



ELAINE APARECIDA GUIMARÃES

**BIOLOGIA REPRODUTIVA, FILOGENIA E
PATOGENICIDADE DE *Fusarium decemcellulare***

LAVRAS - MG

2013

ELAINE APARECIDA GUIMARÃES

BIOLOGIA REPRODUTIVA, FILOGENIA E PATOGENICIDADE DE
Fusarium decemcellulare

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

Orientador

Dr. Ludwig Heinrich Pfenning

LAVRAS-MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Guimarães, Elaine Aparecida.

Biologia reprodutiva, filogenia e patogenicidade de *Fusarium
decemcellulare* / Elaine Aparecida Guimarães. – Lavras : UFLA,
2013.

68 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning.

Bibliografia.

1. *Albonectria*. 2. *Theobroma cacao*. 3. *Mating type*. 4. Galha-
floral. 5. Superbrotamento. 6. Filogenia molecular. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.24

ELAINE APARECIDA GUIMARÃES

BIOLOGIA REPRODUTIVA, FILOGENIA E PATOGENICIDADE DE
Fusarium decemcellulare

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

APROVADA em 22 de fevereiro de 2013.

Dra. Rosane Freitas Schwan UFLA

Dr. Eduardo Alves UFLA

Dra. Sandra Marisa Mathioni UFLA

Dr. Ludwig Heinrich Pfenning
Orientador

LAVRAS – MG

2013

Aos meus pais; José Bento e Maria Terezinha, irmã Francisca e demais
familiares, pelo apoio e incentivo;
A meu noivo, Gilberto, pela compreensão e afeto.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade concedida para a realização do Mestrado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

Ao professor Ludwig H. Pfenning, pela atenção e orientação;

Ao professor Mário Lúcio Vilela de Rezende, Dra. Edna Dora Martins Newman Luz e Dr. Gerardo Rodríguez-Alvarado, pela ajuda e apoio;

Aos pós-doutores, Dr. Lucas Magalhães de Abreu e Dra. Sarah da Silva Costa Guimarães, pela ajuda no desenvolvimento do trabalho;

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pelos conhecimentos transmitidos;

Ao Prof. Dr. José Luiz Bezerra, pelo incentivo e pelas valiosas contribuições na realização desse estudo;

À colega Erica Sfalsin, pela valiosa contribuição inicial neste trabalho;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, pela amizade e aprendizado;

À amigas da República que contribuíram para alegrar meu dia-a-dia.

Ao Dr. Carlos Roberto Casela, pelo apoio, orientação e incentivo a iniciação acadêmica;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão do trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Fusarium decemcellulare é uma espécie fúngica encontrada comumente em regiões tropicais e subtropicais, conhecida como sapróbio e também parasita de diversas plantas lenhosas, induzindo a formação de galhas, superbrotamento e cancos. O objetivo com esse trabalho foi caracterizar isolados de *F. decemcellulare* obtidos de diferentes hospedeiros e substratos, por avaliação de marcadores morfológicos, cruzamentos em laboratório visando à indução da fase sexuada, análise filogenética e teste de patogenicidade. Culturas monospóricas foram submetidas ao teste de homotalismo para verificar a formação espontânea de peritécios férteis. Dos isolados heterotáticos, o *mating type* foi determinado por PCR utilizando *primers* específicos e isolados de tipos opostos foram então cruzados em meio cenoura-agar. A análise filogenética foi realizada com sequências parciais dos genes *tef-1 α* , *rpb2*, *act1* e da região ITS-28S rDNA, incluindo sequências de isolados de referência e de outras espécies. Isolados selecionados de *F. decemcellulare* foram inoculados em sementes de cacaueteiro para condução de testes de patogenicidade em casa-de-vegetação. Todos os 67 isolados avaliados apresentaram marcadores morfológicos característicos da espécie *F. decemcellulare*, de acordo com a literatura. Entre os isolados avaliados, nove foram homotáticos. Entre os heterotáticos, 21 pertencem ao *MAT-1* e 33 ao *MAT-2*. Foram realizados aproximadamente 1590 cruzamentos e em 54 cruzamentos foi constatada a formação de peritécios férteis, exsudando ascósporos. Foi observada a presença de quatro ascósporos por asco em isolados homotáticos e oito ascósporos por asco em isolados heterotáticos. Na análise filogenética, todas as árvores individuais apresentaram topologia similar, agrupando os isolados heterotáticos, obtidos de cacaueteiro, mangueira e guaranazeiro em um clado distinto. Grupos distintos foram formados por isolados homotáticos, isolados de outros substratos ou hospedeiros e isolados de referência de *F. decemcellulare*. No teste de patogenicidade, somente os isolados heterotáticos induziram sintomas de galhas. Os resultados evidenciam que isolados associados à galhas e superbrotamento nos hospedeiros avaliados pertencem a uma espécie filogenética e biológica distinta, diferente de *F. decemcellulare*. Os resultados confirmam ainda o número dos ascósporos como marcador na separação das formas homotáticas e heterotáticas.

Palavras-chave: *Albonectria*. *Theobroma cacao*. *Mating type*. Galha-floral. Superbrotamento. Filogenia molecular.

ABSTRACT

Fusarium decemcellulare is a fungal species commonly found in tropical and subtropical regions, known as saprobe and also parasite to many woody plants, inducing the formation of galls, oversprouting and cancers. The objective of this work was to characterize *F. decemcellulare* isolates obtained from different hosts and substrates, by evaluating morphological markers, laboratory crossings aiming at inducing the sexual phase, phylogenetic analysis and pathogenicity test. Single spore cultures were submitted to homothallism test in order to verify the spontaneous formation of fertile perithecia. Of the heterothallic isolates, the mating type was determined by PCR using specific primers and opposite type isolates were then crossed in carrot-agar medium. The phylogenetic analysis was performed with partial sequences of the genes *tef-1 α* , *rpb2*, *act1* and of the ITS-28S rDNA region, including sequences of reference isolates and of other species. Selected *F. decemcellulare* isolates were inoculated into cocoa plant seeds for the conduction of pathogenicity tests in greenhouse. All 67 evaluated isolates presented morphological markers typical of *F. decemcellulare*, according to literature. Among the evaluated isolates, nine were homothallic. Among the heterothallic, 21 belonged to the *MAT-1* and 33 to the *MAT-2*. Approximately 1590 crossings were performed and, in 54 crossings we observed the formation of fertile perithecia, exuding ascospores. The presence of four ascospores per asci in homothallic isolates and eight ascospores per asci in heterothallic isolates was observed. In the phylogenetic analysis, all individual trees presented similar topology, grouping the heterothallic isolates obtained from cocoa plant, mango tree and guarana plant in a distinct clad. Distinct groups were formed by homothallic isolates, isolates from other substrates or hosts and *F. decemcellulare* reference isolates. In the pathogenicity test, only the heterothallic isolates induced gall symptoms. The results showed that isolates associated with galls and oversprouting on the evaluated hosts belong to a distinct phylogenetic and biological species, different from *F. decemcellulare*. The results confirm the number of ascospores as marker in separating the homothallic and heterothallic forms.

Keywords: *Albonectria*. *Theobroma cacao*. Mating type. Floral-gall. Oversprouting. Molecular phylogeny.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Sintomas de galha e superbrotamento causado por *Fusarium decemcellulare* 20
- Figura 2 Gel da PCR para determinação de *mating types*. A. Isolados testados utilizando os *primers* para determinação do idiomorfo *MAT-2*; B. Isolados testados para determinação do idiomorfo *MAT-1*..... 37
- Figura 3 Fotografia de: A. Cultura monoconidial do isolado homotático CML 800 com formação de peritécios em placa de Petri contendo meio SNA; Fotomicrografias de: B. Peritécios exsudando ascósporos. Barra = 160 μm ; C. Peritécio. Barra = 80 μm ; D. Asco contendo 4 ascósporos. Barra= 20 μm ; E. Ascósporos. Barra = 10 μm ; F. Ascósporo germinando. Barra = 20 μm 42
- Figura 4 Fotografia de: A. Cruzamento fértil entre os isolados CML 2254 e CML 2255 em meio CA; Fotomicrografias de: B. Peritécios exsudando ascósporos. Barra = 160 μm ; C. Peritécio. Barra = 110 μm ; D. Asco contendo 8 ascósporos. Barra = 20 μm ; E. Ascósporos. Barra = 10 μm ; F. Ascósporos germinando. Barra = 10 μm 43
- Figura 5 Análise de *Máxima Verossimilhança* de sequências do gene *tef-1 α* de isolados de *F. decemcellulare* oriundos de vários hospedeiros de diferentes regiões geográficas 46
- Figura 6 Análise de *Máxima Verossimilhança* de sequências do gene *rpb 2* de isolados de *F. decemcellulare* oriundos de vários hospedeiros de diferentes regiões geográficas 47

Figura 7	Análise de <i>Máxima Verossimilhança</i> de sequências do gene <i>acl1</i> de isolados de <i>F. decemcellulare</i> oriundos de vários hospedeiros de diferentes regiões geográficas	48
Figura 8	Análise de <i>Máxima Verossimilhança</i> de sequências da região ITS-LSU de isolados de <i>F. decemcellulare</i> oriundos de vários hospedeiros de diferentes regiões geográficas	49
Figura 9	Análise de <i>Máxima Verossimilhança</i> de sequências combinadas das regiões ITS, <i>rpb2</i> , <i>acl</i> , de isolados de <i>F. decemcellulare</i> oriundos de vários hospedeiros de diferentes regiões geográficas ...	50
Figura 10	Análise de <i>Máxima Verossimilhança</i> de sequências combinadas das regiões ITS-LSU, <i>tef-1a</i> , <i>rpb2</i> , <i>acl</i> , de isolados de <i>F. decemcellulare</i> oriundos de vários hospedeiros de diferentes regiões geográficas	51
Figura 11	Caracteres morfológicos dos isolados de <i>F. decemcellulare</i> . A, B e C fotografias mostrando a coloração da colônia em meio BDA; Fotomicrografias de: D. Cadeias de microconídios. Barra = 10 µm; E. Macroconídios. Barra = 20 µm; F. Microconídios. Barra = 10 µm	53
Figura 12	Dimensões dos marcadores morfológicos do teleomorfo de <i>F. decemcellulare</i> . A. Peritécios; B. Ascospores; C. Ascósporos. () Isolados homotáticos após teste de homotalismo a 20 °C e (○) Isolados heterotáticos após cruzamentos a 22-23 °C sob luz constante.....	54

Figura 13 Teste de patogenicidade em plantas de cacauero inoculadas com isolados de *F. decemcellulare* A. Planta inoculada com o isolado homotático CML 800; B. Planta inoculada com o isolado heterotático CML 2267; C. Planta inoculada com o isolado heterotático CML 2252; D. Planta inoculada com o isolado heterotático CML 2265 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Isolados de <i>Fusarium decemcellulare</i>	30
Tabela 2	Sequências de referência utilizadas na análise filogenética	36
Tabela 3	Relação dos cruzamentos entre isolados de <i>F. demcemcellulare</i> avaliados após incubação a 22-23 °C sob luz constante	39
Tabela 4	Reisolamento dos isolados de <i>Fusarium decemcellulare</i> inoculados em plantas de cacauero	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Fusarium decemcellulare	15
2.2	Reprodução sexual e conceito de espécie biológica	16
2.3	Doenças causadas por <i>F. decemcellulare</i>	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	Obtenção dos isolados	21
3.2	Teste de Homotalismo	21
3.3	Extração de DNA	22
3.4	Determinação de <i>Mating types</i> por PCR	22
3.5	Indução da fase sexuada	23
3.6	Determinação da viabilidade dos ascósporos	24
3.7	Sequenciamento e análise filogenética	24
3.8	Caracterização morfológica	26
3.9	Teste de patogenicidade em cacauero	27
4	RESULTADOS	29
4.1	Teste de homotalismo	29
4.2	Determinação de <i>Mating types</i> por PCR	37
4.3	Indução da fase sexuada	37
4.4	Determinação da viabilidade de ascósporos	41
4.5	Análise filogenética	43
4.6	Caracterização Morfológica	52
4.7	Teste de patogenicidade em cacauero	55
5	DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÕES	61
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

Fusarium decemcellulare (teleomorfo *Albonectria rigidiuscula*) é um fungo considerado sapróbio e também agente etiológico de doenças em espécies das famílias Anacardiaceae, Annonaceae, Malvaceae, Apocynaceae, entre outras, causando a morte de ponteiro, cancro, galha, podridão dos frutos e superbrotamento (LESLIE; SUMMERELL, 2006; ROSSMAN et al., 1999).

A galha-floral causada por *F. decemcellulare* existe em quase todos os países produtores de cacau, mas costuma ser mais importante nos países das Américas Central e do Sul (WOOD; LASS, 1985). Essa doença é considerada fator limitante na produção de cacau (*Theobroma cacao*), e no Brasil sua ocorrência tem sido esporádica tanto na região Amazônica quanto no sul da Bahia, não chegando a causar prejuízos sérios (OLIVEIRA; LUZ, 2005). A galha-floral em mangueira (*Mangifera indica*) tem sido observada em países como Estados Unidos, México e Venezuela (MALAGUTI; REYES, 1964; PLOETZ; VAZQUEZ; BENSCHER, 1996). No Brasil essa doença foi relatada no estado do Pará (SANTOS et al., 1983). O superbrotamento em guaranazeiro (*Paullinia cupana*) é uma doença que vem assumindo importância no Brasil, principalmente na região norte, onde essa cultura possui relevância econômica (GASPAROTTO; PEREIRA; ARAÚJO, 2006).

