

**GRUPOS DE COMPATIBILIDADE  
VEGETATIVA EM ISOLADOS DE *Fusarium*  
ASSOCIADOS À MALFORMAÇÃO DA  
MANGUEIRA NO BRASIL**

**JEAN HERLLINGTON ARAÚJO MONTEIRO**

**2006**

**JEAN HERLLINGTON ARAÚJO MONTEIRO**

**GRUPOS DE COMPATIBILIDADE VEGETATIVA EM ISOLADOS DE  
*Fusarium* ASSOCIADOS À MALFORMAÇÃO DA MANGUEIRA NO  
BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. PhD. Ludwig Heinrich Pfenning

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2006

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

Monteiro, Jean Herllington Araújo

Grupos de compatibilidade vegetativa em isolados de *Fusarium* associados à malformação da mangueira no Brasil / Jean Herllington Araújo Monteiro. – Lavras : UFLA, 2006.

47 p. : il.

Orientador: Ludwig H. Pfenning  
Dissertação (Mestrado) – UFLA.  
Bibliografia.

1. Manga. 2. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.44

**JEAN HERLLINGTON ARAÚJO MONTEIRO**

**GRUPOS DE COMPATIBILIDADE VEGETATIVA EM ISOLADOS DE  
*Fusarium* ASSOCIADOS À MALFORMAÇÃO DA MANGUEIRA NO  
BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 23 de fevereiro de 2006

Prof. PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende	UFLA
Prof. Dr. Mario Sobral de Abreu	UFLA
Prof. PhD. Marcos Paz Saraiva Câmara	UFRPE

Prof. PhD. Ludwig Heinrich Pfenning  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus que sempre me conduziu e me capacitou,

À minha mãe Elena Araújo Monteiro  
Ao meu pai Sebastião Monteiro da Silva

Aos meus irmãos Paulo Henrique e Pablo Prince

**Dedico**

À minha noiva Aderlange Sousa Araújo  
pelo carinho e apoio

**Ofereço**

## **Agradecimentos**

A Universidade Federal de Lavras – UFLA, por meio do Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo

Ao Prof. PhD Ludwig Heinrich Pfenning pela valiosa orientação e constante apoio e amizade.

Aos membros da banca examinadora: Prof. PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende pela confiança, Dr. Mario Sobral de Abreu e Prof. PhD. Marcos Paz Saraiva Câmara pelas valiosas sugestões.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos e experiências, muito importante na minha vida profissional.

A profa. da Graduação Maria Nenmaura Gomes Pessoa, pelos ensinamentos, amizade e incentivo a iniciação científica.

Ao amigo Dr. Cristiano Souza Lima por ser o indicador do meu trabalho em Fitopatologia e pelo incentivo, confiança e valiosas sugestões.

Aos meus colegas do departamento, em especial do Laboratório de Sistemática e Ecologia dos Fungos, pela amizade, companheirismos e boa convivência.

Ao amigo e técnico do laboratório: Edinho que sempre auxiliou na realização do experimento.

As amigas Natália e Sarah que contribuíram muito para a realização do trabalho.

Aos integrantes da república nordestina, Helena, Keline, Niná, Cleilson, César, Livia e Tessiê, pela valiosa amizade e convivência harmoniosa.

A minha turma de mestrado: Helena, Nina, Amanda, Edson, Elida, Juliana, Luciana, Marcella, Dagma, Flávio e Fernanda, pelos momentos de estudos e diversões.

Ao Núcleo de Estudos em Fitopatologia – NIFIT.

Aos amigos do Laboratório de Micologia e Patologia de Sementes – LAMPS / UFC: Robson, Carmem, Márcia Marques, Verônica, Jucilene, Macia Haydeé e Delan.

Aos grandes amigos do curso de Agronomia / UFC: Helena, Keline, Câmara, Karina, Marcos Meireles, Társio, André Luiz, Luiz Eduardo e etc.

A todos que tiveram presentes de alguma forma para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

JEAN HERLLINGTON ARAÚJO MONTEIRO .....	1
JEAN HERLLINGTON ARAÚJO MONTEIRO .....	2
RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Importância da cultura da mangueira .....	3
2.2 A malformação floral e vegetativa .....	5
2.3 Etiologia .....	6
2.4 Compatibilidade vegetativa .....	8
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	14
3.1 Local da realização do trabalho .....	14
3.2 Isolados de <i>Fusarium</i> .....	14
3.3 Obtenção de culturas monospóricas .....	14
3.4 Obtenção de mutantes <i>nit</i> .....	14
3.5 Classificação fenotípica dos mutantes <i>nit</i> .....	15
3.6 Preservação dos mutantes <i>nit</i> .....	16
3.6.1 Preservação em tubo de 1,5 mL .....	16
3.6.2 Preservação pelo método Castellani .....	16
3.7 Testes de compatibilidade vegetativa .....	17
3.7.1 Testes de compatibilidade vegetativa em placas de 24 poços .....	17
3.7.1.1 Preparo da suspensão dos mutantes <i>nit</i> .....	17
3.7.1.2 Arranjo dos testes feito em placas de 24 poços .....	17
3.7.1.3 Transferência para placas de 24 poços .....	18
3.7.1.4 Verificação dos resultados dos testes feitos em placas de 24 poços .....	18
3.7.2 Pareamento em placas de poliestireno .....	19
3.8 Determinação da estabilidade do heterocário .....	20
4 RESULTADOS .....	21
4.1 Obtenção de mutantes <i>nit</i> .....	21
4.2 Classificação fenotípica dos mutantes <i>nit</i> .....	21
4.3 Grupos de compatibilidade vegetativa (VCG) .....	25
5 DISCUSSÃO .....	29
6 CONCLUSÕES .....	35
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	36

CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	42
ANEXOS .....	43

## RESUMO

MONTEIRO, Jean Herllington Araújo. **Grupos de compatibilidade vegetativa em isolados de *Fusarium* associados à malformação da mangueira no Brasil.** 2006. 42 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.\*

A manga é apreciada em vários países, sendo o Brasil o Segundo exportador desta fruta. Entretanto, sua produção é afetada por várias doenças que possivelmente com maior importância econômica nas regiões áridas, as quais, no Brasil, as mangueiras são cultivadas na maior parte para exportação. Os agentes etiológicos da malformação são apontados como espécies de *Fusarium*. Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a variabilidade genética em espécies de *Fusarium* associadas à malformação da mangueira, pela utilização da técnica de compatibilidade vegetativa. Cinquenta e um isolados de *Fusarium* depositados na Coleção Micológica de Lavras (CML) do Departamento de Fitopatologia-UFLA foram utilizados na geração de mutantes *nit*. Os isolados foram transferidos inicialmente para meio mínimo (MM) + clorato de potássio para a indução de mutantes *nit*. Posteriormente os mutantes *nit* foram classificados em *nit* 1, *nit* 3 e *nit* M. Nos testes de complementariedade foram obtidos 16 grupos de compatibilidade vegetativa (VCG). Os isolados identificados como *Fusarium sterilihyphosum* foram agrupados no VCG 4 e VCG 5, enquanto que os isolados de *F. mangiferae* foram agrupados no VCG 1 e VCG 2. Por outro lado, os isolados de *Fusarium* sp. do Brasil agruparam no VCG 6, 11, 13, 14, 15 e 16. O grande número de VCGs obtidos em *Fusarium* sp. do Brasil mostra que esta espécie possui maior variabilidade genética do que *F. sterilihyphosum* e *F. mangiferae*. Nenhum dos isolados de *Fusarium* sp. do Brasil agruparam nos VCG's de *F. sterilihyphosum* e *F. mangiferae*. Neste estudo foi observado também alguma correlação entre VCGs e localização geográfica.

---

\*Comitê Orientador: Ludwig H. Pfenning (Orientador) e Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Co-orientador)

## ABSTRACT

MONTEIRO, Jean Herllington Araújo. **Compatibility vegetative groups in *Fusarium* isolates associated with mango malformation in Brasil.** 2006. 42 p. Dissertation (Master in Plant Pathology) – Federal University of Lavras, Lavras.\*

Mango is appreciated in many countries, being Brazil the second exporter of this fruit. However, its production is affected by many diseases occurring mainly in arid regions, where in Brazil the mango tree is cultivated exclusively for exportation. The etiologic agents of malformation are appointed as *Fusarium* species. Our objective in this study was to assess the genetic variability of *Fusarium* species associated with mango malformation, by using vegetative compatibility technique. Fifty one *Fusarium* isolates deposited in the Mycological Collection of Lavras (CML) of Plant Pathology Department-UFLA were used to generate *nit* mutants. The isolates were initially transferred to minimal medium (MM) + potassium chlorate for induction of *nit* mutants. Then, were submitted to phenotypic classification as *nit* 1, *nit* 3 and *nit* M. In the complementation tests 16 vegetative compatibility groups (VCG) were obtained. Isolates identified as *Fusarium sterilihyphosum* grouped in VCG 4 and VCG 5, while isolates of *F. mangiferae* grouped in VCG 1 and VCG 2. By other hand, isolates of *Fusarium* sp. from Brazil grouped in VCG 6, 11, 13, 14, 15 and 16. The high number of VCG's obtained in *Fusarium* sp. from Brazil shows that this species has more genetic variability than *F. sterilihyphosum* and *F. mangiferae*. None of the isolates of *Fusarium* sp. from Brazil grouped in *F. sterilihyphosum* and *F. mangiferae* VCG's. It was also observed some correlation between VCG's and geographical localization in this study.

---

\*Advising Committee: Ludwig H. Pfenning (Adviser) e Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Co-adviser)

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A malformação floral e vegetativa da mangueira (*Mangifera indica* L.), conhecida também como “embonecamento” quando se manifesta nas inflorescências, é uma doença que causa sérios problemas aos produtores de manga, pois as inflorescências atingidas não produzem ou abortam precocemente os frutos. O sintoma característico da malformação floral é a redução no comprimento do eixo primário e a formação de ramificações secundárias da panícula, o que confere à inflorescência um aspecto compacto (Cunha et al., 2000). Estudos recentes mostraram pelo menos duas espécies distintas de *Fusarium* spp. associados com sintomas de malformação de mangueiras, isto é *F. mangiferae* Britz, Wingfield & Marasas e *F. sterilihyphosum* Britz, Marasas & Wingfield. (Britz et al., 2002). Um terceiro *taxon* também foi identificado no Brasil e está sendo descrito (Lima et al, 2005).

Recentemente, várias técnicas analíticas envolvendo fisiologia e compatibilidade vegetativa tem sido utilizada para estudar a taxonomia, filogenia e as relações patogênicas entre espécies de *Fusarium* (Rosalee et al., 1999). A compatibilidade vegetativa é considerada um recurso para gerar variabilidade genética dentro de populações de fungos assexuados e consiste na anastomose de hifas que apresentam alelos homólogos em seus *loci vic*, o que resulta na formação de heterocário estável. As anastomoses de hifas são importantes por permitirem comunicações entre os compartimentos das hifas e na homeostase. Podem ocorrer fusões de hifas entre indivíduos diferentes formando assim um heterocário, onde núcleos geneticamente distintos coexistem em um citoplasma comum (Glass et al., 2000). A identificação de grupos de compatibilidade vegetativa (VCG's) dentro de uma população

morfologicamente homogênea permite identificar sub-populações geneticamente isolados com possíveis características agronômicas distintas, como patogenicidade ou origem geográfica (Leslie, 1993). No Brasil, não existem trabalhos sobre VCG's nestas espécies de *Fusarium*.

