



VIRGÍNIA GUERRA ELIZEI

**CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES
HOMOTÁLICAS NO COMPLEXO**

Fusarium solani

LAVRAS – MG

2012

VIRGÍNIA GUERRA ELIZEI

CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES HOMOTÁLICAS NO COMPLEXO

Fusarium solani

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

Orientador

Dr. Ludwig H. Pfenning

LAVRAS - MG

2012

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

Elizei, Virginia Guerra.

Caracterização de espécies homotáticas no complexo *Fusarium solani* / Virginia Guerra Elizei. – Lavras : UFLA, 2012.

51 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning.

Bibliografia.

1. Homotalismo. 2. Heterotalismo. 3. Patogenicidade. 4.
Fusariose. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.2304873282

VIRGÍNIA GUERRA ELIZEI

CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES HOMOTÁLICAS NO COMPLEXO

Fusarium solani

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

APROVADA em 17 de agosto 2012.

Dra. Maria Cristina Mendes Costa

UNILAVRAS

Dr. Eduardo Alves

UFLA / DFP

Dr. Eustáquio Souza Dias

UFLA / DBI

Dra. Patrícia Gomes Cardoso

UFLA / DBI

Dr. Ludwig H. Pfenning
Orientador

LAVRAS – MG

2012

Aos meus pais Ronaldo e Cida, por todo amor e carinho;
Aos meus irmãos Rafaela e Giovani, pelo incentivo para cumprir mais uma etapa;
Ao meu marido, Pedro Paulo, pela paciência e carinho.
Essa conquista também é de vocês!

DEDICO

A tia Marlinda e tio Mário

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força espiritual para a realização desse trabalho;

À Universidade Federal de Lavras e ao departamento de Biologia, pela oportunidade da realização do curso. Ao Departamento de Fitopatologia onde os experimentos foram realizados;

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

Agradeço ao professor Dr. Ludwig H. Pfenning, pela orientação;

A todos os professores do programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola, pelos conhecimentos transmitidos;

A minha família, por acreditar e investir em mim;

A minha mãe Cida, pelo seu cuidado e dedicação que me deu e esperanças para seguir e meu pai Ronaldo, pela presença constante que significou a segurança de que não estava sozinha;

Agradeço também a meus tios, Marlinda e Mário, por todo amor e pelas orações;

Aos meus irmãos, Rafaela e Giovani, que junto com meus sobrinhos fizeram com que este percurso fosse mais leve;

Ao meu marido Pedro Paulo, obrigada pelo carinho, pela paciência e por sua capacidade de me trazer paz na correria de cada semestre;

Ao meu sogro, Dr. Paulo Rebelles, por ser um exemplo a ser seguido e a minha sogra Chininha pelo apoio constante.

Às amigas do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos do DFP, Aline Vaz, Gláucia Mara e Simone Ribeiro, pela cumplicidade, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro de produção tornou melhor tudo o que tenho produzido na vida;

Um agradecimento especial à Dra. Sarah da Silva Costa, pela amizade, confiança, cumplicidade, orientação, conhecimentos transmitidos e valiosas sugestões, sem você esse trabalho não teria sido concluído;

Ao melhor laboratorista da UFLA, Edson Rezende, por me ajudar sempre no que eu mais precisei;

Ao Dr. Lucas Abreu, pelo auxílio na redação e sugestões;

E um obrigada a todas as pessoas que contribuíram para meu sucesso e meu crescimento como pessoa e como profissional. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

OBRIGADA!

RESUMO

As espécies pertencentes ao complexo *Fusarium solani* - FSSC (teleomorfo *Haematonectria*, Hypocreales, Ascomycota) são agentes etiológicos de várias doenças de plantas de importância agrícola, principalmente na região tropical e sub-tropical. O objetivo desse trabalho foi avaliar a presença de espécies biológicas homotáticas em uma coleção de 238 isolados do tipo *Fusarium solani*, obtidas de diferentes plantas hospedeiras, por meio de testes de homotalismo e análise filogenética das regiões RPB2 e TEF. Verificou-se ainda se os isolados são patogênicos e mostram especificidade em relação à planta hospedeira. Para o teste de homotalismo, isolados monospóricos foram transferidos para placas de Petri contendo os meios de cultura SNA e meio completo, mantidos em temperatura ambiente por aproximadamente 60 dias, com avaliações semanais. A análise filogenética foi realizada com sequências parciais do gene que codifica o Fator de alongação 1 α e segunda maior subunidade da RNA polimerase, incluindo sequências de isolados de referência de diversas espécies pertencentes ao FSSC. Testes de patogenicidade foram realizados em plantas hospedeiras de *F. solani* como *Passiflora edulis*, *Solanum melongena*, *Cucumis melo* e *Pisum sativum*. Dezesete isolados foram homotáticos, sendo que nove formam um clado junto com isolados homotáticos de referência conhecidos como *Fusarium striatum*, representando uma espécie filogenética distinta dentro do complexo *Fusarium solani*. Os isolados homotáticos não induziram sintomas de podridão radicular em nenhuma das plantas avaliadas, podendo estar associados a plantas como saprofitos. De acordo com a análise das características morfológicas não foi possível detectar um marcador que diferencie esses isolados de outras espécies do FSSC. Tanto a nomenclatura das formas homotáticas como seu status de fitopatógeno devem ser revisados.

Palavras-chave: *Haematonectria*. Fusariose. Filogenia molecular. Heterotalismo e Fitopatógeno

ABSTRACT

The *Fusarium solani* species complex - FSSC (teleomorph *Haematonectria*, Hypocreales, Ascomycota) is an assemblage of pathogens of various plants of agricultural importance, especially in tropical and sub-tropical regions. The objective of this study was to evaluate the presence of homothallic biological species from a collection of 238 isolates of *Fusarium solani*, obtained from different host plants through homothallism tests and phylogenetic analysis of TEF and RPB2 regions. It was also evaluated if homothallic isolates are pathogenic and show specificity with regard to the host plant. To test for homothallism, single spore isolates were transferred to Petri dishes containing SNA culture medium and complete medium and kept at room temperature for about 60 days with weekly evaluations. Phylogenetic analysis was performed with partial sequences of the gene encoding elongation factor 1 α and second largest subunit of RNA polymerase, including sequences from reference strains belonging to several species of the FSSC. Pathogenicity tests were performed on host plants of *F. solani* such as *Passiflora edulis*, *Solanum melongena*, *Cucumis melo* and *Pisum sativum*. Seventeen isolates were homothallic, of which nine form a clade together with other homothallic reference strains known as *Fusarium striatum*, representing a distinct phylogenetic species within the *Fusarium solani* species complex. The homothallic isolates did not induce symptoms of root rot in any of the plants analyzed, and may be associated to plants as saprophytes. According to the analysis of morphological characteristics no marker which distinguishes the homothallic isolates from other FSSC species could be detected. Both nomenclature of homothallic forms as well as phytopathogen status should be reviewed.