Fusarium decemcellulare também ocorre como endófito em plantas aparentemente sadias de cacauzeiro e de outras espécies vegetais e a provável existência de populações patogênicas e não patogênicas precisa ainda ser estudada (MEIJA et al., 2008; ROSSMAN et al., 1999). Em cacauzeiro, existem registros de isolados homotáticos e heterotáticos, porém, há evidências que apenas formas heterotáticas causem sintomas de galha-floral (REICHLE; SNYDER, 1964).

Neste trabalho pretendeu-se responder às seguintes questões: (i) existem linhagens filogeneticamente distintas de *F. decemcellulare*, obtidas em diferentes hospedeiros? (ii) é possível distinguir essas linhagens filogenéticas por meio de marcadores morfológicos tanto do anamorfo quanto do teleomorfo? (iii) Como essas linhagens se comportam reprodutivamente? (iv) Quais linhagens filogenéticas são patogênicas?

Os objetivos específicos com esse trabalho foram: i. realizar análise de filogenia molecular dos isolados, com base em sequências parciais dos genes *tef-1 α* , *acl1*, *rpb2* e ITS-LSU; ii. verificar a presença de formas homotáticas por meio de teste de homotalismo; iii. induzir a fase sexuada em laboratório por meio de cruzamentos; iv. identificar marcadores morfológicos para populações distintas; v. verificar a patogenicidade dos isolados em plantas de cacauero.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Fusarium decemcellulare*

Fusarium decemcellulare Brick é um fungo presente principalmente em regiões tropicais. Ocorre como, endófito ou patogênico a plantas dicotiledôneas, associado aos hospedeiros das famílias Anacardiaceae, Annonaceae, Apocynaceae, Bignoniaceae, Bombacaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Meliaceae, Moraceae, Myrtaceae, Poaceae, Sterculiaceae, Tiliaceae, Ulmaceae (BOOTH, 1971; BRUNT; WARTON, 1962; GERLACH; NIRENBERG, 1982). A colônia de *F. decemcellulare* em BDA apresenta pigmentação rosa após três a cinco dias, possui micélio aéreo algodonoso onde são produzidos em monofíalides microconídios hialinos, que podem ser formados em cadeia ou em “falsas cabeças”, com formato oval, medindo 10-15 x 3-5 μm . Os macroconídios são formados em esporodóquio de coloração amarelada, são curvos, cilíndricos a fusóides com uma parede grossa exterior, exceto para a ponta curvada e célula pé. Quando maduros apresentam de 7 – 10 septos e medem 55-130 x 6-10 μm (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

O teleomorfo associado é conhecido na literatura como *Albonectria rigidiuscula* (B. & Br.) Rossman & Samuels (sinônimo: *Calonectria rigidiuscula* (B. & Br.) Sacc.) que tem como características, peritécios globosos a subglobosos, amarelo ou branco, com pequenas papilas na superfície ascotal, medindo 220-320 μm x 190-300 μm . Possui ascos clavados, medindo 77-100 μm x 12-14 μm , com quatro ascósporos em isolados homotáticos e oito ascósporos ou variável em isolados heterotáticos. Os ascósporos são elipsoides, hialinos, com três septos e levemente estriados quando maduros, medindo 24-35 x 7-10 μm , porém, são menores em ascos com oito ascósporos 19-22 x 6-7 μm (ROSSMAN et al., 1999).

O gênero *Albonectria* pertence à família Nectriaceae, com quatro espécies conhecidas: *A. rigidiuscula*, *A. albosuccinea*, *A. verrucosa* e *A. albida*. Todas essas espécies possuem anamorfo em *Fusarium* (GUU; JU; HSIEH, 2007; ROSSMAN et al., 1999, 2001; SUMMERELL et al., 2010). Entretanto, análises filogenéticas evidenciaram que as quatro espécies conhecidas no gênero *Albonectria* formam um grupo polifilético, sendo *A. albosuccinea* grupo irmão de *A. rigidiuscula* (GRAEFENHAN et al., 2011).

2.2 Reprodução sexual e conceito de espécie biológica

O ciclo de reprodução sexual em fungos passa pelos processos de acasalamento (*mating*) e meiose. A terminologia utilizada para descrever um sistema de cruzamento entre fungos é denominada de *mating type*. O mecanismo básico de *mating type* em ascomicetos é de um loco *MAT* e dois idiomorfos, *MAT-1* e *MAT-2*, sequências não relacionadas presentes na mesma posição do cromossomo. Os genes do loco *MAT* têm regiões conservadas entre espécies distantes, que codificam proteínas denominadas HMG-box (*high mobility group*) e α -box. Em espécies heterotálicas, diferentes tipos de acasalamento (*mating types*) garantem que só seja possível o cruzamento entre dois indivíduos geneticamente diferentes, ou seja, *mating types* opostos, *MAT-1* e *MAT-2*, se cruzam, e ascósporos podem ser observados exsudando de peritécios. Já em espécies homotálicas, os dois idiomorfos (*MAT-1* e *MAT-2*) estão em único genoma (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Espécie biológica ou *mating population* (MP) é definida pela capacidade de produzir cruzamentos férteis entre isolados de uma mesma MP e esterilidade, quando cruzados com membros de MPs diferentes. O conceito biológico é importante para auxiliar nas limitações que surgem na identificação, quando

entidades biológicas distintas são morfologicamente muito similares (LESLIE, 1995; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Primers específicos foram desenvolvidos para a determinação de *mating type* e, assim, evitar o trabalho laborioso de numerosos cruzamentos em laboratório. Neste caso, o pareamento é realizado somente entre *mating types* opostos, reduzindo pela metade o número de cruzamentos a serem realizados (COVERT et al., 1999; KERÉNYI et al., 2004; STEENKAMP et al., 2000).

O sucesso do cruzamento de ascomicetos também é dependente da fertilidade sexual dos isolados parentais. A fertilidade feminina é definida como a capacidade de produzir o peritécio e a fertilidade masculina como a capacidade de produzir gametas fertilizantes, geralmente na forma de conídios. Em cruzamentos de laboratório, o pesquisador pode controlar o papel de cada um dos parentais e, portanto, a capacidade de um isolado para servir como um parental feminino ou masculino pode ser monitorado (ARMENGOL et al., 2005; BRITZ et al., 1998; COVERT et al., 1999; LESLIE; KLEIN, 1996; VIJI; UDDIN, 2002).

Em cacauero, existem registros de isolados homotáticos e heterotáticos, porém apenas os heterotáticos foram considerados como responsáveis pela formação da galha-floral (REICHLE; SNYDER, 1964). Ford, Bourret e Snyder (1967) observaram que isolados homotáticos apresentam quatro ascósporos em seus ascos e não são patogênicos enquanto que isolados heterotáticos apresentam de quatro a oito ascósporos e são patogênicos. Baseado nessa observação descreveram a *forma specialis F. decemcellulare* f. sp. *theobromae*.

2.3 Doenças causadas por *F. decemcellulare*

Existem registros da ocorrência de *F. decemcellulare* em diversas espécies botânicas, onde causam doenças conhecidas como morte de ponteiros, cancro, galhas, e superbrotamentos (ROSSMAN et al., 1999).

Em mangueira, *F. decemcellulare* causa a proliferação excessiva de gemas que saem do ápice e das axilas foliares, com entrenós reduzidos, agrupados formando uma estrutura compacta denominada “galha” ou “vassoura de bruxa”. A infecção em plantas jovens geralmente origina a diminuição do crescimento e secagem da folhagem, em plantas adultas continua a produção de galhas que enfraquecem as árvores, tornando-as improdutivas (Figura 1). Essa doença foi relatada na Flórida, México e Venezuela (ÂNGULO; VILLAPUDUA, 1982; MALAGUTI; REYES, 1964; PLOETZ; VAZQUEZ; BENSCHER, 1996).

No cacauzeiro o fungo causa a doença conhecida como galha-floral, galha da almofada floral, ou “buba floral” que é a denominação para um conjunto de tipos de hipertrofias, que se manifestam tanto no tronco quanto nos galhos do cacauzeiro, conhecidas como: galhas de ponto verde floral, de botão, de disco e de leque (Figura 1) (LAWRENCE; CAMPÊLO; FIGUEIREDO, 1991; THOROLD, 1975; WOOD; LASS, 1985). Esta doença causa perdas crescentes em alguns países produtores de cacau sendo considerado um fator limitante para produção no Hemisfério Ocidental e no Oeste da África. No Brasil, onde essa doença ainda não é considerada relevante, existem condições ideais para seu desenvolvimento. As galhas são formadas por inúmeras gemas que não se desenvolvem, permanecendo compactas, com a aparência de couve-flor, ligadas à planta por um pedúnculo curto e lenhoso (PLOETZ, 2006).

Superbrotamento causado por *F. decemcellulare* é hoje uma das importantes doenças do guaranazeiro no estado do Amazonas, afetando ramos novos e inflorescências. Nos ramos ocorre emissão de brotações sucessivas formando uma massa densa e desuniforme, em consequência da multiplicação exagerada de células. Nas inflorescências ocorre multiplicação exagerada de células, dando às flores um aspecto de cálice compacto e endurecido, impedindo a polinização e causando o secamento precoce (Figura 1) (GASPAROTTO; PEREIRA; ARAÚJO, 2006).

A cancrose é uma doença associada a *F. decemcellulare* e tem grande expressão para a cultura da fruteira-do-conde (*Annona squamosa* L.) no cerrado de Goiás, Minas Gerais e Distrito Federal. Essa doença é caracterizada pela formação de cancrios nos órgãos lenhosos da planta. As plantas jovens podem morrer e, nas adultas, acarreta rachaduras longitudinais e deformações nos galhos que, com o tempo pode ocasionar a morte da planta (JUNQUEIRA et al., 2001).

No Equador foram observados sintomas de cancrose em *Cedrelinga cateniformis*, através do isolamento de tecidos sintomáticos e testes de patogenicidade *F. decemcellulare* foi apontado como agente etiológico da doença (LOMBARD et al., 2008).

No município de Icoaraci - PA foram observadas plantas de limão-de-Caiena (*Averrhoa bilimbi* L.) apresentando anormalidade nas inflorescências. *Fusarium decemcellulare* foi identificado como agente causal após isolamentos de tecidos infetados (BASTOS; SANTOS, 2001). A espécie foi encontrada também em associação com erva-mate (*Ilex paraguariensis*) causando sintomas de podridão de raízes (POLETTO et al., 2010).

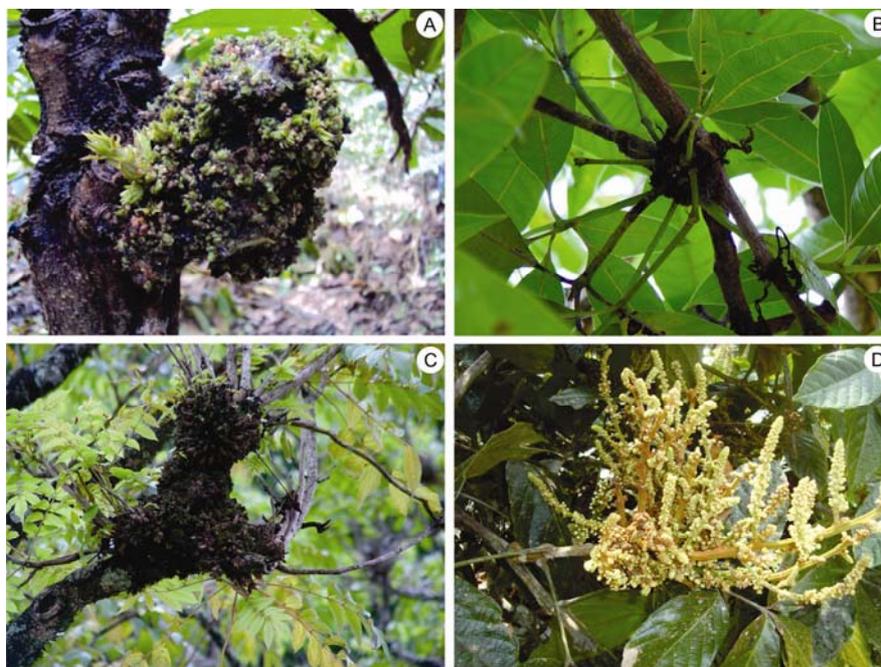


Figura 1 Sintomas de galha e superbrotamento causado por *Fusarium decemcellulare*
A. Cacaueiro; B. Mangueira; C. *Spathodea campanulata*; D. Guaranazeiro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos isolados

Foram utilizados 60 isolados disponíveis na Coleção Micológica de Lavras-CML, incluindo 41 isolados obtidos de cacauzeiro, 12 isolados de mangueira, 2 isolados de espatódea (*Spathodea campanulata*), 2 isolados de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), 1 isolado de solo, 1 isolado de serrapilheira e 1 isolado de substrato não identificado (Tabela 1). Os demais isolados foram obtidos por isolamento de material vegetal proveniente do guaranazeiro (*Paullinia cupana*) com sintomas de superbrotamento (Tabela 1). O isolamento foi realizado a partir de desinfestação superficial (etanol 70%, hipoclorito de sódio 2,5%) dos tecidos vegetais do guaranazeiro (SCHULZ; BOYLE, 2005). As culturas com morfologia típica de *F. decemcellulare* foram transferidas para placas de Petri, contendo meio SNA (*synthetic nutrient-poor Agar*) e a partir dessas foram obtidas culturas monospóricas. As culturas foram preservadas em água destilada esterilizada e armazenadas a 10 °C, no escuro (CASTELLANI, 1939) e por criopreservação, a partir de suspensão de esporos em glicerol 15% mantidas a -80 °C (SMITH; ONIONS, 1994), na Coleção Micológica de Lavras-CML, Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.2 Teste de Homotalismo

Foram utilizados dois protocolos para o teste de homotalismo. No primeiro protocolo os isolados monoconidiais foram transferidos para placas de Petri (60 x 15 mm) contendo meio SNA e incubados a 20° com fotoperíodo de 12 h por aproximadamente 8 semanas. No segundo teste, os isolados foram

cultivados em placas de Petri contendo meio cenoura ágar (CA), e incubados a 25 °C no escuro por sete dias. Após o período de incubação, foram transferidos 2 mL de solução de Tween 80 a 2,5% (v/v) na superfície das colônias e espalhados utilizando uma alça de Drigalski, de modo a umedecer completamente o micélio. As culturas foram incubadas a 20 °C, sob luz constante, por aproximadamente 40 dias. Avaliações foram feitas semanalmente durante dois meses, verificando o surgimento de peritécios e exsudação de ascósporos. Os testes foram repetidos, para a confirmação dos resultados (Adaptado de COVERT et al., 2007; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

3.3 Extração de DNA

A extração do DNA foi feita a partir dos isolados monospóricos em Meio líquido de Extrato de Malte 4% por três dias a 100 rpm em temperatura ambiente em um agitador orbital, para a produção de biomassa. A biomassa foi filtrada e a extração do DNA foi realizada utilizando-se o tampão CTAB seguindo o protocolo descrito por Leslie e Summerell (2006). O DNA obtido foi utilizado tanto para reação de PCR para posterior sequenciamento como na reação de PCR para determinação dos *mating types*.

