes à família Poaceae (Leslie & Summerell, 2006).

Os isolados de campo, obtidos de *Brachiaria* spp. do Brasil, formaram peritécios férteis quando cruzados com os respectivos testadores, *F. verticillioides* dos Estados Unidos e *F. thapsinum* da África, comprova que não existem barreiras reprodutivas entre as populações. O mesmo ocorreu com os isolados obtidos de *S. officinarum*, que produziram cruzamentos férteis com os testadores de *F. sacchari* provenientes da América do Norte e da Índia.

Este estudo fornece o primeiro registro das espécies *F. andiyazi*, *F. thapsinum* e *F. verticillioides* associadas ao gênero *Brachiaria*. Essas espécies são conhecidas por serem específicas dos gêneros *Sorghum* e *Penisetum* na África (Leslie et al., 2005). O fato de se encontrar *Fusarium* apenas nas sementes sugere que esses fungos penetrem na planta via estigma floral. Este evento da infecção pela flor foi observado em *F. verticillioides* associado ao milho (Duncan & Howard, 2010). A presença desse fungo em outras espécies de



gramíneas como *Brachiaria*, evidencia que o leque de plantas hospedeiras é, na verdade, não restrito. O fato que *Brachiaria* é hospedeira de espécies produtoras de micotoxinas e importantes patógenos chama a atenção para o risco de se utilizar consórcios de espécies de *Brachiaria* com outras espécies cultivadas.

Duas novas linhagens filogenéticas foram identificadas neste estudo e ambas pertencem ao clado africano. É provável que essas espécies tenham sido introduzidas via material propagativo, uma vez que o gênero *Brachiaria* possui centro de origem na África. Nas duas linhagens foi observada a presença de clamidósporos, um marcador morfológico de algumas espécies do clado africano. Após avaliação de mais isolados, essas linhagens devem ser descritas formalmente como novas espécies.

Apesar de o Brasil ser o maior produtor de cana de açúcar, até o momento não havia relato de *F. sacchari* associado a esta cultura. Este fato pode ser explicado pela identificação de fungos apenas com base em caracteres morfológicos e não pela utilização de técnicas modernas de identificação. Ainda pode-se observar o uso de nomes obsoletos como “*F. moniliforme* var. *subglutinans*” ou “*F. moniliforme*” sendo utilizados para o agente causal de “*pokkah-boeng*” ou podridão de colmo da cana. Não é possível distinguir morfológicamente *F. sacchari* de *F. subglutinans*, *F. circinatum*, *F. mangiferae* e *F. temperatum* (Kvas et al., 2009; Scaufaire et al., 2011). Isolados obtidos de milho e arroz foram identificados morfológicamente como *F. subglutinans*, no entanto, na análise filogenética do gene EF 1- $\alpha$ , estes mesmos isolados foram identificados como *F. sacchari* (Hsuan et al., 2011). Essa doença é encontrada com frequência em canaviais da Malásia e China.

Alguns isolados de *F. sacchari* apresentam microconídios piriformes (Chen, 1994) e *F. beomiforme* compartilha o mesmo marcador morfológico (Nelson et al., 1987). *F. sacchari* produz mesoconídios no micélio aéreo contendo 1-2 septos, características observadas também em *F. temperatum*, um

novo membro do FFCS (Scauflaire et al., 2011). Com a utilização de teste compatibilidade sexual e marcadores moleculares ambas as espécies podem ser diferenciadas claramente.

É possível que *F. sacchari* esteja presente em vários plantios de cana-de-açúcar no Brasil. Este fungo tem a capacidade de sobreviver em tecidos meristemáticos por longos períodos e é disseminado via colmos infectados (Leslie & Summerell, 2006). Na Austrália *F. sacchari* obtido de arroz selvagem causou podridão de raízes em plantas de sorgo, arroz e milho (Petrovic et al., 2013).

Até o momento não se tinha relato de *F. sacchari* causando “pokkah boeng” em milho, milheto e sorgo. Além de *F. sacchari*, também existem relatos da presença de *F. proliferatum* e *F. verticillioides* associados a sintomas de “pokkah boeng” em cana-de-açúcar (Siti Nordahliawate et al., 2008; Lin et al., 2014).

*F. sacchari* pertence ao clado asiático sendo o gênero *Sacharum* introduzido em várias partes do mundo nos períodos de colonização. Existe a hipótese de que o fungo foi disseminado via material propagativo (O’Donnell et al., 1998). Para esta espécie a teoria da biogeografia é consistente uma vez que o gênero *Saccharum* apresenta centro de origem no continente asiático.

De acordo com os resultados encontrados, existe uma diversidade de espécies do FFSC associadas a *Brachiaria* como endófitos. Entretanto quando inoculadas em milho, sorgo e milheto, todas as espécies testadas mostraram-se patogênicas. Além das espécies já descritas na literatura foram encontradas mais duas linhagens filogenéticas no FSSC associadas a *Brachiaria* que pertencem ao clado africano. *F. sacchari* é registrado pela primeira vez em cana de açúcar no Brasil. Todas as espécies encontradas tanto em *Brachiaria* como na cana-de-açúcar são potencialmente produtoras de fumonisinas.

## REFERÊNCIAS

- Burgess LW, Summerell BA (1992) Mycogeography of *Fusarium*. Survey of *Fusarium* species from subtropical and semi-arid grassland soil from Queensland, Australia. *Mycological Research* 96:780-784.
- Carter LLA, Leslie JF, Webster RK (2008) Population structure of *Fusarium fujikuroi* from California rice and water grass. *Phytopathology* 98:992-998.
- Chen FJ (1994) Genetic analysis of pyriform microconidium production in mating population B of *Gibberella fujikuroi*. *Canadian Journal of Botany* 72:1209-1210.
- Damicone PJ, Vineis PD, Manning WJ (1988) Cross-pathogenicity of *Fusarium moniliforme* isolates from corn and asparagus. *Plant Disease* 72:774-777.
- Duncan KE, Howard RH (2010) Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23:6-16.
- Ferreira DF (2000) Análise estatística por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: Reunião anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45., 2000, São Paulo. Anais São Paulo: SIB. p. 255-258.
- Hepperle D (2011) SeqAssem©: a sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Win32-Version. Disponível em: <<http://www.sequentix.de>>.
- Hsuan HM, Salleh B, Zakaria L (2011) Molecular identification of *Fusarium* species in *Gibberella fujikuroi* species complex from rice, sugarcane and maize from peninsular Malaysia. *International Journal Molecular Sciences* 12:6722-6732. doi:10.3390/ijms12106722
- Klittich CJR, Leslie JF, Nelson PE, Marasas WFO (1997) *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): new species in section Liseola from sorghum. *Mycologia* 89:643-652.
- Kvas M, Marasas WFO, Wingfield BD, Wingfield MJ, Steenkamp ET (2009) Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Diversity* 34:1-21.

Leslie JF, Zeller KU, Logrieco A, Mulè G, Moretti A, Ritiene A (2004) Species diversity of and toxin production by *Gibberella fujikuroi* species complex strains isolated from native prairie grasses in Kansas. *Applied and Environmental Microbiology* 70:2254-2262.

Leslie JF, Zeller K, Lamprecht S, Rheeder JP, Marasas WFO (2005) Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from sorghum and millet. *Phytopathology* 95:275-283.

Leslie JF, Summerell BA (2006) *The Fusarium laboratory Manual*. Sydney. Blackwell. 388p.

Lin Z, Xu S, Que S, Wang Y, Comstock JC, Wei J, McCord PH, Chen B, Chen R, Zhang M (2014) Species-specific detection and identification of *Fusarium* species complex, the causal agent of sugarcane pokkah boeng in China. *PLoS ONE* 9(8): e104195. doi:10.1371/journal.pone.0104195

Nelson PE, Toussoun TA, Burgess LW (1987) Characterization of *Fusarium beomiforme* sp. nov. *Mycologia* 79: 889-889.

O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg HI (1998) Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:465-493.

Patiño B, Mirete S, González-Jaén MT, Mulé G, Rodríguez MT, Vázquez C (2004) PCR detection assay of fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. *Journal of Food Protection* 67:278-283.

Petrovic T, Burgess LW, Cowie I, Warren RA, Harvey PR (2013) Diversity and fertility of *Fusarium sacchari* from wild rice (*Oryza australiensis*) in northern Australia, and pathogenicity tests with wild rice, rice, sorghum and maize. *European Journal Plant Pathology* 136:773-788.

Scauflaire J, Gourgue M, Munaut F (2010) *Fusarium temperatum*, sp. nov. from maize, an emergent species closely related to *Fusarium subglutinans*. *Mycologia* 103:586-597.

Siti Nordahliawate MS, Nur Ain Izzati MZ, Azmi AR, Salleh B (2008) Distribution, morphological characterization and pathogenicity of *Fusarium sacchari* associated with pokkah boeng disease of sugarcane in Peninsular Malaysia. *Pertanika Journal Tropical Agricultural Sciences* 31:279-286.

Steenkamp ET, Wingfield BD, Coutinho TA, Zeller KA, Wingfield MJ, Marasas WFO, Leslie JF (2000) PCR-based identification of MAT-1 and MAT-2 in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4378-4382.

Summerell BA, Rugg CA, Burgess LW (1995) Characterization of *Fusarium babinda* sp. nov. *Mycological Research* 99:1345-1348.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stercher G, Nei M, Kumar S (2011) Mega5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research* 22:4673-4680.

Walsh JL, Laurence MH, Liew ECY, Sagalang AE, Burgess LW, Summerell BA, Petrovic T. (2010) *Fusarium*: two endophytic novel species from tropical grasses of northern Australia. *Fungal Diversity* 44:149-159.