Este trabalho objetivou identificar grupos de compatibilidade vegetativa em isolados de *Fusarium* associados à malformação da manga obtidos de diferentes regiões do Brasil.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Importância da cultura da mangueira

A mangueira (*M. indica* L.) é uma árvore frutífera cultivada comercialmente em muitas áreas tropicais e subtropicais do mundo (Kumar et al., 1993; Ploetz, 1994). Em função do seu amplo consumo nos países asiáticos e da América Latina, a manga pode ser considerada uma das frutas mais populares do mundo. A produção de manga no Brasil apresenta grande potencial de crescimento para exportação e mercado interno, alcançando preços compensadores, e com uma produção que atingiu 969 mil toneladas no ano de 2000 (Anuário da Agricultura Brasileira, 2002). Em 2001, a manga liderou o *ranking* do faturamento entre as frutas frescas brasileiras exportadas (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2002). O faturamento foi de US\$ 50,8 milhões correspondendo a 94,3 mil toneladas da fruta. Esse valor é 42% maior em relação a 2000 (Secretaria de Comércio Exterior, 2002). As exportações em 2002 atingiram US\$ 50 milhões e 103 mil toneladas (Instituto Brasileiro de Frutas, 2003), conferindo à fruta o primeiro lugar entre as exportadas em valor e o segundo em peso. A expansão dos mercados internos e externos, com a abertura de novos mercados como o Japão, é apontada como as principais razões desse crescimento (Cunha et al., 2000). No ano de 2004, a produção de manga foi muito afetada com problemas climáticos, entretanto, no ano de 2005 retornou o seu crescimento e deve contribuir para mais um ano de crescimento das exportações brasileiras de frutas frescas. No comparativo do primeiro semestre de 2005 em relação a 2004, as exportações de manga já apontam um crescimento de 100% em valor e 85% em volume, saltando de 9 para 18 milhões de dólares e de 14,8 para 27,6 mil toneladas (Informativo IBRAF, 2005).

Os cultivos tradicionais da manga no Brasil eram feitos em moldes extensivos, sendo comum o plantio em áreas esparsas, nos quintais e fundos de

pequenas propriedades, formando bosques subespontâneos, e tradicionalmente cultivados nas diversas localidades. No Brasil, ainda predominam as variedades locais do tipo "Bourbon", "Rosa", "Espada", "Coqueiro", "Ouro", entre várias outras, entretanto, nos últimos anos, esse quadro está mudando com a implantação de grandes áreas com novas variedades de manga de comprovada aceitação no mercado externo (Barbosa et al., 2000). Nos últimos anos ocorreu uma expansão bem significativa, principalmente no estado de São Paulo, de onde foram difundidas as novas variedades de manga para o restante do país, e nos pólos de agricultura irrigada do Nordeste. Nesta região, a incorporação de plantios tecnificados, principalmente no Vale do São Francisco, que abrange os estados de Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Alagoas e Sergipe, e em outras áreas irrigadas como as dos Vales do Jaguaribe, Açu-Mossoró e Parnaíba situadas nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Piauí, respectivamente. Portanto, é na região semi-árida nordestina onde foram implementados vários empreendimentos, com plantios comerciais de variedades demandadas pelo mercado externo (Companhia de Desenvolvimento do Vale do Rio Doce, 2001). Em todas essas áreas, o cultivo da manga chamada "tipo exportação" encontra-se em fase de franca expansão, tendo como base as cultivares "Tommy Atkins" e "Haden", entre outras. No Brasil, as perspectivas da cultura são evidenciadas pela ampliação da área cultivada e o um significativo aumento da produtividade, principalmente em áreas irrigadas, possibilitando maior rendimento por área em relação aos cultivos tradicionais (Donadio et al., 1996). Sabe-se hoje que a alta qualidade dos frutos produzidos, livres de pragas, doenças e distúrbios fisiológicos, garante o grande potencial de conquistar novos mercados. Entretanto, existem exigências específicas da parte dos países importadores de frutas frescas que devem, necessariamente, ser atendidas. Em primeiro lugar, rigorosas restrições são impostas à entrada de frutas portadoras de organismos

exóticos, que possam representar risco para a agricultura do país importador (Filgueiras, 2000).

Vários problemas com o cultivo de manga são apontados, entretanto, os mais sérios são as doenças que afetam raízes, folhas, inflorescências, ramos e frutos em diferentes etapas do seu desenvolvimento. De maneira geral, as de maior importância são causadas por fungos e bactérias durante o florescimento e a frutificação. As indústrias da manga de muitos países são ameaçadas principalmente por doenças fúngicas (Kumar et al., 1993). As principais doenças ocasionadas na cultura da mangueira são a Antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Corda), Oídio (*Oidium mangiferae* Sacc.), Seca da mangueira (*Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst.), Morte-descendente-da-mangueira (*Botryodiplodia theobromae* Sacc.), Verrugose (*Elsinoe mangiferae* Racib.), Mancha-angular (*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferae indicae*) e Malformação vegetativa e floral (*Fusarium mangiferae* e *Fusarium sterilihyphosum*) (Cunha et al., 2000).

## **2.2 A malformação floral e vegetativa**

Uma das doenças mais preocupantes da cultura da mangueira é a malformação, causando deformações nos tecidos vegetativos e florais. É um sério problema, pois afeta diretamente a produção. Estudos genéticos realizados na Índia mostraram que a resistência a essa doença é conferida por um gene recessivo, não havendo cultivares de mangueira totalmente resistentes (Varma et al., 1974). A incidência desta fitomoléstia tem levado à erradicação de pomares, principalmente de cultivares “Tommy Atkins” nos principais pólos produtores de manga do Brasil e do mundo (Cunha et al., 2000). As primeiras citações da malformação da inflorescência foram feitas por Watt em 1891 e por Burns em 1910, citado por Piza et al. (1987), sendo que Nirvan (1953) foi quem descreveu pela primeira vez essa anomalia denominando-a de “bunchy top”.

Inflorescências afetadas ficam estéreis ou abortam os frutos precocemente. O sintoma proeminente desta doença é o encurtamento do ramo principal e ramos secundários da panícula. A malformação floral é caracterizada pelo adensamento da inflorescência, apresentando formato compacto conhecido também por “embonecamento” e a transformação da gema floral em vegetativa e sobrevém um grande número de pequenas folhas e ramos. As mudas e plantas afetadas por esta anomalia têm o seu crescimento retardado (Albuquerque & Mouco, 2000). Depois do período de florescimento, as panículas malformadas murcham e tornam-se massas negras nas árvores persistindo, freqüentemente, até o ano seguinte. As inflorescências malformadas nunca frutificam havendo, inclusive, uma sensível alteração de sexo das flores com as hermafroditas tornando-se estaminadas (Piza et al., 1987). Na malformação vegetativa ocorre a produção de um grande número de brotos vegetativos originados das gemas axilares dos ramos principais, que por sua vez também se ramificam bastante, face à perda da dominância apical apresentada pelo conjunto, formando uma estrutura compacta na parte terminal do ramo. Esses brotos apresentam internódios curtos, folhas rudimentares e grande número de gemas intumescidas, que não chegam a brotar, o que lhes confere a aparência de uma vassoura-de-bruxa. Pode ocorrer em mudas no viveiro e ser disseminada com a movimentação do germoplasma. Igualmente, árvores maduras podem ser infectadas de forma latente, mostrando-se naturalmente saudáveis, porém com a propagação de material infectado são responsáveis pela disseminação do patógeno (Kumar et al., 1993; Ploetz, 1993, 2001; Varma et al., 1974).

### **2.3 Etiologia**

A etiologia da malformação já é objeto de discussão há mais de cem anos desde a primeira constatação e foi inicialmente relacionada a fatores bióticos e abióticos como viroses, deficiências nutricionais, distúrbios

fisiológicos e ácaros (Kumar et al., 1993; Ploetz, 2001). Na seqüência, levantou-se a hipótese de que o agente causal da malformação era um fungo. Na Índia, na década de sessenta, foram completados os postulados de Koch para *Fusarium subglutinans* (Wollew & Reinking) Nelson et al., 1983 (= *F. moniliforme* var. *subglutinans*) (Summanwar et al., 1966; Varma et al., 1974). O uso de isolados de *Fusarium subglutinans* transformados com o plasmídeo pGPD-GUS e marcados com *b-glucuronidase* (GUS) possibilitou a visualização do fungo no tecido da planta e a confirmação do agente etiológico da doença (Freeman et al., 1999). Recentemente, isolados provenientes de mangueiras com sintomas de malformação na África do Sul foram descritos como *Fusarium mangiferae* com base em estudos de morfologia, *mating populations*, VCG's e seqüenciamento de fragmentos dos genes da *histona H3* e *b-tubulina* (Britz et al., 2002; Steenkamp et al., 1999, 2000).

A taxonomia do grupo *Fusarium subglutinans* sensu lato sofreu mudanças desde a publicação da monografia de Nelson et al. (1983). Estudos recentes de populações envolvendo biologia molecular, *mating populations* e VCG's evidenciaram que *F. subglutinans sensu lato* representa um complexo de espécies (Britz et al., 1999, 2002; Leslie, 1991, 1995; O'Donnell et al., 1998; Steenkamp et al., 2000). Por estes critérios foram descritos seis *taxa* oriundos de *F. subglutinans sensu lato*: *Gibberella sacchari* (anamorfo *Fusarium sacchari*), patógeno da cana-de-açúcar; *G. subglutinans* (anamorfo *F. subglutinans*), patógeno do milho e *G. circinata* (anamorfo *F. circinatum*), patógeno do pinheiro, e ainda três espécies com fase teleomorfa desconhecida, *F. guttiforme*, patógeno do abacaxi, *F. mangiferae* patógeno da mangueira e *F. sterilihyphosum*, espécie associada à malformação floral e vegetativa de mangueiras na África do Sul. Este último possivelmente também agente etiológico da doença (Britz et al., 2002; O'Donnell et al., 1998; Steenkamp et al., 2000). A presença de fungos do gênero *Fusarium* no interior dos tecidos da

mangueira induz a algumas transformações bioquímicas nas plantas, atuando sobre a formação de auxinas e no transporte de citocininas, substâncias promotoras de crescimento. Essas substâncias, quando imobilizadas, têm papel importante na malformação de ramos e panículas (Chakrabarti & Ghosal, 1985; Varma et al., 1974).