3.4 Determinação de *Mating types* por PCR

A determinação de *mating type* foi realizada a partir do DNA extraído de acordo com o protocolo de extração de DNA acima descrito. Foi feita a amplificação do alelo *MAT-1*, utilizando-se os *primers fusALPHAfor* (CGCCCTCTKAAYGSCTTCATG) e *fusALPHArev* (GGARTARACYTTAGCAATYAGGGC), gerando um fragmento de 200 pb e do alelo *MAT-2*, utilizando os *primers fusHMGfor* (CGACCTCCCAAYGCTACAT) e

fusHMGrev (TGGGCGGTACTGGTARTCRGG), gerando um fragmento de 260 pb (KERÉNYI et al., 2004). O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% para a visualização dos resultados. O comprimento dos fragmentos amplificados foi comparado com um marcador de comprimento de fragmentos 1 Kb.

3.5 Indução da fase sexuada

Após a determinação dos *mating types*, os isolados de tipos opostos foram cruzados com o objetivo de verificar a fertilidade da população, de acordo com o protocolo adaptado de Leslie e Summerell (2006). Cada isolado foi testado como parental masculino e como parental feminino em cruzamentos recíprocos. Isolados usados como parentais masculinos foram cultivados em tubos de ensaio contendo meio completo e incubados a 20 °C sob fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. Isolados usados como parentais femininos foram cultivados em placas de petri de poliestireno (60 x 15 mm) em meio CA, mantidos 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 2 mL de solução Tween 80 a 2,5% (v/v), utilizando-se para tal uma pipeta Pasteur. Em seguida, a suspensão de esporos foi transferida para uma placa contendo o parental feminino e, com o auxílio de uma alça de Drigalski, espalhada de modo a umedecer completamente o micélio.

Os isolados cruzados foram incubados a 22-23 °C, sob luz branca fluorescente constante, por um período de até seis semanas, avaliados semanalmente e considerados férteis quando produziram peritécios com exsudação de ascósporos. Os cruzamentos foram repetidos, para confirmação dos resultados.

3.6 Determinação da viabilidade dos ascósporos

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

3.7 Sequenciamento e análise filogenética

Foram utilizados cinquenta e seis isolados de *F. decemcellulare*, para o sequenciamento do fragmento do gene *fator de alongação 1- α* (*tef-1 α*). Com base nos resultados da análise filogenética, foram selecionados trinta e quatro isolados para o sequenciamento de fragmentos dos genes da *segunda maior subunidade da RNA polimerase II* (*rpb2*), *maior subunidade da ATP citrato liase* (*acl1*) e trinta e três isolados para a região ITS e parte da região 28S do rDNA (ITS-LSU). Foram realizadas análises combinando as sequências das regiões gênicas. Nas análises foram utilizadas sequências de referência adquiridas a partir do GenBank (Tabela 1).

A amplificação do fragmento do gene *fator de alongação 1- α* dos isolados foi realizada utilizando os *primers*: Ef-1 (forward; 5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') e Ef-2 (reverse; 5'-GGAAGTAC CAGTGATCATGTT-3') gerando um fragmento de 691 pb (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'-

GGGGWGAYCAGAAGAA GGC-3') e 7cR (reverse; 5'-CCCATRGCTTGYTTRCCCAT-3') gerando um fragmento de 924 pb (O'DONNELL et al., 2008). Para a *maior subunidade da ATP citrato liase (acl1)* (NOWROUSIAN et al., 2000) foram utilizados os *primers* *acl1-230up* (5'-AGCCCGATCAGCTCATCAAG-3') e *acl1-1220low* (5'-CCTGGCAGCAAGATCVAGGAAGT-3') gerando um fragmento de 886 pb. Para amplificar a região ITS-LSU foram utilizados os *primers* ITS5 (forward; 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (WHITE et al., 1990) e NL4 (reverse; 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (O'DONNELL, 1993) gerando um fragmento de 1080 pb com *gaps*. As reações de PCR foram realizadas no termociclador MyCycler™ (BIO-RAD). As condições de ciclo para *tef-1α* 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). O perfil de temperatura para a região *acl1* foi o seguinte: 3 minutos a 95 °C; 5 ciclos de 45 segundos a 95 °C; 45 segundos a 64 °C; 2 minutos a 72 °C, seguido por 5 ciclos com anelamento a 62 °C, seguido por 30 ciclos com anelamento a 56 °C; com uma extensão final de 8 minutos a 72 °C (GRAEFENHAN et al., 2011). Para ITS-LSU as condições de ciclo foram: 95 °C, por 5 minutos; 35 ciclos: 94 °C, por 40 segundos; 55 °C, por 55 segundos; 72 °C, por 5 minutos e 72 °C, por 2 minutos (O'DONNELL et al., 2008). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium®) com posterior visualização realizada em um transiluminador. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o kit GenElute PCR Clean-up Kit (Sigma-Aldrich) para, posteriormente, serem sequenciados.

Os fragmentos gênicos foram sequenciados, nas direções senso e antisenso, em um sequenciador automático MEGA BACE[®] no Laboratório de Genômica da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente com o auxílio do programa SeqAssem (HEPPERLE, 2004) e as sequências editadas foram comparadas com a base de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information – NCBI, por meio da ferramenta BLAST (ALTSCHUL, 1990).

Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos foram gerados utilizando-se a ferramenta CLUSTALW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994), implementado pelo programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). Os alinhamentos foram corrigidos manualmente. A análise filogenética foi realizada pelos métodos de *Máxima parcimônia* e *Máxima verossimilhança*, utilizando o modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros, através do programa Mega5 (TAMURA et al., 2011). As espécies *Geejayessia desmazieri*, *Cyanonectria cyanostoma* e *Haematonectria illudens* foram usadas como *outgroups* (Tabela 2).

3.8 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica da fase anamorfa foi realizada a partir de culturas monospóricas segundo Leslie e Summerell (2006). Os isolados foram transferidos e crescidos em placas de Petri contendo meio de Batata Dextrose Agar (BDA) e incubados a 25 °C, no escuro por 4 dias, para observação da taxa de crescimento e morfologia das colônias. As características micromorfológicas foram avaliadas em SNA a 20 °C, sob fotoperíodo de 12 horas com luz branca fluorescente, após um período de 10 a 14 dias de incubação. Foi avaliado em microscópio óptico de luz o formato e a septação dos conídios, a produção de microconídios em cadeias longas e falsas cabeças e a produção de macroconídios em esporodóquio, bem como a presença de monofiálides.

As estruturas da fase teleomorfa foram caracterizadas e fotografadas, realizando medição do diâmetro dos peritécios, comprimento e largura dos ascos e de ascósporos e verificação do número de ascósporos por asco e do número de septos dos ascósporos. Foram tomadas 30 medidas de cada estrutura, as quais serviram para a posterior comparação com a literatura (ROSSMAN et al., 1999).

3.9 Teste de patogenicidade em cacauero

Com o objetivo de testar a patogenicidade e completar os postulados de Koch, os isolados CML 800 (homotático), CML 2252, CML 2265, e CML 2267 (heterotáticos) foram inoculados em sementes de cacauero da cultivar TSH1188. As sementes foram lavadas e colocadas para germinar em um recipiente com água e mantidas durante sete dias, sendo a água do recipiente renovada todos os dias. Os isolados a serem inoculados foram cultivados em tubos de ensaio contendo meio completo e incubados a temperatura ambiente durante 7-10 dias. A inoculação foi feita com as sementes pré-germinadas de cacau, por meio da imersão dessas em suspensões de 10^6 conídios/mL provenientes dos isolados de *F. decemcellulare* testados, durante 15 minutos (adaptado de MALAGUTI; REYES, 1964).

Após a inoculação, as sementes foram plantadas em vasos com substrato PLANTMAX[®] e mantidas em casa de vegetação 25 ± 2 °C até o surgimento ou não dos sintomas. Foram realizadas cinco repetições, sendo cada planta uma repetição. Cinco sementes foram utilizadas como testemunha e foram tratadas apenas com água.

As plantas foram avaliadas semanalmente durante quatro meses quanto ao surgimento de sintomas, sendo consideradas doentes aquelas que apresentaram galha-floral e das quais foi possível recuperar o isolado inoculado.

Para tal, os tecidos das plantas com e sem sintoma foram desinfestados com hipoclorito de sódio 3% e inoculados em meio Malte 2%.

4 RESULTADOS

4.1 Teste de homotalismo

Dos 67 isolados de *Fusarium decemcellulare* testados 9 isolados produziram peritécios a 20 °C e fotoperíodo de 12 horas com luz branca fluorescente, com 15 – 40 dias de incubação em ambos os meios (cenoura-agar e SNA), sendo 2 provenientes de pimenta-do-reino, 2 de cacauero, 2 de espatódea, 1 de serrapilheira, 1 de solo e 1 de substrato não definido (Tabela 1). A exsudação de ascósporos ocorreu por volta de 10 dias após a formação dos peritécios.

Tabela 1 Isolados de *Fusarium decemcellulare*

CML	Hospedeiro/ Substrato	Origem	MAT	Tef	Rpb2	Acl1	ITS	LSU
38 Ho	Solo da Amazônia	Belém PA	Nd	X		X	X	X
800 Ho		Marrocos	Nd	X	X	X	X	X
1655	<i>Mangifera indica</i> - H	Lavras MG	Nd					
1694	<i>Theobroma cacao</i> - H	Ilhéus BA	1*					
2056	<i>Theobroma cacao</i> - HG	Uruçuca BA	1	X	X	X	X	X
2057	<i>Theobroma cacao</i> - G	Ilhéus BA	2	X	X	X	X	X
2237	<i>Theobroma cacao</i> - G	Uruçuca BA	1	X				
2238	<i>Theobroma cacao</i> - G	Uruçuca BA	2	X				
2239	<i>Theobroma cacao</i> - G	Ilhéus BA	1	X				
2240	<i>Theobroma cacao</i> - HG	Ilhéus BA	2	X				

“Tabela 1, continuação”

CML	Hospedeiro/ Substrato	Origem	MAT	Tef	Rpb2	Acl1	ITS	LSU
2241 Ho	<i>Theobroma cacao</i> - HG	Uruçuca BA	Nd	X	X	X		
2242	<i>Theobroma cacao</i> - HS/PG	Ilhéus BA	1	X				
2243	<i>Theobroma cacao</i> - HS/PG	Ilhéus BA	1	X	X	X	X	X
2244	<i>Theobroma cacao</i> - HS/PG	Ilhéus BA	1	X	X	X	X	X
2245 Ho	<i>Spathodea campanulata</i> - HG	MG	Nd	X	X	X	X	X
2246 Ho	<i>Spathodea campanulata</i> - G	MG	Nd	X	X	X	X	X
2247	<i>Theobroma cacao</i> - G	Santo Amaro BA	2*	X	X			
2248 Ho	<i>Theobroma cacao</i> - PS	Santo Amaro BA	Nd	X	X	X	X	X
2249 Ho	<i>Piper nigrum</i>	BA	Nd	X	X	X	X	X
2250 Ho	<i>Piper nigrum,</i>	BA	Nd	X	X	X	X	X

“Tabela 1, continuação”

CML	Hospedeiro/ Substrato	Origem	MAT	Tef	Rpb2	Acl1	ITS	LSU
2251	<i>Theobroma cacao</i> - H	AM	1	X	X	X	X	X
2252	<i>Theobroma cacao</i> - G	ES	2	X	X	X	X	X
2253	<i>Theobroma cacao</i> - H	AM	2	X	X	X	X	X
2254	<i>Theobroma cacao</i> - H	AM	1	X	X	X	X	X
2255	<i>Theobroma cacao</i> - H	AM	2	X	X	X	X	X
2256	<i>Theobroma cacao</i> - G	ES	2	X	X	X	X	X
2257	<i>Theobroma cacao</i> - H	AM	1	X	X	X	X	X
2258	<i>Theobroma cacao</i> - G	ES	1	X	X	X	X	X
2259	<i>Theobroma cacao</i> - G	ES	1	X				
2260	<i>Theobroma cacao</i> - H	AM	2	X				
2261	<i>Theobroma cacao</i> - G	ES	2	X				