Zeller KA, Summerell BA, Bullock S, Leslie JF (2003) *Gibberella konza* (*Fusarium konzum*) sp. nov., from prairie grasses, a new species in *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 95:943-954.

**CAPÍTULO 4 *Fusarium musae* agente etiológico da podridão da coroa em frutos de banana no Brasil**

Maruzanete Pereira de Melo<sup>1</sup>, Elaine Aparecida Guimarães<sup>1</sup>, Sarah S. Costa<sup>1</sup>, José Aires Ventura<sup>2</sup>, Ludwig H. Pfenning<sup>1</sup>

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 3037, 37200-000, Lavras-MG, Brasil, Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural - Incaper, 29052-010, Vitória, ES, Brasil.

Manuscrito preparado para submissão à revista Tropical Plant Pathology (JCR 2013: 0,554)

## RESUMO

Podridão da coroa é uma doença pós-colheita de bananas. O agente causal desta doença é *Fusarium musae*, membro do complexo *Fusarium fujikuroi* - FFSC. *F. musae* compartilha os marcadores morfológicos de *F. verticillioides*, mas pertence a uma espécie filogenética e biológica distinta. A doença é observada eventualmente no Brasil, entretanto não existem informações consistentes sobre a sua etiologia. O objetivo desse trabalho foi caracterizar espécies de *Fusarium* associadas a frutos de banana por meio de análise filogenética das regiões *EF-1 $\alpha$* , *tub2* e *RPB2*, testes de compatibilidade sexual, marcadores morfológicos e teste de patogenicidade. Os isolados provenientes do Brasil agruparam com isolados de referência em um único clado, baseado na análise MP de três regiões gênicas. Em cruzamentos feitos em laboratório, cruzam entre si e com isolados de referência, formando peritécios férteis. Na avaliação de oito genótipos de bananeira, inoculados com *F. musae*, a doença foi induzida em todos, sendo que três demonstraram algum nível de resistência. Outras espécies identificadas em associação foram *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. equiseti* e *F. camptoceras*, no entanto sua patogenicidade a bananas não foi comprovada. Esse é o primeiro relato de *F. musae* no Brasil, viabilizando o futuro monitoramento da doença e o desenvolvimento de programas dirigidos de melhoramento.

Palavras-chave: *Fusarium fujikuroi* species complex. *Musa*. Filogenia multigênica. Fontes de resistência. *Mating population*.

## ABSTRACT

### ***Fusarium musae* causal agent of crown rot of bananas in Brazil**

Crown rot of banana is a post-harvest disease of banana fruits. The pathogen is known as *Fusarium musae*, a member *Fusarium fujikuroi* species complex – FFSC. It is well defined as distinct phylogenetic and biological species, even though morphological markers are almost identical to *F. verticillioides*. It can eventually be observed in Brazil, but no consistent information about its etiology is available. The objective of this study was to characterize *Fusarium* species associated with bananas by means of phylogenetic analyses of the *EF-1 $\alpha$* , *tub2* and *RPB2*, laboratory crosses, morphological markers and pathogenicity tests. Isolates from Brazil grouped with reference isolates of *Fusarium musae* in a unique strongly supported clade. When crossed with itself and with reference strains of *F. musae*, the production of fertile perithecia was observed. Selected isolates were inoculated in eight different varieties of banana and induced disease in all of them. Indeed, three genotypes showed some resistance to the pathogen. Other species associated to bananas were identified, as *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. equiseti* and *F. camptoceras*, but its pathogenicity is not confirmed. This is the first report of *F. musae* in Brazil. The findings will contribute to the correct identification of the pathogen, the future monitoring of the disease and the development of breeding programs searching for resistant varieties.

Keywords: *Fusarium fujikuroi* species complex. *Musa*. Mating population. Multigene phylogeny. Sources of resistance.



## 1 INTRODUÇÃO

A podridão da coroa é uma doença pós-colheita comum associada a frutos de banana, sendo um problema prevalente em regiões tropicais. Perdas consideráveis foram observadas em frutos exportados de importantes áreas produtivas da América Central e Leste da África para mercados consumidores. Existem duas típicas doenças em pós-colheita associadas a frutos de banana, a podridão de frutos e a podridão da coroa ou do pedúnculo (Ploetz et al., 1994; Hirata et al., 2001; Lassois et al., 2010). As infecções ocorrem na superfície dos cortes realizados nos processos de colheita e embalagem. Os sintomas iniciais são amolecimento e escurecimento do tecido superficial do corte, onde é possível observar a presença de um complexo de fungos. Na seqüência, o patógeno penetra no pedicelo e, em seguida, no tecido da polpa. Embora a podridão seja restrita a coroa, em vários casos o apodrecimento pode atingir a polpa dos frutos causando grandes perdas. Caso ocorram infecções severas, os frutos podem-se destacar do pedúnculo (Greene & Goos, 1963; Ploetz et al., 1994). Além dos fungos, fatores abióticos estão envolvidos com esta etiologia. A presença de fungos em conjunto com a produção de etileno acelera a maturação (Lassois et al., 2010).

A primeira pesquisa que menciona a relação entre *Fusarium* e o gênero *Musa* foi realizada na América Central, onde várias espécies de *Fusarium* foram observadas, inclusive “*F. moniliforme*” (Wollenweber & Reinking, 1925). Um estudo realizado no Japão investigou a ocorrência de *F. verticillioides* em frutos de bananas importadas e os comparou com isolados obtidos do milho. Foi constatado que isolados do milho não causaram doença quando inoculados em frutos de banana (Hirata et al., 2001). Análises de AFLP, teste de compatibilidade sexual, testes de patogenicidade e produção de toxinas revelaram que populações de *F. verticillioides* de banana e milho possuem

características distintas (Moretti et al., 2004). Em 2011, a espécie *F. musae* foi descrita como novo membro do complexo *Fusarium fujikuroi* (FFSC), representando uma espécie biológica e filogenética distinta, embora compartilhe os marcadores morfológicos de *F. verticillioides*. Outra característica da nova espécie é que não produz fumonisinas (van Hove et al., 2011). Diversas outras espécies do FFSC foram observadas em associação a frutos de banana na América Central e Ásia (Jimenez et al., 1993). A espécie *F. concentricum* foi reportada associada a *Musa sapientum*, no entanto não existe evidencia desta espécie causar podridão (Nirenberg & O'Donnell, 1998). Outras espécies como *F. camptoceras*, *F. equiseti*, *F. musaram* e *F. semitectum* foram registradas em associação com frutos de banana (Leslie & Summerell, 2006; Marasas et al., 1998). *Fusarium thapsinum*, um conhecido patógeno do sorgo, foi isolado de caule de banana (Klittich et al., 1997). Além dos danos que essas espécies podem causar na fase de pós colheita, algumas são potencialmente produtoras de micotoxinas (Jimenez et al., 1997; Moretti et al., 2004; Leslie & Summerell, 2006).

No Brasil existe relato de *F. roseum* e *F. moniliforme* associado à podridão da coroa (Mendes et al., 1998; Cordeiro & Matos, 2005). No entanto, ambos os nomes são hoje considerados obsoletos. De fato, *F. musae* ainda não foi registrado no Brasil, embora exista evidência de sua presença, devido à observação de *Fusarium* associado à podridão da coroa em frutos comercializados. O objetivo desse estudo foi (i.) investigar quais espécies ocorrem em associação com frutos de banana no Brasil; (ii.) verificar se a espécie *F. musae* ocorre no Brasil; e (iii.) avaliar se há fontes de resistência em genótipos comuns de bananeira. Os isolados obtidos foram avaliados por análise filogenética, compatibilidade sexual, marcadores morfológicos e testes de patogenicidade.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção dos isolados

Foram utilizados neste estudo isolados de *Fusarium* obtidos de pencas de bananas com sintomas de podridão da coroa provenientes de regiões produtoras de Minas Gerais, além de isolados de referência das espécies do FFSC (Tabela 1). Foi realizado isolamento direto, transferindo-se porções do micélio do fungo presente na superfície do tecido vegetal. Culturas monospóricas dos isolados foram preservadas em microtubos, armazenados a 10°C no escuro no escuro, e criopreservadas como suspensão de esporos em 15% glicerol a -80°C, na Coleção Micológica de Lavras (CML), Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA).

### 2.2 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica dos isolados foi realizada seguindo as especificações descritas em Nirenberg & O'Donnell (1998) e Leslie & Summerell (2006). Os isolados foram crescidos em placas plásticas de Petri de 6 cm de diâmetro, nos meios batata dextrose ágar (BDA) e em *synthetic low nutrient agar* (SNA) com folha de cravo e foram incubados em BOD, a 25°C no escuro e a 20°C com fotoperíodo de 12 horas, respectivamente. A morfologia, pigmentação, odor e taxa de crescimento das colônias foram avaliadas em BDA após quatro dias da inoculação. As características micromorfológicas foram avaliadas em SNA com folha de cravo 14 dias após a inoculação.

### 2.3 Extração de DNA

Os fungos foram cultivados por três dias em meio líquido com extrato de malte 2%, em temperatura ambiente e sob agitação de 100 rpm. O micélio foi filtrado, macerado em nitrogênio líquido e o DNA foi extraído com o uso do kit de extração Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega Brasil, São Paulo, BR).