#### **2.4 Compatibilidade vegetativa**

A compatibilidade vegetativa é considerada um recurso para gerar variabilidade genética dentro de populações de fungos assexuados, visto que, a heterocariose formada entre isolados geneticamente distintos permite o contato de núcleos para que haja recombinação mitótica. Quando dois isolados de fungos são vegetativamente compatíveis suas hifas podem fazer contato, fusão e formação de heterocariose. Esse fenômeno consiste no estabelecimento, em uma mesma hifa, de núcleos geneticamente diferentes (Leslie, 1990). O fenômeno da heterocariose é um recurso utilizado por espécies fúngicas anamórficas para desfrutar dos benefícios das espécies teleomórficas por meio da complementação, podendo ser completamente estável e persistir por um período indefinido. É um importante componente do ciclo de vida dos fungos anamórficos e serve como princípio para o ciclo parassexual e para transmissão de fatores de hipovirulência, tais como RNA's de fita dupla, diferindo assim os componentes de virulência ou gama de hospedeiros (Leslie, 1993). É por meio da identificação de grupos de compatibilidade vegetativa (VCG's) dentro de uma população morfológicamente homogênea que se torna possível a definição de sub-populações geneticamente isoladas com características agrônômicas distintas, como patogenicidade (Leslie, 1993). A distinção de VCG's reflete também a distribuição geográfica de populações do patógeno e a capacidade de troca de material genético intra-específica entre indivíduos (Correll, 1991). A compatibilidade vegetativa é mediada por múltiplos loci de incompatibilidade

que são os genes *vic* e *het*, locais onde não é possível a formação dos heterocários estáveis. Isolados que compartilham os mesmos alelos de *vic* pertencem ao mesmo grupo de compatibilidade vegetativa (VCG). Na maioria dos fungos, o sistema de compatibilidade vegetativa é independente do sistema de cruzamento sexual ou *mating populations* (Leslie, 1993). A anastomose de hifas é medida em três estágios fisiológicos que são o pré-contato, pós-contato e pós-fusão (Glass, 1992). As hifas nas regiões periféricas das colônias exibem autotropismo negativo, ou seja, repulsão, a qual mantém distanciadadas hifas em crescimento (Prosser, 1994). Atrás das margens das colônias em crescimento, as hifas exibem autotropismo positivo ou atração das hifas, ocorrendo anastomose (McCabe et al., 1999). O início do pré-contato das pontas novas das hifas é denominado de grampo e o re-direcionamento do crescimento da hifa é provavelmente devido a uma difusão de sinais químicos. As pontas das hifas param o crescimento após o contato físico, antes da fusão de hifas. Para que ocorra fusão, inicialmente ocorre a degradação da parede celular pelas enzimas hidrolíticas no ponto de contato e, posteriormente, a formação de uma ponte de parede celular entre duas hifas envolvidas e a liberação de material da parede celular nesta área (Glass, 1992). Os eventos pós-contato de fusão das hifas envolvem a fusão da membrana plasmática e a mistura dos citoplasmas (Jacobson et al., 1998). Uma vez formado o heterocário, sua estabilidade é governada por uma série de loci *vic*. Esta estabilidade será maior se a identidade alélica dentro do conjunto desses loci for maior (Leslie, 1995). A relação de compatibilidade vegetativa alélica foi descrita em diferentes fungos como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cryphonectria* e *Neurospora*. Em *Fusarium moniliforme* há evidência de segregação nos loci *vic* e pelo menos 10 alelos são esperados para o locus *vic*. Para estar em um mesmo VCG dois loci precisam ser idênticos para cada um dos 10 alelos

, pois se houver diferença em um único locus será o suficiente para bloquear a formação de heterocário estável (Liu & Sundheim, 1996). Puhalla (1985) modificou o método desenvolvido por Cove (1976) para demonstração de heterocariose entre isolados compatíveis de *Fusarium oxysporum*, utilizando mutantes que não utilizavam nitrato. Estes estudos demonstraram que pode haver uma correlação entre compatibilidade vegetativa e *formae speciales*. Entretanto, em um trabalho posterior, foi constatado, relações mais complexas entre *formae speciales*, raça e VCG neste fungo. Pois, dentro de uma *formae speciales* mais raças podiam ocorrer em um mesmo VCG e isolados de uma raça podiam pertencer a vários VCG's (Baayen et al., 2000).

São empregadas três técnicas para os estudos da compatibilidade vegetativa: produção de mutantes *nit*, barreiras e coloração de hifas, sendo a principal técnica para a determinação de VCG's a produção de mutantes *nit*, ou seja, mutantes que não têm a capacidade de utilizar o nitrato do meio. Estes mutantes *nit* podem ser recuperados de setores da colônia resistente ao clorato de potássio (KClO<sub>3</sub>) com uma frequência relativamente alta (Puhalla, 1985). Mutantes *nit* não são capazes de assimilar o nitrato do meio, apresentando assim crescimento ralo e só apresentam crescimento robusto quando ocorre complementação com outro isolado mutante do mesmo VCG e passando assim, a utilizar o nitrato (Correll, 1987). Três classes designam os fenótipos mutantes que se baseiam em mutações na via de assimilação do nitrato. As mutações podem ocorrer no locus estrutural de nitrato redutase (*nit 1*), no locus estrutural específico da via metabólica de assimilação do nitrato (*nit 3*) ou no locus que afeta as vias de acesso do co-fator enzimático que contém o molibidênio, necessário à atividade da nitrato redutase e da dehidrogenase purínica (*nit M*) (Leslie, 1993). Estas classes fenotípicas correspondem às mesmas encontradas para *Fusarium oxysporum* e *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*) (Correll, et al., 1987). A redução do nitrato na via metabólica de *Fusarium*

requer duas enzimas para reduzi-lo a amônia: a nitrato redutase que converte nitrato a nitrito e a nitrito redutase que catalisa a redução do nitrito a amônia (Leslie, 1993). Numerosos genes controlam as enzimas, nitrato redutase e nitrito redutase e o processo de assimilação e redução do nitrato é complexo, requerendo vários genes também para a síntese de um cofator contendo molibidênio, que faz parte do complexo nitrato redutase. Em *Fusarium oxysporum* e *Fusarium moniliforme* há o aparecimento de setores que são resistentes ao clorato, mas que não tem a capacidade de assimilar o nitrogênio em um meio que possua nitrato como única fonte de nitrogênio. Estes mutantes não são usados nos testes de VCG's e, portanto são descartados. A complementação entre diferentes mutantes *nit* é identificada pelo desenvolvimento de um denso micélio aéreo no local de contato indicando que houve anastomose e formação do heterocário. A complementaridade entre dois mutantes difere na velocidade em que ocorre e no vigor da formação do heterocário.

Para isolados de *Fusarium oxysporum*, no pareamento entre mutantes *nit* M e *nit* 1 ou *nit* M e *nit* 3 a formação do heterocário é mais rápida do que no pareamento entre *nit* 1 e *nit* 3, o qual pode levar de 2 a 3 semanas para haver a complementação. Quando um heterocário é formado entre linhagens auxotróficas e ocorre como resultado a complementação, ou seja, a formação de um heterocário protótipo, estas linhagens serão consideradas como sendo de um mesmo VCG (Leslie, 1993). Existe, porém, um mecanismo genético que restringe a formação do heterocário entre indivíduos geneticamente diferentes, este mecanismo é denominado de incompatibilidade vegetativa, que reduz os riscos da transmissão de genótipos agressivos (Debets, 1998). A incompatibilidade vegetativa acontece em heterocário entre indivíduos que diferem em um ou mais loci *het* (incompatibilidade de heterocário). Uma única

diferença alélica ou não alélica em algum *het* é suficiente para a inibição do crescimento, compartimentalização de hifas e morte.

Experimentos de compatibilidade vegetativa promovem informações sobre diversidade genética das espécies fúngicas, e foram bastante utilizados em estudos dos isolados de *F. oxysporum*, possibilitando a distinção de VCGs (Elmer & Stephens, 1989; Jacobsen & Gordon, 1988; Katan & Katan, 1988; Leslie, 1993; Ploetz, 1988). Recentemente, várias técnicas analíticas envolvendo fisiologia e compatibilidade vegetativa têm sido utilizadas para estudar a taxonomia, filogenia e as relações patogênicas entre espécies de *Fusarium*. Em genética, os testes de compatibilidade vegetativa são bastante úteis para a caracterização da diversidade entre isolados fúngicos, permitindo a diferenciação entre populações patogênicas e não-patogênicas (Rosalee et al., 1999).

Em estudos recentes da malformação da manga na África Sul foram analisados 18 espécimes de *F. subglutinans* isolados consistentemente das árvores de manga doentes, procedentes de Israel, Estados Unidos e África do Sul. Os isolados de *F. subglutinans* foram agrupados em quatro VCG distintos. Os dois isolados de Israel no VCG 1, os isolados dos Estados Unidos estavam também em um único grupo VCG 2. No entanto, os isolados da África do Sul foram agrupados em dois VCG distintos (Steenkamp et al., 2000).

Recentemente nos Estados Unidos foram feitos estudos da diversidade genética de 74 isolados de *F. subglutinans sensu lato* de mangueira malformada procedentes do Brasil, Egito, Flórida (EUA), Índia, Israel e África do Sul. Usando mutantes auxotróficos não utilizadores de nitrato (*nit*) foram identificados sete grupos de compatibilidade vegetativos (VCG's). A maior diversidade de VCG's ocorreu no Egito e nos EUA onde foram encontrados quatro e três VCG's diferentes, respectivamente. Isolados do Egito foram agrupados no mesmo VCG da Índia, indicando que os mesmos são originados da

Índia. Entretanto, existe grande especulação sobre os isolados da África do Sul e Israel que foram agrupados no mesmo VCG dos isolados dos Estados Unidos. Na Flórida foram realizadas pesquisas com cultivares de mangueira procedentes da Índia, confirmando que os isolados dos quatro países são da mesma espécie de '*F. subglutinans*' e a doença poderia ser originária da Índia. Neste estudo foram usados dois isolados oriundos do Vale do São Francisco (Petrolina-PE/Juazeiro-BA) maior pólo produtor de manga do Brasil, foram agrupados num grupo distinto (VCG 7), separados dos outros VCG's (Zheng & Ploetz, 2002). A pequena quantidade de isolados estudados oriundos de uma única localidade não é suficiente para se tirar qualquer conclusão sobre a ocorrência de VCG's no Brasil. Para gerar informações consistentes a este respeito, faz-se necessário o estudo do fenômeno da compatibilidade vegetativa utilizando o maior número de isolados possíveis de diversas áreas geográficas do país.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Local da realização do trabalho**

O estudo foi conduzido no Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos do Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Minas Gerais, no período de janeiro a dezembro de 2005.

### **3.2 Isolados de *Fusarium***

Foram utilizados 51 isolados de *Fusarium* associados à malformação floral e vegetativa da manga disponíveis na Coleção Micológica de Lavras – CML, obtidos de várias regiões geográficas do Brasil e de outros países. Os isolados utilizados no experimento estão representados na Tabela 1.

### **3.3 Obtenção de culturas monospóricas**

Culturas de cada isolado foram manipuladas em microscópio devidamente adaptado. No condensador do microscópio foi acoplada uma agulha de vidro com ponta extremamente fina. Foi colocado em uma das extremidades de uma lâmina de vidro com borda laterais adaptadas um fragmento de ágar contendo conídios, na outra extremidade fragmentos de ágar estéril. A lâmina foi levada ao microscópio de cabeça para baixo e com movimento da agulha para baixo e para cima retirava-se um único conídio o qual era transferido para um dos fragmentos de ágar estéril. Cada fragmento foi transferido para uma placa de Petri contendo SNA.