“Tabela 1, continuação”

CML	Hospedeiro/ Substrato	Origem	MAT	Tef	Rpb2	Acl1	ITS	LSU
262	<i>Theobroma cacao</i> - G	ES	1	X				
2263	<i>Theobroma cacao</i> - G	ES	2	X				
2264	<i>Theobroma cacao</i> - HS/PG	Uruçuca BA	1	X				
2265	<i>Theobroma cacao</i> - G	Ilhéus BA	2	X	X	X	X	X
2266	<i>Mangifera indica</i>	Colima, México	2	X		X	X	X
2267	<i>Mangifera indica</i>	Colima, México	2	X	X	X	X	X
2268	<i>Mangifera indica</i>	Colima, México	2	X				
2269	<i>Mangifera indica</i>	Colima, México	2	X	X	X	X	X
2270	<i>Mangifera indica</i>	Colima, México	2	X				
2271	<i>Mangifera indica</i>	Colima, México	1	X	X	X	X	X
2272	<i>Mangifera indica</i>	Colima, México	1	X				
2273	<i>Mangifera indica</i>	Colima, México	2	X				

“Tabela 1, continuação”

CML	Hospedeiro/ Substrato	Origem	MAT	Tef	Rpb2	Acl1	ITS	LSU
2274	<i>Mangifera indica</i>	Colima, México	2	X		X	X	X
2275	<i>Mangifera indica</i>	Colima, México	2	X				
2276	<i>Mangifera indica</i>	Colima, México	2	X				
2277	<i>Theobroma cacao</i> - G	ES	2	X				
2278	<i>Theobroma cacao</i> - G	ES	2					
2279	<i>Theobroma cacao</i> - G	ES	2					
2280	<i>Theobroma cacao</i> - G	ES	2					
2330	<i>Theobroma cacao</i> - G	Ilhéus BA	2					
2331	<i>Theobroma cacao</i> - G	Uruçuca BA	1		X	X	X	X
2332	<i>Theobroma cacao</i> - G	Ilhéus BA	2					
2333	<i>Theobroma cacao</i> - HG	Uruçuca BA	1					
2334	<i>Theobroma cacao</i> - HS/PG	Ilhéus BA	2					

“Tabela 1, conclusão”

CML	Hospedeiro/ Substrato	Origem	MAT	Tef	Rpb2	Acl1	ITS	LSU
2335	<i>Theobroma cacao</i> - HS/PG	Ilhéus BA	2*		X			
2336	<i>Theobroma cacao</i> - HS/PG	Itabuna BA	2					
2337	<i>Theobroma cacao</i> - G	Santo Amaro BA	1*					
2338	<i>Theobroma cacao</i> - semente	BA	2					
2370 Ho	Serrapilheira	Igrapiúna BA	Nd	X	X	X	X	X
2408	<i>Paullinia cupana</i> - G	Manaus AM	1	X	X	X	X	X
2409	<i>Paullinia cupana</i> - G	Manaus AM	1	X	X	X	X	X
2411	<i>Paullinia cupana</i> - G	Manaus AM	2	X	X	X	X	X
2412	<i>Paullinia cupana</i> - G	Manaus AM	2	X	X	X	X	X
2413	<i>Paullinia cupana</i> - G	Manaus AM	Nd	X	X	X	X	X
2414	<i>Paullinia cupana</i> - G	Manaus AM	Nd	X	X	X		
2415	<i>Paullinia cupana</i> - G	Manaus AM	Nd	X	X	X	X	X

Nota: Ho Isolados homotáticos; *Isolados em que o *mating type* foi definido por cruzamento com testadores. Abreviações: H: haste; HG: haste com galha; G: galha; HS/PG: haste sadia/planta c/galha; PS: planta sadia; **CML**: Coleção Micológica de Lavras; Nd: Não determinado.

Tabela 2 Sequências de referência utilizadas na análise filogenética

Espécie	Código	Hospedeiro/Substrato	Origem	<i>Tef</i>	<i>Rpb2</i>	<i>Acl1</i>	ITS	LSU
<i>A. rigidiuscula</i>	CBS122570	casca de árvore	Camarões		HQ897760	HQ897896	HQ897815	
<i>A. albosuccinea</i>	BBA64502	madeira	Venezuela		HQ897699	HQ897837	HQ897788	U34554
<i>G. desmazieri</i>	^b CBS125507			HQ728146	HM626675	HM626633	HM626651	HM626663
<i>C. cyanostomona</i>	^{b,c,d} CBS 101734			HM626647	GQ506017	GQ505961	FJ474076	HM626671
<i>H. illudens</i>	^{b,c,d,e} BBA 67606			AF178326	GQ506017	GQ505961	FJ474076	FJ474081
<i>N. rigidiuscula</i>	^f CMW 18783			EU849670				
<i>N. rigidiuscula</i>	^f CMW 18785			EU849671				
<i>N. rigidiuscula</i>	^f F0174			DQ295126				

Nota: Abreviações das coleções de culturas: **BBA**: Julius Kuhn-Institute, Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics, Berlin e Braunschweig, Germany. **CBS**: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. **CMW**: Collection Mike Wingfield. Os códigos que não são CML são sequências de referência utilizadas na análise filogenética. ^aGraefenhan et al. (2011), ^bSchroers et al. (2011), ^cHirooka et al. (2010), ^dSamuels et al. (2009), ^eO'Donnell (2000) e ^fLombard et al. (2008).

4.2 Determinação de *Mating types* por PCR

Para determinar o *mating type* dos isolados, a melhor temperatura de anelamento foi de 60 °C e o melhor tempo de extensão dos *primers* foi de 2 minutos. Os 58 isolados que não formaram peritécios espontaneamente no teste de homotalismo foram submetidos à determinação de *mating type*. Utilizando os *primers* descritos por Kerényi et al. (2004) foi possível a identificação somente do idiomorfo *MAT-2* (Figura 2). Trinta e um isolados foram identificados como *MAT-2* e outros 19 isolados foram considerados como *MAT-1* (Tabela 1, APÊNDICE). Todos os isolados homotáticos também foram testados para verificar a presença de ambos os *mating types* no mesmo isolado, no entanto, não houve amplificação dos fragmentos. O *Mating type* de outros 4 isolados que não pode ser definido pela técnica de PCR, foi determinado por meio de cruzamentos com isolados testadores.

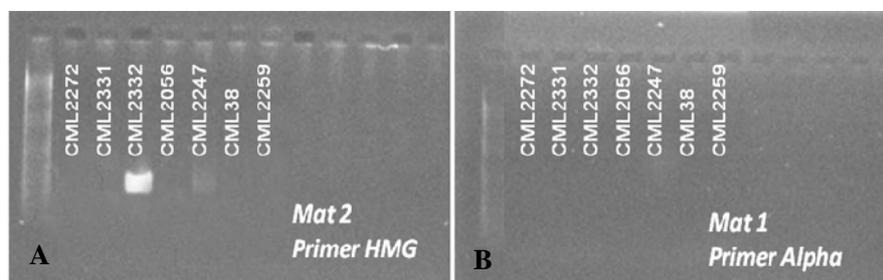


Figura 2 Gel da PCR para determinação de *mating types*. A. Isolados testados utilizando os *primers* para determinação do idiomorfo *MAT-2*; B. Isolados testados para determinação do idiomorfo *MAT-1*

4.3 Indução da fase sexuada

Foram realizados aproximadamente 1590 cruzamentos. As condições de incubação dos cruzamentos, como temperatura de 22-23 °C e luminosidade, com

luz branca fluorescente constante, foram eficientes na formação de peritécios férteis entre isolados de *F. decemcellulare*. Os cruzamentos foram avaliados semanalmente quanto à formação de peritécios e exsudação de ascósporos. Peritécios foram observados entre a segunda e a quarta semana de avaliação, sendo a exsudação observada uma semana após o aparecimento do peritécio. Em 54 cruzamentos distintos foi observada a formação de peritécios férteis típicos do teleomorfo heterotático. O resultado se confirmou nas duas repetições (Tabela 3).

Tabela 3 Relação dos cruzamentos entre isolados de *F. demcencellulare* avaliados após incubação a 22-23 °C sob luz constante

♀ (MAT-1) ^a		♂ (MAT-2) ^b	♀ (MAT-2) ^c		♂ (MAT-1) ^d
CML2271	X	CML2332	CML2338	X	CML2254
CML2271	X	CML2335	CML2338	X	CML2331
CML2271	X	CML2255			
CML2271	X	CML2260*	CML2057	X	CML2243
CML2271	X	CML2256*	CML2057	X	CML2271
CML2271	X	CML2253*	CML2057	X	CML1694
CML2257	X	CML2332			
CML2257	X	CML2057	CML2332	X	CML2251
CML2257	X	CML2335			
CML2257	X	CML2336	CML2336	X	CML2333
CML2257	X	CML2247	CML2336	X	CML2264*
CML2257	X	CML2253			
CML2257	X	CML2255			
CML2257	X	CML2256			
CML2257	X	CML2252			
CML2257	X	CML2411	CML2269	X	CML2257
CML2257	X	CML2338			
CML2254	X	CML2332	CML2411	X	CML1694
CML2254	X	CML2057	CML2253	X	CML2258*
CML2254	X	CML2335	CML2253	X	CML2271*
CML2254	X	CML2336	CML2253	X	CML2056*
CML2254	X	CML2253	CML2253	X	CML2264*
CML2254	X	CML2256			
CML2254	X	CML2252	CML2256	X	CML2272*
CML2254	X	CML2412	CML2256	X	CML2242*
CML2254	X	CML2255			
CML2254	X	CML2411	CML2255	X	CML2409*
CML2242	X	CML2335	CML2335	X	CML2258*
CML2242	X	CML2253			
CML2242	X	CML2412			
CML2242	X	CML2252			
CML1694	X	CML2335			
CML1694	X	CML2336			
CML2337	X	CML2336			
CML2337	X	CML2255			
CML2337	X	CML2253			
CML2337	X	CML2335*			
CML2337	X	CML2411*			
CML2251	X	CML2253			
CML2251	X	CML2256			
CML2251	X	CML2252			
CML2251	X	CML2411			

“Tabela 3, conclusão”

♀ (<i>MAT-1</i>) ^a		♂ (<i>MAT-2</i>) ^b	♀ (<i>MAT-2</i>) ^c	♂ (<i>MAT-1</i>) ^d
CML2409	X	CML2280		
CML2409	X	CML2338		
CML2331	X	CML2255		
CML2331	X	CML2253		
CML2333	X	CML2335		
CML2243	X	CML2338		
CML2258	X	CML2411		
CML2056	X	CML2332		
CML2259	X	CML2338*		
CML2332	X	CML2237*		
CML2272	X	CML2338*		

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

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

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

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

* Cruzamentos que produziram peritécios, porém, não ocorreu exudação de ascósporos

Peritécios férteis foram observados nos cruzamentos entre isolados do cacauero, entre isolados do cacauero e mangueira e entre isolados do cacauero e guaranazeiro (Tabela 1; Tabela 3). Dezesete cruzamentos formaram peritécios, entretanto, não ocorreu à exsudação de ascósporos (Tabela 3).

Os isolados CML2271, CML2257, CML2254, CML2057, CML2242, CML1694, CML2337, CML2251, CML2409, CML2331, CML2338 e CML2335 formaram peritécios férteis com mais de um parceiro sexual (Tabela 2). De acordo com os resultados dos cruzamentos os isolados CML 2257 (*MAT-1*) e CML 2057 (*MAT-2*) foram selecionados como testadores, já que apresentaram maior fertilidade quando usados como parental feminino.

4.4 Determinação da viabilidade de ascósporos

Ascósporos exsudados por peritécios de todos os cruzamentos férteis foram transferidos para agar-água 2% e mostraram-se viáveis, germinando após 24 horas de incubação (Figura 3 e 4).

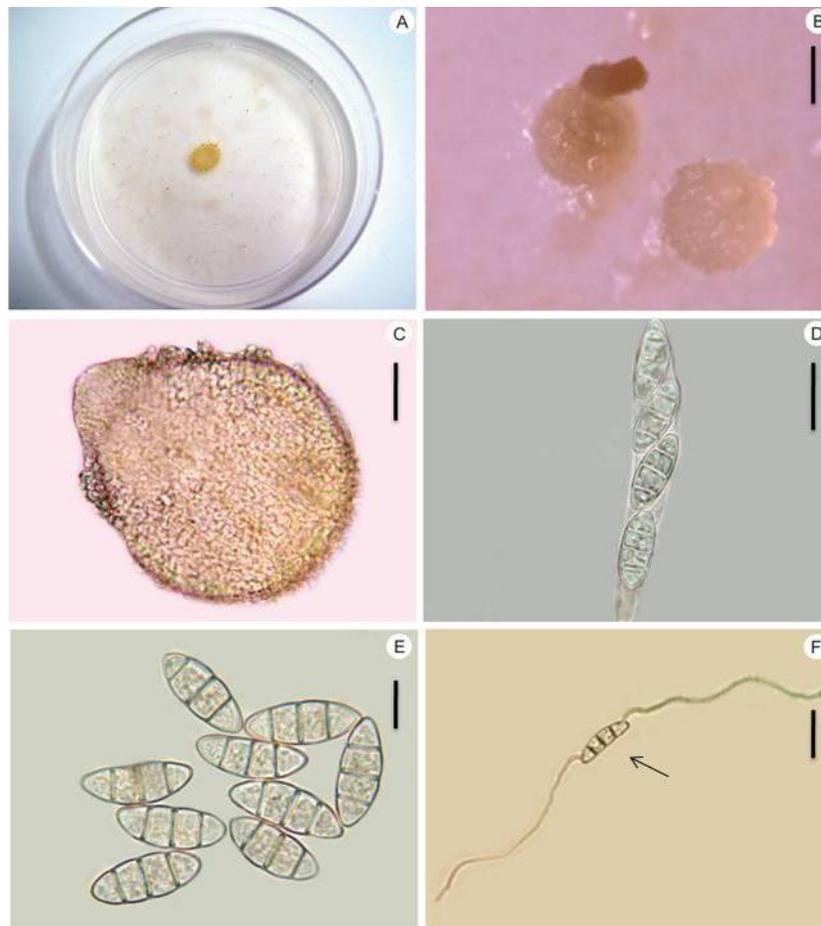


Figura 3 Fotografia de: A. Cultura monoconidial do isolado homotático CML 800 com formação de peritécios em placa de Petri contendo meio SNA; Fotomicrografias de: B. Peritécios exsudando ascósporos. Barra = 160 μm ; C. Peritécio. Barra = 80 μm ; D. Asco contendo 4 ascósporos. Barra= 20 μm ; E. Ascósporos. Barra = 10 μm ; F. Ascósporo germinando. Barra = 20 μm .