Keywords: *Haematonectria*. Fusariose. Molecular phylogeny. Heterothallism and Plant pathogen.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | Árvore filogenética de neighbor joining para o gene <i>TEF-1α</i> de espécies do complexo <i>Fusarium solani</i> | 27 |
| Figura 2 | Árvore filogenética de neighbor joining para o gene RPB2 de espécies do complexo <i>Fusarium solani</i> | 28 |
| Figura 3 | Árvore filogenética de neighbor joining para os genes <i>TEF-1α</i> e RPB2 de espécies do complexo <i>Fusarium solani</i> | 29 |
| Figura 4 | Plantas de <i>Pisum sativus</i> inoculadas com isolados homotáticos de <i>F.solani</i> sem sintoma de podridão radicular..... | 31 |
| Figura 5 | Plantas de <i>Cucumis melo</i> inoculadas com isolados homotáticos de <i>F.solani</i> , sem sintomas de podridão radicular | 32 |
| Figura 6 | Plantas de <i>Passiflora edulis</i> inoculadas com isolados homotáticos de <i>F. solani</i> sm sintomas de podridão radicular | 33 |
| Figura 7 | Plantas de <i>Solanum melongena</i> inoculadas com isolados homotáticos de <i>F. solani</i> sem sintoma de podridão radicular | 34 |
| Figura 8 | Anamorfo de <i>Fusarium solani</i> | 37 |
| Figura 9 | Comprimento e largura (µm) de microconídios com 0-1 septos e de macroconídios com 3-5 septo, avaliados após 10-14 dias de incubação em SNA a 20 °C e fotoperíodo de 12 horas | 38 |
| Figura 10 | Teleomorfo de <i>Fusarium solani</i> | 39 |
| Figura 11 | Comprimento e largura (µm) de peritécios, ascos e ascósporos obtidos após testes de homotalismo | 40 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Isolados de <i>Fusarium solani</i> utilizados no teste de homotalismo | 18 |
| Tabela 2 | Isolados identificados como homotáticos no teste de homotalismo | 24 |
| Tabela 3 | Características morfológicas das fases anamorfa e teleomorfa dos isolados de <i>F.solani</i> homotáticos | 36 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 14 |
| 2.1 | Aplicação do conceito de espécie biológica em FSSC..... | 14 |
| 2.2 | Espécies heterotáticas no FSSC..... | 15 |
| 2.3 | Espécies homotáticas..... | 16 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| 3.1 | Isolados estudados..... | 18 |
| 3.2 | Teste de homotalismo..... | 18 |
| 3.3 | Sequenciamento e análises filogenéticas..... | 19 |
| 3.4 | Teste de patogenicidade..... | 20 |
| 3.5 | Caracterização morfológica..... | 22 |
| 4 | RESULTADOS | 23 |
| 4.1 | Teste de homotalismo..... | 23 |
| 4.2 | Análise Filogenética..... | 24 |
| 4.3 | Teste de Patogenicidade..... | 30 |
| 4.4 | Caracterização morfológica dos isolados homotáticos..... | 35 |
| 5 | DISCUSSÃO | 41 |
| 6 | CONCLUSÕES | 45 |
| | REFERÊNCIAS | 46 |
| | ANEXO | 50 |

1 INTRODUÇÃO

O Complexo de espécies *Fusarium solani* (FSSC *Fusarium solani* specie complex) compreende mais de 50 espécies filogenéticas, antes desconhecidas por causa da semelhança morfológica (NALIM et al., 2011; O'DONNELL, 2000; O'DONNELL et al., 2008). Este complexo compreende espécies patogênicas de importantes plantas cultivadas, principalmente nas regiões tropical e subtropical, além de espécies causadoras de doenças em humanos e animais. Na natureza, ocorrem como saprófitas e endófitos (GERLACH; NIRENBERG, 1982; ZHANG et al., 2006).

Em estudos filogenéticos com espécies deste complexo baseados em sequências parciais de genes do RNA ribossômico (28S rDNA, ITS), fator de alongação (EF-1 α) e segunda maior subunidade da RNA polimerase (RPB2), demonstram que FSSC era distinto e consistia de três grupos monofiléticos: Clados 1, 2 e 3 (O'DONNELL, 2000). O Clado 1 do complexo *F. solani* possui apenas dois membros originários da Nova Zelândia. O Clado 2 engloba oito espécies filogenéticas, que são importante patógenos da soja e feijão (AOKI et al., 2003). O Clado 3, o maior e mais diverso, possui representantes das sete espécies biológicas, ou *mating populations*, anteriormente descritas por Matuo e Snyder (1973), e espécies homotáticas.

O teleomorfo de isolados heterotáticos de *F. solani* é identificado como *Nectria haematococca* Berk. e Broome (BOOTH, 1971; SAMUELS, 1976), mas esse conceito tem sido aplicado para todas as espécies que fazem parte de FSSC. Gerlach e Nirenberg (1982) nomearam *N. haematococca* var. *haematococca* como teleomorfo de *Fusarium eumartii*, e *N. haematococca* var. *brevicon* como teleomorfo de *F. solani* var. *solani*. O'Donnell (2000) demonstrou, por meio de análises filogenéticas, que teleomorfos do gênero *Neocosmospora* pertencem ao FSSC, sendo o gênero *Haematonectria* parafilético. A fase sexuada de isolados

homotáticos de *F. solani* é denominada de *Nectria (Haematonectria) ipomoeae* (NIRENBERG; BRIELMAIER-LIEBETANZ, 1996; ROSSMAN, 1999). Matuo e Snyder (1973), em seus trabalhos verificaram que populações heterotáticas de *F. solani* eram responsáveis por causarem doenças em plantas e que populações homotáticas eram saprófitas.

Como no Brasil o nome de *Fusarium solani* é utilizado geralmente para todas as formas do FSSC até os dias atuais, propomos responder às seguintes questões (i) No Brasil, existem espécies ou populações homotáticas distintas no FSSC, obtidos de diferentes substratos? (ii) É possível distinguir espécies através de marcadores morfológicos tanto no anamorfo como no teleomorfo? (iii) Os isolados homotáticos são patogênicos? Os objetivos do trabalho foram: i. verificar a presença de espécies homotáticas em uma coleção de isolados utilizando teste de homotalismo; ii. Realizar análises de filogenia molecular com sequências das regiões gênicas que codificam para o fator de alongação 1-alfa (EF-1 α) e a segunda maior subunidade de RNA polimerase (RPB2); iii. Verificar a patogenicidade dos isolados por meio de inoculação cruzada. iv. identificar marcadores morfológicos para populações distintas;

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aplicação do conceito de espécie biológica em FSSC

A aplicação do conceito biológico de espécie permitiu uma definição mais acurada de espécies que causam doenças em plantas cultivadas (LESLIE; SUMMERELL, 2006; NIRENBERG; O'DONNELL, 1998). O conceito de espécie biológica considera que um grupo de indivíduos que compartilha as mesmas características morfológicas e fisiológicas possui o potencial de se cruzarem gerando descendentes férteis (DOBZHASKY, 1950).

A reprodução sexual de populações do complexo *Fusarium solani* - FSSC pode ser heterotática ou homotática. O mecanismo básico de mating type é de um locus MAT e dois idiomorfos, MAT-1 ou MAT-2, ou seja, sequências não relacionadas presentes no mesmo locus do genoma. Em espécies heterotáticas, o acasalamento só é possível entre dois indivíduos geneticamente diferentes, MAT-1 e MAT-2. Já em espécies homotáticas, os dois idiomorfos fazem parte de único genoma (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Ao longo dos anos, diversos nomes e sinônimos para o teleomorfo de espécies do FSSC foram propostos, como *Hypomyces* sp., *Nectria* sp., *Neocosmospora* sp. e *Haematonectria* sp. Análises filogenéticas, utilizando sequências de DNA, demonstraram que '*Nectria*' *haematococca* e *Neocosmospora vasinfecta*, formaram um grupo irmão de *Nectria cinnabarina*. Diante disso, as espécies de '*N.*' *haematococca* e de *Fusarium* (seção *Martiella*) foram incluídas no gênero *Neocosmospora*. No entanto, estudos posteriores revelaram que existiam diferenças no anamorfo e no teleomorfo de '*N.*' *haematococca* e espécies relacionadas com *Neocosmospora*. O anamorfo de *N. vasinfecta* é denominado de *Acremonium*, e possui conídios e ascósporos não septados, possivelmente seria um microconídio de *Fusarium* que perdeu a

habilidade de produzir macroconídios e ascósporos septados (O'DONNELL; GRAY, 1995).