### **3.4 Obtenção de mutantes *nit***

Os isolados de *Fusarium* foram transferidos para placas de Petri contendo meio mínimo modificado (MM) e incubados por um período de 7 dias a 23 °C. Blocos de micélios (1-2 mm<sup>3</sup>) foram retirados das margens das colônias

e transferidos para placas contendo meio mínimo modificado e clorato de potássio (MMC), na concentração de 1,5 a 2,5%, para a indução de mutantes os quais se manifestam através de setores na colônia (Correll, 1986; Puhalla, 1985). Além do clorato de potássio foram adicionados ao meio dois aminoácidos, L-asparagina e L-treonina. Nos primeiros testes, adicionou-se 1,6 g/L de L-asparagina, posteriormente substituída por L-treonina, na proporção de 1,4 g/L de MM (Klittich & Leslie, 1988). Neste ensaio foram usadas 10 placas de Petri (90 x 15 mm) por isolado. Nas margens de cada placa foram colocados três blocos de micélios, em arranjo triangular, e as placas foram mantidas a temperatura 25 °C. No total, foram distribuídos 30 blocos de micélio por isolado. Após essa etapa, foram reservados 14 a 21 dias para a verificação da formação dos setores. Com a constatação da formação dos mesmos, foi retirado, um único setor de cada bloco de micélio, e transferido para placas contendo meio MM. Os isolados que tiveram crescimento ralo em MM foram classificados como mutantes *nit*. Isolados que apresentavam crescimento robusto após o tratamento foram descartados (Leslie, 1993).

### **3.5 Classificação fenotípica dos mutantes *nit***

Este ensaio foi realizado em placas de plástico (90 x 15 mm) contendo dois meios distintos, que apresentam diferentes fontes de nitrogênio: nitrito de sódio (0,4 g/L) e hipoxantina (0,5g/L) (Correll et al., 1987). Cada mutante *nit* foi transferido para duas placas de poliestereno de 90 mm de diâmetro, uma contendo nitrito de sódio e outra apenas hipoxantina, dispostos em um arranjo de 12 blocos (1 mm<sup>3</sup>) de micélio por placa. Em cada placa foram marcadas 4 linhas de pontos com o mesmo espaçamento no verso das mesmas. Todas as linhas continham 3 pontos. Os três pontos superiores foram utilizados para *nit* 1, *nit* 3 e *nit* M, usados como testemunhas. Os nove pontos seguintes foram inoculados com blocos de micélio dos nit que precisavam ter o fenótipo identificado. As

placas foram então mantidas a 25 °C por um período de 3-4 dias (Leslie, 2006). Três classes designam os fenótipos dos mutantes *nit* em *Fusarium*, as quais se baseiam na mutação na rota de assimilação do nitrogênio. Os *nit* que apresentaram crescimento robusto no nitrato de sódio e na hipoxantina foram denominados *nit* 1, os mutantes que apresentaram crescimento robusto somente na hipoxantina foram denominados *nit* 3 e os mutantes que apresentaram crescimento robusto apenas no nitrato de sódio foram denominados *nit* M (Correll et al., 1987).

### **3.6 Preservação dos mutantes *nit***

Após a classificação dos mutantes *nit*, foram selecionados dois *nit* de cada classe fenotípica (*nit* 1 e *nit* M). Porém, quando no processo de obtenção dos mutantes não era possível obter um *nit* M, eram preservados dois *nit* 3. Os mutantes foram preservados em tubos de 1,5 mL e pelo método de Castellani.

#### **3.6.1 Preservação em tubo de 1,5 mL**

Cada mutante foi preservado em tubo de 1,5 mL e incubado a temperatura de 10 °C. Em cada tubo foram colocados dois blocos de aproximadamente 3 mm<sup>3</sup>. Foram feitas duas repetições para cada *nit* classificado fenotipicamente. Estes foram usados na etapa seguinte, nos testes de compatibilidade vegetativa.

#### **3.6.2 Preservação pelo método Castellani**

Foram colocados cinco blocos (1 mm<sup>3</sup>) de micélio dos mutante *nit* em frascos de penicilina estéreis contendo um volume de água destilada e estéril de aproximadamente metade da capacidade do recipiente e fechados hermeticamente com tampa metálica e depois estocados a temperatura ambiente (Castellani, 1939, 1967). Estes *nit* serão usados em trabalhos futuros.

### **3.7 Testes de compatibilidade vegetativa**

Os testes de compatibilidade vegetativa foram realizados de acordo com a metodologia de Leslie (1993). Todos os pareamentos foram feitos em placas de 24 poços e posteriormente confirmados em placas de poliestireno de 60 mm de diâmetro. O meio empregado foi MM tendo  $\text{NO}_3$  como única fonte de nitrogênio. Mutantes *nit* cresceram finamente nesse meio, a menos que forme heterocário com outro mutante.

#### **3.7.1 Testes de compatibilidade vegetativa em placas de 24 poços**

O ensaio é feito em placas de poliestireno e subdivididas em 24 poços. São adicionado em cada poço cerca de 1,7 mL de meio MM e inoculadas com gotas das suspensões dos mutantes *nit* das espécie de *Fusarium* testado (Leslie et al., 2006).

##### **3.7.1.1 Preparo da suspensão dos mutantes *nit***

Cada mutante *nit* foi transferido para um tubo 100 x 75 mm com aproximadamente 1/3 do seu volume preenchido por meio completo (BDA) e mantidos por período de sete dias. Após esse período, cada tubo foi levado para câmara de fluxo laminar e adicionado em cada tubo, cerca de 1,5 mL da solução 2,5%, (v/v) de Tween 60<sup>®</sup> em água destilada para se obter uma suspensão de esporos. Com auxílio de pipetas de Pasteur estéreis, friccionou-se a superfície de cada colônia. Em seguida, os tubos foram agitados até homogeneizar a suspensões dos mutantes *nit*.

##### **3.7.1.2 Arranjo dos testes feito em placas de 24 poços**

Os mutantes foram arranjados como numa grade, com mutantes *nit* 1 ao longo de um eixo e os mutantes *nit* M ou *nit* 3 no outro eixo. Sendo assim, o

número de pareamentos a serem realizados será o quadrado do número de isolados do tipo selvagem dos quais os mutantes *nit* foram gerados, mais 1 controle para cada mutante no qual a placa de 24 poços contenha um único mutante (para identificar os mutantes que reverteram ao tipo selvagem). O arranjo em grade resulta em um controle positivo para isolado tipo selvagem, e para dois testes, entre diferentes mutantes para cada par de isolados do tipo selvagem. Os testes feitos em placas de 24 poços foram repetidos em placas de poliestireno pelo método do pareamento dos mutantes *nit* (60 x 15 mm).

#### **3.7.1.3 Transferência para placas de 24 poços**

Usualmente com auxílio de uma peseta de pico fino foram adicionados 1,7 mL de meio MM em cada poço e em seguida feitos os registros dos testes de compatibilidade vegetativa, depois mantida em local asséptico a temperatura ambiente por período de dois dias. Posteriormente, as placas foram levadas para capelas assépticas para serem usadas nos testes de VCG. Em seguida foi preparada cada suspensão dos mutantes *nit* mencionadas no item anterior. Com pipetas de Pasteur, retirou-se quantidades suficiente das suspensões dos mutantes *nit* e transferidas para placas de 24 poços colocando-se apenas uma gota de *nit* 1 e outra de *nit* M ou *nit* 3 nos poços das placas já registradas antes. Após a inoculação, as placas foram deixadas em repouso, para que as gotas das suspensões de esporos fossem absorvidas, antes de serem levadas para a transferência mantida a 25 °C.

#### **3.7.1.4 Verificação dos resultados dos testes feitos em placas de 24 poços**

Após o período de três dias foram iniciadas as verificações dos resultados. Os mutantes foram arranjados como numa grade, com mutantes *nit* 1 ao longo do eixo horizontal e os mutantes *nit* M ou *nit* 3 ao longo do eixo vertical. Na primeira linha superior foram colocados apenas uma gota de *nit* M

ou *nit* 3 e na primeira linha a esquerda de cada placa apenas uma gota de *nit* 1. Nestes poços serão avaliados os controle negativos, que consistem no crescimento ralo de cada mutante *nit* empregado neste ensaio. Os controles positivos foram avaliados nos poço contendo *nit* 1 e *nit* M ou *nit* 3 do mesmo isolados testado, onde cada uma destes poços apresentaram crescimento rugoso do micélio aéreo. Reações positivas e negativas foram usadas para classificação dos isolados das populações de *Fusarium* em grupos de compatibilidade vegetativa. Reações positivas foram observadas em poços que possui uma gota de *nit* 1 e outra de *nit* M ou *nit* 3 de isolados diferentes onde foram observadas o crescimento denso do micélio aéreo, confirmando a anastomose das hifas e formação do heterocário. Reações negativas foram consideradas através do crescimento ralo do micélio aéreo mostrando a rejeição das hifas dos mutantes *nit*, confirmando que estes isolados pertencem a grupos distintos de compatibilidade vegetativa.

### **3.7.2 Pareamento em placas de poliestireno**

Para cada pareamento em placas de 24 poços foram feitas repetições usando placas de poliestireno com diâmetro de 60 mm. Cada placa possuía 10 mL de meio MM. Os pareamentos foram feitos em um arranjo contendo quatro mutantes *nit* 1 nas margens da placa e um mutante *nit* M no centro da mesma. O controle positivo foram observados com crescimento de micélio aéreo na linha de intersecção entre *nit* 1 e *nit* M ou *nit* 3 das mesmas espécie estudada. Reações positivas foram observadas através do crescimento do micélio aéreo na linha de intersecção entre *nit* 1 e *nit* M ou *nit* 3 de espécie diferentes, confirmando a classificação destes isolados como pertencentes ao mesmo VCG. Reações negativas foram observadas através do crescimento ralo na linha de intersecção entre *nit* 1 e *nit* M ou *nit* 3 de espécie diferentes. O pareamento foi realizado em

câmara de fluxo laminar e as placas foram transferidas para local asséptico por um período de 7 a 14 dias, a temperatura ambiente.