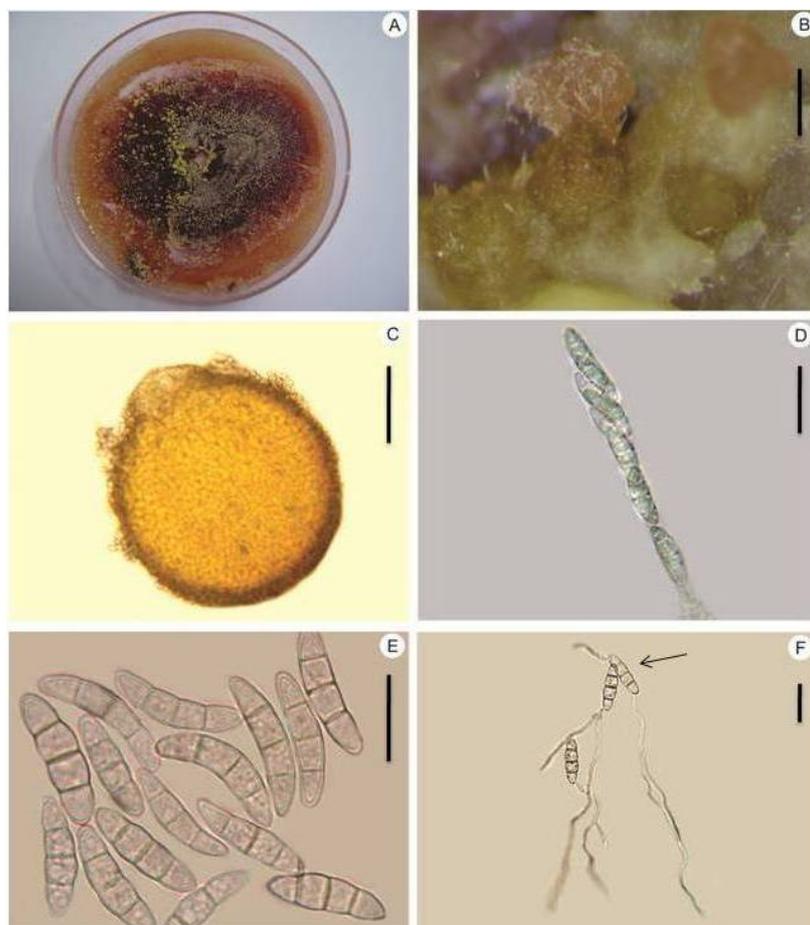


Figura 4 Fotografia de: A. Cruzamento fértil entre os isolados CML 2254 e CML 2255 em meio CA; Fotomicrografias de: B. Peritécios exsudando ascósporos. Barra = 160 μm ; C. Peritécio. Barra = 110 μm ; D. Asco contendo 8 ascósporos. Barra = 20 μm ; E. Ascósporos. Barra = 10 μm ; F. Ascósporos germinando. Barra = 10 μm .

4.5 Análise filogenética

Os resultados de ambos os métodos filogenéticos *Máxima Parcimônia* e *Máxima Verossimilhança* foram congruentes. Portanto, apenas os resultados da

análise de *Máxima Verossimilhança* serão apresentados. Todos os isolados heterotáticos obtidos de cacaueteiro, mangueira e guaranazeiro com sintomas de galha floral e superbrotamento formaram um clado distinto nas árvores geradas com sequências parciais dos genes *tef1- α* , *rpb2* e *acl1* (Figuras 5, 6 e 7). As árvores combinadas das regiões *rpb2+acl+ITS* e *tef-1 α +rpb2+acl+ITS-LSU* mostraram o mesmo resultado, com suporte *bootstrap* de 99% (Figuras 9 e 10).

Os isolados homotáticos agruparam em vários cladros distintos, de acordo com a análise dos genes *tef1- α* , *rpb2*, *acl1* e nas árvores combinadas das regiões *rpb2+acl+ITS* e *tef-1 α +rpb2+acl+ITS-LSU*, com exceção da análise da região ITS-LSU. Isolados de *Piper nigrum* (CML 2249 e CML 2250) e cacaueteiro (CML 2241 e CML 2248), se posicionaram em um mesmo clado (Figuras 5-10).

Isolados homotáticos recuperados de galhas em *S. campanulata* (CML 2245 e CML 2246), formaram um subclado distinto nas árvores das regiões *tef-1 α* , *rpb2*, *acl1* e também nas árvores combinadas com as regiões *rpb2+acl+ITS* e *tef-1 α +rpb2+acl+ITS-LSU* (Figuras 5, 6, 7, 9 e 10). Na árvore da região ITS-LSU eles ficaram próximos, porém, não houve suporte estatístico (Figura 8). Nas análises das regiões *rpb2*, *acl1* e ITS esses isolados agruparam-se próximo de *A. albosuccinea*.

Os isolados homotáticos CML 800, CML 38 agruparam na árvore do gene *tef-1 α* e formaram um grupo irmão do isolado de referência de *Nectria rigidiuscula* F0174. Os isolados CML 800 e CML 38 também agruparam na árvore do gene *acl1* e na árvore da região ITS-LSU. O isolado CML 2370 se posicionou separadamente dos demais isolados nas árvores dos genes *tef-1 α* e *acl1* e da região ITS-LSU. Na árvore do gene *rpb2* ele se agrupou com o isolado de referência de *A. rigidiuscula* (CBS 122570) e nas árvores combinadas se ele se agrupou com o isolado CML 800, entretanto sem suporte estatístico. Nas árvores das regiões *acl1* e ITS-LSU e na árvore combinada das regiões *tef-1 α* ,

rpb2, *act1*, o isolado de referência de *A. rigidiuscula* (CBS 122570) proveniente de casca de árvore, posicionou separadamente dos demais isolados (Figuras 7, 8 e 9).

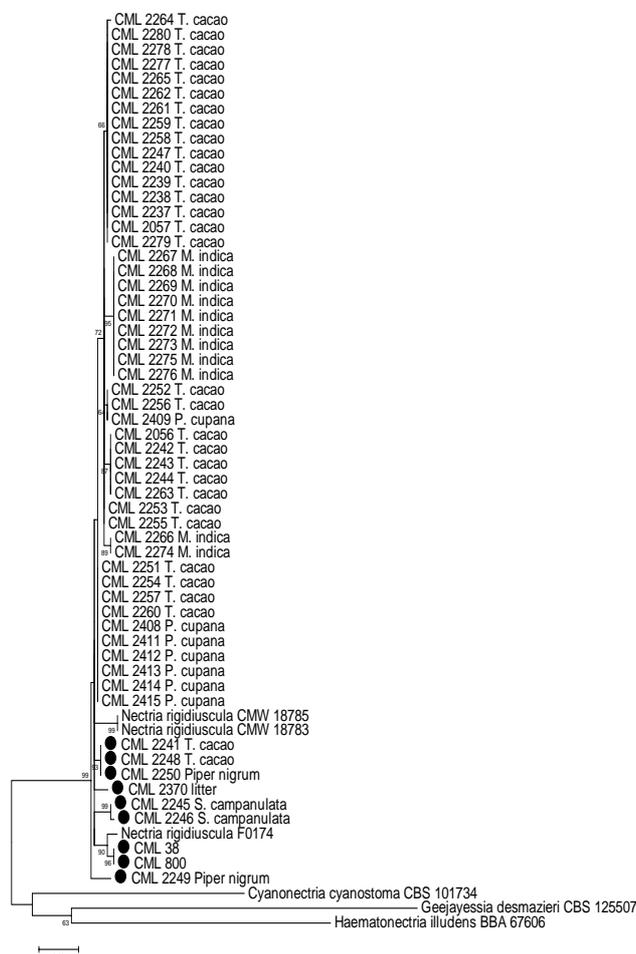


Figura 5 Análise de *Máxima Verossimilhança* de sequências do gene *tef-1α* de isolados de *F. decemcellulare* oriundos de vários hospedeiros de diferentes regiões geográficas

Nota: Um ponto negro ao lado do código indica que o isolado é homotálico. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico, *Bootstrap* (1.000 repetições), são indicados acima dos internódios. Essa árvore tem como *outgroup* *Geeyayessia desmazieri*, *Haematonectria illudens* e *Cyanonectria cyanostoma*. Abreviações das coleções de culturas: **CML**: Coleção Micológica de Lavras; **BBA**: Julius Kuehn-Institute, Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics, Berlin e Braunschweig, Germany. **CBS**: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands; **CMW**: Collection Mike Wingfield, África do Sul.

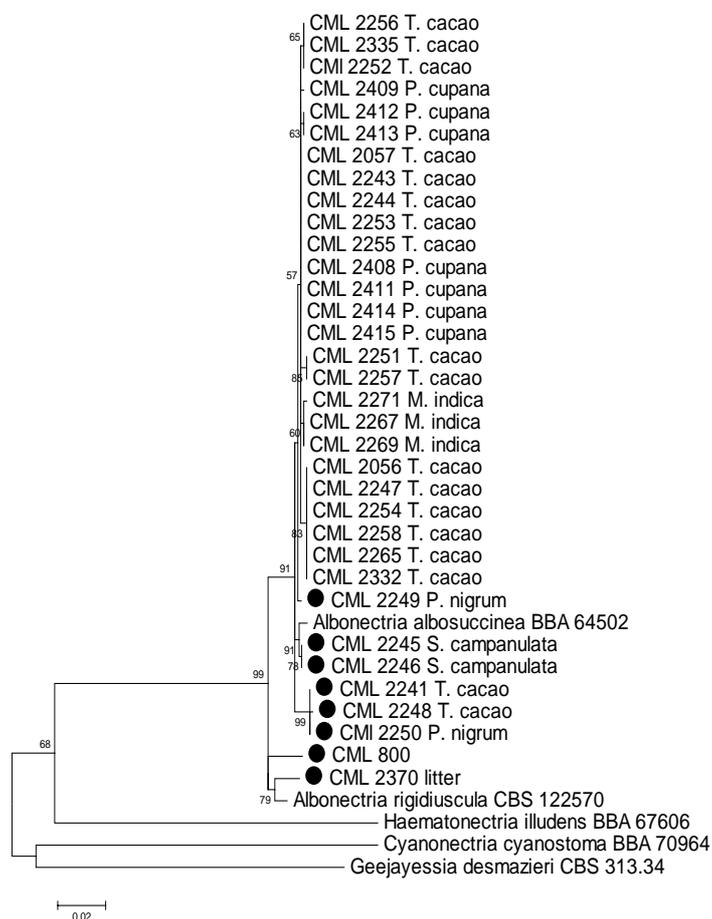


Figura 6 Análise de *Máxima Verossimilhança* de sequências do gene *rpb 2* de isolados de *F. decemcellulare* oriundos de vários hospedeiros de diferentes regiões geográficas

Nota: Um ponto negro ao lado do código indica que o isolado é homotático O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico, *Bootstrap* (1.000 repetições), são indicados acima dos internódios. Essa árvore tem como *outgroup* *Geejayessia desmazieri*, *Haematonectria illudens* e *Cyanonectria cyanostoma*. Abreviações das coleções de culturas: **CML**: Coleção Micológica de Lavras; **BBA**: Julius Kuehn-Institute, Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics, Berlin e Braunschweig, Germany. **CBS**: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