### 2.4 Identificação de mating type e indução da fase sexuada

O idiomorfo *MAT1* foi identificado utilizando-se os *primers* GFmat1a (forward; 5-GTTCATCAAAGGGCAAGCG-3) e GFmat1b (reverse; 5-TAAGCGCCCTCTTAACGCCTTC -3), gerando um fragmento de 200 pb, com condições de amplificação de acordo com Steenkamp et al. (2000). Para a identificação do idiomorfo *MAT2*, utilizou-se os *primers* *fusHMGfor* (forward; 5- CGACCTCCCAAYGCYTACAT-3) e *fusHMGrev* (reverse; 5-TGGGCGGTACTGGTARTCRGG-3) gerando um fragmento de 260 pb com condições de amplificação de acordo com Kerényi et al. (2004). O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% com GelRed (Biotium®), com posterior visualização realizada em um transluminador. O comprimento dos fragmentos amplificados foi comparado com um marcador de comprimento de fragmentos 1 Kb. As reações de PCR foram repetidas duas vezes para cada isolado, sendo o *mating type* confirmado apenas quando, nas duas reações, forem obtidos os mesmos resultados.

Isolados obtidos de banana foram cruzados entre si e com testadores de *F. musae*, *F. verticillioides* e *F. thapsinum* de *mating types* opostos (ITEM 1245 *MAT-2* ), (KSU 00149 *MAT-1* e KSU 00999 *MAT-2*) e (KSU 04094 *MAT-1* e KSU 04093 *MAT-2*). O isolado de *F. subglutinans* foi cruzado com os isolados

testadores para esta espécie (KSU 00990 *MAT-1* e KSU 02192 *MAT-2*) e os isolados de *F. proliferatum* foi cruzado com os isolados testadores para esta espécie (KSU 04854 *MAT-1* e KSU 04853 *MAT-2*).

Os isolados de um determinado *mating type*, utilizados como parental masculino foram cultivados em tubo de ensaio contendo meio completo e mantidos a 20°C, sob fotoperíodo 12 h por sete dias. Os isolados do *mating type* oposto, utilizado como parental feminino, foram cultivados em placas de Petri de poliestireno (60 x 15 mm), em meio de CA, e mantidos a 25°C no escuro por 7 dias. Após o período de incubação, foi preparada uma suspensão de esporos 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, foi espalhada de modo a umedecer completamente o micélio. Os cruzamentos foram mantidos a 22-23°C, com luz branca fluorescente constante, por um período de até 6 semanas (Leslie and Summerell, 2006). As avaliações foram realizadas semanalmente e os cruzamentos foram considerados férteis quando os peritécios produzidos exsudavam ascósporos. Os cruzamentos foram repetidos 3 vezes, para confirmação dos resultados.

Ascósporos exsudados por peritécios de todos os cruzamentos férteis foram transferidos em ágar-água 2% para verificar se são viáveis, germinando após 24 a 32 horas de incubação. As estruturas da fase sexuada foram caracterizadas, realizando medição do diâmetro do peritécio, comprimento e largura dos ascos e de ascósporos e verificação do número de septos. Foram realizadas 20 medidas de cada estrutura, as quais serviram para a comparação com as outras espécies biológicas de FFSC, já descritas na literatura.

## 2.5 Análise filogenética

A amplificação do fragmento do gene Fator de elongação -1 $\alpha$  (EF-1  $\alpha$ ) dos isolados foi realizada utilizando os *primers*: Ef - 1 (forward; 5-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC - 3) e Ef - 2 (reverse; 5-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3) (O'Donnell et al., 1998). Para a amplificação do fragmento da segunda maior subunidade da RNA polimerase (RPB2), foram utilizados os *primers* 5F2 (forward; 5-GGGGWGAYCAGAAGAAGGC-3) e 7cR (reverse; 5-CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT-3) (O'Donnell et al., 2008). Para o gene da  $\beta$ -tubulina (*tub2*) foram utilizados os *primers* T1 (forward; 5-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3) e T2 (reverse; 5-TAGTGACCCTTGCCCCAGTTG-3). As reações de PCR foram realizadas no termociclador My Cycler™ (BIO-RAD). As condições de ciclo para EF-1 $\alpha$  foram: 94°C, por 1 minuto; 34 ciclos: 94°C, por 30 segundos, 62°C, por 45 segundos, 72°C, por 1 minuto; 72°C, por 5 minutos (O'Donnell et al., 1998). Para RPB2, o programa de ciclos foi: 94°C, por 90 segundos; 40 ciclos: 94°C, por 30 segundos; 55°C, por 90 segundos e 1 ciclo 68°C, por 2 minutos; 68°C por 5 minutos (O'Donnell et al., 2008). Para *tub2* as condições de ciclo foram: 94°C, por 1 minuto; 34 ciclos: 94°C, por 30 segundos, 62°C, por 45 segundos, 72°C, por 1 minuto; 72°C, por 5 minutos (O'Donnell & Cigelnik, 1997). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium®), com posterior visualização realizada em um transluminador. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Brasil, São Paulo, BR) para posteriormente, serem sequenciados.

Os fragmentos gênicos foram sequenciados, nas direções senso e antisenso, em um sequenciador automático da empresa Macrogen, USA. Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente com o auxílio do programa SeqAssem ver. 07/2008 (SequentiX - Digital DNA Processing, Klein Raden, Germany) (Hepperle, 2011) e as sequências editadas foram comparadas com a base de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information - NCBI, por meio da ferramenta BLAST.

Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos de *F. musae* foram gerados utilizando-se a ferramenta CLUSTALW (Thompson et al., 1994), implementada pelo programa MEGA 5. Os alinhamentos foram corrigidos manualmente. A análise filogenética foi realizada pelo método de máxima parcimônia por meio do programa MEGA 5 (Tamura et al., 2011). Sequências de referência correspondentes aos genes *EF-1 $\alpha$* , *RPB2* e *tub 2*, de espécies do FFSC previamente depositadas no GenBank, também foram acrescentadas às análises. Sequências de *Fusarium oxysporum* e *F. inflexum* foram utilizadas como *outgroup*.

## 2.6 Genotipagem do potencial micotoxigênico

O potencial toxigênico para a produção de fumonisinas foi determinado por meio da utilização dos *primers* VERTF-1 (5-GCGGGAATTCAAAAGTGGCC-3) e VERTF-2 (5-GAGGGCGCGAAACGGATCGG-3) como descrito em Patino et al. (2004), para todos os isolados de *F. musae*. Como controle positivo foi utilizado um isolado de *F. verticillioides* (CML 766) e como controle negativo um isolado de *F. oxysporum* (CML 755). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com GelRed (Biotium®), com posterior visualização realizada em um transiluminador.

## 2.7 Avaliação da susceptibilidade de cultivares de bananeira a *F. musae*

Foram selecionados três isolados de *F. musae* (CML 2587, CML 2863, CML 2864) para inoculação em frutos das cultivares Vitória (AAAB), cv. Japira (AAAB), cv. Prata, cv. Tropical (AAAB), cv. Nanicao (AAA), cv. Prata Anã (AAB), cv. Terra (AAB), e cv. Prata Zulu (AAB) para a avaliação da susceptibilidade. Os frutos foram lavados em água corrente, desinfestados superficialmente usando álcool 70% e hipoclorito de sódio 1% e, novamente, lavados com água destilada esterilizada.

O inóculo foi cultivado em placas de Petri de 9 cm, contendo meio BDA, e mantidas por seis dias sob uma temperatura de 25°C no escuro. Posteriormente, dois discos de micélio com aproximadamente 4 mm foram retirados de colônias desenvolvidas e introduzidos na casca dos frutos. A testemunha recebeu apenas discos do meio BDA sem o fungo. Os tratamentos (isolados) foram arrançados em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. O postulado de Koch foi completado por meio do reisolamento dos isolados inoculados no fruto das plantas. Este experimento foi realizado duas vezes em períodos diferentes. As avaliações foram realizadas após oito dias da inoculação. Os dados foram analisados utilizando um pacote estatístico Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados – Sisvar (Ferreira, 2000) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



### 3 RESULTADOS

Foi composta uma coleção de 15 isolados de *Fusarium*, obtidos de pencas de bananas com sintomas de podridão da coroa provenientes de regiões produtoras de Minas Gerais. Destes isolados, sete foram identificados como *F. musae*, três como *F. proliferatum*, dois como *F. camptoceras*, dois como *F. equiseti* e um como *F. subglutinans* (Tabela 1).

Tabela 1 Isolados de *Fusarium* analisados neste estudo

CML	Outro código	Espécie	Hospedeiro	Origem	Isolamento	MAT <sup>a</sup>
2500	MP 90	<i>F. musae</i>	<i>Musa</i> sp.	Brasil, Janaúba MG	2012	1
2501	MP 91	<i>F. musae</i>	<i>Musa</i> sp.	Brasil, Janaúba MG	2012	1
2502	MP 92	<i>F. musae</i>	<i>Musa</i> sp.	Brasil, Janaúba MG	2012	T-1
2503	MP 93	<i>F. musae</i>	<i>Musa</i> sp.	Brasil, Janaúba MG	2012	1
2504	MP 94	<i>F. musae</i>	<i>Musa</i> sp.	Brasil, Janaúba MG	2012	2
2863	MP 271	<i>F. musae</i>	<i>Musa</i> sp.	Brasil, Ijaci MG	2013	1
2864	MP 272	<i>F. musae</i>	<i>Musa</i> sp.	Brasil, Ijaci MG	2013	2
2587	ITEM 1245	<i>F. musae</i>	<i>Musa</i> sp.	Ilhas Canárias	--	T-2
	ITEM 1121, MUCL 52573	<i>F. musae</i>	<i>Musa</i> sp.	Panamá	--	1
	NRRL 25059 T	<i>F. musae</i>	<i>Musa</i> sp.	Honduras	--	2
	NRRL 28893	<i>F. musae</i>	<i>Musa</i> sp.	México	--	1
3169	MP 238	<i>F. proliferatum</i>	<i>Musa</i> sp.	Brasil, Ijaci MG	2013	1
3170	MP 239	<i>F. proliferatum</i>	<i>Musa</i> sp.	Brasil, Ijaci MG	2013	1
3171	MP 243	<i>F. camptoceras</i>	<i>Musa</i> sp.	Brasil, Ijaci MG	2013	
2862	MP 266	<i>F. subglutinans</i>	<i>Musa</i> sp.	Brasil, Ijaci MG	2013	2
3198	MP 468	<i>F. equiseti</i>	<i>Musa</i> sp.	Brasil, Janaúba MG	2014	
3199	MP 469	<i>F. equiseti</i>	<i>Musa</i> sp.	Brasil, Janaúba MG	2014	
766	KSU 00999	<i>F. verticillitoides</i>				2
767	KSU 00149	<i>F. verticillitoides</i>				1
774	KSU 04093	<i>F. thapsinum</i>				2
775	KSU 04094	<i>F. thapsinum</i>				1
770	KSU 04853	<i>F. proliferatum</i>				2
771	KSU 04854	<i>F. proliferatum</i>				1

"continua"

Tabela 1 “conclusão”

CML	Outro código	Espécie	Hospedeiro	Origem	Isolamento	MAT <sup>a</sup>
772	KSU 00990	<i>F. subglutinans</i>				1
773	KSU 02192	<i>F. subglutinans</i>				2
755		<i>F. oxysporum</i>	Solo	Lavras MG	2006	

Identificação das Coleções: **CML** = Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil;  
**ITEM** = Agri-Food Toxicogenic Fungi Culture Collection, Institute of Sciences of Food Production, Bari, Itália; **KSU** = Kansas State University, Manhattan KS, EUA.