### **3.8 Determinação da estabilidade do heterocário**

Foram feitos 10 sub-cultivos em meio MM de cada pareamento positivo para verificar a estabilidade do heterocário formado na linha de contato entre os mutantes *nit*. Após a confirmação positiva no pareamento testado, era feita uma repicagem para placas contendo meio MM e transferidos para local asséptico e mantido em temperatura ambiente por período de sete dias. O heterocário foi considerado estável se após os sub-cultivos continuava apresentando crescimento robusto em MM (Leslie, 1993).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Obtenção de mutantes *nit*

Dos 51 isolados de *Fusarium* cultivados em meio MM contendo o agente mutagênico clorato de potássio, 49 isolados formaram setores resistentes, sendo então classificados como mutantes *nit* (Tabela 1). Em somente 37 isolados foi possível a obtenção de, no mínimo, dois tipos de mutante *nit*, para os testes de VCG (Tabela 2). Os isolados CML 349 e CML 408 quando cultivados em meio MM, sem agente mutagênico, produziram crescimento ralo e foram descartados. Em dez isolados só foi possível a obtenção de mutantes *nit* 1 (CML 266, CML 267, CML 268, CML 345, CML 379, CML 381, CML 388, CML 397, CML 399, CML 412). Em dois casos, houve a reversão dos mutantes ao tipo selvagem logo após a transferência para o meio MM (CML 383, CML 396). O maior número de setores resistentes a clorato de potássio foi obtido na concentração de 2,5% de  $\text{KClO}_3$ , do total de setores obtidos, 40% foram classificados como mutantes *nit*. Na concentração de 1,5% de  $\text{KClO}_3$ , apenas 25% dos setores foram classificados como mutantes *nit* (Figura 1). Alguns isolados apresentaram um único setor por bloco e outros produziam mais de um. Contudo, para efeito de análise, utilizou-se apenas um setor por bloco, sendo os outros descartados (Figura 2). Praticamente todos os setores que tiveram coloração roxo claro foram classificados como mutantes *nit*. Entretanto, 40% dos setores que mostraram crescimento robusto em MM foram descartados.

### 4.2 Classificação fenotípica dos mutantes *nit*

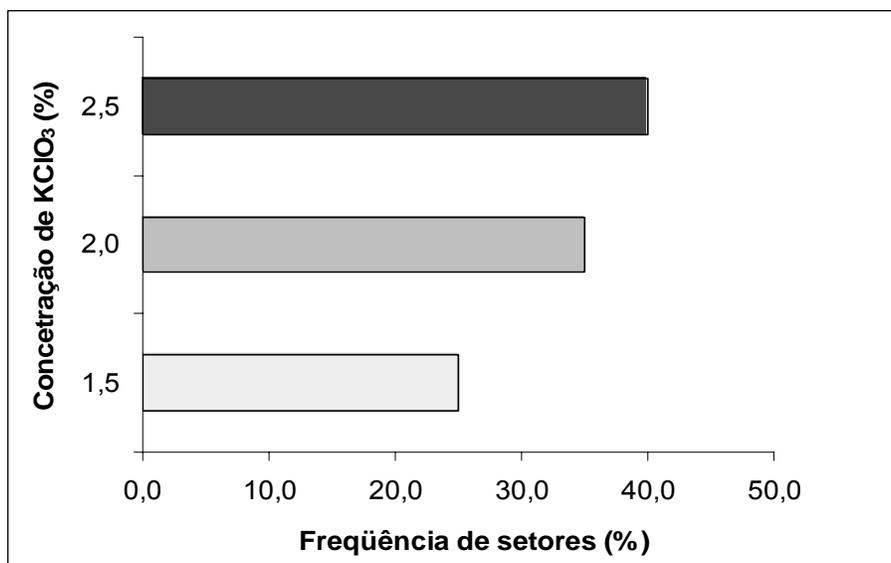
Os fenótipos dos mutantes *nit* foram determinados através da morfologia de suas colônias, quando foram cultivadas em meios (MM) contendo nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) ou hipoxantina (HX) (Figura 4).

**Tabela 1** Isolados de *Fusarium* obtidos de mangueira com sintoma de malformação floral e vegetativa, utilizados nesse estudo, e tipo de mutante induzido

Código	Espécies	Origem	Resultados
CML 406 (BBA 69662)	<i>F. magiferae</i>	Índia	nit 1 e nit 3
CML 407 (BBA 70826)	<i>F. magiferae</i>	Índia	nit 1 e nit 3
CML 409 (BBA 70896)	<i>F. magiferae</i>	Egito	nit 1 e nit M
CML 410 (BBA 71281)	<i>Fusarium</i> sp.	México	nit 1 e nit M
CML 411 (BBA 71282)	<i>Fusarium</i> sp.	México	nit 1 e nit M
CML 412 (MRC 2730)	<i>F. magiferae</i>	África do sul	nit 1
CML 413 (MRC 7559)	<i>F. magiferae</i>	Israel	nit 1 e nit M
CML 414 (MRC 2802)	<i>F. sterilihyphosum</i>	África do Sul	nit 1 e nit M
CML 415 (MRC 8101)	<i>F. sterilihyphosum</i>	África do Sul	nit 1 e nit M
CML 259	<i>Fusarium</i> sp.	Uberlândia, MG	nit 1 e nit M
CML 258	<i>Fusarium</i> sp.	Lavras, MG	nit 1 e nit M
CML 260	<i>Fusarium</i> sp.	Uberlândia, MG	nit 1 e nit M
CML 261	<i>Fusarium</i> sp.	Uberlândia, MG	nit 1 e nit M
CML 262	<i>Fusarium</i> sp.	Lavras, MG	nit 1 e nit M
CML 264	<i>Fusarium</i> sp.	Uberlândia, MG	nit 1 e nit M
CML 265	<i>Fusarium</i> sp.	Uberlândia, MG	nit 1 e nit M
CML 266	<i>Fusarium</i> sp.	Uberlândia, MG	nit 1
CML 267	<i>Fusarium</i> sp.	Jaguariúna, SP	nit 1
CML 268	<i>Fusarium</i> sp.	Jaguariúna, SP	nit 1
CML 269	<i>Fusarium</i> sp.	Passos, MG	nit 1 e nit M
CML 270	<i>Fusarium</i> sp.	Fortaleza, CE	nit 1 e nit M
CML 272	<i>Fusarium</i> sp.	Brejetuba, ES	nit 1 e nit M
CML 273	<i>Fusarium</i> sp.	Janaúba, MG	nit 1 e nit M
CML 274	<i>Fusarium</i> sp.	Perdões, MG	nit 1 e nit M
CML 276	<i>Fusarium</i> sp.	Barra Mansa, RJ	nit 1 e nit M
CML 277	<i>Fusarium</i> sp.	Barra Mansa, RJ	nit 1 e nit M
CML 278	<i>Fusarium</i> sp.	Eloi Mendes, MG	nit 1 e nit M
CML 279	<i>Fusarium</i> sp.	São João Del Rei, MG	nit 1 e nit M
CML 280	<i>F. sterilihyphosum</i>	Ijaci, MG	nit 1 e nit M
CML 281	<i>Fusarium</i> sp.	Caxambu, MG	nit 1 e nit 3
CML 282	<i>F. sterilihyphosum</i>	Itumirim, MG	nit 1 e nit M
CML 283	<i>F. sterilihyphosum</i>	Piracicaba, SP	nit 1 e nit M
CML 345	<i>Fusarium</i> sp.	Rondonópolis, MT	nit 1
CML 350	<i>Fusarium</i> sp.	Várzea Grande, MT	nit 1 e nit M
CML 379	<i>Fusarium</i> sp.	Tururu, CE	nit 1
CML 380	<i>Fusarium</i> sp.	Pentecoste, CE	nit 1 e nit M
CML 381	<i>Fusarium</i> sp.	Cruz, CE	nit 1
CML 382	<i>Fusarium</i> sp.	Nova Porteirinha, MG	nit 1 e nit 3
CML 384	<i>Fusarium</i> sp.	Nova Porteirinha, MG	nit 1 e nit 3
CML 385	<i>Fusarium</i> sp.	Nova Porteirinha, MG	nit 1 e nit M
CML 387	<i>Fusarium</i> sp.	Petrolina, PE	nit 1 e nit 3
CML 388	<i>Fusarium</i> sp.	Juazeiro, BA	nit 1
CML 389	<i>Fusarium</i> sp.	Juazeiro, BA	nit 1 e nit M
CML 390	<i>Fusarium</i> sp.	Petrolina, PE	nit 1 e nit M
CML 397	<i>Fusarium</i> sp.	Lavras, MG	nit 1
CML 399	<i>Fusarium</i> sp.	Guidoval, MG	nit 1
CML 401	<i>F. sterilihyphosum</i>	Lavras, MG	nit 1 e nit M

CML - Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil. MRC - Medical Research Council, Programme on Mycotoxins and Experimental Carcinogenesis (PROMEC), Tygerberg, South África. BBA - Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, Germany.

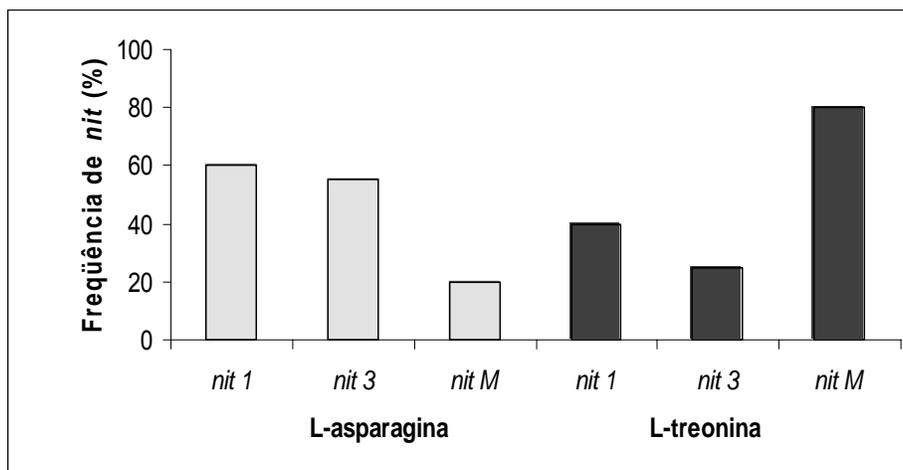
Nos primeiros ensaios, os mutantes *nit* foram transferidos para meio MM contendo o aminoácido L-asparagina como fonte de nitrogênio, o que permitiu a obtenção de 60% de mutantes *nit* 1, mas somente 20% de mutantes *nit* M. Com a substituição do aminoácido L-asparagina por L-treonina, houve um aumento significativo na obtenção de *nit* M, passando de 20 para 80%, o que possibilitou o início dos testes de VCG (Figura 3 e 4).



**Figura 1** Efeito da concentração de clorato de potássio sobre a frequência de setores classificados como mutantes *nit* obtidos no experimento



**Figura 2** Produção de setores resistentes a clorato de potássio apresentando micélio aéreo denso de coloração roxo claro (CML 259)



**Figura 3** Frequência de mutantes *nit* obtidos através da adição de diferentes aminoácidos no meio (MM) +  $\text{KClO}_3$ .