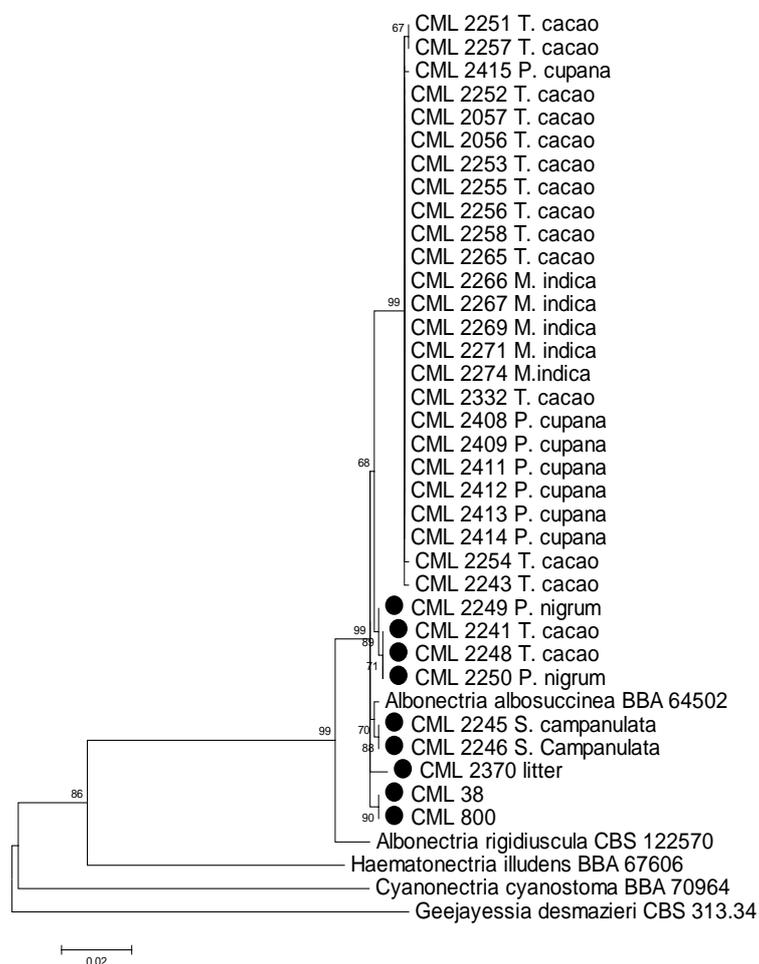


Figura 7 Análise de Máxima Verossimilhança de sequências do gene *acII* de isolados de *F. decemcellulare* oriundos de vários hospedeiros de diferentes regiões geográficas

Nota: Um ponto negro ao lado do código indica que o isolado é homotático O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico, *Bootstrap* (1.000 repetições), são indicados acima dos internódios. Essa árvore tem como *outgroup* *Geejayessia desmazieri*, *Haematonectria illudens* e *Cyanonectria cyanostoma*. Abreviações das coleções de culturas: **CML**: Coleção Micológica de Lavras; **BBA**: Julius Kuehn-Institute, Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics, Berlin e Braunschweig, Germany. **CBS**: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

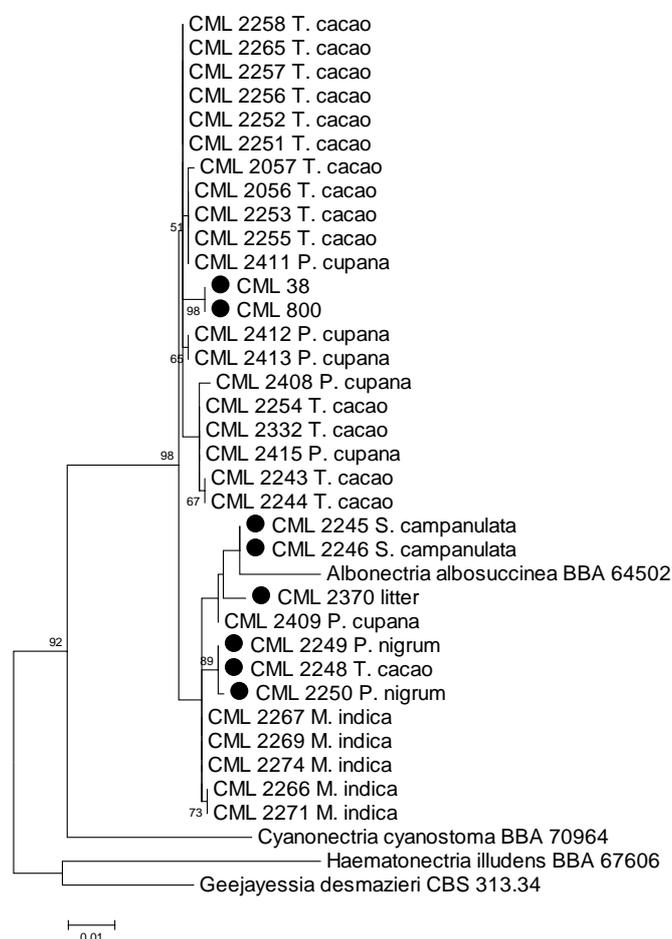


Figura 8 Análise de *Máxima Verossimilhança* de sequências da região ITS-LSU de isolados de *F. decemcellulare* oriundos de vários hospedeiros de diferentes regiões geográficas

Nota: Um ponto negro ao lado do código indica que o isolado é homotático. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico, *Bootstrap* (1.000 repetições), são indicados acima dos internódios. Essa árvore tem como *outgroup* *Geejayessia desmazieri*, *Haematonectria illudens* e *Cyanonectria cyanostoma*. Abreviações das coleções de culturas: **CML**: Coleção Micológica de Lavras; **BBA**: Julius Kuehn-Institute, Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics, Berlin e Braunschweig, Germany. **CBS**: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

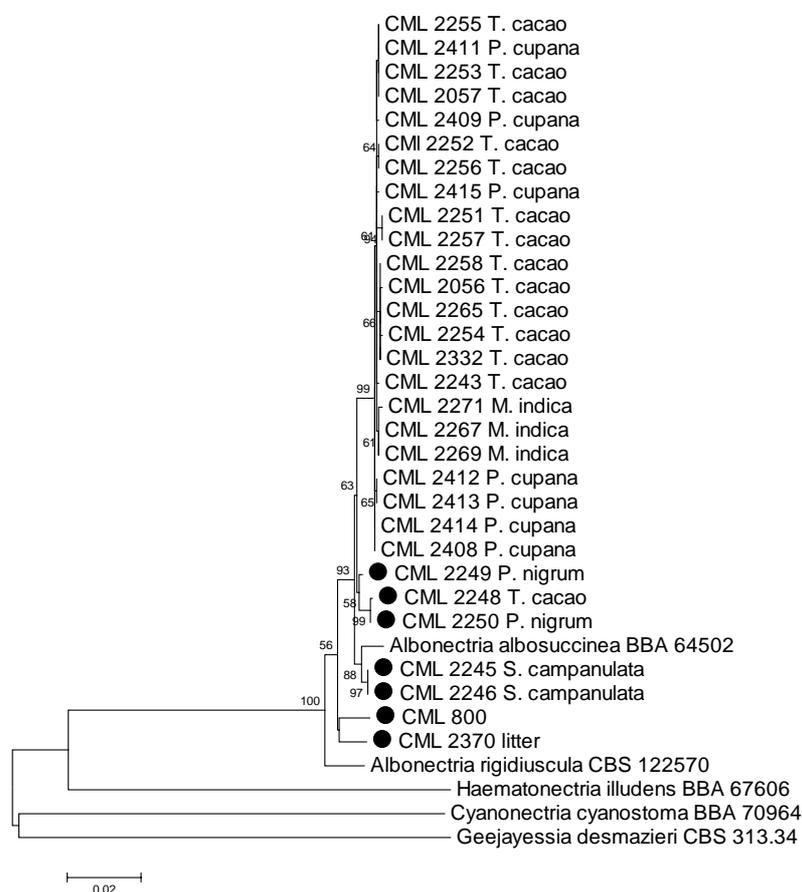


Figura 9 Análise de *Máxima Verossimilhança* de sequências combinadas das regiões ITS, *rpb2*, *acl*, de isolados de *F. decemcellulare* oriundos de vários hospedeiros de diferentes regiões geográficas

Nota: Um ponto negro ao lado do código indica que o isolado é homotático O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico, *Bootstrap* (1.000 repetições), são indicados acima dos internódios. Essa árvore tem como *outgroup* *Geejayessia desmazieri*, *Haematonectria illudens* e *Cyanonectria cyanostoma*. Abreviações das coleções de culturas: **CML**: Coleção Micológica de Lavras; **BBA**: Julius Kuehn-Institute, Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics, Berlin e Braunschweig, Germany. **CBS**: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

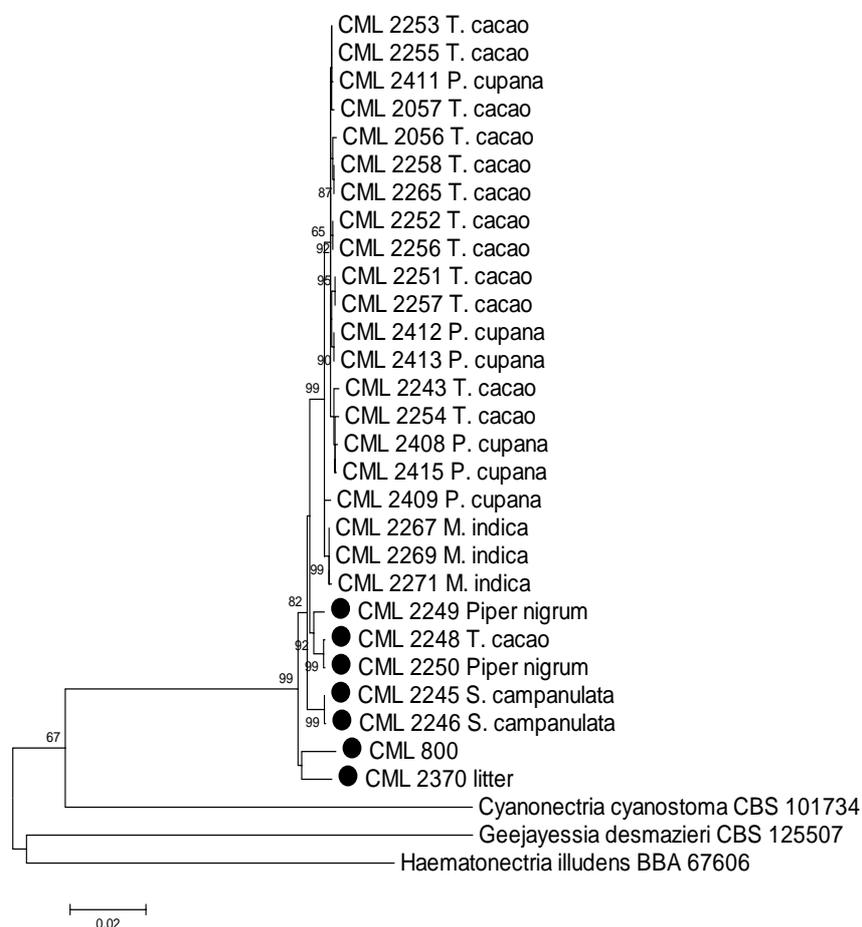


Figura 10 Análise de Máxima Verossimilhança de sequências combinadas das regiões ITS-LSU, *tef-1α*, *rpb2*, *acl*, de isolados de *F. decemcellulare* oriundos de vários hospedeiros de diferentes regiões geográficas

Nota: Um ponto negro ao lado do código indica que o isolado é homotático. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico, *Bootstrap* (1.000 repetições), são indicados acima dos internódios. Essa árvore tem como *outgroup* *Geejayessia desmazieri*, *Haematonectria illudens* e *Cyanonectria cyanostoma*. Abreviações das coleções de culturas: **CML**: Coleção Micológica de Lavras; **BBA**: Julius Kuehn-Institute, Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics, Berlin e Braunschweig, Germany. **CBS**: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

4.6 Caracterização Morfológica

Na caracterização morfológica da fase anamorfa, isolados homotáticos e heterotáticos apresentaram características morfológicas típicas de *F. decemcellulare*, de acordo com Leslie e Summerell (2006) como: microconídios com formato oval, hialinos, sem septo, mas ocasionalmente com um septo, produzidos a partir do micélio aéreo em longas cadeias; presença de monofiálides; esporodóquios de coloração amarelada; macroconídios produzidos em esporodóquio apresentaram formato curvo a cilíndrico, seis a dez septos, com célula apical arredondada e célula pé bem característica da espécie (Figura 11). Não foi observada a formação de clamidósporos e nem constatada a presença de morfotipos entre os isolados avaliados neste estudo.

De acordo com as características morfológicas da fase teleomorfa observadas, os isolados apresentaram peritécios subglobosos, amarelos, com pequenas papilas na superfície ascomatal, medindo 238-432 x 221-336 μm em isolados heterotáticos e 276-387 x 217-326 μm em isolados homotáticos (Figura 12 A). Os ascos são clavados, medindo 75-107,5 x 10-13,5 μm em isolados heterotáticos e 64,5-97 x 10,5-14 μm em isolados homotáticos (Figura 12 B). Foram observados quatro ascósporos por asco (Figura 3) em isolados homotáticos e oito ascósporos por asco em isolados heterotáticos (Figura 4). Os ascósporos são elipsoides, hialinos, com três septos, medindo 18-27 x 6-7,5 μm em isolados heterotáticos (Figura 12 C). Em isolados homotáticos foi observada uma variação quanto ao tamanho de ascósporos. Os isolados CML 38 e CML 800 mediram 25,5 x 9 μm e 24 x 9 μm respectivamente, e os demais isolados mediram 23-27 x 6,5-7 μm (Figura 12 C).

