



YASMIM FREITAS FIGUEIREDO

**POLIPHASIC TAXONOMY OF *Aspergillus* SPECIES IN THE
SECTION *Nigri* INVOLVED WITH THE SISAL BOLE ROT
DISEASE**

**LAVRAS-MG
2017**

YASMIM FREITAS FIGUEIREDO

**POLIPHASIC TAXONOMY OF *Aspergillus* SPECIES IN THE SECTION *Nigri*
INVOLVED WITH THE SISAL BOLE ROT DISEASE**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia/Fitopatologia, para a
obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza
Orientador
Dr. Fernando Pereira Monteiro
Coorientador

**LAVRAS-MG
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Figueiredo, Yasmim Freitas.

Poliphasic taxonomy of *Aspergillus* species in the section *Nigri*
involved with the sisal bole rot disease / Yasmim Freitas

Figueiredo. - 2017.

42 p. : il.

Orientador(a): Jorge Teodoro de Souza.

Coorientador(a): Fernando Pereira Monteiro.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Taxonomia polifásica. 2. *Agave sisalana*. 3. *Aspergillus*
welwitschiae. I. Souza, Jorge Teodoro de. II. Monteiro, Fernando
Pereira. III. Título.

YASMIM FREITAS FIGUEIREDO

**POLIPHASIC TAXONOMY OF *Aspergillus* SPECIES IN THE SECTION *Nigri*
INVOLVED WITH THE SISAL BOLE ROT DISEASE**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia/Fitopatologia, para a
obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 24 de abril de 2017

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros - UFLA
Dr. Phellippe Arthur Santos Marbach - UFRB

Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza
Orientador

Dr. Fernando Pereira Monteiro
Coorientador

**LAVRAS-MG
2017**

À minha mãe e meus irmãos, o amor e apoio incondicionais e compreensão das minhas ausências em prol da pesquisa.
Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me proteger, guiar e dar forças para superar os obstáculos em minha vida e a Nossa Senhora por passar na frente nos momentos de desespero.

À minha família, meus pais, irmãos e sobrinhas por estarem sempre presentes em minha caminhada e não deixar que eu desista dos meus sonhos, mesmo tendo que conviver com a distância e a saudade.

À Universidade Federal de Lavras por todo o suporte dado.

Ao Departamento de Fitopatologia por toda experiência adquirida na minha jornada de trabalho.

Ao professor Jorge Teodoro de Souza pela orientação, compreensão e amizade.

Aos meus colegas dos laboratórios de Fitopatologia Molecular e Controle Biológico que sempre estão dispostos a ajudar e dar uma palavra amiga.

A todos os Laboratórios que me deram suporte para que minhas pesquisas fossem realizadas, principalmente o de Laboratório de Taxonomia Polifásica de *Aspergillus* e *Penicillium* e Laboratório de Patologia Florestal.

Aos meus amigos de longa data, meu bonde, que mesmo longe, estão sempre dispostos a ajudar

À todos os amigos que a vida e os congressos me deram, principalmente a Sueny, pois sem ela eu não estaria em Lavras.

Ao meu namorado, Murilo Henrique, o carinho, companheirismo e por estar presente mesmo nos momentos de estresse e nervosismo.

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

À todos que me ajudaram direta e indiretamente, para a realização deste trabalho, meu muito obrigada!!!

“Podemos escolher recuar em direção à segurança ou avançar em direção ao crescimento. A opção pelo crescimento tem que ser feita repetidas vezes. E o medo tem que ser superado a cada momento.”

(Abraham Maslow)

RESUMO

O sisal (*Agave sisalana*) é uma planta originária da Península de Yucatan no México e é cultivada para fins comerciais por produzir fibra dura de alta qualidade. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial desde 1971, no entanto, sua produção está em declínio devido ao baixo nível tecnológico e a ocorrência da podridão vermelha do sisal. *Aspergillus niger* foi anteriormente relatado como o causador da doença com base em caracteres morfológicos. No entanto, espécies de *Aspergillus* da seção *Nigri* são morfológicamente indistinguíveis. A taxonomia polifásica inclui a caracterização morfológica, fisiológica e molecular dos isolados. Objetivou-se identificar por meio de taxonomia polifásica, as espécies de *Aspergillus*, causadoras da podridão vermelha do sisal. A taxonomia polifásica foi inicialmente aplicada em 26 isolados de *Aspergillus* de diversos locais. As características morfológicas e fisiológicas, incluindo cor, tamanho, forma e textura dos conídios; tamanho e forma da vesícula, divisão, comprimento, largura e textura do conidióforo; crescimento em diferentes meios de cultura e diferentes temperaturas, cor do micélio, cor e textura do reverso da colônia e presença de exsudados, mostrou que todos os isolados pertencem à espécie *A. niger*. No entanto, as análises moleculares de fragmentos da região espaçador transcrito interno (*ITS*) do RNA ribossomal, β -tubulina (*BenA*) e calmodulina (*CaM*), mostraram que vinte isolados pertencem à espécie *A. welwitschiae*, cinco isolados a *A. niger* e um isolado a *A. brasiliensis*. Os testes de patogenicidade em mudas de sisal revelaram que a maior parte dos isolados de *A. welwitschiae* são patogênicos, juntamente com o isolado de *A. brasiliensis*, mas nenhum dos isolados de *A. niger* foi capaz de causar a doença. Os testes de patogenicidade mostraram que a maior parte dos isolados foi capaz de causar doença em mudas de sisal. Conclui-se que *A. welwitschiae* é o principal causador da doença e que até o momento nenhum isolado de *A. niger* se mostrou patogênico e tampouco foi observada sua associação com plantas de sisal.

Palavras-chave: Taxonomia polifásica. *Agave sisalana*. *Aspergillus welwitschiae*.

ABSTRACT

Sisal (*Agave sisalana*) is a plant native to the Yucatan Peninsula in Mexico and is grown for commercial purposes by producing high quality hard fiber. Brazil is the world's largest producer and exporter since 1971, however, its production is declining due to the low level of technology and the occurrence of sisal bole rot. *Aspergillus niger* was previously reported as the cause of the disease based on morphological characters. However, some *Aspergillus* species of the section *Nigri* are morphologically indistinguishable. The polyphasic taxonomy includes the morphological, physiological and molecular characterization of the isolates. The objective of this study was to identify the *Aspergillus* species that cause sisal bole rot by polyphasic taxonomy. The polyphasic taxonomy was initially applied to 26 *Aspergillus* isolates from several sites. Morphological and physiological characteristics, including color, size, shape and texture of conidia; size and shape of the vesicle, division, length, width and texture of the conidiophore; growth in different culture media and different temperatures, mycelial color, color and texture of the colony reverse and the presence of exudates showed that all the isolates belong to *A. niger* species. However, molecular analyzes of internal transcribed spacer (*ITS*), β -tubulin (*BenA*) and calmodulin (*CaM*) fragments showed that twenty isolates were *A. welwitschiae*, five were *A. niger* and one isolate was *A. brasiliensis*. Pathogenicity tests on sisal seedlings revealed that most isolates of *A. welwitschiae* are pathogenic, together with the *A. brasiliensis* isolate, but none of *A. niger* isolates were able to cause the disease. It is concluded that *A. welwitschiae* is the main agent of the disease and *A. niger* was not associated with sisal bole rot.

Keywords: Poliphasic taxonomy. *Agave sisalana*. *Aspergillus welwitschiae*.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA.....	9
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1. GÊNERO <i>Aspergillus</i>.....	11
2.2. SEÇÃO <i>Nigri</i> DE <i>Aspergillus</i>.....	13
2.3. PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL.....	15
3. REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO 2: MANUSCRITO.....	23
<i>Aspergillus welwitschiae</i> IS THE MAIN CAUSAL AGENT OF SISAL BOLE ROT DISEASE.	24
ABSTRACT.....	24
REFERENCES.....	31
SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	36

CAPÍTULO 1: Revisão de Literatura

1 INTRODUÇÃO GERAL

2
3 O gênero *Aspergillus* é integrado por espécies diversificadas e para a correta
4 identificação destas é necessário o estudo das características morfológicas, fisiológicas e
5 filogenéticas (SAMSON *et al.*, 2014). Com o avanço tecnológico ao longo dos anos, muitas
6 descobertas no ramo da fitopatologia têm sido realizadas e diversos patógenos de plantas têm
7 sido identificados em laboratórios (SILVA *et al.*, 2006). A correta identificação dos agentes
8 causais das doenças de plantas permite a orientação para a tomada de decisão quanto ao
9 manejo a ser utilizado na cultura.

10 A identificação morfológica é realizada por macro e micromorfologia, principalmente
11 pela análise das colônias fúngicas e dos conídios. Já a identificação molecular é realizada por
12 meio da análise de sequências da região do espaçador transcrito interno (*ITS*) do DNA
13 ribossômico, a β -tubulina (*BenA*), a calmodulina (*CaM*) e pela segunda subunidade da RNA
14 polimerase (*rpb2*). Os testes de patogenicidade, incluindo os postulados de Koch, são
15 utilizados para confirmar a patogenicidade de supostos agentes etiológicos da podridão
16 vermelha do sisal, como realizado por Santos *et al.* (2014).

17 O sisal (*Agave sisalana* Perrine) é uma planta monocotiledônea, semi-xerófila e
18 rústica que se desenvolve bem em regiões secas, com altas temperaturas e luminosidade e em
19 solos pouco férteis. Com isso, é de fundamental importância socioeconômica, por gerar renda
20 em locais de elevada pobreza, como o semiárido brasileiro (ALVES *et al.*, 2004). O sisal é
21 cultivado para fins comerciais, por possuir uma fibra dura de alta qualidade, utilizada na
22 produção de cordas, artesanato, papel kraft, tapetes, podendo também ser utilizada na
23 construção civil e na indústria (MARTIN *et al.*, 2009). O Brasil é líder mundial na produção
24 sisaleira desde 1971 (MAPA, 2015). Entretanto, o baixo nível tecnológico e as doenças
25 causadas por fitopatógenos são alguns dos fatores limitantes para o cultivo e aumento da
26 produção no Brasil. Entre as doenças já relatadas em sisal, a podridão vermelha (*Aspergillus*
27 *sp.*) é a mais importante (SANTOS *et al.*, 2014).