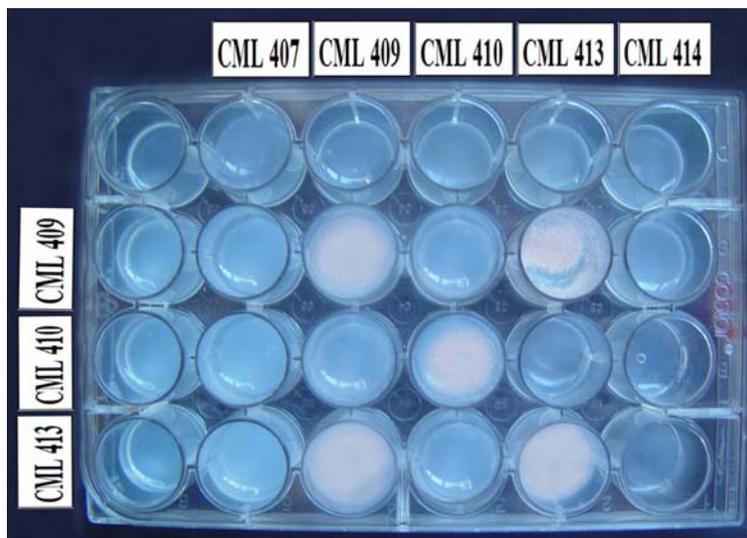
**Figura 4** Classificação fenotípica dos mutantes *nit* obtidos das populações de *Fusarium*, cultivados em meio de cultura com diferentes fontes de nitrogênio: nitrito de sódio ( $\text{NO}_2^-$ ) e hipoxantina (HX).

#### 4.3 Grupos de compatibilidade vegetativa (VCG)

De acordo com os resultados obtidos, os isolados foram alocados em 16 grupos de compatibilidade distintos (Tabela 2). Os isolados brasileiros ficaram em grupos diferentes dos isolados de outros países. No VCG 01 foi agrupado um isolado de *F. mangiferae* do Egito e outro de Israel. No VCG 02 foram agrupados dois isolados de *F. mangiferae* da Índia. Dois isolados de *Fusarium sterilihyphosum* oriundos do México e dois da África do Sul foram agrupados no VCG 03 e VCG 04, respectivamente (Figura 6). Os quatro isolados de *Fusarium sterilihyphosum* oriundos do Brasil foram agrupados no VCG 05. O maior grupo foi o VCG 06, contendo todos os isolados de *Fusarium* sp. provenientes do estado de Minas Gerais. Já os VCG's 07, 08, 10 e 16 foram compostos por apenas um isolado de localidades distintas. O VCG 09 reuniu dois isolados do

estado do Rio de Janeiro. O VCG 11 foi representado por quatro isolados, todos de Uberlândia-MG. O VCG 12 foi atribuído aos isolados do estado do Ceará, dos municípios de Tururú e Pentecoste. No Grupo 13 foram agrupados três isolados, de Uberlândia-MG, Juazeiro-BA e Petrolina-PE. No Grupo 14 foram reunidos dois isolados oriundos do município de Nova Porteirinha-MG e o grupo 15 foi composto por isolados de Várzea Grande-MT e Petrolina-PE.

Nenhum dos isolados brasileiros mostrou-se compatível com os isolados testados da espécie *Fusarium mangiferae*. Estes também não foram compatíveis com isolados de *Fusarium sterilihyphosum* da África do Sul.



**Figura 5** Transferência de cinco isolados de *Fusarium* em placas de 24 poços para a verificação da complementação (CML 407, CML 409, CML 410, CML 413, CML 414).



**Figura 6** Pareamento de isolados de *Fusarium sterilihyphosum* em placas de poliéstereno de 60 mm de diam. No centro, *nit* M (A - CML 280), nas margens *nit* 1, dois isolados do Brasil (A - CML 280, C - CML 282), dois da África do Sul (B - MRC 2802, D - MRC 8101);

**Tabela 2** Grupos de Compatibilidade vegetativa (VCG) dos isolados de *Fusarium* spp. recuperados de inflorescência e partes vegetativas malformadas da manga

Isolados	Espécies	Procedência	VCG(s)
CML 409 (BBA 70896)	<i>Fusarium mangiferae</i>	Egito	1
CML 413 (MRC 7559)	<i>Fusarium mangiferae</i>	Israel	
CML 406 (BBA 69662)	<i>Fusarium mangiferae</i>	Índia	2
CML 407 (BBA 70826)	<i>Fusarium mangiferae</i>	Índia	
CML 410 (BBA 71281)	<i>Fusarium</i> sp.	México	3
CML 411 (BBA 71282)	<i>Fusarium</i> sp.	México	
CML 414 (MRC 2802)	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	África do Sul	4
CML 415 (MRC 8101)	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	África do Sul	
CML 280	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	Ijaci, MG	
CML 282	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	Itumirim, MG	5
CML 283	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	Piracicaba, SP	
CML 401	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	Lavras, MG	
CML 258	<i>Fusarium</i> sp.	Lavras, MG	
CML 262	<i>Fusarium</i> sp.	Lavras, MG	
CML 269	<i>Fusarium</i> sp.	Passos, MG	6
CML 273	<i>Fusarium</i> sp.	Janaúba, MG	
CML 278	<i>Fusarium</i> sp.	Eloi Mendes, MG	
CML 279	<i>Fusarium</i> sp.	São João Del Rei, MG	
CML 272	<i>Fusarium</i> sp.	Brejetuba, ES	7
CML 274	<i>Fusarium</i> sp.	Perdões, MG	8
CML 276	<i>Fusarium</i> sp.	Barra Mansa, RJ	9
CML 277	<i>Fusarium</i> sp.	Barra Mansa, RJ	
CML 270	<i>Fusarium</i> sp.	Fortaleza, CE	10
CML 259	<i>Fusarium</i> sp.	Uberlândia, MG	
CML 260	<i>Fusarium</i> sp.	Uberlândia, MG	
CML 261	<i>Fusarium</i> sp.	Uberlândia, MG	11
CML 264	<i>Fusarium</i> sp.	Uberlândia, MG	
CML 379	<i>Fusarium</i> sp.	Tururu, CE	12
CML 380	<i>Fusarium</i> sp.	Pentecoste, CE	
CML 265	<i>Fusarium</i> sp.	Uberlândia, MG	
CML 389	<i>Fusarium</i> sp.	Juazeiro, BA	13
CML 390	<i>Fusarium</i> sp.	Petrolina, PE	
CML 382	<i>Fusarium</i> sp.	Nova Porteirinha, MG	14
CML 383	<i>Fusarium</i> sp.	Nova Porteirinha, MG	
CML 350	<i>Fusarium</i> sp.	Várzea Grande, MG	15
CML 387	<i>Fusarium</i> sp.	Petrolina, PE	
CML 385	<i>Fusarium</i> sp.	Nova Porteirinha, MG	16

CML - Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil. MRC - Medical Research Council, Programme on Mycotoxins and Experimental Carcinogenesis (PROMEC), Tygerberg, South África. BBA - Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, Germany.

## 5 DISCUSSÃO

Foram obtidos com sucesso mutantes *nit* auxotróficos dos 37 isolados de *Fusarium* para os testes de VCG (Tabela 2). O aumento na concentração do agente mutagênico de 1,5 para 2,5 % permitiu a obtenção de um maior número de setores resistentes ao mesmo. Outros estudos feitos com populações de *Fusarium*, foi mostrado que a frequência de setores espontâneos resistentes a clorato de potássio variam de isolado para isolado. Alguns isolados podem produzir setores na concentração de 1,5% de  $KClO_3$  e outros requerem uma concentração maior para formar setores (Klittich & Leslie, 1988; Leslie, 1993). Na indução dos mutantes *nit* obteve-se 40% dos setores com crescimento robusto em meio MM, sendo os mesmos descartados. Este resultado foi explicado em trabalhos anteriores, onde espécies de *Fusarium* apresentaram setores que são resistentes ao clorato de potássio, mas que tem capacidade de utilizar o nitrato como fonte de nitrogênio, pois provavelmente sofreram mutações em outras rotas metabólicas que não a de assimilação do nitrogênio (Correll et al., 1987; Leslie, 1993; Puahalla, 1985).

O uso de duas fontes distintas de nitrogênio: nitrito de sódio e hypoxantina e o arranjo de nove mutantes *nit* por placa de poliestereno 90 mm de diâmetro, possibilitou a classificação fenotípica dos mutantes *nit*, principalmente devido à facilidade, praticidade e rapidez desse método (Leslie, 2006). O uso das diferentes fontes de nitrogênio é justificado devido ao fato de que os mutantes *nit* têm a sua via metabólica alterada. (Leslie, 1993). A substituição do aminoácido L-asparagina por L-treonina possibilitou a obtenção dos *nit* M, proporcionando um aumento de 60% na recuperação dos mesmos, resultado bastante satisfatório para o início dos testes de VCG. A maioria destes

setores são heterocários com composições do núcleo selvagem (Klittich & Leslie, 1988; Leslie, 1993).

O método de inoculação em placas de 24 poços foi empregado devido ao grande número de isolados a serem testados (Figura 5). Estes testes são mais rápidos e requerem menor quantidade de meio de cultura e espaço na incubação em comparação com pareamento em placas de Petri ou com o pareamento em placas de poliestireno de 60 mm de diâmetro (Leslie et al., 2006) (Figura 6).

Britz et al. (2002) recentemente descreveram que os isolados CML 413 (*F. mangiferae*) e os isolados CML 414 e CML 415 (*F. sterilihyphosum*) como espécies novas do complexo *Gibberella fujikuroi* associadas à malformação da mangueira. Com base nos resultados obtidos nos testes de compatibilidade vegetativa os 37 isolados de *Fusarium* (Tabela 2) estudados foram agrupados em 16 VCG's distintos. No VCG 01 foram agrupados isolados de *Fusarium mangiferae* oriundos do Egito - CML 409 e Israel - CML 413, os quais já foram utilizados em estudos anteriores de compatibilidade vegetativa (Steenkamp et al., 2000). No VCG 02 foram agrupados os isolados de *Fusarium mangiferae* oriundos da Índia. Esses dois VCG's foram distintos dos VCG's obtidos das espécies recuperadas no Brasil. Os VCG's 03 e 04 foram atribuídos às espécies de *Fusarium sterilihyphosum* oriundas do México e da África do Sul, respectivamente. O isolado CML 414, pertencente ao VCG 04, este VCG foi determinado por Steenkamp et al. (2000) em um estudo anterior. Os VCG's 03 e 04 foram distintos do VCG 05 atribuído aos isolados de *Fusarium sterilihyphosum* recuperados no Brasil.

Dos 37 isolados estudados, foram obtidos 12 VCG's somente no Brasil. A grande quantidade de VCGs observados neste estudo é reflexo da grande

variabilidade genética existente entre os isolados de *Fusarium* associadas à malformação da mangueira. Esta grande variabilidade genética entre os isolados do Brasil pode ser explicada pelo fato desta população estar se reproduzindo sexuadamente, ou pela existência de mais de uma espécie associada à malformação da mangueira no país (Lima, 2006). Um grande número de VCGs foi também observado em outros estudos de compatibilidade vegetativa de isolados de *Fusarium* da mangueira (Shaw et al., 1993; Steenkamp et al., 2000; Zheng & Ploetz, 2002).