<sup>a</sup>MAT - *Mating type* dos isolados.

### 3.1 Caracterização morfológica

Os isolados de *F. musae* apresentaram coloração branca, tornando violeta a salmão, com a presença de pigmentação uniforme, com taxa de crescimento de 3.2 mm/dia. O micélio aéreo é abundante de aspecto algodinoso. Os microconídios possuem formato clavado a elipsóides, base truncada, com 0-2 septos. As monofiálides são longas, proliferadas e ramificadas, medindo 12-56 x 1,7-3,5  $\mu\text{m}$ . Produção de poucos esporodóquios em folhas de cravo e em papel de filtro, apresentando coloração alaranjada. Os macroconídios apresentaram formato afilado, com 3-5 septos, a presença de célula pé é pouca desenvolvida. Em culturas de 20 dias de idade observou a presença de pseudoclamidósporos nas extremidades de hifas e agrupados medindo 10-13  $\mu\text{m}$  de diâmetro, de formato globoso, unicelulares, com parede única e ausência de ornamentação (Figura 1).

O isolado de *F. subglutinans* apresentou coloração purpúrea em BDA e produção de pigmentos violeta. Em SNA observou-se microconídios produzidos no micélio aéreo, que apresentaram formato, número de septo e tamanho variáveis. Alguns macroconídios apresentaram curvatura dorsoventral pronunciada, com célula pé evidente. Os macroconídios produzidos em esporodóquio foram uniformes. Os isolados de *F. proliferatum* apresentaram características semelhantes ao isolado de *F. subglutinans*, entretanto o que os distinguiu foi a produção de microconídios em cadeias.

Os isolados de *F. camptoceras* apresentaram coloração salmão em BDA. Macroconídios falcados, com 3-5 septos, raramente com 5-7 septos, produzidos no micélio aéreo em polifiálides. Os clamidósporos eram produzidos nas extremidades de hifas ou em grupos, eram lisos, bicelulares e com parede dupla.

Os isolados de *F. equiseti* apresentaram macroconídios longos e finos com célula apical curvada, a maioria com 5 a 7 septos produzidos em esporodóquio de coloração alaranjada e produção abundante de clamidósporos.

### 3.2 Identificação de mating type e indução da fase sexuada

Dos sete isolados de *F. musae*, cinco foram identificados como idiomorfo *MAT-1* enquanto dois pertencem ao idiomorfo *MAT-2* (Tabela 1). Os cruzamentos entre de isolados de *F. musae* do Brasil e destes com o isolado de referência ITEM 1245 das Ilhas Canárias, África, formaram peritécios férteis. Entretanto, quando estes foram cruzados com os isolados testadores de *F. verticillioides* e *F. thapsinum* não houve produção de peritécios. O isolado de *F. subglutinans* cruzou com um dos isolados testadores desta espécie (KSU 00990 *MAT-1* e KSU 02192 *MAT-2*) e os isolados de *F. proliferatum* pareados com os isolados testadores para esta espécie (KSU 04854 *MAT-1e* KSU 04853 *MAT-2*) produziram peritécios férteis quatro semanas após a incubação, assim confirmando a identificação dos isolados obtidos da banana.

A produção de peritécios entre os isolados de *F. musae* foi baixa, com distribuição esparsa na superfície do meio. Os ascósporos exsudados por estes peritécios mostraram-se viáveis, germinando após 12 horas de incubação. Os peritécios apresentaram coloração negra, cirros de ascósporos com coloração alaranjada. Os ascósporos eram bicelulares, formatos elipsóides a obovóides, alguns ascósporos apresentaram com a presença de septos com constrição, medindo 10-19 x 3.2 x 3.9  $\mu\text{m}$  (Figura 1). As avaliações das características morfológicas do teleomorfo observado nos cruzamentos estão de acordo com as características descritas por Van Hove et al. (2011).

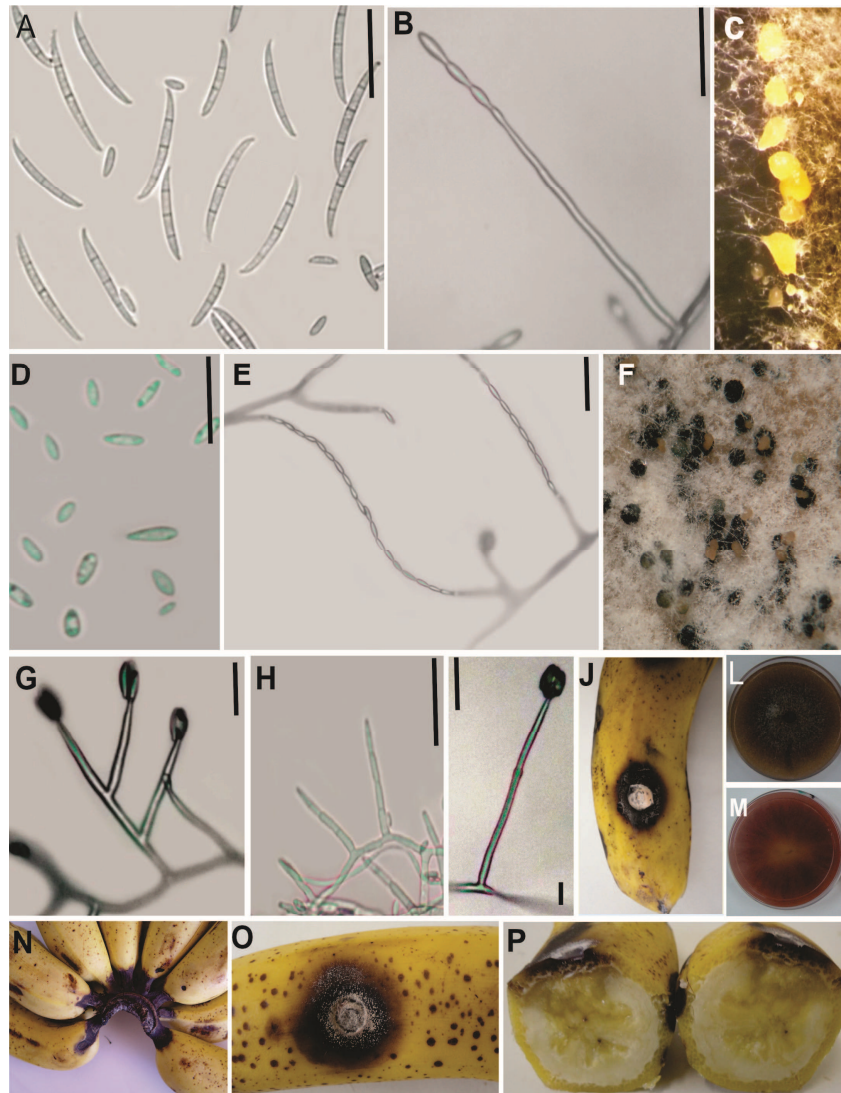


Figura 1 A-I Características morfológicas de *Fusarium musae*. A. macroconídios (Barra 40 μm); B e E. microconídios em cadeias (Barra 20 μm); C. esporodóquio em CLA; D. microconídios (Barra 40μm); F. peritécios com cirros de ascósporos (150 μm); G e I. microconídios em falsa cabeça (Barra 40μm); H. monofiálides (Barra 80μm); L e M. culturas em BDA; N. sintoma em penca de banana naturalmente infectada; J, O e P. Sintomas em frutos inoculados.

### 3.3 Análise filogenética

Árvores filogenéticas foram geradas para cada região genômica, *EF 1- $\alpha$*  (Figura 5, Anexo 1), *tub2* (Figura 6, Anexo 2) e *RPB2* (Figura 7, Anexo 3) em separado, e para a combinação das regiões (Figura 2). Para todas as árvores geradas pela análise de Máxima Parcimônia (MP), os isolados de origem do Brasil, agruparam juntos com o tipo de *F. musae* (NRRL 25059), tendo como grupo irmão *F. verticillioides*. Para as análises de *EF 1- $\alpha$*  e *tub2* e para a combinação das regiões não houve suporte de 100%, já para a análise de *RPB2* houve um suporte de 100%.

### 3.4 Genotipagem do potencial micotoxigênico

Os *primers* VERTF-1 e VERTF-2, marcadores para síntese de fumonisina, geraram um fragmento gênico de aproximadamente 400 pb para todos os isolados de *F. musae* analisados, o isolado de referência ITEM 1245 e para o isolado de *F. verticillioides* (CML 766), utilizado como controle positivo. Entretanto, não houve amplificação para o isolado de *F. oxysporum* (CML 755), utilizado como controle negativo.