28 A doença é caracterizada por produzir inicialmente uma podridão interna do tronco
29 da planta, progredindo para as bases foliares, que passam a apresentar coloração avermelhada,
30 e externamente o amarelecimento das folhas das plantas afetadas (LIMA *et al.*, 1998). O
31 agente causal da podridão vermelha do sisal foi identificado, por meio de análises
32 morfológicas e testes de patogenicidade, como *Aspergillus niger* (COUTINHO *et al.*, 2006;
33 SOARES *et al.*, 2006). Todavia, Santos *et al.* (2014), utilizando métodos de caracterização

34 morfológicos e moleculares, identificaram *A. brasiliensis* e *A. tubingensis*, além de *A. niger*,
35 como agentes da podridão vermelha do sisal.

36 Diante do exposto, o primeiro capítulo é uma revisão de literatura com objetivo de
37 apresentar a cultura do sisal e informar sobre os agentes da podridão vermelha, bem como
38 sobre sua identificação taxonômica. O segundo capítulo é um manuscrito a ser submetido, que
39 tem como objetivo identificar por meio de taxonomia polifásica as espécies de *Aspergillus* da
40 seção *Nigri* causadoras da podridão vermelha do sisal.

41

42 1. REFERENCIAL TEÓRICO

43

44 2.1. GÊNERO *Aspergillus*

45

46 O gênero *Aspergillus* é caracterizado pela formação de conídios em cadeia e fiálides.
47 Pertencente ao filo Ascomycota, ordem *Eurotiales*, e a família *Trichocomaceae*. Estão
48 presentes nesse gênero 339 espécies, divididas em seis subgêneros: *Aspergillus*, *Cremeri*,
49 *Circumdati*, *Fumigati*, *Nidulantes* e *Polypaecillum* em 22 seções (Tabela 1), sendo que os
50 subgêneros *Cremeri* e *Polypaecillum* não são divididos em seções (KOC SUBÉ *et al.*, 2016).
51 Micheli (1729) foi quem descreveu pela primeira vez este gênero, e a primeira revisão deste
52 foi realizada por Thom e Church (1926). A classificação mais recente é de Kocsubé *et al.*
53 (2016) e foi baseada principalmente em características morfológicas, fisiológicas e
54 principalmente filogenéticas, incluindo métodos moleculares para auxiliar na qualidade e
55 confiabilidade da classificação do gênero. Este gênero é importante por possuir espécies
56 patogênicas a humanos, a animais e a plantas. Além disso, também podem ser agentes de
57 deterioração de alimentos, produtores de metabólitos tóxicos, embora algumas espécies
58 possam ser utilizadas na fermentação de alimentos e aplicações biotecnológicas (SAMSON;
59 VARGA, 2009). Em plantas como o sisal, estes microrganismos podem atuar como saprófitas
60 ou parasitas fracos e causa doenças apenas em locais com lesões de origem mecânica ou
61 fisiológica (SILVA *et al.*, 2008).

62 A reprodução deste fungo é sexuada e assexuada e suas características microscópicas
63 são importantes em sua caracterização. A fase sexuada produz ascos, ascósporos e cleistotécio
64 (SAMSON *et al.*, 2014). Na fase assexuada possuem conídios, conidióforos usualmente
65 asseptados e em seu ápice está a vesícula que pode ser ligada diretamente às fiálides ou
66 possuir uma métula (estrutura que liga a fiálide à vesícula) entre elas, sendo denominados de
67 unisseriados (Figura 1A) ou bisseriados (Figura 1B), respectivamente (KLICH, 2002).

68 A caracterização morfológica é dividida em macro e micromorfologia. A
 69 macromorfologia engloba a taxa de crescimento da colônia, grau de esporulação, textura, cor
 70 do micélio, exsudados, presença de escleródio ou cleistotécios e análise das estruturas sexuais
 71 e assexuais, devido à ocorrência dos dois tipos de reprodução em diferentes meios como
 72 *czapek yeast autolysate agar* (CYA), *malt extract autolysate* (MEA), *yeast extract sucrose*
 73 *agar* (YES), *oatmeal agar* (OA) e *creatine sucrose agar* (CREA). A micromorfologia inclui a
 74 forma do conídio, presença ou não de métulas, dimensão, forma, coloração e textura do
 75 conidióforo, forma e desenvolvimento da vesícula, tamanho, morfologia e ornamentação dos
 76 conídios no meio *czapek yeast autolysate agar* (CYA) ou *malt extract autolysate* (MEA)
 77 (SAMSON *et al.*, 2014).

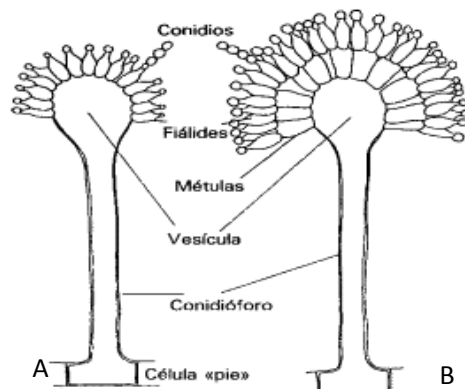
78

79 Tabela 1 – Gênero *Aspergillus* e sua divisão em subgêneros e seções.

Gênero	Subgênero	Seção
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
		<i>Restricti</i>
	<i>Circumdati</i>	<i>Candidi</i>
		<i>Circumdati</i>
		<i>Flavi</i>
		<i>Flavipedes</i>
		<i>Jani</i>
		<i>Petersonii</i>
		<i>Nigri</i>
		<i>Robusti</i>
		<i>Tanneri</i>
		<i>Terrei</i>
	<i>Cremei</i>	-
	<i>Fumigati</i>	<i>Cervini</i>
		<i>Clavati</i>
		<i>Fumigati</i>
	<i>Nidulantes</i>	<i>Aeni</i>
		<i>Bispori</i>
		<i>Nidulantes</i>
		<i>Ochraceorosei</i>
		<i>Raperi</i>
<i>Silvati</i>		
<i>Sparsi</i>		
<i>Usti</i>		
<i>Versicolores</i>		
<i>Polypaecillum</i>	-	

80 Fonte: Samson *et al.*, 2007; Houbraken; Samson, 2011; Samson *et al.*, 2014; Hubka *et al.*,
 81 2014; Jurjevic *et al.*, 2015; Hubka *et al.*, 2016; Kocsubé *et al.*, 2016; Despot *et al.*, 2017.

82 Figura 1 – Morfologia dos conidióforos de espécies de *Aspergillus* unisseriados (A) e
 83 bisseriados (B).



84 Fonte: <http://www.uprm.edu/biology/profs/betancourtc/Lab/Aspergilosis.htm>

85

86

87 A caracterização morfológica é uma parte importante na identificação de *Aspergillus*
 88 sp., mas se faz necessária a junção com outros métodos, uma vez que nem todas as espécies
 89 podem ser separadas somente por análises morfológicas como *A. niger* e *A. welwitschiae*. A
 90 taxonomia polifásica é baseada no fenótipo, com análise morfológica (macro e
 91 micromorfologia) e produção de extrólitos e também no genótipo, por meio de sequências de
 92 fragmentos de genes (SAMSON *et al.*, 2007).

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

2.2. SEÇÃO *Nigri* DE *Aspergillus*

105

106

107

108

109

A seção *Nigri* é caracterizada por possuírem conídios pretos ou próximos a cor preta. Este grupo possui espécies importantes nos setores alimentício, médico e biotecnológico (VARGA *et al.*, 2011). A classificação e identificação de espécies nessa seção é complexa devido ao número reduzido de caracteres diagnósticos. Muitas classificações taxonômicas já

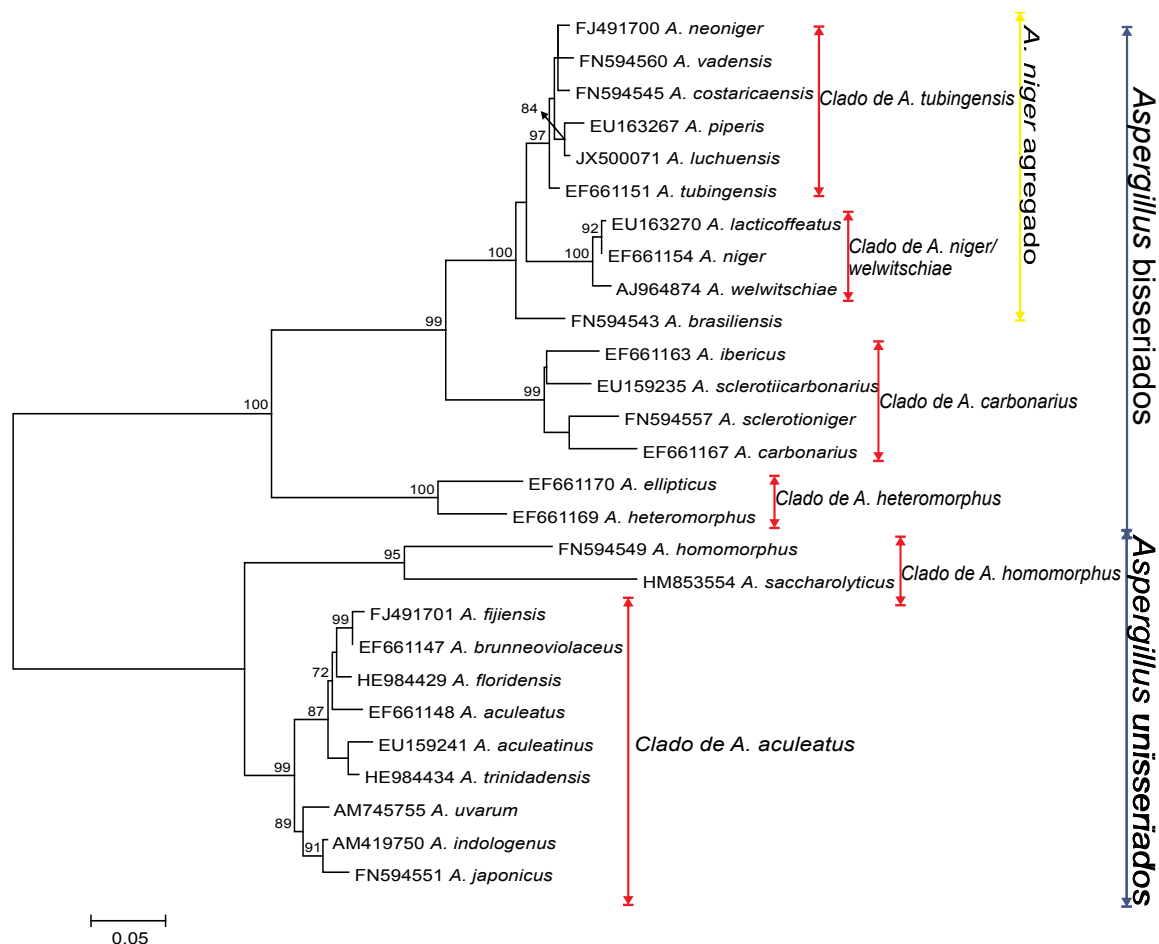
110 foram propostas, porém, existe grande dificuldade de se classificar apenas por fenótipo. Com
111 isso, o uso de caracteres moleculares é de extrema importância. A taxonomia polifásica é
112 utilizada como ferramenta para a separação de espécies desse clado com o uso de caracteres
113 morfológicos, fisiológicos e moleculares (SAMSON *et al.* 2007; SAMSON *et al.*, 2014).