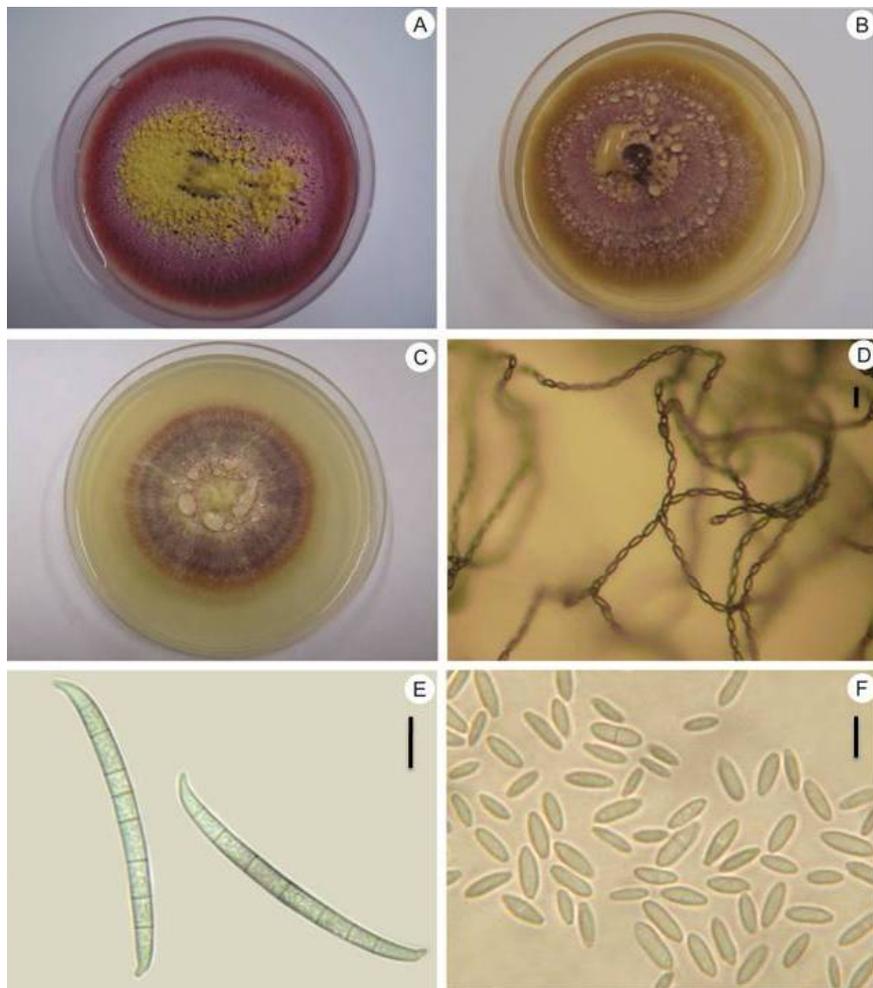


Figura 11 Caracteres morfológicos dos isolados de *F. decemcellulare*. A, B e C fotografias mostrando a coloração da colônia em meio BDA; Fotomicrografias de: D. Cadeias de microconídios. Barra = 10 μm; E. Macroconídios. Barra = 20 μm; F. Microconídios. Barra = 10 μm

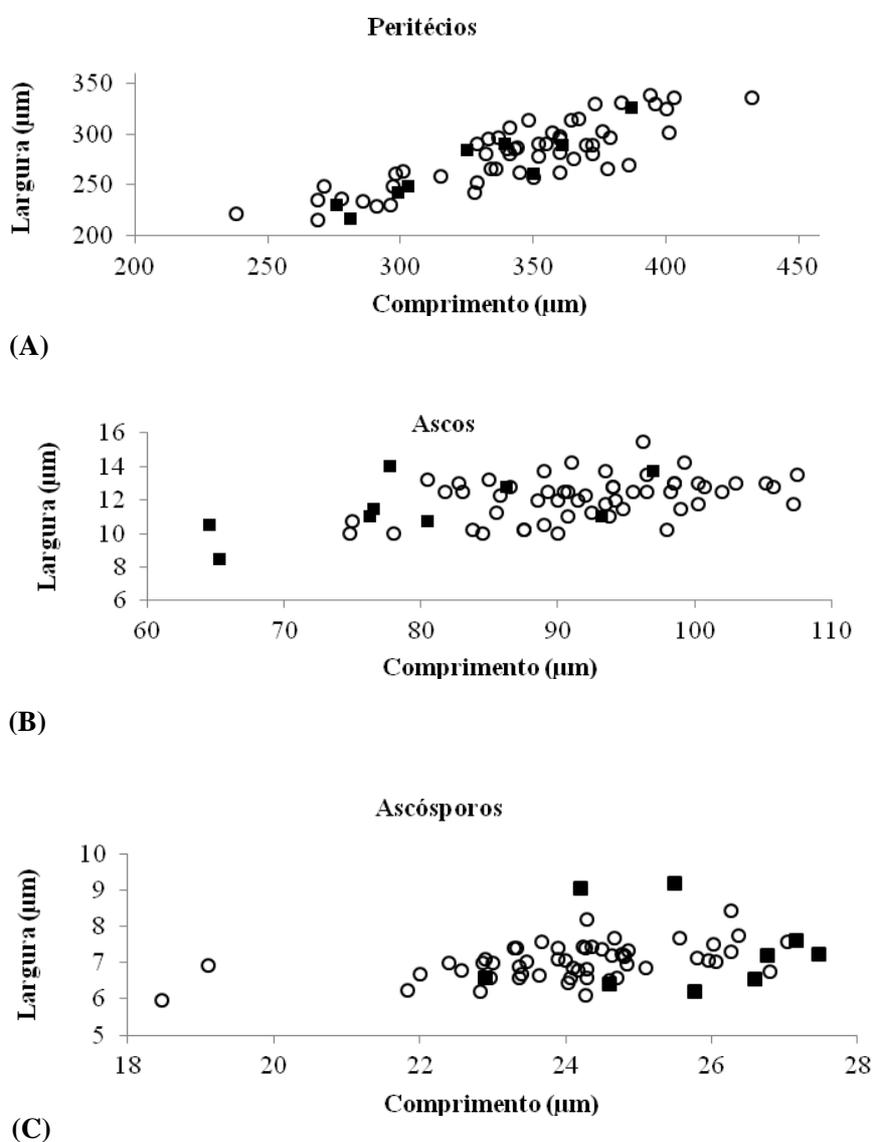


Figura 12 Dimensões dos marcadores morfológicos do teleomorfo de *F. decemcellulare*. A. Peritécios; B. Ascós; C. Ascósporos. (■) Isolados homotáticos após teste de homotalismo a 20 °C e (○) Isolados heterotáticos após cruzamentos a 22-23 °C sob luz constante

4.7 Teste de patogenicidade em cacauero

Foi observado o aparecimento de sintomas de galha após três meses da inoculação (Figura 13). Os isolados heterotáticos (CML 2265, CML 2252 e CML 2267) causaram sintomas em todas as plantas. O isolado homotático CML 800 não causou nenhuma alteração na planta (Figura 13), mas foi reisolado das plantas inoculadas. Nas testemunhas também não foi observado o sintoma da doença. Foram realizados reisolamentos em diversas regiões das plantas inoculadas: galha, abaixo da galha, acima da galha, raiz, folhas e da haste sadia e foram recuperadas culturas típicas de *F. decemcellulare* (Tabela 4).

Tabela 4 Reisolamento dos isolados de *Fusarium decemcellulare* inoculados em plantas de cacauero

Parte da planta que foi feito o isolamento	Isolado				Testemunhas
	CML 800	CML 2252	CML 2265	CML 2267	
Folha	-	-	-	-	-
Acima da galha	-	-	+	+	-
Galha	-	+	+	+	-
Abaixo da Galha	-	-	+	+	-
Raiz	-	-	-	+	-
Haste sadia	+	-	-	-	-

(-) O fungo não foi reisolado.

(+) O fungo foi reisolado.

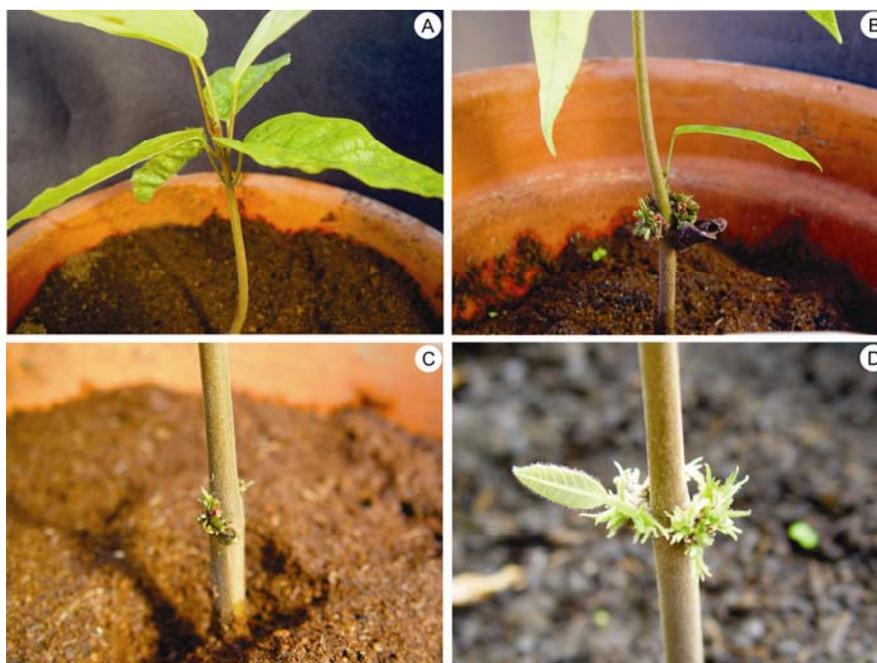


Figura 13 Teste de patogenicidade em plantas de cacauero inoculadas com isolados de *F. decemcellulare* A. Planta inoculada com o isolado homotático CML 800; B. Planta inoculada com o isolado heterotático CML 2267; C. Planta inoculada com o isolado heterotático CML 2252; D. Planta inoculada com o isolado heterotático CML 2265

5 DISCUSSÃO

Em uma ampla coleção contendo 67 isolados com características morfológicas de *F. decemcellulare* obtidos de diferentes hospedeiros e substratos, foi possível observar a presença de espécies biológicas e filogenéticas distintas.

Com base nas análises filogenéticas das sequências parciais dos genes *tef-1 α* , *rpb2*, *acl1* e da região ITS-LSU (Figuras 6-10), os isolados heterotáticos que causam galha-floral e superbrotamento em cacaueteiro, mangueira e guaranazeiro formaram uma linhagem monofilética. Os isolados homotáticos formaram grupos filogenéticos distintos. Um grupo contendo isolados provenientes de pimenta-do-reino e de plantas assintomáticas de cacaueteiro, outro composto pelos isolados da espatódea. O terceiro grupo incluiu os isolados CML 38 (proveniente de solo), CML 800 (substrato não definido) e CML 2370 (proveniente de serrapilheira), que compartilharam o ancestral comum mais recente com as espécies de referência de *A. rigidiuscula*.

As sequências de referência utilizadas nesse estudo se posicionaram separadamente dos demais isolados evidenciando que os isolados do Brasil e do México analisados pertencem a uma espécie filogenética diferente de *F. decemcellulare*. Não foram encontradas sequências do tipo de *F. decemcellulare* para inclusão nas análises filogenéticas. Também não foi encontrada sequências de todos os genes para o mesmo isolado, sendo necessário utilizar algumas sequências para o gene *tef-1 α* e outras para as demais regiões.

Os isolados provenientes de espatódea formaram um grupo monofilético com *A. alboscucinea* nas árvores dos genes *rpb2*, *acl1*, e na árvore combinada com as regiões ITS, *rpb2* e *acl 1*. Do isolado tipo de *A. alboscucinea* (BBA 64502) a sequência de *tef-1 α* não está disponível e poucos isolados de espatódea foram utilizados na análise filogenética para afirmar com segurança que

pertencem a uma mesma espécie. Na caracterização morfológica os isolados de espatódea apresentaram características típicas de *F. decemcellulare*.

Uma filogenia elaborada baseada nos genes *rpb2* e *act1* posicionou *A. albossucinea* como grupo irmão de *A. rigidiuscula* (GRAEFENHAN et al., 2011). Rossman et al. (1999) afirmam que *A. albossucinea* não produz pigmento rosa, os microconídios não são formados em cadeias e os macroconídios são menores e com menos septos que os de *F. decemcellulare*.

As características da fase anamorfa de espécies homotáticas e heterotáticas são muito similares, não sendo possível a distinção de morfotipos. Entretanto, os isolados homotáticos apresentaram como característica comum a produção de peritécios com quatro ascósporos por asco. Os isolados CML 800 e CML 38 diferiram dos demais isolados quanto ao formato dos ascósporos, representando uma espécie morfológica distinta dos demais isolados e similar a *A. rigidiuscula* descrita na literatura (ROSSMAN et al., 1999). Apesar dos isolados CML 800 e CML 38 se agruparem com o isolado CML 2370, esses isolados apresentaram características morfológicas diferentes. O isolado homotático CML 2370 foi obtido de ascósporos provenientes de peritécio encontrado em ramo de serrapilheira, indicando que a fase sexuada pode ocorrer em condições de campo.

Os *primers* descritos por Kerényi et al. (2004) para determinar o *mating type* de espécies de *Fusarium* não forneceram resultado satisfatório para a determinação do idiomorfo *MAT-1* dos isolados de *F. decemcellulare* testados. Provavelmente a não-funcionalidade dos *primers* pode estar relacionada com a divergência de sequência que pode ocorrer mesmo em regiões conservadas para esse gênero (STEENKAMP et al., 2000). Os *primers* para a identificação do *MAT-2* apresentaram melhor resultado. O idiomorfo *MAT-1* é relativamente mais complexo, pois possui três transcritos (*MAT-1-1*, *MAT-1-2* e *MAT-1-3*), sendo que *MAT-1-1* codifica proteína da α -box com funções importantes na

formação de peritécios e ascósporos. *MAT-1-2* e *MAT-1-3* aumentam a eficiência dos cruzamentos, mas não estão diretamente ligados à produção de peritécios e ascósporos. Já o idiomorfo *MAT-2* tem somente a proteína HMG-box, que desempenha papel importante na ascosporigênese e na determinação de cruzamentos específicos (YUN et al., 2000).