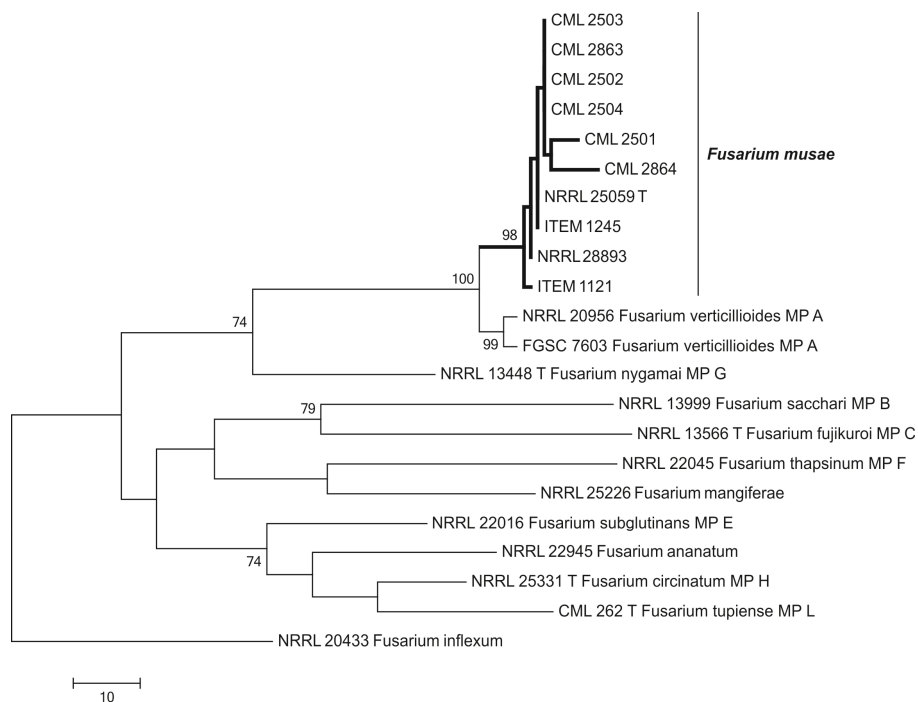


Figura 2 Análise de máxima parcimônia (MP) de seqüências combinadas de *EF-1α*, *tub2* e *RBP2* de isolados de *F. musae* do Brasil e espécies do complexo *Fusarium fujikuroi*. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore, e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos internódios. Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras; NRRL = Northern Regional Research Laboratory, FGSC = Fungal Genetics Stock Center, Kansas City MI, EUA.

### 3.5 Avaliação da susceptibilidade de cultivares de bananeira a *F. musae*

Todos os isolados de *F. musae* testados, quando inoculados em frutos de banana, induziram sintomas típicos de podridão. No ponto de inoculação observou-se inicialmente escurecimento da casca, com posterior desenvolvimento de micélio de coloração esbranquiçada a róseo. A partir do



oitavo dia após a inoculação observou-se lesões necróticas expandidas. Cortes longitudinais evidenciaram o amolecimento da polpa da fruta, ficando impróprio para consumo. Os isolados apresentaram o mesmo nível de agressividade (Figura 3). As testemunhas não apresentaram sintomas.

Na cultivar Vitória foi observado maior nível de resistência em relação às outras cultivares testadas. As cultivares Tropical e Ouro da mata apresentaram níveis de resistência intermediária, as demais cultivares não apresentaram níveis de resistência (Figura 4).

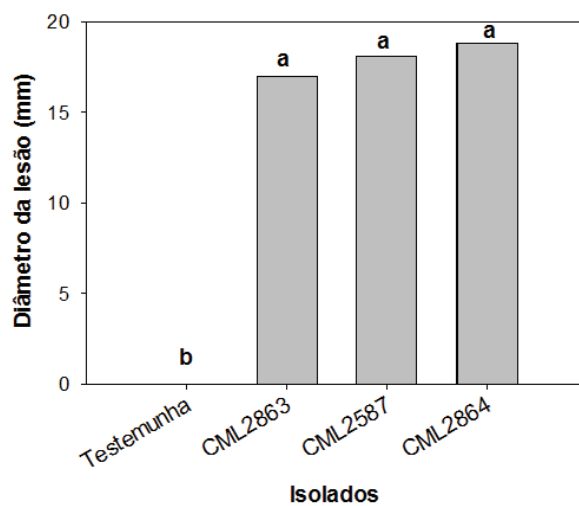


Figura 3 Níveis de agressividade dos isolados de acordo com o diâmetro da lesão em frutos de banana. Teste Tukey 5% de probabilidade.

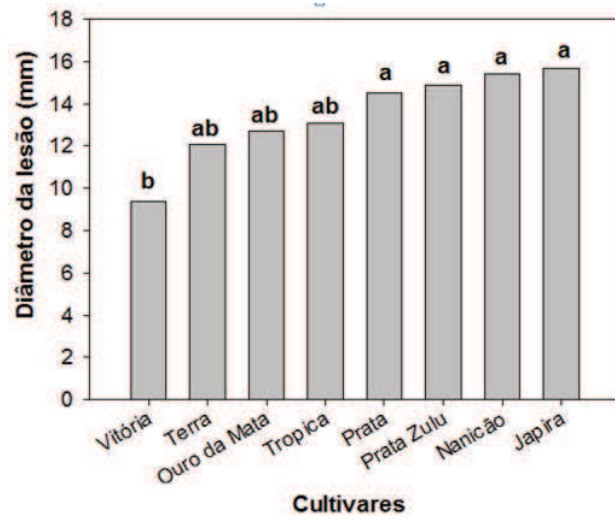


Figura 4 Níveis de resistência de cultivares de bananeira de acordo com o diâmetro da lesão nos frutos. Teste Tukey 5% de probabilidade.

#### 4 DISCUSSÃO

Análise de filogenia, teste de patogenicidade, compatibilidade sexual e caracterização morfológica, revela que o agente etiológico da podridão da coroa em frutos de banana no Brasil é *F. musae*. Morfologicamente, *F. musae* possui características próxima a outras espécies do FFSC, principalmente com *F. verticillioides*, *F. andiyazi* e *F. thapsinum*. Essas espécies produzem microconídios com formato clavado a elipsóide em cadeias longas e falsas cabeças exclusivamente em monofiálides (Leslie & Summerell, 2006). Foi observada a presença de esporodóquios e macroconídios em isolados obtidos de banana.

Na descrição original de *F. musae* os autores não observaram a produção de macroconídios, enquanto neste estudo observamos a formação de poucos esporodóquios em fragmentos de folhas de cravo e papel filtro. Os macroconídios possuem três septos e célula pé não evidente. Essas características morfológicas são compartilhadas nas espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* (Leslie & Summerell, 2006). Os microconídios de *F. musae* são morfológicamente diferentes de isolados obtidos de milho, apresentando 0-2 septos, enquanto em *F. verticillioides* raramente apresentam septos (Hirata et al., 2001). Devido à presença de pseudoclamidósporos, características das fiálides e dos microconídios é possível diferenciar as duas espécies. No entanto, é impossível diferenciar *F. musae* de *F. andiyazi* apenas por marcadores morfológicos, já que ambas as espécies produzem microconídios em cadeias longas, pseudoclamidósporos e monofiálides longas.

Todos os isolados de *Fusarium musae* de idiomorfo *MAT-1* produziram peritécios quando cruzados com o isolado testador de *MAT-2* (ITEM 1245). Esse fato mostra que entre a população do Brasil e da África não existe barreira reprodutiva. Em trabalhos anteriores já existia evidência que isolados obtidos de

banana não cruzaram produzindo peritécios férteis com isolados da *mating population A*, evidenciando que isolados de banana possuem características biológicas distintas (Moretti et al., 2004). A presença de ambos os *mating types* entre os isolados do Brasil evidencia a possível ocorrência de reprodução sexuada em condições naturais. Porém, os cruzamentos realizados entre os isolados de *F. musae* demonstraram baixa fertilidade, em função do pequeno número de peritécios formados e pelo fato da exsudação de poucos ascósporos. Mesmo assim foi possível comprovar que todos os isolados foram férteis, produzindo ascósporos que germinavam.

De qualquer maneira, a ocorrência da reprodução sexuada em condições naturais é considerada rara (Leslie & Summerell, 2006). Isto é provavelmente devido ambos os isolados de *mating types* opostos não estarem no mesmo local, além das condições de temperatura, luz, gás e nutrientes não seja favoráveis (Leslie & Summerell, 2006). Nas condições naturais apenas foi observado peritécios de *F. verticillioides* (Summerell et al., 1998), *F. fujikuroi* (Watanabe & Umehara, 1977) e *F. xylarioides* (Booth, 1971). Algumas espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* possuem a capacidade de cruzarem entre si. Este evento já foi observado entre isolados das espécies *F. fujikuroi* e *F. proliferatum* (Leslie et al., 2004) e *F. circinatum* e *F. subglutinans* (Desjardins et al., 2000). A espécie investigada foi cruzada com isolados das espécies biológicas *F. verticillioides* e *F. thapsinum*, já que ambas apresentam características morfológicas similares. Curiosamente, estes resultados de cruzamentos entre distintas espécies biológicas foram apenas observadas entre espécies pertencentes ao mesmo clado. Estes eventos ocorrem em função da existência de barreiras reprodutivas não completas mesmo em espécies filogenéticas bem definidas (Leslie & Summerell, 2006).