114 A análise da produção de extrólitos auxilia na separação de algumas seções, mas não
115 diferencia espécies (SUSCA *et al.*, 2016). Algumas das espécies presentes na seção *Nigri*,
116 como *A. niger* podem produzir metabólitos secundários que auxiliam na taxonomia, como a
117 micotoxina ocratoxina A com propriedades carcinogênicas, teratogênicas, imunossupressoras
118 e nefrotóxicas (VARGA *et al.*, 2007). Micotoxinas geram impactos significativos na
119 sociedade moderna, pois contaminam os produtos no campo, durante o armazenamento e
120 processamento. Os níveis de ocratoxina A não podem estar acima dos níveis tolerados por
121 cada país ou região e inviabilizam a venda dos produtos (VARGA *et al.*, 2010). No Brasil a
122 resolução nº 7 de 18 de fevereiro de 2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária
123 (ANVISA) dispõe sobre os limites máximos tolerados de diferentes micotoxinas em
124 alimentos.

125 Samson *et al.* (2014) analisaram a filogenia, identificação e nomenclatura de espécies
126 do gênero *Aspergillus* utilizando as regiões *ITS*, *BenA*, *CaM* e *rpb2*, e para a seção *Nigri*, um
127 fragmento do gene de calmodulina foi a mais informativa devido a presença de polimorfismos
128 fixos, também chamados de SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), pois diferenciou
129 espécies muito próximas. O alinhamento e comparação das sequências de calmodulina das
130 espécies da Seção *Nigri* (Figura 2) descritas até o momento, separou esta seção em 18
131 espécies, divididas em 6 clados: *A. tubingensis*, *A.niger/A.welwitschiae*, *A. carbonarius*, *A.*
132 *heteromorphus*, *A. homomorphus* e *A. aculeatus*. Os clados *A. tubingensis* e
133 *A.niger/A.welwitschiae* e a espécie *A. brasiliensis* estão no clado *A. niger* agregado. Os
134 integrantes desse clado possuem elevada similaridade morfológica.

135 O clado *A. niger/A. welwitschiae* é o de mais difícil diferenciação, por serem espécies
136 crípticas com características morfológicas idênticas e pouca diferença filogenética
137 (PERRONE *et al.*, 2011). Apenas 3 SNPs do fragmento sequenciado do gene da calmodulina
138 foi utilizado para diferenciar essas espécies (SAMSON *et al.*, 2014). A espécie *A. awamori*
139 (PERRONE *et al.*, 2011) foi descrita no clado *A.niger/A.welwitschiae* com base no isolado
140 depositado incorretamente como neotipo (CBS 557.65^{NT}). Estudos posteriores empregando
141 sequências de calmodulina mostraram que *A. awamori* é idêntica à espécie tipo de *A.*
142 *welwitschiae* (CBS 139.54) (HONG *et al.*, 2013). Portanto, descrições que não levam em
143 consideração sequências de calmodulina podem incorrer no risco de serem invalidadas.

144 Figura 2 – Árvore filogenética de um fragmento do gene que codifica a calmodulina de todas
 145 as espécies válidas da seção *Nigri* encontradas nos bancos de dados públicos. A árvore foi
 146 construída com 456 nucleotídeos alinhados utilizando o método de Máxima verossimilhança
 147 (ML) e o modelo de substituição K2 + G + I. A análise de bootstrap foi feita com 1000
 148 pseudo-reamostragens e os números nos clados representam valores acima de 70%. A escala
 149 representa o número de substituições por sítio.



150 Obs: as espécies *A. awamori*, *A. fijiensis*, *A. lacticoffeatus* e *A. piperis*, não são válidas.

151

152 2.3. PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL

153

154 O sisal (*Agave sisalana*) pertence ao gênero *Agave*, que possui mais de 300 espécies.
 155 *A. sisalana* se destaca por sua beleza e rusticidade, podendo ser utilizada como ornamental,
 156 mas é principalmente usada para fins comerciais, como fonte de fibra vegetal dura. Essa fibra
 157 possui boa qualidade e é capaz de substituir fibras sintéticas (CUNHA NETO; MARTINS,
 158 2012). Estas fibras estão presentes nas folhas do sisal e podem variar de 1 a 1,5 m de
 159 comprimento com uma coloração creme ou amarelo pálido (SILVA *et al.*, 2008). A fibra pode
 160 ser usada na confecção de cordas, tapetes, tecidos, mantas e bolsas (BROWN, 2002). No

161 Brasil, possui importância socioeconômica no nordeste brasileiro, promovendo a geração de
162 renda em locais de elevada pobreza (ALVES *et al.*, 2004).

163 O sisal é de região tropical e se desenvolve bem em locais com climas quentes e com
164 alta luminosidade. A reprodução da planta é principalmente assexuada, o plantio deve ser
165 realizado antes da época chuvosa, através de rebentos ou de bulbilhos de plantas sadias,
166 havendo assim pouca variação morfológica entre as plantas. O ciclo da cultura varia entre 8 a
167 10 anos, sendo o primeiro corte realizado aos 36 meses e os posteriores, a cada 12 meses. A
168 planta possui sistema radicular fibroso e fasciculado, com raízes: fixadoras e alimentadoras. É
169 acaulescente, pois o caule é subterrâneo, denominado rizoma. Na parte aérea, o pseudocaule
170 tem forma de roseta, seu eixo central é envolto por uma casca lignificada, de espessura média
171 de 3 mm, onde há a inserção das folhas em forma de espiral (SILVA *et al.*, 2008). As folhas
172 são rígidas, lisas, de coloração verde, com ápices pontiagudos, carnosas, com alta cutinização
173 da epiderme e número reduzido de estômatos. Esses três últimos auxiliam na defesa da planta
174 contra as condições de aridez e fitopatógenos (ALVES *et al.*, 2004). No interior das folhas
175 está um tecido esponjoso, denominado parênquima, onde está a fibra. O florescimento ocorre
176 apenas uma vez ao final do ciclo vegetativo com flores hermafroditas, e raramente ocorre a
177 frutificação de forma natural (SILVA *et al.*, 2008).

178 O provável centro de origem do sisal é na Península de Yucatan no México (BROWN,
179 2002). O Brasil é o maior produtor mundial, em 2013 obteve uma produção de 150.584 t,
180 seguido da Tanzânia (34.875 t), Quênia (28.000 t), Madagascar (18.950 t) e México (12.000 t)
181 (FAO, 2015). Os principais exportadores mundiais são Brasil, Tanzânia, Quênia e
182 Madagascar, com exportações de 69.251 t, 18.000 t, 23.030 t e 6.390 t, respectivamente. O
183 principal importador dos derivados do sisal é a China, que importa elevada porcentagem das
184 produções do Brasil (64%), de Madagascar (52%) e da Tanzânia (42%), enquanto o Quênia
185 tem como principais importadores China, Arábia Saudita, Nigéria e Marrocos (<50%) (WGC,
186 2015). Nacionalmente, os estados produtores são Bahia, Paraíba, Ceará e Rio Grande do
187 Norte, responsáveis por 95,6%, 3,6%, 0,8% e 0,1%, da produção brasileira, respectivamente
188 (IBGE, 2015).