Diante desse fato, foi proposto um novo gênero a partir de '*Nectria*' *haematococca*, denominado de *Haematonectria* Samuels & Nirenberg, caracterizado por peritécios globosos ou piriformes vermelhos, asco clavado com oito ascósporos, ascósporos elipsóides, com um septo e estriado (ROSSMAN; SAMUELS, 1999). Três espécies estão incluídas no gênero *Haematonectria*, *Haematonectria haematococca*/*F. solani*, *Haematonectria ipomoeae*/*Fusarium striatum*' e *Haematonectria illudens*/*Fusarium illudens*. O tipo de reprodução sexual heterotálica ou homotálica neste estudo foi levado em consideração. Populações *H. haematococca*, heterotálicas foram encontradas em várias plantas cultivadas, e podem representar espécies distintas, principalmente devido a especiação em resposta às atividades agrícolas. Em *H. ipomoeae*, são encontradas espécies homotálicas ou auto-férteis. O anamorfo é denominado de '*F. striatum*' e corresponde a um sinônimo de *F. solani* (O'DONNELL, 2000; O'DONNELL; GRAY, 1995; ROSSMAN; SAMUELS, 1999).

Existem dificuldades práticas com a aplicação do conceito de espécie biológica para *Fusarium*, que incluem os altos níveis de reprodução assexuada, a desigualdade de frequências relativas dos idiomorfos MAT, e muitas vezes um número limitado de linhagens que são férteis (TAYLOR et al., 2000).

2.2 Espécies heterotálicas no FSSC

A diversidade das populações é evidenciada pela quantidade de *formae speciales*. Em *F. solani* existem mais de 20 *formae speciales* conhecidas, as quais representam espécies biológicas e filogenéticas distintas (O'DONNELL, 2000; O'DONNELL et al., 2008).

Dentro do complexo *Fusarium solani* já foram descritas sete espécies biológicas, ou *mating populations* (MPs). *F. solani* f. sp. *cucurbitae* raça 1, MP-I e raça 2, MP-V, causam podridão de frutos em *Cucurbita* spp.; *F. solani* f. sp. *batatas*, MP-II patógeno de batata; *F. solani* f. sp. *mori*, MP-III patógeno de *Moris Alba*; *F. solani* f. sp. *xanthoxyli*, MP-IV patógeno de *Xanthoxylum piperitum*; *F. solani* f. sp. *pisi*, MP-VI causador da fusariose em ervilha; *F. solani* f. sp. *robiniae*, MP-VII patógeno de *Robinea* SP. (MATUO; SNYDER, 1973). Em 2007, a ocorrência do teleomorfo de *Fusarium tucumaniae*, heterotático, um dos agentes etiológicos da PVR, foi relatada, acrescentando outra *mating population* ao FSSC (COVERT et al., 2007).

As populações heterotáticas do FSSC são responsáveis por várias doenças em plantas economicamente importantes como, por exemplo, *F. solani* f. sp. *cucurbitae* raça 1, MP-I e raça 2, MP-V causam podridão de frutos em *Cucurbita* spp.; *F. solani* f. sp. *batatas*, MP-II patógeno de batata; *F. solani* f. sp. *mori*, MP-III patógeno de *Moris Alba*; *F. solani* f. sp. *xanthoxyli*, MP-IV patógeno de *Xanthoxylum piperitum*; *F. solani* f. sp. *pisi*, MP-VI causador da fusariose em ervilha; *F. solani* f. sp. *robiniae*, MP-VII patógeno de *Robinea* sp. (MATUO; SNYDER, 1973); *F. tucumaniae*, anteriormente denominado como *F. solani* f. sp. *glycines* é um dos agentes etiológicos da podridão vermelha da raiz da soja (AOKI et al., 2003; AOKI; O'DONNELL; SCANDIANI, 2005; COVERT et al., 2007). Outra fusariose importante ocorre em pimenta-do-reino causada por *F. solani* f.sp. *piperis*.

2.3 Espécies homotáticas

Culturas homotáticas foram descritas por Blakeslee (1904), como culturas que produziam estruturas sexuais a partir de culturas originadas de um único esporo. Dentro do homotalismo existem dois grupos, que são os

homotáticos primários ou verdadeiros que incluem *Gibberella zeae* e inúmeras espécies de *Nectria*. E os pseudo-homotáticos ou também chamados de homotáticos secundários, esses crescem vegetativamente a partir de uma única célula, mas contem dois núcleos geneticamente distintos compartilhando o mesmo citoplasma. Não se tem conhecimento de espécies pseudo-homotáticas em *Fusarium* (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Sherbakoff (1915) trabalhou com isolados obtidos da batata, e descreveu *Fusarium striatum*. Na época não foi observado o teleomorfo do mesmo. Em 1951 McClure, relatou a fase sexuada do isolado heterotático *F. solani* f.sp. *batatas* que era patogênico a *Ipomoea batatas* e nomeou o teleomorfo de *Hypomyces ipomoeae*. O teleomorfo de *Fusarium solani* é frequentemente associado a *Nectria haematococca*, e esse conceito tem sido aplicado a todas as espécies que pertencem ao complexo *Fusarium solani*.

Rossmann e Samuels (1999) descreveram *Nectria ipomoeae* como o teleomorfo de *Fusarium striatum* Sherb., porém os isolados utilizados para a descrição do teleomorfo foram obtidos de maracujá e não da batata.

Matuo e Snyder (1973) notaram que populações heterotáticas de *F. solani* eram responsáveis por causarem doenças e danos econômicos no Japão e Estados Unidos. Já as populações homotáticas foram coletadas nos mesmos locais como saprófitas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados estudados

Foram realizados testes de homotalismo com 238 isolados (Tabela 1) provenientes de várias plantas cultivadas e da vegetação natural e do solo, de diferentes regiões geográficas do Brasil. Estes isolados estão depositados na Coleção Micológica de Lavras – CML, do Laboratório de Sistemática e Ecologia de fungos no Departamento de Fitopatologia, DFP da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Minas Gerais, Brasil.

Tabela 1 Isolados de *Fusarium solani* utilizados no teste de homotalismo

| Substrato | Nº de isolados |
|---------------------------|-----------------------|
| <i>Solanum tuberosum</i> | 10 |
| <i>Coffea arábica</i> | 12 |
| <i>Passiflora edulis</i> | 18 |
| <i>Glycine Max</i> | 60 |
| Solo | 78 |
| <i>Gossypium hirsutum</i> | 3 |
| <i>Phoradendron</i> | 7 |
| <i>Piper nigrum</i> | 10 |
| Outros | 40 |
| Total: 238 | |

3.2 Teste de homotalismo

O teste de homotalismo foi realizado seguindo dois protocolos, de acordo com Leslie e Summerell (2006). No primeiro protocolo, isolados

monoconidiais foram cultivados em placas de Petri de poliestireno (60 x 15 mm) contendo o meio de cultura Cenoura-ágar (CA) e incubados a 25 °C no escuro por sete dias. Após o período de incubação, foram transferidos 2 mL de uma solução de Tween 80 a 2,5% (v/v) na superfície da colônia e espalhada utilizando uma alça de Drigalski de modo a umedecer completamente o micélio. As culturas foram incubadas a 22-23 °C, sob luz constante, por aproximadamente 60 dias. Também foi feito o mesmo procedimento sem adição do Tween 80. O segundo protocolo consistiu em transferir os isolados para placas contendo o meio SNA (*synthetic nutrient-poor agar*) e tubos contendo meio completo (CM), incubados a temperatura ambiente e a 20 °C sob 12 horas de luz fluorescente combinada com 12 horas de escuro, por mais de 60 dias. Os testes foram repetidos, para a confirmação dos resultados.