Dos 16 grupos de compatibilidade vegetativa obtidos neste estudo, apenas três VCG's não tiveram relação com regiões geográficas. Os isolados CML 280, CML 282 e CML 401 todos do estado de Minas Gerais foram reunidos no VCG 05 junto com o CML 283 de uma região geográfica distinta (Piracicaba-SP). Um isolado recuperado no triângulo mineiro, na cidade de Uberlândia foi reunido no VCG 13 que possuem isolados recuperados de Petrolina (CML 389) e Juazeiro (CML 390). Um isolado de Várzea Grande-MT foi agrupado com um isolado recuperado em Petrolina, formando o VCG 15. De acordo com a literatura, isolados oriundos de regiões geográficas distintas podem ocupar o mesmo VCG (Leslie, 1993). Deste modo, isolados que são compatíveis vegetativamente e que estiverem geograficamente isolados um do outro, podem ter se originado do mesmo clone (Oliveira & Costa, 2003). A mangueira é cultivada em praticamente todo o país e o trânsito de mudas é feito livremente entre as diferentes regiões produtoras. Tal fato explica a existência de populações de *Fusarium* sp. em diferentes regiões geográficas do Brasil pertencerem ao mesmo VCG.

Em estudos realizados na África do Sul com a malformação da mangueira foram analisados 18 isolados de *F. subglutinans sensu lato*

recuperados de inflorescências e ramos doentes procedentes da África do Sul, Estados Unidos e Israel. Os isolados de *F. subglutinans sensu lato* foram agrupados em quatro VCG's distintos, sendo os dois isolados de Israel no VCG 01 e os isolados dos Estados Unidos também reunidos em um único grupo (VCG 02). No entanto, os isolados da África do Sul foram agrupados em dois VCG's distintos apresentando uma considerável diversidade genética. Segundo os autores a existência de quatro VCG's está relacionada ao isolamento geográfico dos isolados (Steenkamp et al., 2000). A provável ausência do ciclo sexual nas espécies estudadas por Steenkamp et al. (2000) deve também contribuir para a existência de um menor número de VCG's e para maior estabilidade genética destes. Esta hipótese é suportada pelos resultados deste trabalho, onde um grande número de VCG's foi identificado para uma espécie de *Fusarium* que comprovadamente mantém o ciclo sexual.

Em estudos com *Fusarium subglutinans lato sensu* associados à malformação da mangueira provenientes de seis regiões geográficas do mundo, demonstrou-se uma diversidade populacional de acordo com a sua localização. Os isolados foram separados em sete grupos de compatibilidade vegetativa. Os isolados recuperados no EUA foram compatíveis com isolados do Egito, da África do Sul e Israel. Já isolados do Egito foram compatíveis com isolados oriundos da Índia e Israel. Com os agrupamentos de VGC obtidos no referido estudo foi lançada uma hipótese para explicar a disseminação internacional dos isolados causadores da doença através de fluxo de germoplasma. Como a malformação foi relatada primeiramente na Índia, e possivelmente originou-se nesta região, então especula-se que a doença se disseminou para o Egito a partir da introdução de material vindo da Índia. Na Flórida-EUA, são desenvolvidas cultivares de mangueira que foram posteriormente introduzidas em vários países. Acredita-se que o trânsito de material vegetal a partir da Ásia para a Flórida e,

em seguida, para várias partes do mundo foi responsável pela disseminação da doença para vários países, principalmente, África do Sul e Israel (Zheng & Ploetz, 2002).

No estudo descrito anteriormente, o VCG 07 foi composto por dois isolados de Petrolina-PE, cidade localizada no sertão central do Brasil (Zheng & Ploetz, 2002). O número de isolados é muito pequeno quando comparado com a extensão territorial do país possuidor de diversidade climática e de germoplasma, e que é o segundo produtor de manga do planeta (IBRAF, 2005). Por outro lado, no presente estudo foram utilizados isolados provenientes das mais diversas localidades do Brasil, sendo cada isolado obtido de uma árvore distinta.

A maioria dos grupos de compatibilidade vegetativa observados no presente estudo possuíam correlação com a distribuição geográfica dos isolados, dando indício da existência de grupos localizados com carga genética distinta dos demais. Entretanto, seria necessária a utilização de centenas de isolados para que fosse possível fazer qualquer conclusão sobre a estrutura populacional das espécies de *Fusarium* associadas à malformação da mangueira no Brasil (Tabela 2).

Em outro estudo feito com diferentes isolados de *Fusarium oxysporum* do Irã foi possível distinguir três VCG's com ocorrência na mesma região, indicando uma considerável diversidade genética entre estes isolados (Zamani et al., 2004). Em experimento realizado na Itália com isolados de *Fusarium oxysporum* da alface (*Lactuca sativa*), oriundos da Itália, Estados Unidos, Taiwan e Japão, os mesmos foram agrupados em um único VCG, mostrando uma pequena variabilidade genética entre estes isolados (Pasquali et al., 2005).

Os VCG's observados no presente estudo estão de acordo com análises de AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) realizadas

pelo nosso grupo de pesquisa, as quais levaram a um agrupamento similar em relação às diferentes espécie e populações de *Fusarium* encontradas na mangueira (Lima et al., 2005) (Figura A1). Os isolados de *Fusarium* do Brasil estudados no presente estudo foram reunidos em 12 VCG's distintos. Por meio deste resultado, observou-se que *Fusarium* sp. do Brasil apresenta grande diversidade genética em comparação com *Fusarium mangiferae* e *F. sterilihyphosum*. O segundo grupo observado na análise de AFLP continha os isolados, CML 280, 282, 283 e 401, do Brasil e os ex-holotipos de *F. sterilihyphosum* CML 414 e 415 da África do Sul. No entanto, os 4 isolados do Brasil formaram um VCG único, comprovando que estes isolados não pertencem a *Fusarium* sp. do Brasil. Nenhum isolado do Brasil foi posicionado no terceiro grupo obtido na análise de AFLP. O terceiro grupo corresponde a *Fusarium mangiferae* obtido na África do Sul, Egito, Estados Unidos e Índia, indicando que as duas espécies são isoladas quanto a compatibilidade vegetativa, e que *F. mangiferae* aparentemente não está presente no Brasil.

Estudos semelhantes feitos para verificar a diversidade genética de 89 isolados de *Fusarium oxysporum*, permitiram comparações entre grupos de VCG's e grupos obtidos pela análise de AFLP, havendo uma relação positiva entre os dois (Baayen et al., 2000). Grupos de Compatibilidade Vegetativos (VCG's) são marcadores ideais para estudos de população em *Fusarium*, pois ocorrem naturalmente e facilmente são marcados usando mutantes *nit* (Sidhu, 1986).

## 6 CONCLUSÕES

1. A técnica de obtenção de mutantes *nit* é adequada para a obtenção dos *nit* 1, *nit* M e *nit* 3, essenciais nos testes de VCG para espécies de *Fusarium* da mangueira.
2. Isolados do Brasil apresentaram grande diversidade genética. Dos utilizados no estudo foram obtidos 12 VCG's.
3. A determinação dos VCG's é uma ferramenta eficiente para corroborar resultados obtidos por outras técnicas, como AFLP e cruzamentos, já que ainda não foram determinados marcadores morfológicos que possam separar *Fusarium* sp. do Brasil de *Fusarium sterilihyphosum* e *F. mangiferae*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUÁRIO BRASILEIRA DA AGRICULTURA. **Manga**. São Paulo: FNP Consultoria & Agroinformativos, 2002. p. 392-398.

ALBUQUERQUE, J. A. S. de; MOUCO, M. A. do C. **Manga**: indução floral. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000. 34 p. (Embrapa Semi-Árido. Circular Técnica; 47).

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

BARBOSA, F. R.; MOREIRA, A. N.; ALENCAR, J. A. de; HAJI, F. N. P.; MEDINA, V. D. **Metodologia de amostragem e nível de ação para as principais pragas da mangueira, no Vale do São Francisco**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000. 23 p. (Embrapa Semi-Árido. Circular Técnica; 50).

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

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

BURNETT, J. H. Aspects of *Fusarium* genetics. In: MOSS, M. O.; SMITH, J. E. (Ed.) **The applied Mycology of Fusarium**. New York: Cambridge University, 1984. p. 39-69.

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

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

CHAKRABARTI, D. K.; GHOSAL, S. Effect of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* infection on mangifera production in the twigs of *Mangifera indica* **Phytopatologische Zeitschrift**, Hamburg, v. 113, n. 1, p. 47-50, 1985.

COMPANHIA DO DESENVOLVIMENTO DO VALE DO SÃO FRANCISCO. **Censo Frutícola 2001**. Disponível em: <<http://www.codevasf.gov.br/fruticultura>>. Acesso em: 20 out. 2005.

CORRELL, J. C. The relationship between formae speciales, races and vegetative compatibility group in *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n. 9, p. 1061-1064, 1991. Supplement.

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

CORRELL, J. C.; PAHALLA, J. E.; SCHNEIDER, R. W. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* on the basis of colony size, virulence, and vegetative compatibility. **Phytopathology**, St. Paul, v. 76, n. 4, p. 396-400, Apr. 1986.

COVE, D. J. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: Studies of mutants altered in nitrate assimilation. **Molecular General Genetics**, New York, v. 146, n. 2, p. 147-159, 1976.

CUNHA, M. M. da; SANTOS FILHO, H. P.; NASCIMENTO, A. S. do. (Org.). **Manga: Fitossanidade**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. Cap. 3, p. 25-47. (Frutas do Brasil, n. 6).

DEBETS, A. J. M. Paraxesuality in fungi: mechanisms and significance in wild population In: COUTEAUDIER, P. B. Y; CLARKSON, J. **Molecular Variability of Fungal pathogens**. New York: CAB International, 1998. v. 3, p. 41-53.

DONADIO, L. C.; FERREIRA, F. R.; SOARES, N. B.; RIBEIRO, I. J. **Variedades brasileiras de manga**. São Paulo: Fundação da UNESP, 1996. 74 p.

ELMER, W. H.; STEPHENS, C. T. Classification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* into vegetatively compatible groups. **Phytopathology**, St. Paul, v. 79, n. 1, p. 88-93, Jan. 1989.

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

FILGUEIRAS, H. A. C. **Manga pós-colheita**. Brasília: MAA, 2000. p. 40. (Publicação Técnica).

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

LIU, W.; SUNDHEIM, L. Nitrate nonutilizing mutants and vegetative compatibility groups in *Fusarium poae*. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 20, n. 1, p. 12-17, 1996.

JACOBSON, D. J.; BEURKENS, K.; KLOMPARENS, K. L. Microscopic and ultrastructural examination of vegetative incompatibility in partial diploids heterozygous at *het* loci *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 23, n. 1, p. 45-46, Feb. 1998.

JACOBSEN, D. J.; GORDON, T. R. Vegetative compatibility and self-incompatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 8, p. 668-672, Aug. 1988.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. Mercanotas. **Informativo IBRAF**, São Paulo, n.18, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. Mercanotas. **Informativo IBRAF**, São Paulo, n.34, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo/acervo2.asp>>. Acesso em: 2 set. 2005.

KATAN, T.; KATAN, J. Vegetative compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* from tissue and the rhizosphere of cotton plants. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 6, p. 852-855, June 1988.

KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F. Nitrate Reduction Mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). **Genetics**, Baltimore, v. 118, p. 417-423, 1988.