189 O sisal chegou ao Brasil aproximadamente em 1903, e a partir da década de 1930 foi
190 introduzido como possibilidade socioeconômica para a região nordeste (ALVES *et al.*, 2004).
191 Devido à sua facilidade de adaptação, desenvolveu-se bem no semiárido, e por ser cultivado
192 no período seco, gera emprego e renda nos setores industriais, artesanais e medicinais,
193 mostrando assim sua importância econômica local e nacional (SILVA *et al.*, 2008). Traz
194 benefícios à sociedade pois são produzidos principalmente via agricultura familiar no estado

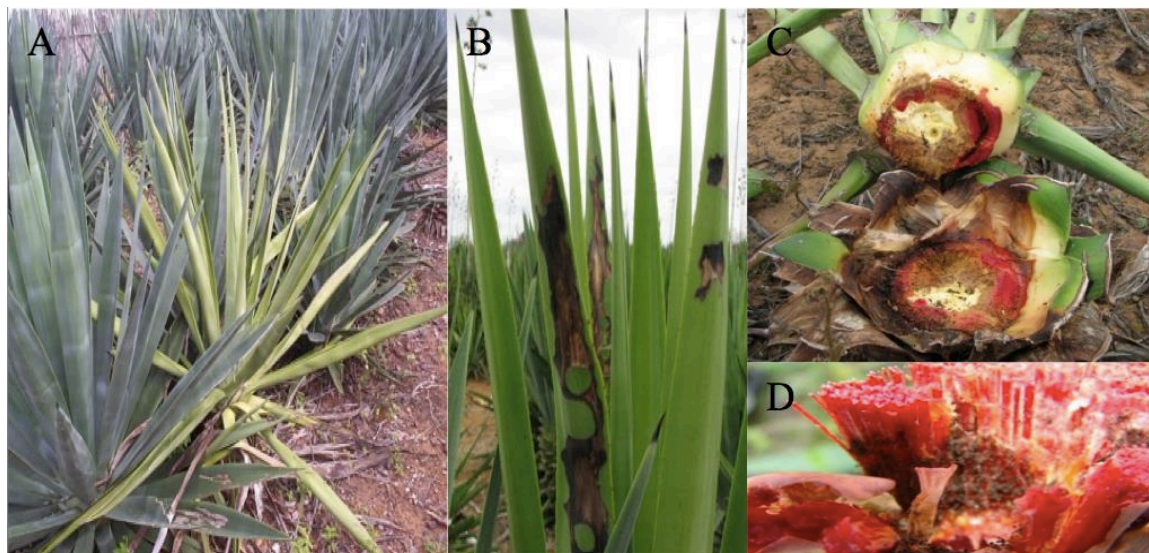
195 da Bahia, onde mais de 400 mil agricultores familiares sobrevivem do cultivo do sisal, fato
196 esse que auxilia na permanência do homem no campo e na região nordestina (CONAB, 2013).
197 O meio ambiente também é beneficiado, pois seus produtos são biodegradáveis e podem ser
198 reciclados e seu cultivo é de baixo impacto, por possuir baixa necessidade de defensivos e
199 adubos químicos (MOREIRA *et al.*, 1996).

200 Apesar dos benefícios, a área cultivada com sisal e a produtividade no Brasil estão
201 decrescendo nos últimos anos devido à baixa tecnologia ao longo da cadeia produtiva.
202 Geralmente, a mão-de-obra empregada não é qualificada e a remuneração é baixa, todavia, a
203 demanda de seu produto está em ascensão. Outro fator que afeta a produção é que apenas 4%
204 das folhas são aproveitadas na forma de fibra, e seus resíduos são divididos em líquidos
205 (80%) e sólidos (16%) (CONAB, 2013), que possuem potencial de uso para fins fitoterápicos
206 (CUNHA NETO; MARTINS, 2012).

207 A ocorrência de algumas doenças em plantações brasileiras já foi relatada, como a
208 antracnose, que tem como agente causal *Colletotrichum agaves* Cavo (MEDINA, 1954) e a
209 podridão vermelha do sisal, também conhecida como podridão do cepo, que causam prejuízos
210 significativos à lavoura (MEDINA, 1954; LIMA *et al.*, 1998). O baixo conhecimento
211 tecnológico e manejo inadequado da cultura elevam a pressão da doença e disseminação. Com
212 isso elevam os prejuízos ao agricultor e reduz a sustentabilidade e continuidade das lavouras
213 (BATISTA *et al.*, 2010). Não existem produtos químicos registrados para o controle da
214 podridão vermelha do sisal (SILVA *et al.*, 2008; BATISTA *et al.*, 2010). No entanto, se esses
215 existissem, não garantiriam o sucesso da lavoura, pois a maior parte dos produtores não
216 teriam condições financeiras para investir. Dentre as alternativas de manejo mais promissoras,
217 estão a adoção de tratamentos culturais adequados e uso de material propagativo sadio, para evitar a
218 entrada do patógeno na área (BATISTA *et al.*, 2010).

219 O sintoma da podridão vermelha do sisal é a alteração de cor das folhas de verde para
220 avermelhada, de forma progressiva para as bases foliares e externamente o amarelecimento
221 das folhas nas plantas afetadas e posterior murcha (LIMA *et al.*, 1998). Os prejuízos causados
222 às lavouras iniciaram na década de 70 em locais específicos da Bahia, Paraíba e Rio Grande
223 do Norte e em 1998 atingiu níveis de prejuízos mais acentuados (SILVA *et al.*, 2008). De
224 acordo com trabalhos realizados por Silva *et al.* (2009), em diferentes áreas de plantio da
225 Bahia, a incidência da doença variou de 1,5 à 43,66% nas áreas avaliadas, e mudas de
226 rebentos, mesmo provenientes de plantas sadias ou de plantas doentes, apresentaram entre
227 54,54 e 75 % de plantas doentes.

228 Figura 3 – Podridão Vermelha do sisal (A) planta com amarelecimento causado pela doença
 229 entre plantas saudias; (B) lesão foliar da doença; (C) pseudocaule sintomático de planta doente;
 230 (D) tecido lesionado.



231 Fonte: Jorge Teodoro de Souza.

232

233 No Brasil já foram registrados alguns relatos de agentes causais, sendo eles: *A. niger*
 234 (MEDINA, 1954; COUTINHO *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2006), identificado por meio de
 235 características morfológicas, sendo realizado o teste de patogenicidade com isolados dos
 236 estados da Bahia e Paraíba; *Lasiodiplodia theobromae* identificado por métodos morfológicos
 237 com posterior teste de patogenicidade utilizando material isolado do Estado da Paraíba
 238 (LIMA *et al.*, 1998). As espécies *Aspergillus brasiliensis*, *A. niger* e *A. tubingensis*, foram
 239 isoladas de materiais do estado da Bahia, sendo as únicas identificadas por métodos
 240 moleculares com o gene da β -tubulina além de métodos morfológicos e posterior teste de
 241 patogenicidade (SANTOS *et al.*, 2014). No entanto, como indicado anteriormente, espécies
 242 do clado *A.niger/A.welwitschiae* são distinguidos apenas por sequências do gene da
 243 calmodulina. Portanto, esses estudos serão indispensáveis para a identificação de espécies do
 244 clado *A.niger/A.welwitschiae* causadoras da podridão vermelha do sisal.

245

246 3. REFERÊNCIAS

247

248 ALVES, M.O.; SANTIAGO, E.G.; LIMA, A.R.M. Diagnóstico socioeconômico do setor
 249 sisaleiro do Nordeste brasileiro. Fortaleza, Banco do Nordeste, Série de documentos ETENE,
 250 n. 04, 90 p. 2004.

251

252 BATISTA, D.C.; SILVA, F.M.; SOUZA, W.C.O.; BARBOSA, M.A.G.; COSTA, V.S.O.;
 253 BRANDÃO, W.N. TERAÓ, D. Manejo da Podridão Vermelha do Tronco do Sisal. Embrapa,
 254 Circular Técnica, Petrolina, n. 92, Dez. 2010.

- 255 BRASIL. Resolução RDC N° 07, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos
256 tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Órgão emissor: ANVISA – Agência
257 Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em:
258 <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC_07_2011_COMP.pdf/afe3f054-
260 bc99-4e27-85c4-780b92e2b966](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC_07_2011_COMP.pdf/afe3f054-
259 bc99-4e27-85c4-780b92e2b966)>. Acesso em 20 de fevereiro de 2017.
- 261 BROWN, K. *Agave sisalana* Perrine. Wildlands weeks: Summer 2002, p.18-21. Disponível
262 em: <http://www.se-eppc.org/wildlandweeds/fullpdf/ww_Summer_2002.pdf>. Acesso em: 09
263 de setembro de 2015.
- 264
265 CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Proposta de preços
266 mínimos – Safra 2013/2014: Produtos de Inverno, Regionais e Leite. Disponível em:
267 <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_11_22_15_42_37_pm_imverno_1
269 3_14.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_11_22_15_42_37_pm_imverno_1
268 3_14.pdf)>. Acesso 20 de agosto de 2015.
- 270 COUTINHO, W.M.; SUASSUNA, N.D.; LUZ, C.M.; SUINAGA, F.A.; SILVA, O.R.R.F.
271 Bole rot of sisal caused by *Aspergillus niger* in Brazil. Fitopatologia Brasileira. Brasília, v.
272 31, n. 6, p. 605, Dec. 2006.
- 273
274 CUNHA NETO, I.L.; MARTINS, F.M. ANATOMIA DOS ÓRGÃOS VEGETATIVOS DE
275 *Agave sisalana* PERRINE ex ENGELM (AGAVACEAE) Revista Caatinga, Mossoró, v. 25,
276 n. 2, p. 72-78, mar.-jun., 2012.
- 277
278 DESPOT, D.J.; KOCSUBÉ, S.; BENCSIK, O; KECSKEMÉTI, A; SZEKERES, A.;
279 VÁGVÖLGYI, C.; VARGA, J.; KLARIĆ, M.S. New sterigmatocystin-producing species of
280 *Aspergillus* section *Versicolores* from indoor air in Croatia. Mycological Progress, v. 16, p.
281 63–72, jan., 2017.
- 282
283 FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.
284 Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/>>. Acesso em: 22 de setembro de 2015.
- 285
286 HONG, SB; LEE, M; KIM, D.H; VARGA, J; FRISVARD, J.C.; PERRONE, G.; GOMI, K.;
287 YAMADA, O.; MACHIDA, M.; HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R.A. *Aspergillus luchuensis*,
288 an industrially important black *Aspergillus* in east Asia. PLoS ONE 8(5): e63769, 2013.
- 289
290 HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R.A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of
291 *Trichocomaceae* into three families. Studies in Mycology v.70, p. 1–51, 2011.
- 292
293 HUBKA, V.; NOVÁKOVA, A.; KOLARÍK, A; JURJEVIĆ, Ž.; PETERSON, S.W. Revision
294 of *Aspergillus* section *Flavipedes*: seven new species and proposal of section *Jani* sect. nov.
295 Mycologia: In press. 2014.
- 296
297 HUBKA, V.; NOVÁKOVÁ, A.; PETERSON, S.W. A reappraisal of *Aspergillus* section
298 *Nidulantes* with descriptions of two new sterigmatocystin-producing species. Plant
299 Systematics and Evolution, v.302, p.1267–1299, 2016.
- 300
301 IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa mensal
302 de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Levantamento sistemático
303 da produção agrícola, Rio de Janeiro, v. 29, 83 p. 2015.