*F. musae* possui distribuição em países da América Central, nas Filipinas e Ilhas Canárias (Jimenez et al., 1997; Hirata et al., 2001; Moretti et al.,

2004; Van Hove et al., 2011). A presença de *F. musae* no Brasil reforça a hipótese que esta espécie pode ter sido disseminada via material propagativo ou através comercialização de frutos. Baseado em análises filogenéticas multigênicas, as espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* são agrupadas em três grandes grupos, sendo *F. musae* pertencendo ao clado africano (O'Donnell et al., 1998). Para explicar a origem destes grupos os autores recorrem à hipótese da biogeografia, baseado na origem das plantas com as respectivas espécies de *Fusarium*. No entanto para algumas espécies esta hipótese é falha, como por exemplo para *F. verticillioides*. A espécie pertence ao clado africano, enquanto o centro de origem do milho e teosinte é na América central. Da mesma forma esta hipótese é falha para *F. musae*, apesar de agrupar no clado mencionado, o gênero *Musa* possui seu centro de origem na Ásia. Para *F. concentricum* a hipótese da biogeografia é consistente, já que o centro de origem do hospedeiro é na Ásia e a espécie pertence o clado asiático. É provável que *F. musae* e *F. concentricum* foram disseminado para outros continentes via material propagativo ou associado a frutos comercializados.

O clado africano é composto por 23 linhagens filogenéticas, sendo cinco espécies biológicas, com a maioria dessas espécies associadas a plantas do gênero Poaceae (Kvas et al., 2009). Recentemente, duas espécies pertencentes ao clado americano foram descritas, *F. tupiense*, agente etiológico da malformação floral da mangueira (Lima et al., 2012). Apesar de agrupar no clado americano, a origem do hospedeiro da espécie é na Índia. Porém existe a hipótese que fungos de outras plantas podem estabelecer relações parasitárias nas plantas introduzidas de outros continentes. Para o mesmo hospedeiro existe *F. mangiferae* que pertence ao clado asiático e *F. sterilihyphosum* pertencendo ao clado americano (Britz et al., 2002).

Através de análises bioquímicas as duas espécies podem ser diferenciadas pelo fato de *F. musae* não produzir fumonisinas (Jimenez et al.,

1997; Van Hove et al., 2011). Isolados de *F. verticillioides* obtidos de banana não produzem fumonisinas B1 e B2, enquanto se detectou a presença de monilioforminas neste isolados. Já *F. verticillioides* de milho produz fumonisinas B1 e B2, no entanto não se detectou a presença de monilioforminas (Leslie et al., 1996; Moretti et al., 2004). A biossíntese de fumonisinas é dependente do gene *FUM*. Este gene é composto de 16 regiões contínuas e co-expressas (Brown et al., 2007). Supõe-se que isolados de *F. musae* perderam a capacidade da produção de fumonisinas, restando apenas porções dos genes *FUM 21* e *FUM 9*, enquanto *F. verticillioides* possuem todos os genes intactos (Van Hove et al., 2011). Isolados de *F. verticillioides* produtores de fumonisinas causa sintomas de necrose em folhas de plântulas de milho, demonstrando que a síntese de fumonisinas é importante na interação *F. verticillioides* x milho (Glenn et al., 2008). O gene de síntese de fumonisinas é composto pelas regiões *FUM 1*, *FUM 2*, *FUM 3*, *FUM 8* e *FUM 19*, parte deste genes não estão presentes em isolados de *F. verticillioides* obtidos de banana (Proctor et al., 2003). Curiosamente, neste estudo com a utilização de *primers* específicos constatou-se a amplificação de genes de síntese de fumonisinas para os isolados de *F. musae*. É provável que os isolados de *F. musae* do Brasil sejam produtores de fumonisinas ou os *primers* utilizados estão amplificando de uma forma inespecífica.

Neste estudo teste de inoculações revelaram que isolados causaram podridão típica, seguido do amolecimento da polpa. No entanto as cultivares avaliadas mostraram reação diferenciada no tamanho da lesão. Até então não existe estudo sobre a reação de *F. musae* e os genótipos de *Musa*. Estes resultados de inoculações geram informações importantes no manejo pós-colheita. Vários estudos demonstraram que *F. musae* são patogênicos a frutos de banana, porém não causa doença em milho, enquanto *F. verticillioides* não causa doença quando inoculado em frutos de banana e causa doença em milho (Hirata

et al., 2001, Moretti et al., 2004). Até o momento não existem programas de melhoramento, que visem à obtenção de variedades de banana resistentes à podridão da coroa.

Existem outras espécies de *Fusarium* associado à podridão da coroa, no entanto não são fitopatogênicos. Apesar de não causar podridão estes organismos merecem atenção em função da possibilidade de síntese de micotoxinas. *F. semitectum* é uma das espécies mais importantes associadas à podridão da coroa (Knight et al., 1977). *F. camptoceras*, *F. proliferatum*, *F. graminearum*, *F. acuminatum* e *F. equiseti* são espécies, que estão presentes em frutos causando contaminação e geralmente associados a detritos em folhas em decomposição (Wallbridge, 1981). Existe relato da associação de *F. equiseti* a diversos tipos de sintomas, no entanto não existe comprovação através de postulado de Koch que este fungo seja patogêneo (Leslie & Summerell, 2006). Os restos florais aderidos nos frutos são fonte de inóculo para *Colletotrichum musae* e várias espécies de *Fusarium* (De Lapapeyre De Balaire & Mourichon, 1997). Estas espécies de *Fusarium* apresentam características de endófito, um caráter que dificulta o manejo da doença, já a presença dos sintomas é observada apenas quando os frutos encontram-se no estágio inicial de maturação.

Este é o primeiro registro de *F. musae* no Brasil. Existem indícios de fontes de resistência para algumas cultivares avaliadas. Estes resultados contribuirão para o melhor conhecimento sobre a biologia do fungo e poderá auxiliar em trabalhos futuros de melhoramento genético, métodos de controle e manejo pós-colheita.

Tabela 2 Sequências de isolados de referência obtidas do Genbank utilizadas na análise filogenética

CML <sup>a</sup>	Outro código <sup>a</sup>	Espécie	Hospedeiro	Origem	Tub	RPB2	Tef
2587	ITEM 1245	<i>F. musae</i>	<i>Musa</i> sp.	Ilhas Canárias	FN 545370	FN 552110	FN 552088
2586	ITEM 2537	<i>F. verticillitoides</i>	<i>Musa</i> sp.	Turquia	FN 545358	FN 552098	FN 552076
	ITEM 2541	<i>F. verticillitoides</i>	<i>Musa</i> sp.	Tailândia	FN 545363	FN 552103	FN 552081
	NRRL 25059 T M2	<i>F. musae</i>	<i>Musa</i> sp.	Honduras	FN 545368	FN 552108	FN 552086
	ITEM 1121 M1	<i>F. musae</i>	<i>Musa</i> sp.	Panamá	FN 545375	FN 552115	FN 552093
	ITEM 1142	<i>F. musae</i>	<i>Musa</i> sp.	Ecuador	FN 545376	FN 552116	FN 552094
	NRRL 20956	<i>F. verticillitoides</i>	<i>Zea mays</i>	Califórnia, EUA	FN 54356	FN 552096	FN 552074
	FGSC 7303	<i>F. verticillitoides</i>	<i>Zea mays</i>	Indiana, EUA	FN 54360	FN 552100	FN 552078
262	NRRL 53984 T	<i>F. tuiense</i>	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	DQ 445781		DQ452859
	NRRL 13308	<i>F. acutatum</i>	desconhecido	Índia	U34486		AF160276
	NRRL 13602	<i>F. anthophilum</i>	<i>Hippeastrum</i> sp.	Alemanha	U61541		AF160292
	NRRL 25181 T	<i>F. concentricum</i>	<i>Musa sapientum</i>	Costa Rica	U61548		AF160282
	NRRL 13164 T	<i>F. dlamini</i>	<i>Zea mays</i>	África do Sul	U34430		AF160277
	NRRL 13566	<i>F. fujikaroi</i>	<i>Oryza sativa</i>	Taiwan	U34415	JX171570	AF160279
	NRRL 22945 T	<i>F. guttiforme</i>	<i>Ananas comosus</i>	Inglaterra	U34420	JX171618	AF160297
	NRRL 20433	<i>F. inflexum</i>	<i>Vicia faba</i>	Alemanha	U34435	JX171583	AF008479
	NRRL 13604 T	<i>F. napiforme</i>	<i>Pennisetum typhoides</i>	África do Sul	U34428		AF160266
	NRRL 13448 T	<i>F. nygamai</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	Austrália	U34426	EF470114	AF160273
	NRRL 22902	<i>F. oxysporum</i>	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	EUA	U34424		AF160312

“continua”



Tabela 2 “continuação”

CML <sup>a</sup>	Outro código <sup>a</sup>	Espécie	Hospedeiro	Origem	Tub	RPB2	Tef
	NRRL 13617	<i>F. phyllophilum</i>	<i>Dracaena deremensis</i>	Itália	U34432		AF160274
	NRRL 22944	<i>F. proliferatum</i>	<i>Cattleya</i> sp.	Alemanha	U34416	JX171617	AF160280
	NRRL 22946 T	<i>F. pseudocircinatum</i>	<i>Solanum</i> sp.	Gana	U34482		AF160271
	NRRL 13592 T	<i>F. pseudonygamai</i>	<i>Pennisetum typhoides</i>	Nigéria	U34421		AF160263
	NRRL 13999	<i>F. sacchari</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	India	U34414	JX171580	AF160278
	NRRL 25623	<i>F. sterilihyphosum</i>	<i>Mangifera indica</i>		AF160344		AF160300
	NRRL 22016	<i>F. subglutinans</i>	<i>Zea mays</i>	EUA	U34417	JX171599	AF160289
	NRRL 22045	<i>F. thapsinum</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	África do Sul	U34418	JX171600	AF160270
	NRRL 28852	<i>F. fractiflexum</i>	<i>Cymbidium</i> sp.	Japão	AF160315		AF160288
	NRRL 25300	<i>F. begoniae</i>	<i>Begonia elatior</i>	Alemanha	U61543		AF160293
405	NRRL 25331	<i>F. circinatum</i>	<i>Pinus radiata</i>	EUA	U61547	JX171623	AF160295
	NRRL 13618	<i>F. bulbicola</i>	<i>Nerine bowdenii</i>	Holanda	U61546		AF160294
	NRRL 20476	<i>F. bactridioides</i>	<i>Cronartium conigenum</i>	EUA	U34434		AF160290
	NRRL 13613	<i>F. succisae</i>	<i>Succisa pratensis</i>	Alemanha	U34419		AF160291
	NRRL 22949	<i>F. udum</i>	desconhecido	Alemanha	U34433		AF160275