- KUMAR, J.; SINGH, U. S.; BENIWAL, S. P. S. Mango malformation: one hundred years of research. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 217-232, 1993.
- LESLIE, J. F. Genetic exchange within sexual and asexual populations of the genus *Fusarium*. In: PLOETZ, R. C. **Fusarium wilt of banana**. 2. ed. St. Paul, Minnesota: APS, 1990. p. 37-48.
- LESLIE, J. F. Fungal vegetative compatibility. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 127-150, 1993.
- LESLIE, J. F. *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 282-291, 1995. Suppl.
- LESLIE, J. F. Mating populations in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n. 9, p. 1058-1060, Sept. 1991
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S. **The Fusarium laboratory manual**. Ames: Blackwell, 2006. 366 p.
- MCCABE, P. M.; GALLAGHER, M. P.; DEACON, J. W. Microscopic observation of perfect hyphal fusion in *Rhizoctonia solani*. **Mycological Research**, New York, v. 103, n. 4, p. 487-490, Apr. 1999.
- NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. **Fusarium species: an illustrated manual for identification**. University Park: Pennsylvania State University, 1983. 193 p.
- NIRVAN, R.S. "Bunchy top" of Young mango seedlings. **Science and Culture**, Washington, v. 18, p. 335-336, 1953.
- O'DONNELL, K; CIGELNIK, E., NIRENBERG, H.I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, Bronx, v. 90, p. 465-493, July/Aug. 1998.
- PASQUALI, M. DEMATHEIS, F., GILARDI, G., GULLINO, M. L., GARIBALDI, A. Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lectucae* from Lettuce. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, p. 237-240, 2005.
- PIZA, S. M. T.; PIZA, JÚNIOR, C. T.; RIBEIRO, L. J. A. A malformação da mangueira: uma revisão bibliográfica. **O Agrônomo**, Campinas, v. 39, n. 3, p. 251-267, 1987.

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

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

PLOETZ, R. C.; CORRELL, J. C. Vegetative compatibility among races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 72, n. 4, p. 325-328, Apr. 1988.

PLOETZ, R. C.; GREGORY, N. Mango malformation in Florida: distribution of *Fusarium subglutinans* in affected trees, and relationships within and among strains from different orchards. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 341, p. 388-394, 1993.

PROSSER, J. I. Kinetics of filamentous growth and branching. In: GOW, N.A.R.; GADD, G. M. **The growing fungus**, London: Chapman & Hall, 1994. p.301-318.

PUHALLA, J. E. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the bases of vegetative compatibility. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 63, n. 2, p. 179-183, Feb. 1985.

PUHALLA, J. E. Genetic considerations of the genus *Fusarium*.. In: NELSON, P. E. ; TOUSSOUN, T. A. COOK, R. J. (Ed.). **Fusarium**: diseases, biology, and taxonomy. University Park, Pa: Pennsylvania State University Press, 1981. p. 291-305.

ROSALEE, A.; COELHO, N.; DHINGRA, O. D. Grupos de compatibilidade vegetativa entre insalados de *Fusarium oxysporum* não patogênicos ao feijoeiro e de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 546-548, dez. 1999.

SCHLOSSER, R. Mango malformation: symptoms, occurrence end varietal susceptibility. **FAO Plant Protection Bulletin**, Rome, n. 19, p. 12-14. 1971.

SECRETARIA DE COMÉRCIO EXTERIOR. **Dados de Exportação**. 2002. Disponível em: <<http://www.protaledoexportador.gov.br>>. Acesso em: 22 set. 2005.

SHAW, S. F.; ELLIOT, V.; MANSOUR, I. M.; LESLIE, J. F. Genetic diversity in *Fusarium* section Liseola from mangoes. **Fungal Genetics Newsletter**, San Diego, v. 40A, p. 25, 1993.

SIDHU, G. S. Genetics of *Gibberella fujikuroi*. VIII. Vegetative compatibility groups. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 64, n. 1, p. 117-121, Jan. 1986.

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

STEENKAMP, E.; BRITZ, H.; COUTINHO, T.; WINGFIELD, B.; MARASAS, W.; WINGFIELD, M. Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 1, n. 2, p. 187-193, 2000.

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

VARMA, A.; LELE, V. C.; RAYCHAUDHURI, S. P.; RAM, A.; SANG, A. Mango malformation a fungal disease. **Phytopathologische Zeitschrift**, Hamburg, v. 79, n. 3, p. 254-257, 1974.

ZAMANI, M. R.; MATALLEBI, M.; ROSTAMIAN, A. Characterization of Iranian isolates of *Fusarium oxysporum* on the basis of RAPD analysis, virulence and vegetative compatibility. **Journal of Phytopathology**, St. Paul, v. 152, n. 8/9, p. 449-453, Sept. 2004.

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

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

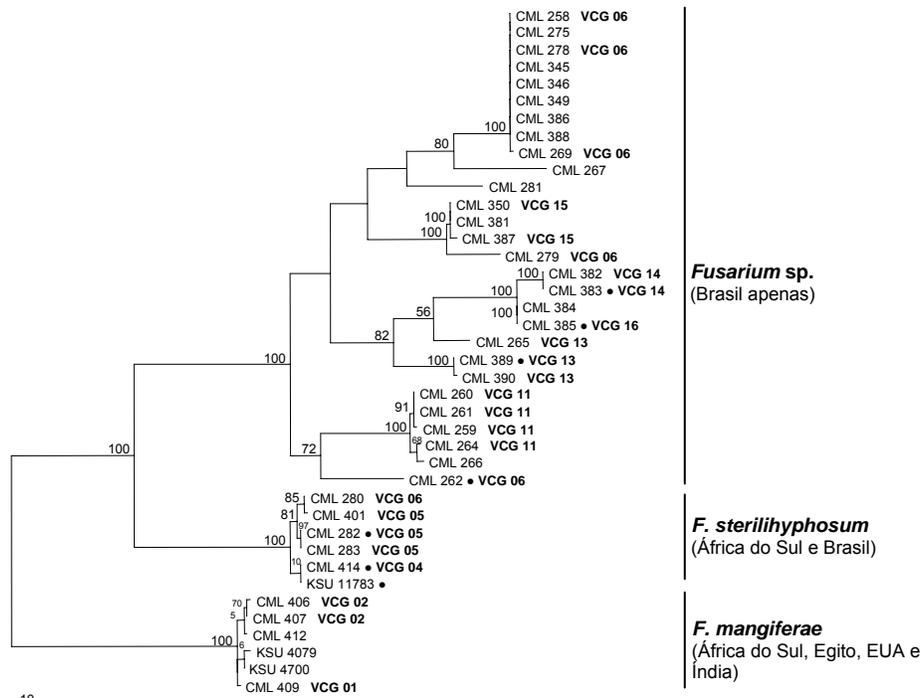
Os isolados de *Fusarium* sp. da mangueira oriundos no Brasil quando empregados nos testes de compatibilidade vegetativa mostram haver uma grande variabilidade genética entre isolados de *Fusarium*. A determinação de VCG mostrou-se ser uma ferramenta que evidencia sub-grupos em populações complexas e geneticamente diversas de ascomicetos anamorfos do gênero *Fusarium*.

O doze VCG's obtido dos isolados de *Fusarium* da mangueira oriundos do Brasil estava de acordo com a localização geográfica dos mesmos, entretanto os isolados na nossa coleção obtidos das regiões produtoras de manga no Brasil são insuficientes em número para justificar a relação entre VCG's e localização geográfica. Faz necessária a obtenção de um número maior de isolados por região produtora de mangas.

Devido ao tempo para a realização do experimento e principalmente pelas dificuldades na obtenção dos mutantes *nit*, não foi possível a verificação ao microscópio da formação do heterocário. No entanto faz necessário novos estudos usando a técnica de coloração das hifas no processo de anastomose e formação do heterocário para serem visualizadas ao microscópio.

## ANEXOS

<b>ANEXO A</b>		<b>Paginas</b>
FIGURA 1A	Posição dos VCG, em relação ao padrão de AFLP (Faixas marcadas entre 200-800 bp). Valores de Bootstrap baseados em 1.000 repetições; (adaptado de Lima et al., 2005).....	44
<b>ANEXO B</b>		<b>Paginas</b>
TABELA 1B	Meio mínimo modificado (MM) para a recuperação de mutantes nit de <i>Fusarium mangiferae</i> e <i>Fusarium sterilihyphosum</i> (Puhalla, 1985).....	45
TABELA 2B	Solução estoque de traços de elementos: mg L <sup>-1</sup> de água destilada Cooper e Wood, 1975).....	45
TABELA 3B	Meio Mínimo Modificado (MM) com clorato de potássio para obtenção de setores de <i>Fusarium mangiferae</i> e <i>Fusarium sterilihyphosum</i> .....	45
TABELA 4B	Meio com Nitrito de sódio para caracterização fenotípica dos mutantes nit de <i>Fusarium mangiferae</i> e <i>Fusarium sterilihyphosum</i> .....	46
TABELA 5B	Meio com Hipoxantina para caracterização fenotípica dos mutantes nit de <i>Fusarium mangiferae</i> e <i>Fusarium sterilihyphosum</i> .....	46



**Figura 1A** Posição dos VCG, em relação ao padrão de AFLP (Faixas marcadas entre 200-800 bp.). Valores de Bootstrap baseados em 1.000 repetições; (adaptado de Lima et al., 2005).

**TABELA 1B** Meio mínimo modificado (MM) para a recuperação de mutantes nit de *Fusarium mangiferae* e *Fusarium sterilihyphosum* (Puhalla, 1985).

Reagentes	g.L <sup>-1</sup>
NaNO <sub>3</sub>	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,5
KCl	0,5
Sucrose	30
Agar	20
Traço de elementos (sol. Estoque)	0,2 mL <sup>-1</sup>

**TABELA 2B** Solução estoque de traços de elementos: mg L<sup>-1</sup> de água destilada Cooper e Wood, 1975).

Reagentes	mg L <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	20
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	100
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	2
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	2
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	2

**TABELA 3B** Meio Mínimo Modificado (MM) com clorato de potássio para obtenção de setores de *Fusarium mangiferae* e *Fusarium sterilihyphosum*

Reagentes	g.L <sup>-1</sup>
NaNO <sub>3</sub>	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,5
KCl	0,5
Sucrose	30
Agar	20
Traço de elementos (sol. Estoque)	0,2 mL <sup>-1</sup>
Clorato de potássio	15
L-asparagina	1,6

**TABELA 4B** Meio com Nitrito de sódio para caracterização fenotípica dos mutantes nit de *Fusarium mangiferae* e *Fusarium sterilihyphosum*

<b>Reagentes</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
NaNO <sub>2</sub>	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,5
KCl	0,5
Sucrose	30
Agar	20
Traço de elementos (sol. Estoque)	0,2 mL <sup>-1</sup>

**TABELA 5B** Meio com Hipoxantina para caracterização fenotípica dos mutantes nit de *Fusarium mangiferae* e *Fusarium sterilihyphosum*

<b>Reagentes</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
Hipoxantina	0,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,5
KCl	0,5
Sucrose	30
Agar	20
Traço de elementos (sol. Estoque)	0,2 mL <sup>-1</sup>