3.3 Sequenciamento e análises filogenéticas

A extração de DNA foi realizada utilizando-se o tampão CTAB (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

A amplificação do fragmento do gene fator de alongação *1-α* dos isolados homotáticos foi realizada utilizando os *primers*: Ef-1 (forward; 5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') e Ef-2 (reverse; 5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') (O'DONNELL et al., 1998). Para a amplificação do fragmento da segunda maior subunidade da RNA polimerase (RPB2) foram utilizados os *primers* 5F2 (forward; 5'-GGGGWGAYCAGAAGAAGGC-3') e 7cR (reverse; 5'-CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT-3') (O'DONNELL et al., 2008). As reações de PCR foram realizadas no termociclador My Cycler™ (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). 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 de DNA foram sequenciados, nas direções senso e anti-senso, 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, 2012) e as sequências editadas foram comparadas com a base de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information - NCBI (2012), por meio da ferramenta BLAST. Sequências de referência correspondentes ao fator de alongação-1 α e RPB2 das espécies do FSSC, previamente depositadas no GenBank, também foram acrescentadas às análises. 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 pelo método de *Neighbor joining* através do programa Mega 5.

3.4 Teste de patogenicidade

Foi testada a patogenicidade dos isolados homotáticos de acordo com um protocolo adaptado de Hartman et al. (1997) de inoculação utilizando grãos de sorgo infectados. Foram também utilizados isolados heterotáticos de

referência para posterior comparação: *F. solani* f. sp. *curcubitae* (NRRL 22098), patogênico ao melão, *F. solani* f. sp. *pisi* (NRRL 22278), patogênico à ervilha e o isolado homotálico (BBA 64379) patogênico ao maracujá. As plantas utilizadas para o teste de patogenicidade foram maracujá (*Passiflora edulis*), berinjela (*Solanum melongena*), melão (*Cucumis melo*) e ervilha (*Pisum sativum*), todas susceptíveis e hospedeiras de *F. solani*.

O inóculo foi cultivado em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio BDA por sete dias, sob temperatura de 25 °C. Um disco de micélio, com aproximadamente 6 mm de diâmetro, foi retirado das colônias desenvolvidas e transferido para tubos de ensaio contendo 3 g de grãos de sorgo previamente autoclavados por duas vezes (60 minutos, a 121 °C, com intervalo de 24 h). Os tubos foram incubados à temperatura de 25 °C, por 15 dias. Para a inoculação foi adotado o seguinte procedimento: copos plásticos de 750 mL foram preparados com substrato Tropstrato-HA® previamente autoclavado. As covas de semeadura foram feitas com 4 cm de profundidade e ali foram colocados grãos de sorgo colonizados, sendo, em seguida, cobertos com uma camada de 2 cm de substrato.

A seguir, foram semeadas duas sementes de uma das plantas testadas. Em seguida outra camada do substrato com aproximadamente 2 cm que encobriu as sementes. Os copos foram mantidos em casa de vegetação por cinco semanas. As testemunhas foram preparadas com sementes de sorgo não inoculadas. Os tratamentos (isolados) foram arranjados em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Para avaliação, foi realizada análise descritiva da presença ou da ausência de sintomas. Os sintomas das plantas inoculadas com os isolados obtidos neste estudo foram comparados com os dos isolados de referência. O postulado de Koch foi completado por meio do re-isolamento dos isolados inoculados.

3.5 Caracterização morfológica

Os isolados foram cultivados em meio BDA (batata-dextrose-agar) para observação da taxa de crescimento, pigmentação da colônia e formação do micélio aéreo, após quatro dias de incubação a 25 °C no escuro. Em SNA, após 10 a 14 dias de incubação a 20 °C, com fotoperíodo de 12 horas luz branca fluorescente, foram observadas as características micromorfológicas, como a presença ou não e coloração de esporodóquios; frequência, tamanho, formato e origem de microconídios e macroconídios; tipos de fiálides e de clamidósporos (AOKI et al., 2003).

As estruturas da fase sexuada foram caracterizadas, realizando medição do diâmetro do peritécio, comprimento e largura dos ascos e de ascósporos e verificação do número de septos. Foram tomadas 20 medidas de cada estrutura, as quais serviram para a posterior comparação com as outras espécies biológicas de *F. solani*, já descritas na literatura (COVERT et al., 2007; ROSSMAN; SAMUELS, 1999).

4 RESULTADOS

4.1 Teste de homotalismo

Os testes de homotalismo foram realizados com 238 isolados de *Fusarium solani*, seguindo dois protocolos e os resultados obtidos foram parecidos para ambos. Os peritécios apareceram nos três meios utilizados, no entanto o meio de cenoura agar induziu a formação de peritécios mais rápido que os demais meios. Dezesete isolados homotáticos foram encontrados, provenientes de algodão, crisântemo, pimentão, pimenta do reino, maracujá, erva de passarinho, batata e solo (Tabela 2).

Os peritécios foram formados entre 20 e 30 dias após a transferência dos isolados para placas de Petri com os meios avaliados, e a exsudação de ascósporos ocorreu por volta de 10 dias após a formação dos peritécios.

|

Tabela 2 Isolados identificados como homotáticos no teste de homotalismo

| ^a CML | Espécie | Substrato | Origem geográfica |
|------------------|------------------|---------------------------|------------------------|
| 46 | <i>F. solani</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | Sta Rita de Caldas, MG |
| 48 | <i>F. solani</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | Muzambinho, MG |
| 576 | <i>F. solani</i> | <i>Gossypium hirsutum</i> | Planaltina, DF |
| 582 | <i>F. solani</i> | <i>Chrysantemum</i> sp. | Holambra, SP |
| 1346 | <i>F. solani</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | Alfenas, MG |
| 1746 | <i>F. solani</i> | <i>Phoradendron</i> sp. | Lavras, MG |
| 2025 | <i>F. solani</i> | Solo | Amazônia |
| 2050 | <i>F. solani</i> | <i>Coffea arabica</i> | Lavras, MG |
| 2053 | <i>F. solani</i> | Solo | Amazônia |
| 2054 | <i>F. solani</i> | Solo | Amazônia |
| 2055 | <i>F. solani</i> | <i>Capsicum annuum</i> | Lavras, MG |
| 2183 | <i>F. solani</i> | <i>Passiflora edulis</i> | Jaíba, MG |
| 2194 | <i>F. solani</i> | <i>Piper nigrum</i> | Nilo Peçanha, BA |
| 2195 | <i>F. solani</i> | <i>Piper nigrum</i> | Ituberá, BA |
| 2198 | <i>F. solani</i> | <i>Piper nigrum</i> | Ituberá, BA |
| 2199 | <i>F. solani</i> | <i>Piper nigrum</i> | Ituberá, BA |
| 2203 | <i>F. solani</i> | <i>Piper nigrum</i> | Ituberá, BA |
| Total: 17 | | | |

^a Abreviação para Coleção Micológica de Lavras

4.2 Análise Filogenética

A partir dos 17 isolados homotáticos, foram geradas árvores filogenéticas utilizando as regiões parciais que codificam a região genômica fator de alongação 1- α (Figura 1) e RPB2 (Figura 2); e também uma árvore com a combinação das duas regiões gênicas (Figura 3). As relações filogenéticas

obtidas para as demais espécies filogenéticas do complexo *Fusarium solani* foram congruentes com as descritas anteriormente (O'DONNELL, 2000; O'DONNELL et al., 2008).

Os isolados homotáticos obtidos de diversas plantas e de diferentes regiões do país pertencem ao Clado 3 do FSSC (O'DONNELL, 2000). A árvore gerada com sequências parciais do gene TEF, evidencia um grupo monofilético composto por seis isolados homotáticos, de diferentes origens e substratos com um suporte estatístico (80% de bootstrap). Este grupo monofilético contém também os isolados homotáticos de *Fusarium striatum* (MAFF 237668, MAFF 240020, MAFF 238974) descritos por Aoki, Scandiani e O'Donnell (2010), o isolado BBA 64379, identificado como "*Nectria ipomoeae*" (NIRENBERG; BRIELMAIER-LIEBETANZ, 1996) e também o isolado homotático NRRL 20101, identificado como *F. striatum* (O'DONNELL, 2000) (Figura 1). Nove isolados ficaram distribuídos em 3 grupos filogenéticos dentro do clado 3. Nenhuma correlação foi observada entre o substrato de origem e a posição filogenética dos isolados. Os isolados CML 576, oriundo do algodão, e CML 2194, obtido de pimenta do reino, agruparam-se ao isolado heterotático CML 1833, obtido da soja, embora sem suporte de bootstrap. O isolado CML 2054 formou grupo monofilético com isolados de *F. pseudensiforme* (FRC S1834) e *F. ambrosium* (NRRL 22354). Quatro isolados homotáticos (CML 1746, 1346, 46 e 2195) formaram um grupo monofilético irmão àquele contendo isolados que constituem a *mating populations* de *F. solani* MP-III, MP-VI e MP-VII, embora sem suporte estatístico significativo.