- 304 JURJEVIC, Z.; KUBATOVA, A.; KOLARÍK, M.; HUBKA, V. Taxonomy of *Aspergillus*
305 section *Petersonii* sect. nov. encompassing indoor and soil-borne species with predominant
306 tropical distribution. *Plant Systematics and Evolution*, v. 301, p. 2441 – 2462, 2015.
307
- 308 KLICH, M.A. Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor
309 Schimmelcultures, Utrecht, 2002.
310
- 311 KOCSUBÉ S.; PERRONE, G.; MAGISTÀ, D.; HOUBRAKEN, J.; VARGA, J.; SZIGETI,
312 G.; HUBKA, V.; HONG, S.B.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. *ASPERGILLUS* IS
313 MONOPHYLETIC: EVIDENCE FROM MULTIPLE GENE phylogenies and extrolites
314 profiles. *Studies in Mycology*, nov., 2016.
315
- 316 LIMA, E. F.; MOREIRA, J. de A. N.; BATISTA, F. A. S; SILVA, O. R. R. F. da; FARIAS,
317 F. J. C.; ARAÚJO, A. E.; Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perr.)
318 causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. *Revista de Oleaginosas e Fibras*, Campina
319 Grande, v. 2, n. 2, p. 109- 112, 1998.
320
- 321 MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.
322 Estatísticas e perspectivas de 2015 – Sisal: Produção Mundial. Disponível em:
323 <[http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Fibras/10RO/ESTATISTIC
324 AS%20E%20PERSPECTIVA%20-%20SISAL.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Fibras/10RO/ESTATISTICAS%20E%20PERSPECTIVA%20-%20SISAL.pdf)>. Acesso 20 de agosto de 2015.
325
- 326 MARTIN, A.R.; MARTINS, M.A.; MATTOSO, L.H.C.; SILVA, O.R.R.F. Caracterização
327 Química e Estrutural de Fibra de Sisal da Variedade *Agave sisalana*. *Polímeros: Ciência e*
328 *Tecnologia*, vol. 19, no 1, p. 40-46, 2009.
329
- 330 MEDINA, J. C. O Sisal. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Diretoria de Publicidade
331 Agrícola, 1954, 285p.
332
- 333 MICHELI, P.A. Nova plantarum genera juxta Tournefortii methodum disposita. In: KLICH,
334 M.A. Identification of common *Aspergillus* species. Netherlands: Centraalbureau voor
335 Schimmelcultures, 2002. 116p.
336
- 337 MOREIRA, J.A.N.; SILVA, O.R.R.F.; AMORIM NETO, M.S.; BELTRÃO, N.E.M.; VALE,
338 L.V.; SANTOS, R.F. Declínio do sisal e medidas para seu soerguimento no nordeste
339 brasileiro. *Embrapa Algodão*, Campina grande, 1996.
340
- 341 PERRONE, G.; STEA, G.; EPIFANI, F.; VARGA, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A.
342 *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal Biology*,
343 v.115, p. 1138–1150, 2011.
344
- 345 SANTOS, P.O.; SILVA, A.C.M.; CORRÊA, É.B.; MAGALHÃES, V.C.; SOUZA, J.T.
346 Additional species of *Aspergillus* causing bole rot disease in *Agave sisalana*. *Tropical Plant*
347 *Pathology*, Brasília, v. 39, n. 4, p. 331-334, Aug. 2014 .
348
- 349 SAMSON, R.A.; HONG, S.B.; PETERSON, S.W.; FRISVAD, J.C.; VARGA, J. Polyphasic
350 taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Studies in*
351 *Mycology*, Vol. 59, p. 147-203, 2007.
352

- 353 SAMSON, R.A.; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? Medical Mycology, Oxford,
354 v.47, n. 13/20, p.813-820, 2009.
355
- 356 SAMSON, R.A.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S. B.; HUBKA, V.;
357 KLAASSEN, C.H.W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; SUSCA, A.; TANNEY, J.B.;
358 VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J. C. Phylogeny,
359 identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Studies in Mycology, Vol. 78, p.
360 141-173, 2014.
361
- 362 SCHOCH C.L.; SEIFERT, K.A.; HUHDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J.L.;
363 LEVESQUE, C.A.; CHEN, W.; FUNGAL BARCODING CONSORTIUM. Nuclear
364 ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for
365 *Fungi*. University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, 2012.
366
- 367 SILVA, F. M. ; BRANDAO, W. N. ; BARBOSA, M. A. G. ; TERAQ, D. ; BATISTA, D. C. .
368 Levantamento e Distribuição Espacial da Podridão Vermelha do Sisal em Áreas de Produção
369 da Bahia. In: IV Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semiárido, 2009, Petrolina.
370 Anais da IV Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semiárido. Petrolina: Embrapa
371 Semiárido, 2009. p. 122-128.
372
- 373 SILVA, O.R.R.F.; COUTINHO, W.M.; CARTAXO, W.V; SOFIANTTI, V.; SILVA FILHO,
374 J.L.; CARVALHO O.S.; COSTA, L.B. Cultivo do Sisal no Nordeste Brasileiro. Embrapa
375 Algodão, Circular Técnica, Campina Grande, v.123, p. 24, 2008.
376
- 377 SILVA, R. R. Da; COELHO, G. D. Fungos, Principais grupos e aplicações biotecnológicas.
378 Instituto de Botânica IBT, São Paulo, outubro, 2006.
379
- 380 SOARES, A.C.F.; SALOMÃO, M.; ALMEIDA, N.S.; PEREZ, J.O.; GARRIDO, M.
381 Podridão vermelha do pseudocaule e mancha foliar do sisal (*Agave sisalana* Perrine) causados
382 por *Aspergillus niger* na Bahia. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Resumos.
383 Salvador, BA. Sociedade Brasileira de Fitopatologia. 2006.
384
- 385 SUSCA, A.; PROCTOR, R.H.; MORELLI, M.; HAIDUKOWSKI, M.; GALLO, A.;
386 LOGRIECO, A. F.; MORETTI, A. Variation in Fumonisin and Ochratoxin Production
387 Associated with Differences in Biosynthetic Gene Content in *Aspergillus niger* and *A.*
388 *welwitschiae* Isolates from Multiple Crop and Geographic Origins. Frontiers in Microbiology,
389 7, 1412, 2016.
390
- 391 THOM, C.; CHURCH, M.B. The Aspergilli. Williams; Wilkins Co., Baltimore, 272 p.
392
- 393 VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; KOCSUBÉ, S.; BRANKOVICS, B.; TÓTH, B.; SZIGETI, G.;
394 SAMSON, R. A. New and revisited species in *Aspergillus* section Nigri. Studies in
395 Mycology, v. 69, p. 1-17, 2011.
396
- 397 VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; TÓTH, B.; FRISVAD, J.C.; PERRONE, G.; SUSCA, A.;
398 MEIJER, M.; SAMSON, R.A. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriata black *Aspergillus*
399 species with world-wide distribution. International Journal of Systematic and Evolutionary
400 Microbiology (2007), 57, 1925–1932, 2007.
401

- 402 VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; PÉTERI, Z.; VÁGVÖLGYI, C.; TÓTH, B. Chemical, Physical
403 and Biological Approaches to Prevent Ochratoxin Induced Toxicoses in Humans and
404 Animals. *Toxins*, 2(7), 1718–1750, 2010.
- 405
406 WGC - Wilhelm G. Clasen. Market Report Sisal November 2014 - March 2015. Disponível
407 em: < http://www.wgc.de/pdf_data/en_sisal-marketreport-03-2015.pdf>. Acesso em: 20 de
408 setembro de 2015.

CAPÍTULO 2: MANUSCRITO

28 The genus *Aspergillus* comprises 339 species divided into six subgenera and 22
29 sections (Samson et al., 2014; Kocsubé et al., 2016). A group of 26 species that possess black
30 spores are collectively called black aspergilli and are in the subgenus *Circumdati* and section
31 *Nigri* (Gams et al., 1985). Some species in the section *Nigri* are morphologically
32 indistinguishable from each other (Susca et al., 2016) and therefore polyphasic taxonomy that
33 includes morphological and molecular characterization is advocated to distinguish *Aspergillus*
34 species in the section *Nigri* (Samson et al., 2007).

35 Many of these species are important in the food and biotechnology industries, in
36 medical mycology (Varga et al., 2011) and plant pathology (Perrone et al., 2007). Some
37 species of *Aspergillus* are reported to cause a disease bole rot in sisal (*Agave sisalana*)
38 (Santos et al., 2014). This disease leads to plant death and is one of the factors responsible for
39 the decline of sisal production in Brazil (Coutinho et al., 2006; Santos et al., 2014). Sisal is a
40 source of hard fibre and is cultivated in the semi-arid region of the Brazilian northeast, where
41 it is a source of income to poor farmers that depend on familiar labor (CONAB, 2013). Brazil
42 is the world's largest producer and exporter of sisal fibre since 1971 and Bahia State is
43 responsible for 95.6% of the national production (IBGE, 2015; MAPA, 2015).