“continua”

Tabela 2 “conclusão”

CML <sup>a</sup>	Outro código <sup>a</sup>	Espécie	Hospedeiro	Origem	Tub	RPB2	Tef
	NRRL 25302	<i>F. denticulatum</i>	<i>Ipomoea batatas</i>	EUA	U61550		AF160269
	NRRL 25200	<i>F. lactis</i>	<i>Ficus carica</i>	EUA	U61551		AF160272
	NRRL 25446	<i>F. brevicatenulatum</i>	<i>Striga asiatica</i>	Madagascar	U61545		AF160265
	NRRL 25206	<i>F. pseudoanthophilum</i>	<i>Zea mays</i>	Zimbabwe	U61553		AF160264
	NRRL 25208	<i>F. ramigenum</i>	<i>Ficus carica</i>	EUA	U61554		AF160267
	NRRL 25226	<i>F. mangiferae</i>	<i>Mangifera indica</i>	India	U61639	JX171622	AF160281
	MRC 8544	<i>F. konzum</i>	<i>Sorghastrum nutans</i>	EUA	EU220234		EU220235

<sup>a</sup>Código dos isolados: **CML**, Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil; **ITEM**, Agri-Food Toxicogenic Fungi Culture Collection, Institute of Sciences of Food Production, Bari, Itália; **MRC**, Medical Research Council, Tygerberg, África do Sul; **MUCL**, Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Bélgica; **NRRL**, Northern Regional Research Laboratory, NCAUR, Peoria IL, EUA; **FGSC**, Fungal Genetics Stock Center, School of Biological Sciences, University of Missouri, Kansas City MO, EUA.

## REFERÊNCIAS

- Booth C (1971) The genus *Fusarium*. Commonwealth Agricultural Bureau. Commonwealth Mycological Institute, Fernham Royal, England. 237 p.
- Brown DW, Butchko RAE, Busman M, Proctor RH (2007) The *Fusarium verticillioides* FUM gene cluster encodes a ZN (II) 2Cys6 protein that affects FUM gene expression and fumonisin production Eukaryot. Cell 6:1210-1218.
- Britz H, Steenkamp ET, Coutinho TA, Wingfield BD, Marasas WFO, Wingfield MJ (2002) Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation. Mycologia 94:722-730.
- Cordeiro ZJM, Matos AP (2005) Doenças da banana. Informe Agropecuário 26:12-16.
- De Lapeyre De Bellaire L, Mourichon X (1997) The pattern of fungal contamination of banana bunch during its development and potential influence on incidence of crown-rot and anthracnose diseases. Plant Pathology 46:481-489.
- Desjardins AE, Plattner RD, Gordon TR (2000) *Gibberella fujikuroi* mating population A and *Fusarium subglutinans* from teosinte species and maize from Mexico and Central America. Mycological Research 104:865-872.
- Ferreira DF (2000) Análise estatística por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: Reunião anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45. São Paulo. Anais São Paulo: SIB. p. 255-258.
- Geiser DM, Lewis Ivey ML, Hakiza G, Juba JH, Miller SA (2005) *Fusarium xylarioides* (anamorph: *Fusarium xylarioides*), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is previously unrecognized member of the *Fusarium fujikuroi* complex. Mycologia 97:191-201.
- Glenn AE, Zitomer NC, Zimeri AM, Williams LD, Riley RT, Proctor RH (2008) Transformation-mediated complementation of a FUM gene cluster deletion in *Fusarium verticillioides* restores both fumonisin production and pathogenicity on maize seedlings. Molecular Plant Microbe Interactions 21:87-97.
- Greene GL, Goos RD (1963) Fungi associated with crown rot boxed bananas. Phytopathology 53:271-275.

Hepperle D (2011) SeqAssem©: a sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Win32-Version. Disponível em: <<http://www.sequentix.de>>.

Hirata T, Kimishima E, Aoki T, Nirenberg HI, O'Donnell K (2001) Morphological and molecular characterization of *Fusarium verticillioides* from rotten banana imported into Japan. *Mycoscience* 42:155-166.

Jimenez M, Huerta T, Mateo R (1997) Mycotoxin production by *Fusarium* species isolated from bananas. *Applied and Environmental Microbiology* 63:364-369.

Jimenez M, Logrieco A, Bottalico A (1993) Occurrence and pathogenicity of *Fusarium* species in banana fruits. *Journal of Phytopathology* 137:214-220.

Kerényi Z, Moretti A, Waalwijk C, Oláh B, Hornok L (2004) *Mating type* sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 70:4419-4423.

Klittich CJR, Leslie JF, Nelson PE, Marasas WFO (1997) *Fusarium thapsinum* (*Fusarium thapsina*): New species in section *Liseola* from sorghum. *Mycologia* 89:643-652.

Knight C, Cutts DF, Colhoun J (1977) The role of *Fusarium semitectum* in causing crown rot of banana. *Journal of Phytopathology* 89:170-176.

Kvas M, Marasas WFO, Wingfield BD, Wingfield MJ, Steenkamp ET (2009) Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Fusarium fujikuroi* complex. *Fungal Diversity* 34:1-21.

Lassois L, Jijakli MH, Chillet M, Bellaire LL (2010) Crown Rot of Bananas: pre-harvest factors involved in postharvest diseases development and integrated control methods. *Plant Disease* 94:648-658.

Leslie JL, Zeller KA, Wohler M, Summerell BA (2004) Interfertility of two mating populations in the *Fusarium fujikuroi* species complex. *European Journal Plant Pathology* 110:611-618.

Leslie JL, Summerell B (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*. 368p.

Lima CS, Pfenning LH, Costa SS, Abreu LM, Leslie JF (2012) *Fusarium tupiense* sp. nov., a member of the *Fusarium fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. *Mycologia* 104:1408-1419.

Marasas WFO, Rheeder JP, Logrieco A, Van Wyk PS, Juba JH (1998) *Fusarium nelsonii* and *F. musarum*: two new species in section *Arthrosporiella* related to *F. camptoceras*. *Mycologia* 90:505-513.

Mendes MAS, da Silva VL, Dianese JC (1998) Fungos em Plantas no Brasil. Embrapa-SPI, Embrapa Cenargen. 555p.

Moretti A, Mulè G, Susca, A, Gonzalez-Jaén MT, Logrieco A (2004) Toxin profile, fertility and AFLP analysis of *Fusarium verticillioides* from banana fruits. *European Journal Plant Pathology* 110:601-609.

Nirenberg HI, O'Donnell K (1998) New *Fusarium* species and combinations within the *Fusarium fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:434-458.

O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg HI (1998) Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:465-493.

O'Donnell K, Sutton DA, Fothergill A, McCarthy D, Rinaldi MG, Brandt ME, Zhang N, Geiser DM (2008) Molecular phylogenetic diversity; multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *Journal Clinical Microbiological* 46:2477-2490.

Patiño B, Mirete S, González-Jaén MT, Mulé G, Rodríguez MT, Vázquez C (2004) PCR detection assay of fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. *Journal of Food Protection* 67:1278-1283.

Phoulivong S, Cai L, Chen H, McKenzie EHC, Abdelsalam K, Chukeatirote E, Hyde KD (2010) *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity* 44:33-43.

Ploetz RC, Zentmayer GA, Nishijima WT, Rohrbach KG, Ohr HD (1994) Compendium of Tropical Fruit Disease. APS Press. pp 2-22.

Proctor RH, Brown DW, Plattner RD, Desjardins AE (2003) Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genetics Biology* 38:237-249.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.

Van Hove F, Waalwijk C, Logrieco A, Munaut F, Moretti A (2011) *Fusarium musae* (*Fusarium musae*) sp. nov. a recently discovered species from banana is sister to *F. verticillioides*. *Mycologia* 103:570-585.

Watanabe T, Umehara T (1977) The perfect state of the causal fungus of bakanae disease of rice plant recollected at Toyama, Japan. *Nippon Kingakukai Kaiho* 18:136-142.

Wallbridge A (1981) Fungi associated with crown-rot disease of boxed bananas from the Winward Islands during a two year survey. *Transactions British Mycological Society* 77:567-577.

Wollenweber HW, Reinking OA (1925) Aliquot *Fusaria tropicalia* nova vel revisa. *Phytopathology* 15:155-169.

## 5 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos por meio dessa Tese confirmam a ocorrência de três espécies de *Fusarium* ainda desconhecidas no Brasil: *F. udum*, agente etiológico de murcha em *Crotalaria*; *F. musae*, agente causal da podridão da coroa da bananeira e; *F. sacchari*, que causa uma doença conhecida como “*pokkah boeng*” em cana-de-açúcar e outras gramíneas. Também ficam registradas pela primeira vez no Brasil as espécies *F. thapsinum* e *F. andiyazi*. Além da caracterização dos agentes etiológicos de doenças, foram geradas evidências que espécies forrageiras podem abrigar espécies conhecidas como importantes patógenos de grandes culturas e produtores de micotoxinas. Esse aspecto deve ser explorado de forma mais abrangente e com grande atenção. Talvez o aspecto mais relevante seja a observação que a diversidade de espécies de *Fusarium* que ocorrem no Brasil como patógenos de plantas e como endófitos é bem maior que se imagina.