A árvore filogenética obtida com sequências parciais do gene RPB2 agrupou todos os isolados homotáticos de *F. solani* deste estudo em um único grupo monofilético (74 % de bootstrap) junto ao isolado de "*Nectria ipomoeae*" BBA 64379 (Figura 2).

Na análise filogenética combinada dos genes TEF e RPB2 os isolados CML 1346 e CML 1746 formaram um grupo monofilético próximo dos isolados representativos das *mating populations* MPV e MPVI. O restante dos isolados formou um grupo monofilético junto aos isolados NRRL 20101 de *Fusarium striatum* e de NRLL 22147 de “*Nectria ipomoeae*”, porém sem suporte estatístico significativo (Figura 3).

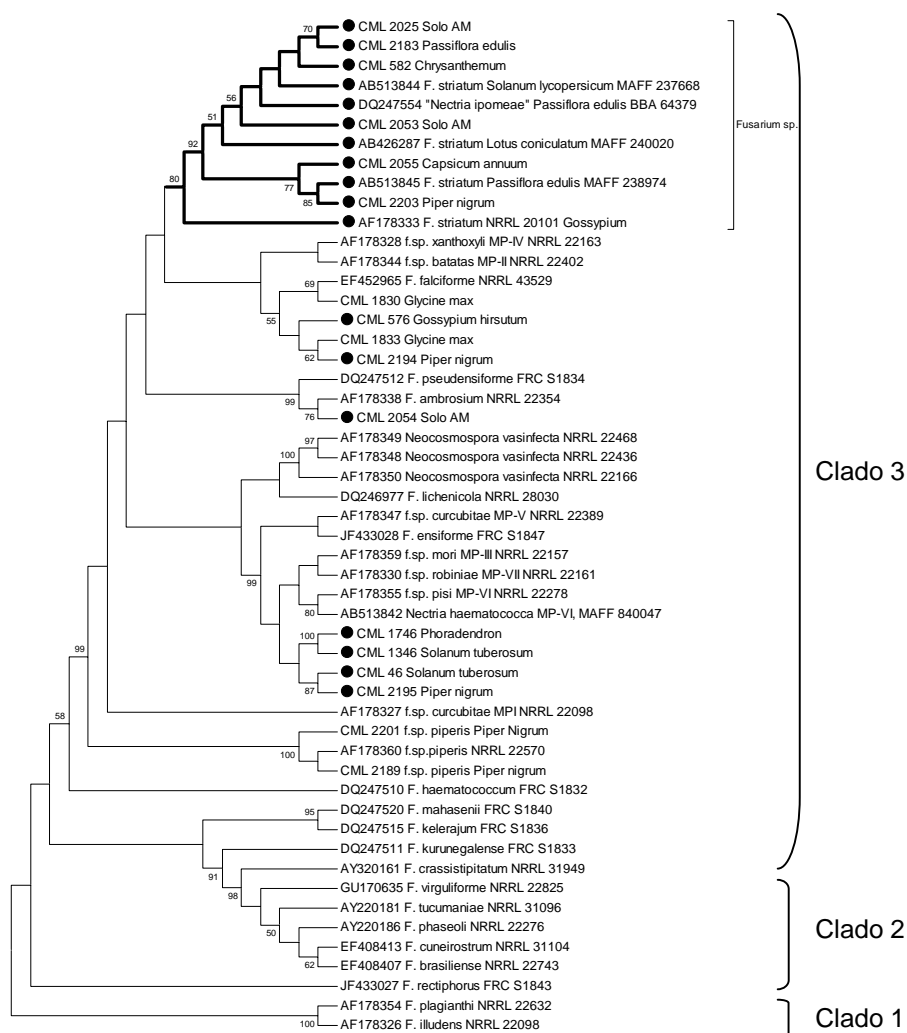


Figura 1 Árvore filogenética de neighbor joining para o gene *TEF-1a* de espécies do complexo *Fusarium solani*

Nota: O símbolo (•) ao lado do código do isolado indica que este é homotático. Os valores de *bootstrap* (1000 repetições) são indicados em porcentagem acima dos internódios. A árvore tem como raiz *Nectria plagianthi* e *Nectria illudens*. MP= *Mating populations* (I-VII) de acordo com Matuo e Snyder (1973); f.sp.= *forma especialis*. Abreviações das coleções: CML= Coleção Micológica de Lavras; AF; AY; DQ; JF; AB; EF= código das sequências obtidas do GenBank.

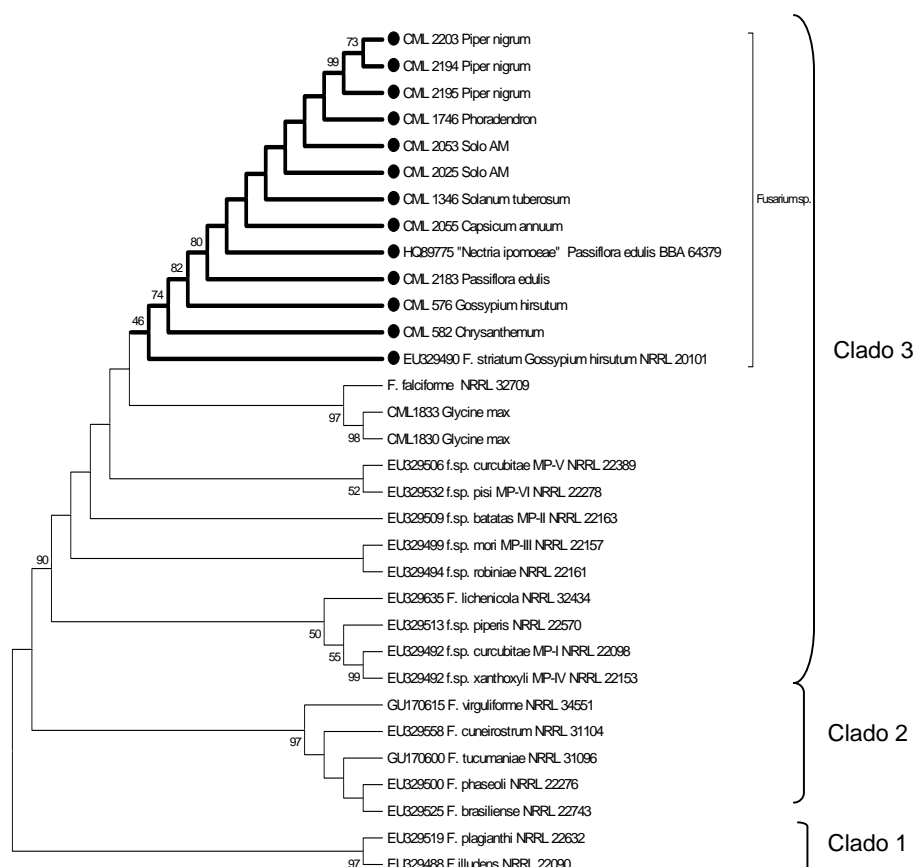


Figura 2 Árvore filogenética de neighbor joining para o gene RPB2 de espécies do complexo *Fusarium solani*

Nota: O símbolo (*) ao lado do código do isolado indica que este é homotático. Os valores de *bootstrap* (1000 repetições) são indicados em porcentagem acima dos internódios. A árvore tem como raiz *Nectria plagianthi* e *Nectria illudens*. MP= *Mating populations* (I-VII) de acordo com Matuo e Snyder (1973); f.sp.= *forma especialis*. Abreviações das coleções: CML= Coleção Micológica de Lavras; AF; AY; DQ; JF; AB; EF= código das sequências obtidas do GenBank.