44 The species *A. brasiliensis*, *A. niger* and *A. tubingensis* were identified as causal
45 agents of the disease on the basis of pathogenicity tests, morphological and molecular analysis
46 with the β -tubulin gene. Molecular analysis of this gene alone is not sufficient to separate
47 some of the species in the section *Nigri*, such as the components of the *A. niger/A.*
48 *welwitschiae* complex. However, sequences of the calmodulin gene were shown to distinguish
49 species in the section *Nigri* (Samson et al., 2014). In this study, we report the identification of
50 species associated with sisal bole rot disease with special reference to the distinction of the
51 species in the *A.niger/A.welwitschiae* complex.

52 Sixteen isolates of *Aspergillus* were obtained from soil or diseased sisal plants in
53 Bahia State and ten isolates were obtained from samples unrelated to sisal in Minas Gerais
54 and Pernambuco States or from the ITEM culture collection (Table 1). All isolates were
55 routinely grown on malt extract agar (MEA) composed of malt extract (20g), peptone (1g),
56 glucose (20g), agar (20g) and distillate water (1L). The isolates were stored in glycerol 40%
57 at -80°C and all experiments were done with fresh colonies from the -80°C. Morphological
58 identification of the isolates was performed with Klich's (2002) key for *Aspergillus* species.
59 The isolates were grown on czapek yeast autolysate agar (CYA), malt extract autolysate
60 (MEA), yeast extract sucrose agar (YES), oatmeal agar (OA) and creatine sucrose agar
61 (CREA) (SAMSON *et al.*, 2014) incubated in the dark at 25°C for 7 days, except for the ones
62 on CYA that were incubated at 25°C and 37°C. Micromorphological observations were done
63 with microscopic mounts with methyl blue from CYA colonies grown at 25°C for 7 days. The
64 following characteristics were observed: color, diameter, shape and texture of the conidia;
65 conidial heads; dimension, diameter, and texture of the conidiophores; diameter and shape of
66 the vesicles. DNA extraction was done with Wizard® Genomic DNA Purification Kit
67 (Promega) according to the manufacturer's instructions using mycelium from cultures grown
68 in liquid malt extract medium incubated in a shaker at 150 rpm at 28°C for 24 h. Primers ITS1
69 and ITS4 (White *et al.* 1990), Bt2a and Bt2b (Glass and Donaldson, 1995) and CF1 and CF4
70 (Peterson *et al.*, 2005) were used to amplify fragments of the internal transcribed spacer (*ITS*),
71 β -tubulin (*BenA*) and calmodulin (*CaM*) gene, respectively. PCR amplifications were done in
72 a thermal cycle with the program: 93 °C for 2 min followed by 38 cycles of 93 °C for 30 s, 55
73 °C for 30 s, 72 °C for 60 s and 72 °C for 10 min (Hubka *et al.*, 2016). Sequencing was done
74 with the sanger method utilizing the amplification primers. Sequences were assembled and
75 edited with the program Sequencher v. 5.0 software (Gene Codes) and were deposited in
76 public databases and may be accessed by the accession numbers listed in Table 1. Alignments

77 of the obtained sequences and reference sequences from Samson *et al.* (2014) were performed
78 with the program MAFFT (Multiple sequence alignment based on Fast Fourier Transform)
79 v7.149 (Kato & Standley, 2013). Phylogenetic analyses with the Maximum Likelihood (ML)
80 method and choice of the substitution model were done with the program MEGA 6.06
81 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura *et al.*, 2013). Bootstrap analyses were
82 done with 1,000 replicates. Pathogenicity tests were performed by inoculating each of the 26
83 isolates in sisal plantlets of approximately 20 cm of height grown in pots filled with 0.5 kg of
84 soil. Spore suspensions adjusted to 10^7 conidia/ml were obtained by scraping spores from
85 MEA plates incubated for 7 days at 25 °C. Sisal plantlets were wounded at the bole (2 cm
86 from the crown) with four nails of 1 mm diam, separated by 1 cm and fixed to a wooden base.
87 Each perforation was 2 cm deep and was inoculated with 100 μ l of spore suspension (Santos
88 *et al.*, 2014). Plantlets treated with sterile distilled water served as negative controls. The
89 experiments were conducted in a completely randomized design with three replicates per
90 treatment and the whole experiment was done three times independently. Pathogenicity tests in
91 the laboratory were performed by inoculating each of the 26 isolates in sisal plantlets of
92 approximately 15 cm of height kept in box without soil with high humidity. The subsequent
93 steps were the same as those described above, but this was done with five replicates per
94 treatment. Fourteen days after the inoculation plantlets were cut horizontally to observe
95 disease incidence and severity. Severity evaluations were done with a scale varying from 0 to
96 3, where 0 represents no symptom; 1 is darkening of the internal tissues of the stem; 2 is
97 redness in the internal tissues of the stem and 3 is a dead plant (Sá, 2009). Re-isolations from
98 diseased and healthy plants were performed to confirm the pathogenicity of the isolates
99 inoculated.

100 The morphological characteristics of the 26 *Aspergillus* isolates used in this study did
101 not allow their unequivocal identification (Table 1). On the other hand, phylogenetic analysis

102 of the combined sequences of the *ITS*, *BenA* and *CaM* or *CaM* alone revealed that one isolate
103 was *A. brasiliensis*, five were *A. niger* and twenty were *A. welwitschiae* (Figure 1A).
104 Pathogenicity tests showed that none of the five isolates of *A. niger* was pathogenic to sisal,
105 whereas the isolate of *A. brasiliensis* and most of the isolates of *A. welwitschiae* were able to
106 cause bole rot in inoculated plantlets (Table 3).

107 Previous work done in our research group showed that *A. niger*, *A. tubingensis* and *A.*
108 *brasiliensis* were the causal agents of sisal bole rot disease (Santos et al., 2014). However, at
109 that time the phylogenetic analysis was performed with the β -tubulin gene, which is able to
110 correctly identify *A. tubingensis* and *A. brasiliensis*, but this region does not have sufficient
111 resolution to separate *A. niger* and *A. welwitschiae*.

112 In this study, we show that *A. welwitschiae* is the most common pathogen of sisal bole
113 rot disease in Bahia. From the 16 randomly selected isolates obtained from diseased sisal
114 plants and soil cultivated with sisal used in this study, none of the isolates was from the
115 species *A. niger*, whereas 15 were classified as *A. welwitschiae* and one as *A. brasiliensis*.
116 Additionally, none of the five *A. niger* isolates used in this study were able to cause
117 symptoms of bole rot disease in sisal plantlets. We recognize that the number of isolates of *A.*
118 *niger* is small, and furthermore, all the isolates of *A. niger* used in our analyses were obtained
119 from other sources because we never found any isolate of this species in association with
120 sisal. We are currently initiating an effort to sequence the *CaM* gene from 73 isolates from the
121 complex *A. niger/A. welwitschiae* from sisal in order to have a better understanding of their
122 epidemiology in the field. Although many studies done only on the basis of morphology have
123 identified *A. niger* as a common species in many substrates, including sisal (Medina, 1954;
124 Coutinho et al., 2006; Soares et al., 2006; Santos et al., 2014), modern taxonomic work is
125 beginning to reveal that *A. welwitschiae* seems to be more common in several substrates,
126 including onions, whereas *A. niger* is more common in coffee beans, dried fruits, and grapes

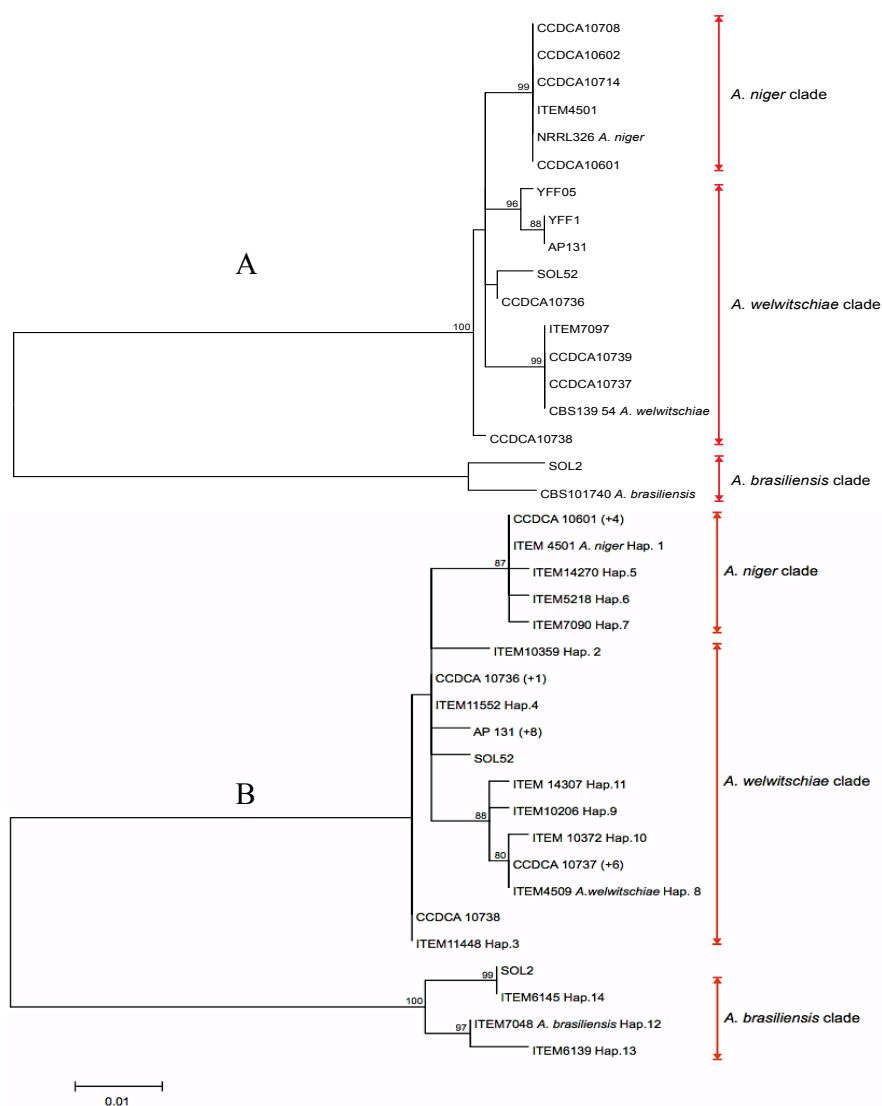
127 (Massi et al., 2016). Furthermore, *A. welwitschiae* was initially described as a plant pathogen
128 in *Welwitschia mirabilis* (Wehmer, 1907). *A. niger* and *A. welwitschiae* are cryptic species
129 with identical morphology, which are only separated on the basis of *CaM* sequence analyses.
130 Due the complexity of distinguishing these species, *A. welwitschiae* was initially identified as
131 *A. awamori* (Perrone et al., 2011) based on the isolate incorrectly selected as a neotype (CBS
132 557.65NT), which after molecular identification with Calmodulin was found to be equal to
133 the type species of *A. welwitschiae* (CBS 139.54). Therefore, *A. awamori* has an uncertain
134 status at the moment and is considered an invalid species (Hong et al., 2013).