Os 54 cruzamentos distintos formaram peritécios férteis com oito ascósporos por asco. Assim, a quantidade de ascósporos por asco é um bom marcador morfológico para a separação das espécies homotáticas e heterotáticas. O cruzamento entre isolados oriundos do Brasil (cacaueiro) com isolados do México (mangueira) evidenciam que não há barreira reprodutiva entre populações oriundas de diferentes hospedeiros e regiões geográficas, portanto pertencem a uma mesma espécie biológica.

Os isolados CML 2257 e CML 2057 foram selecionados como testadores *MAT-1* e *MAT-2*, respectivamente, e apresentaram resultados positivos quando cruzados com os isolados que não tiveram sucesso na determinação de *mating types*.

No teste de patogenicidade apenas os isolados heterotáticos inoculados induziram sintomas da doença. Porém, o isolado homotático foi reisolado na haste sadia da planta, evidenciando ser endófito. Os reisolamentos realizados demonstram que *F. decemcellulare* pode colonizar vários tecidos vegetais, pois a inoculação nas sementes germinadas proporcionou a translocação de dois isolados para várias partes da planta. O isolado CML 2267 oriundo de *Mangifera indica* induziu sintoma de galha floral em plantas de cacau, mostrando não haver especificidade de hospedeiro.

Testes de patogenicidade com isolados de *F. decemcellulare* já foram realizados com sucesso em outros estudos e demonstraram que apenas isolados heterotáticos foram patogênicos (FORD; BOURRET; SNYDER, 1967). No complexo *Fusarium solani*, tem sido observado situação semelhante, onde na

maioria dos casos, as populações patogênicas são heterotáticas ou não possuem teleomorfo conhecido (PLOETZ, 2006).

Existem evidências que apontam que reguladores do crescimento de plantas tais como citocinas e auxinas desempenham um papel nas doenças bacterianas, virais e fúngicas em plantas, incluindo o crescimento anormal, a formação de galhas, hipertrofias, alongamento do caule e senescência prematura (SCHMULLING; SCHAFER; ROMANOV, 1997). Em *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da doença conhecida como vassoura-de-bruxa em cacauero, foi observado que a presença de alguns fitohormônios pode contribuir para a sua patogenicidade (KILARU; BAILEY; HASENSTEIN, 2007).

Zhan, Torriani e McDonald (2007) realizaram um estudo para verificar a associação entre os *mating types* e a patogenicidade de *Mycosphaerella graminicola* em trigo. Usando um grande número de isolados oriundos de diversas regiões geográficas e genótipos do hospedeiro, foi observado que o *mating type MAT-1* mostrou-se consistentemente com maior patogenicidade em relação ao *mating type MAT-2*.

A maneira que o tipo de reprodução sexuada influencia a patogenicidade, ainda precisa ser elucidada.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados, pode-se concluir que:

- a) *Fusarium decemcellulare* representa um complexo de espécies que podem ser homotáticas ou heterotáticas.
- b) Isolados heterotáticos causadores de galha e superbrotamento em cacaueiro, mangueira e guaranazeiro pertencem a uma espécie filogenética e biológica distinta.
- c) Isolados homotáticos podem ser distinguidos dos isolados heterotáticos pela quantidade de ascósporos por asco.
- d) Isolados homotáticos oriundos de diversos substratos ou hospedeiros e isolados de referência de *F. decemcellulare*, formam grupos distintos da espécie patogênica.
- e) Há fortes evidências que *Fusarium decemcellulare* como é conhecido na literatura, é uma espécie homotática associada a material vegetal em decomposição ou solo como sapróbio ou endófito.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi realizado pela mestranda Erica Sfalsin no Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia com o propósito de gerar conhecimentos sobre a morfologia e biologia do fungo causador da galha floral do cacau e inferir sobre a sua posição filogenética. Foi iniciada a caracterização morfológica do anamorfo, a análise filogenética utilizando sequências parciais do gene *tef-1 α* , testes de homotalismo e testes de patogenicidade.

No presente trabalho, novos isolados foram incluídos e com o auxílio de análises filogenéticas com outras regiões gênicas, novos testes de homotalismo, teste de compatibilidade sexual e a avaliação do teste de patogenicidade iniciado anteriormente, foram obtidos resultados que mostram que isolados com características morfológicas de *F. decemcellulare* podem ser separados em no mínimo duas espécies filogenéticas distintas. Esses resultados contribuiram para um maior conhecimento sobre a biologia do fungo, e podem auxiliar na identificação de *F. decemcellulare* em trabalhos futuros.

Pretende-se agora avaliar se os demais isolados homotáticos são patogênicos e se os isolados heterotáticos podem causar doença em outras cultivares de cacau e também em outras espécies frutíferas como mangueira e guaranazeiro. Todas essas informações terão importância para programas de melhoramento de plantas e no manejo e controle de doenças.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, Oct. 1990.
- ÂNGULO, S. M.; VILLAPUDUA, J. R. Buba of mango (*Mangifera indica* L.) in the state of Sinaloa, México: abstract the American Phytopathological Society. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 72, n. 1, p. 171, 1982. Abstract.
- ARMENGOL, J. et al. Identification, incidence and characterization of *Fusarium proliferatum* on ornamental palms in Spain. *Plant Pathology*, Oxford, v. 112, p. 123-131, June 2005.
- BASTOS, C. N.; SANTOS, A. Superbrotamento de inflorescências do limão-de-caiena causado por *Fusarium decemcellulare*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 26, n. 2, p. 222-232, jun. 2001.
- BOOTH, C. The genus *Fusarium*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 237 p.
- BRUNT, A. A.; WARTON, A. L. *Calonectria rigidiuscula* (Berk. & Br.) Sacc. in the case of a gall disease of cocoa in Ghana. *Nature*, London, v. 193, p. 903-904, Mar. 1962.
- BRITZ, H. et al. Female fertility and mating type distribution in a South African population of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 64, p. 2094-2095, June 1998.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Oxford, v. 42, p. 225-226, 1939.
- COVERT, S. F. et al. Partial MAT-2 gene structure and the influence of temperature on mating success in *Gibberella circinata*. *Fungal Genetics and Biology*, Arkansas, v. 28, n. 2, p. 43-54, June 1999.

COVERT, S. F. et al. Sexual reproduction in the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium tucumaniae*. *Fungal Genetics and Biology*, Arkansas, v. 44, n. 4, p. 799-807, 2007.

FORD, E. J.; BOURRET, J. A.; SNYDER, W. C. Biologic specialization in *Calonectria (Fusarium) rigidiuscula* in relation to green point gall of cocoa. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 57, p. 710-712, 1967.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R.; ARAÚJO, J. C. A. Doenças de expressão econômica de culturas exploradas na Amazônia Ocidental. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 31, p. 37-38, ago. 2006. Suplemento.

GERLACH, W.; NIRENBERG, H. The genus *Fusarium*: a pictorial atlas. Berlin: Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft, 1982. 406 p.

GRAEFENHAN, T. et al. An overview of the taxonomy, phylogeny, and typification of nectriaceous fungi in *Cosmospora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella* and *Volutella*. *Studies in Mycology*, Utrecht, v. 68, p. 79-113, Mar. 2011.

GUU, J. R.; JU, Y. M.; HSIEH, H. J. Nectriaceous fungi collected from forests in Taiwan. *Botanical Studies*, Minneapolis, v. 48, p. 187-203, Apr. 2007.

HEPPERLE, D. SeqAssem©: a sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences: win32-version. Klein Raden: Sequentx, 2004. Disponível em: <<http://www.sequentix.de>>. Acesso em: 10 out. 2010.

HIROOKA, Y. et al. *Verrucostoma*, a new genus in the bionectriaceae from the Bonin Islands, Japan. *Mycologia*, Lawrence, v. 102, n. 2, p. 418-29, Mar./Apr. 2010.

JUNQUEIRA, N. T. V. et al. Principais doenças da fruteira-do-conde no cerrado. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2001. 33 p.

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

KILARU, A.; BAILEY, B. A.; HASENSTEIN, K. H. *Moniliophthora pernicios*a produces hormones and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa leaves. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 274, p. 238-244, July 2007.

LAWRENCE, J. S.; CAMPÊLO, A. M. F. L.; FIGUEIREDO, J. M. *Enfermidades do cacauzeiro: II. doenças fúngicas que ocorrem nas folhas, ramos e tronco*. *Agrotópica*, Itabuna, v. 3, n. 1, p. 1-14, 1991.

LESLIE, J. F. *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 73, n. 1, p. 282-291, Jan. 1995.

LESLIE, J. F.; KLEIN, K. K. Female fertility and mating type effects on effective population size and evolution in filamentous fungi. *Genetics*, Austin, v. 144, p. 557-567, Oct. 1996.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. *The Fusarium laboratory manual*. Malden: Blackwell, 2006. 387 p.

LOMBARD, L. et al. A new bark canker disease of the tropical hardwood tree *Cedrelinga cateniformis* in Ecuador. *Fungal Diversity*, Hong Kong, v. 31, n. 1, p. 73-81, Mar. 2008.

MALAGUTI, G.; REYES, C. A gall disease of cacao and mango in Venezuela caused by *Calonectria rigidiuscula*. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 54, p. 499-500, May 1964.

MEIJA, L. C. et al. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biocontrol*, Dordrecht, v. 46, n. 1, p. 4-14, Feb. 2008.

NOWROUSIAN, M. et al. The fungal *acl1* and *acl2* genes encode two polypeptides with homology to the N- and C-terminal parts of the animal ATP citrate lyase polypeptide. *Current Genetics*, New York, v. 37, p. 189-193, Mar. 2000.

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

O'DONNELL, K. et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Journal of Applied Biological Sciences*, Ankara, v. 95, n. 3, p. 2044-2049, Mar. 1998.

O'DONNELL, K. *Fusarium* and its near relatives. In: REYNOLDS, D. R.; TAYLOR, J. W. (Ed.). *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematic*. Wallingford: CAB International, 1993. p. 225-233.

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

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. Identificação e manejo das principais doenças do cacaueteiro no Brasil. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC/SEFIT, 2005. 132 p.

PLOETZ, R. C. *Fusarium*-induced disease of tropical, perennial crops. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 96, n. 6, p. 648-652, Aug. 2006.

PLOETZ, R.; VAZQUEZ, A.; BENSCHER, D. First report of *Fusarium decemcellulare* as a pathogen of mango in the United States. *Plant Disease*, Quebec, v. 80, n. 10, p. 1207, Oct. 1996.

POLETTI, I. et al. Influência da inoculação de *Fusarium* spp. e níveis de sombreamento no crescimento e desenvolvimento da erva-mate. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, n. 3, p. 513-521, jul./set. 2010.

REICHLE, R. E.; SNYDER, W. C. Heterothallism and ascospore number in *Calonectria rigidiuscula*. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 54, n. 10, p. 1297-1299, 1964.

ROSSMAN, A. Y. et al. Genera of *Bionectriaceae*, *Hypocreaceae* and *Nectriaceae* (*Hypocreales*, Ascomycetes). *Studies Mycology*, Utrecht, v. 42, n. 3, p. 134-137, May 1999.

ROSSMAN, A. Y. et al. Molecular studies of the bionectriaceae using large subunit rDNA sequences. *Mycologia*, Lawrence, v. 93, n. 1, p. 100-110, Feb. 2001.

SAMUELS, G. J. et al. *Cyanonectria*, a new genus for *Nectria cyanostoma* and its *Fusarium* anamorph. *Studies in Mycology*, Utrecht, v. 8, n. 1, p. 49-58, 2009.

SANTOS, A. B. C. et al. Etiologia do superbrotamento da mangueira no estado do Pará. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 8, p. 595, out. 1983.

SCHMULLING, T.; SCHAFER, S.; ROMANOV, G. Cytokinins as regulators of gene expression. *Physiologia Plantarum*, Sweden, v. 100, p. 505-519, July 1997.

SCHROERS, H. -J. et al. A revision of *Cyanonectria* and *Geejayessia* gen. nov., and related species with *Fusarium*-like anamorphs. *Studies in Mycology*, Utrecht, v. 68, p. 115-138, Mar. 2011.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. *Mycological Research*, Cambridge, v. 109, n. 6, p. 661-686, June 2005.

SMITH, D.; ONIONS, A. H. S. The preservation and maintenance of living fungi. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1994. 132 p.

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

SUMMERELL, B. et al. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal Diversity*, Hong Kong, v. 44, n. 1, p. 3-13, Jan. 2010.

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

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

THOROLD, C. A. *Diseases of cocoa*. New York: Clarendon, 1975. 423 p.

VIJI, G.; UDDIN, W. Distribution of mating type alleles and fertility status of *Magnaporthe grisea* causing gray leaf spot of perennial ryegrass and St. Augustine grass turf. *Plant Disease*, Quebec, v. 86, p. 827-832, Aug. 2002.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. (Ed.) et al. *PCR protocols: a guide to methods and application*. New York: Academic, 1990. p. 315-322.

WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. *Cocoa*. 4th ed. London: Longman Scientific and Technical, 1985. 620 p. (Tropical Agriculture Series).

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

ZHAN, J.; TORRIANI, S. F. F.; MCDONALD, B. A. Significant difference in pathogenicity between *MAT1-1* and *MAT1-2* isolates in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology*, Orlando, v. 44, p. 339-346, May 2007.