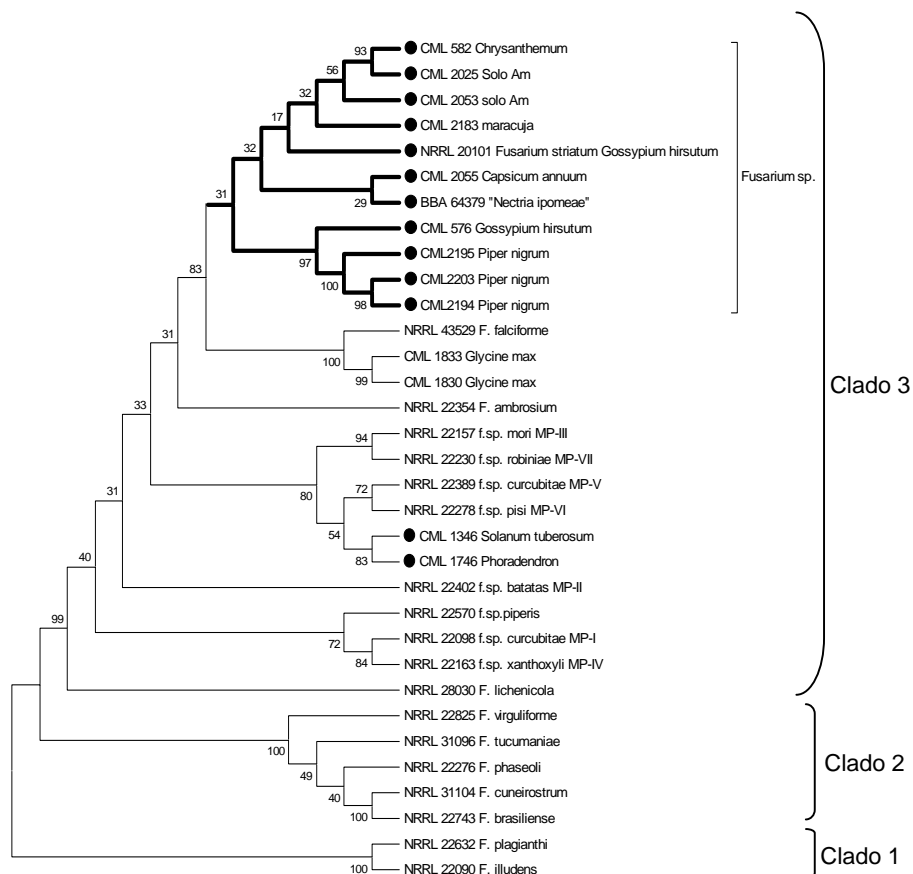


Figura 3 Árvore filogenética de neighbor joining para os genes *TEF-1a* e *RPB2* de espécies do complexo *Fusarium solani*

Nota: O símbolo (•) ao lado do código do isolado indica que este é homotático. Os valores de *bootstrap* (1000 repetições) são indicados em porcentagem acima dos internódios. A árvore tem como raiz *Nectria plagianthi* e *Nectria illudens*. MP= *Mating populations* (I-VII) de acordo com Matuo e Snyder (1973); f.sp.= *forma especialis*. Abreviações das coleções: CML= Coleção Micológica de Lavras; AF; AY; DQ; JF; AB; EF= código das sequências obtidas do GenBank.

4.3 Teste de Patogenicidade

Os isolados testados não induziram sintomas de podridão radicular assim como as testemunhas também não apresentaram sintomas de podridão de raiz. O isolado de referência isolado homotático BBA 64379, patógeno do maracujá, e os isolados heterotáticos NRRL 22098, patógeno do melão, e NRRL 22278, patógeno da ervilha, foram testados para comparação. Os isolados heterotáticos utilizados como controle negativo, patogênicos a ervilha e melão induziram sintomas de podridão radicular após cinco semanas da inoculação, em suas respectivas hospedeiras e foram realizados os isolamentos a partir das raízes. A identificação do fungo reisolado foi confirmada por meio de análise morfológica. Os isolados recuperados apresentaram características iguais aos dos isolados inoculados, completando assim os postulados de Koch (Figuras 4, 5, 6 e 7).

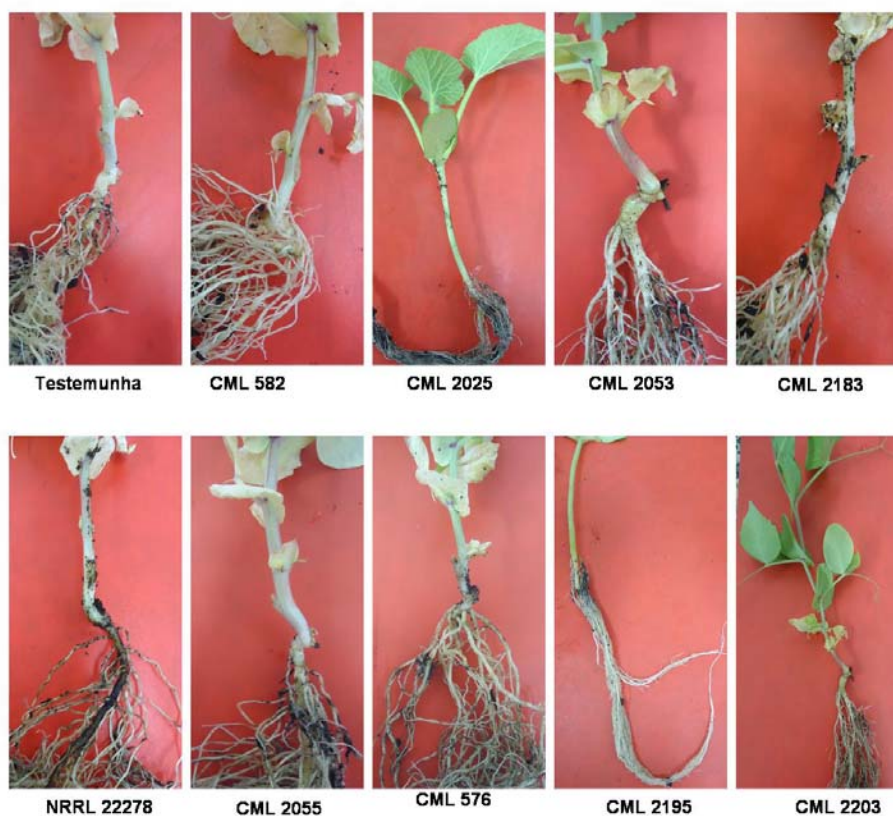


Figura 4 Plantas de *Pisum sativus* inoculadas com isolados homotáticos de *F.solani* sem sintoma de podridão radicular

Nota: Planta inoculada com o isolados *F. solani* f.sp. *pisi* NRRL 22278, com sintoma de podridão radicular.