**ANEXOS**



## ANEXO A

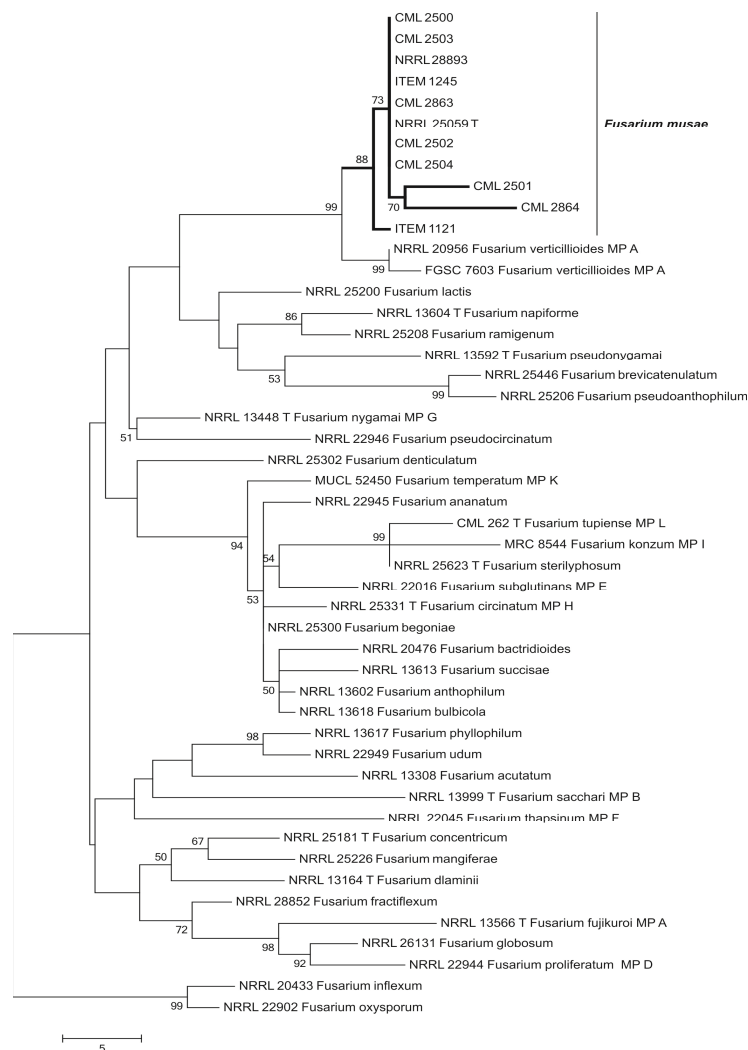


Figura 1A Análise de Máxima Parcimônia de seqüências *EF-1α* das espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* e isolados de *F. musae* do Brasil. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore; os valores do suporte estatístico são indicados acima dos internódios. Abreviações das coleções de culturas: CML - Coleção Micológica de Lavras; NRRL - Northern Regional Research Laboratory, FGSC Fungal Genetics Stock Center.

## ANEXO B

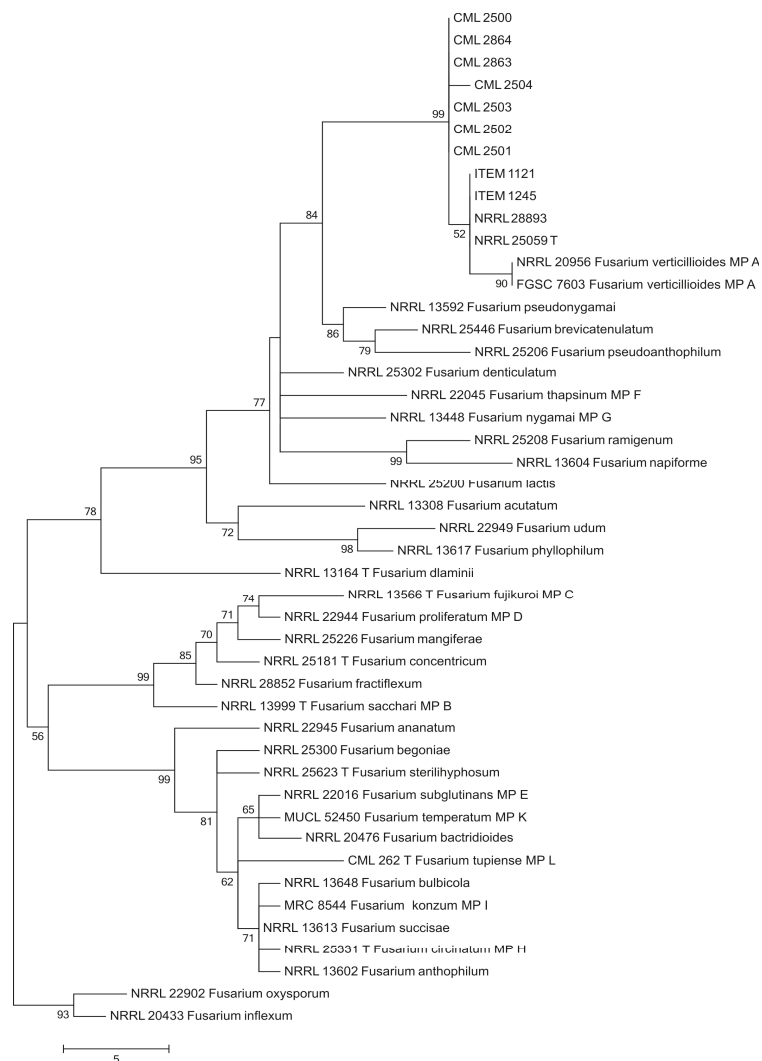


Figura 1B Análise de Máxima Parcimônia de seqüências *tub2* de espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* e isolados de *F. musae* do Brasil. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore, e os valores do suporte estatístico são indicados acima dos internódios. Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras; NRRL - Northern Regional Research Laboratory, FGSC - Fungal Genetics Stock Center.

## ANEXO C

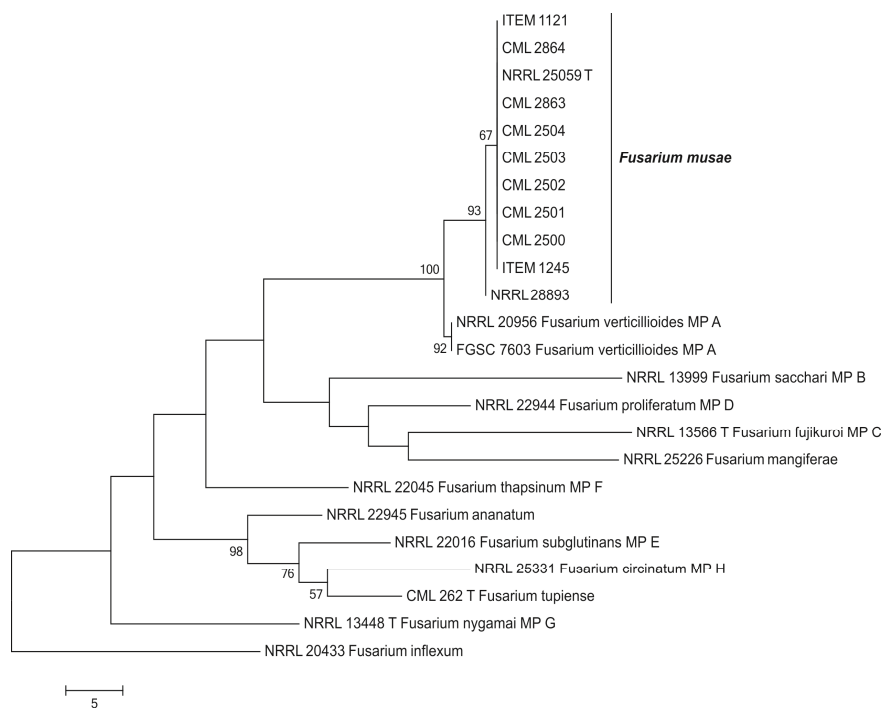


Figura 1C Análise de Máxima Parcimônia de seqüências *RBP2* de espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* e isolados de *F. musae* do Brasil. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore; os valores do suporte estatístico são indicados acima dos internódios. Abreviações das coleções de culturas: CML - Coleção Micológica de Lavras; NRRL - *Northern Regional Research Laboratory*, FGSC - *Fungal Genetics Stock Center*.

## **CURRÍCULO DO AUTOR**

Maruzanete Pereira de Melo é natural de Cristália MG, onde nasceu em 1980. Iniciou seus estudos na Escola Estadual Professor Tutu. A partir de 2000 realizou o curso Técnico em Agropecuária na Escola Agrotécnica Federal de Januária, concluído em 2002. Em 2004 ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, campus Seropédica RJ, onde foi bolsista de iniciação científica no departamento de fitotecnia sob orientação do professor João Sebastião Araújo. Concluída a graduação em 2009, obteve no mesmo ano uma vaga no curso de mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife PE, sob orientação do professor Cristiano Souza Lima. Em agosto de 2011 iniciou o curso de doutorado em Fitopatologia na Universidade Federal de Lavras, sob orientação do professor Ludwig H. Pfenning. Após obtenção do título de Doutor em setembro 2014, é atualmente bolsista PNPd CAPES na Universidade Federal do Piauí, campus Teresina PI.