135 The number of fixed differences between the species *A. niger* and *A. welwitschiae* is
136 very limited: there are only three differences reported in studies employing either 536-bp
137 (Samson et al., 2014) or 363-bp (Massi et al., 2016) of the *CaM* gene. In this study, we used
138 sequences of the *CaM* gene that were 670 nucleotides long and found the three previously
139 reported and three additional fixed nucleotides differences, which are listed below. The
140 numbers represent the position of the nucleotides in the alignment and letters between
141 parentheses are the nucleotides in *A. niger* and in *A. welwitschiae*, respectively: 126 (A/T),
142 149 (T/C), 170 (T/C), 177 (C/T), 203 (A/deletion) and 652 (A/T). The longer calmodulin
143 fragments used in the study provided a better separation of *A. niger* and *A. welwitschiae* (Fig.
144 2), eliminating the unresolved clades (polytomies) observed with shorter fragments (Fig. 1).

145 Calmodulin sequences were previously used to classify the isolates of *A. niger* and *A.*
146 *welwitschiae* in haplotypes (Samson et al., 2014; Massi et al., 2016). Four haplotypes of *A.*
147 *niger* and seven haplotypes of *A. welwitschiae* have been described (Samson et al., 2014). In
148 our analyses, we adopted the haplotype classification proposed by Samson et al. (2014)
149 because these authors used longer fragments of the *CaM* gene. Our phylogenetic analyses
150 were able to place all our five isolates of *A. niger* in haplotype 1, and our *A. welwitschiae*
151 were distributed into three known and in two previously undescribed haplotypes (Figure 1B).

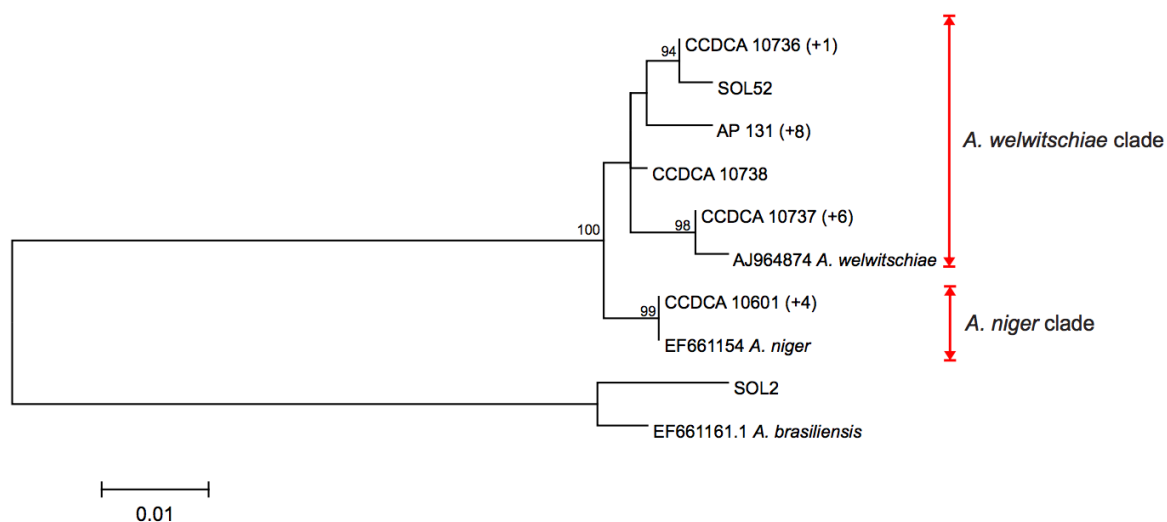
152 We currently do not know if there is any link between haplotype classification and
 153 pathogenicity, however, our data indicate the possibility that the new haplotype represented
 154 by the isolate AP131 could be specific to cause sisal bole rot disease in Bahia. Further studies
 155 might be needed to determinate this hypothesis.

156 In conclusion, our studies show that *A. welwitschiae* is the main causal agent of sisal
 157 bole disease and *A. niger* does not seem to be involved.



158 Figure 1 - Phylogenetic trees of *Aspergillus* isolates constructed by the Maximum
 159 Likelihood method. The tree was inferred with 1429 aligned combined nucleotides for the
 160 *ITS*, *BenA* and *CaM* (A) and 458 aligned nucleotides of *CaM* gene (B). The nucleotide
 161 substitution model used for A was T92 and to B was K2 and the bootstrap analyses were

162 performed with 1,000 resamplings. CBS 101740 *A. brasiliensis* was used as an outgroup.
 163 Numbers between in parentheses indicates the additional number of isolates with identical
 164 sequences.



166 Figure 2 - Phylogenetic trees of *Aspergillus* isolates constructed by the Maximum
 167 Likelihood method. The tree was inferred with 670 aligned nucleotides for the CaM gene. The
 168 nucleotide substitution model used was K2 and bootstrap analyzes were performed with 1000
 169 resamplings. EF661161 *A. brasiliensis* was used as an outgroup. Numbers in parentheses
 170 indicate the additional number of isolates with identical sequences.

172 ACKNOWLEDGEMENTS

173 The authors acknowledge the financial support of CNPq and CAPES.

175 REFERENCES

177 CONAB. Proposta de preços mínimos – Safra 2013/2014: Produtos de Inverno, Regionais e
 178 Leite. Available at:
 179 <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_11_22_15_42_37_pm_inverno_1](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_11_22_15_42_37_pm_inverno_13_14.pdf)
 180 [3_14.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_11_22_15_42_37_pm_inverno_13_14.pdf)>. Accessed on August 20, 2015.

181

182 Coutinho WM, Suassuna ND, Luz CM, Suinaga FA, Silva ORRF (2006) Bole rot of sisal
183 caused by *Aspergillus niger*. In: Fitopatologia Brasileira. Resumo de Congresso. Brasília, v.
184 31, n. 6, p. 605.

185

186 Gams W, Christensen M, Onions AHS, Pitt JI, Samson RA (1985) Infrageneric taxa of
187 *Aspergillus*. In: Samson RA, Pitt JI (Eds.), *Advances in Aspergillus and Penicillium*
188 Systematics, Plenum Press, New York: 55–61.

189

190 Glass NL & Donaldson GC (1995) Development of primer sets designed for use with the
191 PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental*
192 *Microbiology* 61:1323–1330.

193

194 Hong SB, Lee M, Kim DH, Varga J, Frisvard JC, Perrone G, Gomi K, Yamada O, Machida
195 M, Houbraken J, Samson RA (2013) *Aspergillus luchuensis*, an industrially important black
196 *Aspergillus* in east Asia. *PLoS ONE* 8(5): e63769.

197

198 Hubka V, Nováková A, Peterson SW (2016) A reappraisal of *Aspergillus* section *Nidulantes*
199 with descriptions of two new sterigmatocystin-producing species. *Plant Systematics and*
200 *Evolution* 302:1267–1299.

201

202 IBGE (2015) Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano
203 civil. Levantamento sistemático da produção agrícola, Rio de Janeiro, v.29.

204 Katoh K, Standley DM (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7:
205 improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution* 30:772–780.

206

207 Klich MA (2002) Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor
208 Schimmelcultures, Utrecht.

209

210 Kocsubé S, Perrone G, Magistà D, Houbraken J, Varga J, Szigeti G, Hubka V, Hong SB,
211 Frisvard JC, Samson RA (2016) *Aspergillus* is monophyletic: evidence from multiple gene
212 phylogenies and extrolites profiles. *Studies in Mycology*, nov.

213

214 MAPA. Estatísticas e perspectivas de 2015 – Sisal: Produção Mundial. Available at:
215 [http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Fibras/10RO/ESTATISTICA](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Fibras/10RO/ESTATISTICA_S%20E%20PERSPECTIVA%20-%20SISAL.pdf)
216 [S%20E%20PERSPECTIVA%20-%20SISAL.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Fibras/10RO/ESTATISTICA_S%20E%20PERSPECTIVA%20-%20SISAL.pdf). Accessed on August 20, 2015.

217

218 Massi FP, Sartori D, De Souza Ferranti, L, Iamanaka BT, Taniwaki M H, Vieira ML, Fungaro
219 MH (2016). Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin
220 biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*.
221 *International journal of food microbiology* 221:19–28.

222

223 Medina JC (1954) O Sisal. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Diretoria de Publicidade
224 Agrícola, 1954, 285p.

225

226 Peterson SW, Vega FE, Posada F, Nagai C (2005) *Penicillium coffeae*, a new endophytic
227 species isolated from a coffee plant and its phylogenetic relationship to *P. fellutanum*, *P.*
228 *thiersii* and *P. brocae* based on parsimony analysis of multilocus DNA sequences. *Mycologia*
229 97:659 – 666.