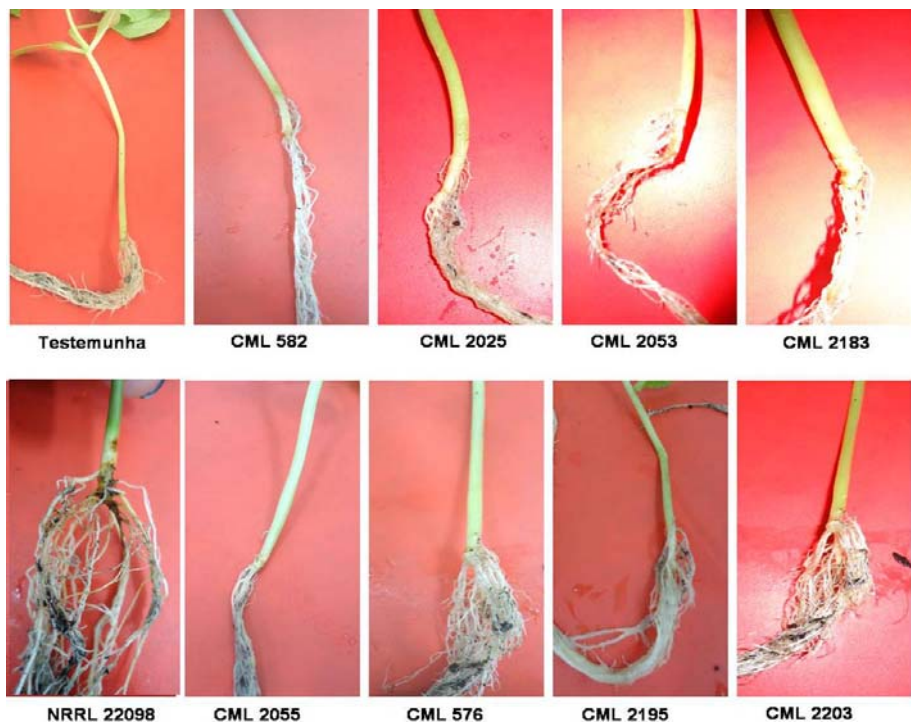


Figura 5 Plantas de *Cucumis melo* inoculadas com isolados homotáticos de *F.solani*, sem sintomas de podridão radicular

Nota: Planta inoculada com o isolados *F. solani* f.sp. *cucurbitae* NRRL 22098 com sintoma de podridão radicular.



Figura 6 Plantas de *Passiflora edulis* inoculadas com isolados homotáticos de *F. solani* sm sintomas de podridão radicular

Nota: Planta inoculada com o isolado "*Nectria ipomoeae*" BBA 64379 sem sintoma de podridão radicular.



Figura 7 Plantas de *Solanum melongena* inoculadas com isolados homotáticos de *F. solani* sem sintoma de podridão radicular

Nota: Planta inoculada com o isolado "*Nectria ipomoeae*" BBA 64379 sem sintoma de podridão radicular.

4.4 Caracterização morfológica dos isolados homotáticos

Fase anamorfa

Na caracterização morfológica feita em meio SNA, a maioria dos isolados apresentou características semelhantes, incluindo macro e microconídios agregados em falsas cabeças no micélio aéreo e macroconídios no esporodóquio. Dois tipos de macroconídios foram observados, o primeiro apresenta formato cilíndrico a falcado, sem a presença de célula pé evidente e o segundo tipo apresenta formato falcado, com célula pé evidente. Os macroconídios, quando observados no micélio aéreo apresentaram de 3 a 4 septos, ocasionalmente 5 septos, medindo 25-40 x 5-7,5 µm e quando observados no esporodóquio possuíam de 3 a 6 septos, medindo 58-75 X 5-7,5 µm (Tabela 3, Figura 8). Tais características tornam difícil a diferenciação de isolados homotáticos e heterotáticos, visto que são características compartilhadas por membros do FSSC (Figura 9).

Com base na célula conidiogênica dos isolados dois grupos foram observados. O primeiro grupo apresentou monofiáides longas e simples, medindo 75-130 x 5 µm, sendo composto pelos isolados CML 576, CML 2025, CML 2053, CML 2054 e CML 2055. O segundo grupo, compostos pelos isolados CML 46, CML 582, CML799, CML 1346, CML 2183, CML 1746, CML 2203, CML 2194 e CML 2195 apresentaram fiáides longas e ramificadas.

A coloração das colônias em meio BDA, após quatro dias de incubação no escuro, variou de branca a creme, e foi observada uma variação no diâmetro de crescimento entre 30 e 55 mm. Os clamidósporos não foram observados na maioria dos isolados e quando presentes, como nos isolados CML 576 e CML 2055, eram globosos e lisos, encontravam-se em arranjos simples ou aos pares, medido 10-15 x 10-7,5 µm.

Tabela 3 Características morfológicas das fases anamorfa e teleomorfa dos isolados de *F.solani* homotáticos utilizados no estudo (Medidas em µm) e isolados de Nirenberg e Brielmaier-Liebetanz (1996), Rossman e Samuels (1999) e Sherbakoff (1915)

| Espécies | ^c Macroconídio | | ^b Microconídio | | Peritécios | Ascospores | Ascósporos |
|--|---------------------------|-------|---------------------------|-------|------------|---------------------------|-------------------------------|
| | Comp/Larg | Septo | Comp/Larg | Septo | Comp/Larg | Larg/Comp | Larg/Comp |
| CML 2025 | 25-35 x 7,5 | 3 | 7,5-10 x 5 | 0-1 | 400 x 380 | 72 x 10 | 10 x 7,5 |
| CML 2054 | 28-40 x 7,5 | 3 | 7,5-10x5 | 0-1 | 330 x 270 | 60 x 7,0 | 12,5 x 5,0 |
| CML 1746 | 27,5-37,5 x 7,5 | 3 | - | 0-1 | 380 x 270 | 67 x 6,5 | 10 x 5,0 |
| CML 46 | 26-43 x 7,5 | 3 | 7,5-10 x 5-7,5 | 0-1 | 380 x 350 | 65 x 6,0 | 10 x 4,0 |
| CML 576 | 27,5-47,5 x 5-7,5 | 3 | 7,5-15 x 7,5 | 0-1 | 400 x 330 | 58 x 6,5 | 14 x 5,0 |
| CML 2194 | 30-60 x 7,5 | | 12,5 – 17,5 x 7,5 | 0-1 | 250 x 200 | 72 x 7,5 | 10 x 7,5 |
| <i>Fusarium striatum</i> Sherbakoff (1915) | 50 x 4,8 | 3 | 10 x 3,4 | 0-1 | - | - | - |
| <i>Nectria ipomoeae</i> Nirenberg e Brielmaier-Liebetanz (1996) | 49 x 5,2 | 3 | 12 x 5,0 | 0-1 | - | - | 65 x 8,0 |
| <i>Haematonectria ipomoeae</i> Rossman e Samuels (1999) | 49-64 x 4,8-5,9 | 3 | 9,8-14,5 x 4,5-5 | 0 | 300 | 60-70 x 8-10 ^d | 11,5-14 x 4-6 ^d |

^a Refere-se aos isolados utilizados neste estudo,

^b Macroconídio e microconídio do micélio aéreo, caracterizados em SNA a 20 °C / fotoperíodo de 12 horas.