230

- 231 Perrone G, Susca A, Cozzi G, Ehrlich K, Varga J, Frisvad J C, Meijer M, Noonim P,
232 Mahakarnchanakul W, Samson R A (2007) Biodiversity of *Aspergillus* species in some
233 important agricultural products. *Studies in Mycology* 59:53–66.
234
- 235 Perrone G, Stea G, Epifani F, Varga J, Frisvad JC, Samson RA (2011) *Aspergillus niger*
236 contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal Biology* 115:1138–1150.
237
- 238 Sá JO (2009) Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por
239 *Trichoderma* spp. MSc Dissertation, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das
240 Almas, BA.
241
- 242 Santos PO, Silva ACM, Corrêa ÉB, Magalhães VC, Souza JT (2014) Additional species of
243 *Aspergillus* causing bole rot disease in *Agave sisalana*. *Tropical Plant Pathology*, Brasília
244 39(4):331-334.
245
- 246 Samson RA, Hong SB, Peterson SW, Frisvad JC, Varga J (2007) Polyphasic taxonomy of
247 *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Studies in Mycology* 59:147-
248 203.
249
- 250 Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong, SB, Hubka V, Klaassen CHW, Perrone G,
251 Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC
252 (2014) Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in*
253 *Mycology* 78:141-173.
254

- 255 Soares ACF, Salomão M, Almeida NS, Perez JO, Garrido M (2006) Podridão vermelha do
256 pseudocaule e mancha foliar do sisal (*Agave sisalana* Perrine) causados por *Aspergillus niger*
257 na Bahia. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Resumos. Salvador, BA.
258 Sociedade Brasileira de Fitopatologia.
259
- 260 Susca A, Proctor RH, Morelli M, Haidukowski M, Gallo A, Logrieco AF, Moretti A (2016)
261 Variation in Fumonisin and Ochratoxin Production Associated with Differences in
262 Biosynthetic Gene Content in *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae* Isolates from Multiple
263 Crop and Geographic Origins. *Frontiers in Microbiology* 7(1412).
264
- 265 Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular
266 evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725–
267 2729.
268
- 269 Varga J, Frisvad J C, Kocsubé S, Brankovics B, Tóth B, Szigeti G, Samson RA (2011) New
270 and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology* 69:1-17.
271
- 272 White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal
273 ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and
274 applications (Innis MA, Gelfand DH, Shinsky TJ, White TJ, eds). Academic Press, New
275 York, 315–322.
276
- 277 Wehmer C (1907) Zur Kenntnis einiger *Aspergillus* arten. *Centralb. f. Bakt. etc. II, Abt. Bd.*
278 18:385–395.

279 **SUPPLEMENTARY MATERIAL**

280 Table 1- Fungal isolates used in this study.

Isolate ³	Substrate	Origen	Gen		
			<i>ITS</i>	<i>BenA</i>	<i>CaM</i>
ANS142¹	Sisal Soil	Barrocas - BA	-		
ANS147	Sisal leaf	Conceição do Coité - BA	-		
ANS156	Sisal Soil	Miguel Calmon -BA	-		
ANS159	Sisal Soil	Mirangaba - BA	-		
ANS173	Sisal Soil	São Domingos - BA	-		
ANS201	Sisal leaf	Retirolândia - BA	-		
ANS220	Sisal leaf	Araci - BA	-		
ANS228	Sisal stolon	Araci - BA	-		
ANS247	Sisal leaf	Retirolândia - BA	-		
ANS33	Sisal bole	Conceição do Coité - BA	-		
ANS55	Sisal bole	São Domingos - BA	-		
AP131	Sisal bole	Conceição do Coité - BA	-		
CBS101740 ²			FJ629321	FJ629272	FN594543
CBS139.54			FJ629340	FJ629291	KC480196
CCDCA10601	Soil	Sabará - MG	-		
CCDCA10602	Soil	Sabará - MG	-		
CCDCA10708	Coffee bean	Zona da Mata - MG	-		
CCDCA10714	Coffee bean	Zona da Mata - MG	-		
CCDCA10736	Grape	Lagoa Grande - PE	-		
CCDCA10737	Grape	Lagoa Grande - PE	-		
CCDCA10738	Grape	Lagoa Grande - PE	-		
CCDCA10739	Grape	Lagoa Grande - PE	-		

ITEM10206				Samson et al. 2014
ITEM10359				Samson et al. 2014
ITEM10372				Samson et al. 2014
ITEM11448				Samson et al. 2014
ITEM11552				Samson et al. 2014
ITEM14270				Samson et al. 2014
ITEM14307				Samson et al. 2014
ITEM4501	Fermentation	Connecticut - USA	-	-
ITEM4509			-	- AJ964874
ITEM5218				Samson et al. 2014
ITEM6139				Samson et al. 2014
ITEM6145				Samson et al. 2014
ITEM7048				Samson et al. 2014
ITEM7090				Samson et al. 2014
ITEM7097	Grape	Italy	-	
NRRL326			EF661186	EF661089 EF661154
NRRL 26652				EF661161
SOL2	Sisal Soil	Santa Inês - BA	-	
SOL52	Sisal Soil	Santa Inês - BA	-	
YFF1	Soil	Valente - BA	-	
YFF5	Air	Valente - BA	-	

281 ¹The isolates in bold were the fungi used in the pathogenic test and phylogenetic analysis

282 ²The isolates not in bold were used only for phylogenetic analysis.

283 ³Filamentous Fungi Culture Collection of the Department of Food Science (CCDCA), Federal
284 University of Lavras and two strains were provided by Agri-Food Toxigenic Fungi Culture (ITEM)
285 collection at the Institute of Sciences of Food Production CNR-ISPA.

286 Table 2- Morphological characterization with macroscopic and microscopic characteristics of
 287 the species found in our study based on data obtained from the studied isolates.

<i>Aspergillus</i> species		<i>A. brasiliensis</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. welwitschiae</i>	
Number of isolates studied		1	5	10	
Macromorphology	CYA 25 °C	Colony growth (mm)	75-80	40-75	60-76
		Conidia color	black	black	black
		Mycelia color	white	white	colorless
		Exudate	colorless	colorless	colorless
		Reverse color	straw-yellow	straw	straw
		Reverse texture	striated	striated	striated
	CYA 37 °C	Colony growth (mm)	59-62	35-80	60-75
		Conidia color	black	black	black
		Mycelia color	white	white	colorless
		Exudate	colorless	colorless	colorless
		Reverse color	straw-yellow	straw	straw-cream
		Reverse texture	striated	striated	striated
	MEA 25 °C	Colony growth (mm)	45-46	40-53	50-60
		Conidia color	black	black	black
		Mycelia color	white	colorless	colorless
		Exudate	colorless	colorless	colorless
		Reverse color	straw-yellow	straw	straw-cream
		Reverse texture	smooth	smooth	smooth
	YES 25 °C	Colony growth (mm)	-	25-80	68-80
		Conidia color	-	black	black

	Mycelia color	-	white	colorless	
	Exudate	-	colorless	colorless	
	Reverse color	-	cream	straw	
	Reverse texture	-	striated	striated	
OA 25 °C	Colony growth (mm)	-	45-55	50-55	
	Conidia color	-	black	black	
	Mycelia color	-	colorless	colorless	
	Exudate	-	colorless	colorless	
	Reverse color	-	colorless	colorless	
	Reverse texture	-	smooth	smooth	
CREA 25° C	Colony growth (mm)	-	10-48	45-55	
	Medium color	-	yellow or purple	yellow	
Micromorphology	Conidiophores	Conidial heads	biseriate	biseriate	biseriate
		Dimension	100-850	600-1000	400-1800
		Diameter	10-11	8-15	08-15
		Texture	smooth	smooth	smooth
	Vesicles	Diameter	45-50	25-40	28-55
		Shape	subglobose	globose	globose
	Conidia	Diameter	5	3-5	3-5
		Shape	subglobose	globose	globose
		Texture	rough	rough	rough

289 Table 3 – The Pathogenicity tests I, II and III were done in pots filled with soil in greenhouse
 290 in pots with soil and with three replicates per treatment. Test IV was done in the laboratory in
 291 a box without soil and with five replicates per treatment.

Isolate	Specie	Experiments			
		I	II	III	IV
ANS33	<i>A. welwitschiae</i>	3	3	3	5
ANS55	<i>A. welwitschiae</i>	3	3	3	5
ANS142	<i>A. welwitschiae</i>	3	3	3	5
ANS147	<i>A. welwitschiae</i>	3	3	3	5
ANS156	<i>A. welwitschiae</i>	3	3	3	5
ANS159	<i>A. welwitschiae</i>	3	3	3	5
ANS173	<i>A. welwitschiae</i>	3	3	3	5
ANS201	<i>A. welwitschiae</i>	3	3	3	5
ANS220	<i>A. welwitschiae</i>	3	3	3	5
ANS228	<i>A. welwitschiae</i>	3	3	3	5
ANS247	<i>A. welwitschiae</i>	3	3	3	5
AP131	<i>A. welwitschiae</i>	3	3	3	5
CCDCA10601	<i>A. niger</i>	0	0	0	0
CCDCA10602	<i>A. niger</i>	0	0	0	0
CCDCA10708	<i>A. niger</i>	0	0	0	0
CCDCA10714	<i>A. niger</i>	0	0	0	0
CCDCA10736	<i>A. welwitschiae</i>	2	3	3	0
CCDCA10737	<i>A. welwitschiae</i>	1	0	0	0
CCDCA10738	<i>A. welwitschiae</i>	3	3	1	1

CCDCA10739	<i>A. welwitschiae</i>	2	1	2	0
ITEM4501	<i>A. niger</i>	0	0	0	0
ITEM7097	<i>A. welwitschiae</i>	0	0	0	0
SOL2	<i>A. brasiliensis</i>	3	3	3	5
SOL52	<i>A. welwitschiae</i>	1	0	0	0
YFF1	<i>A. welwitschiae</i>	3	3	3	5
YFF5	<i>A. welwitschiae</i>	3	3	3	5

292 Numbers in this table represent de quantity of disease plants per treatment.