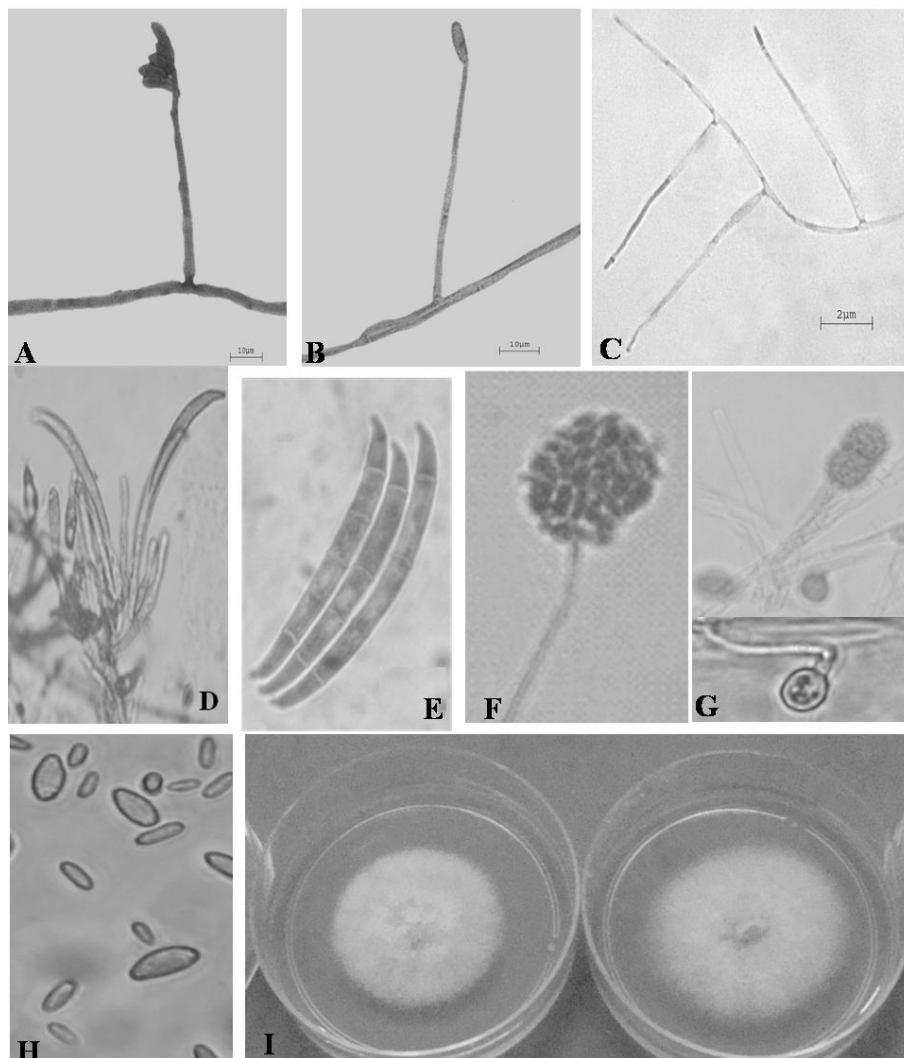


Figura 8 Anamorfo de *Fusarium solani*

Nota: (A) Macroconídeo produzido no micélio aéreo; (B) Fiálide longa; (C) Fiálides simples; (D) Esporodóquio; (E) Macroconídeo produzido no micélio aéreo; (F) Microconídios em falsas cabeças; (G) Clamidósporos; (H) Microconídios e (I) Taxa de crescimento.

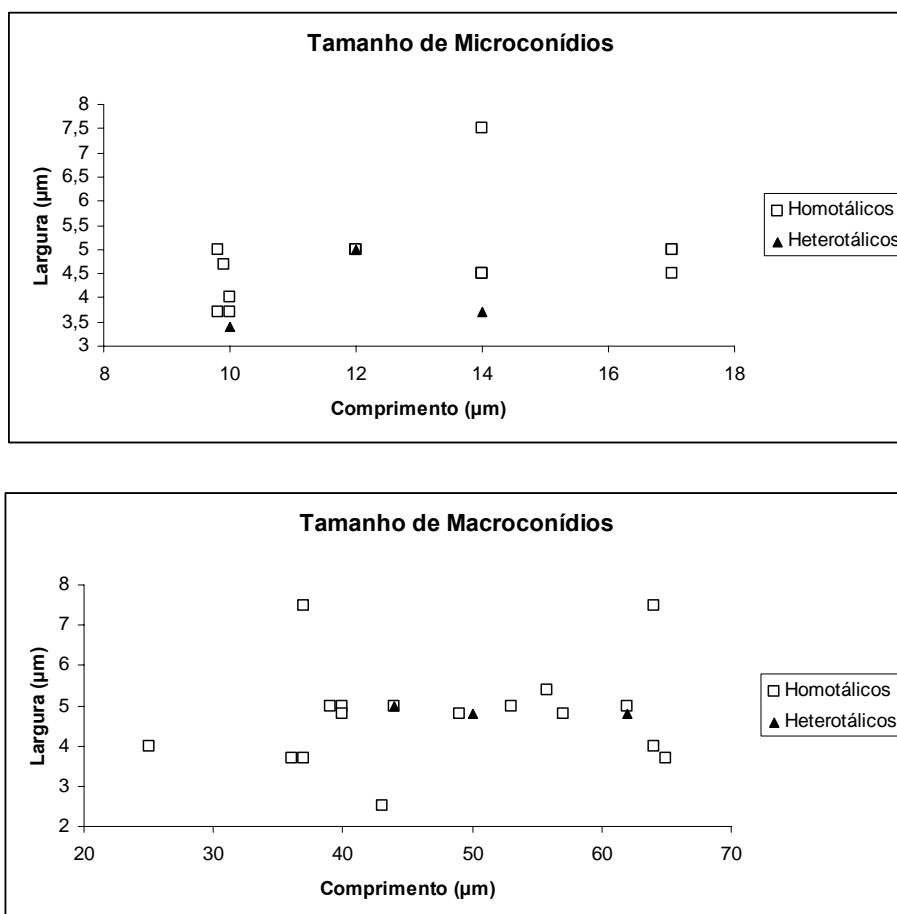


Figura 9 Comprimento e largura (μm) de microconídios com 0-1 septos e de macroconídios com 3-5 septo, avaliados após 10-14 dias de incubação em SNA a 20 °C e fotoperíodo de 12 horas

Nota: (▲) Isolados heterotáticos e (□) Isolados homotáticos de *F. solani*.

Fase teleomorfa

Todos os isolados apresentaram formação abundante de peritécios vermelhos, solitários e agrupados, subglobosos a piriformes, medindo 350-460 x 290-380 μm . Os ascos possuem formato cilíndrico ou clavado, contendo oito ascósporos, medindo 52-72 x 10-12 μm . Os ascósporos são hialinos, de formato elipsóides, com um septo e estriados, medindo 10-15 x 7,5 μm (Tabela 3; Figura 10). As características morfológicas da fase sexuada de isolados homotáticos e heterotáticos apresentam diferenças muito discretas, sendo insuficientes para a distinção destes (Figura 11).

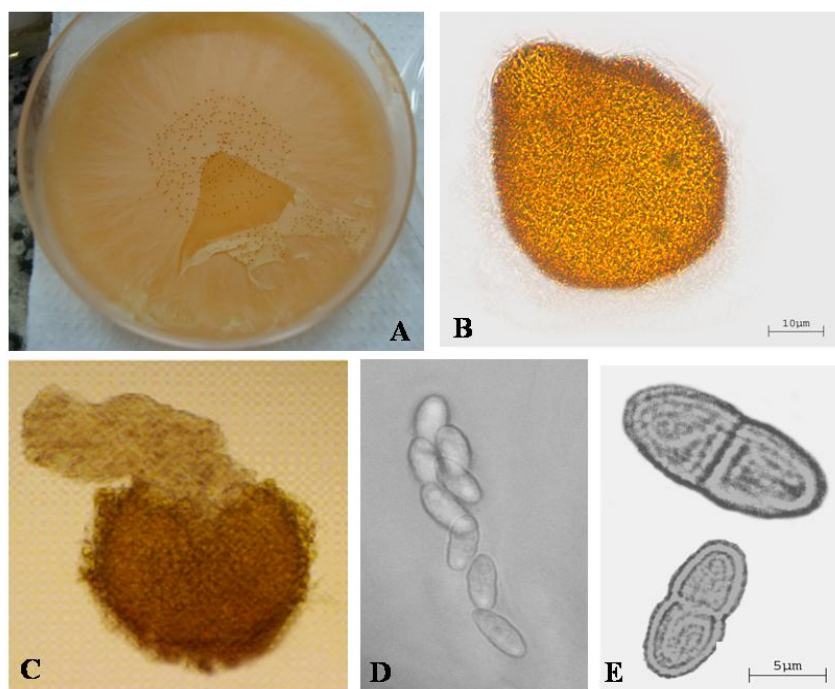


Figura 10 Teleomorfo de *Fusarium solani*

Nota: (A) Monocultura com peritécios, em placa com meio de cenoura; (B) Peritécio laranja avermelhado e globoso; (C) Peritécio exsudando ascósporos; (D) Asco contendo oito ascósporos; (E) Ascósporos.

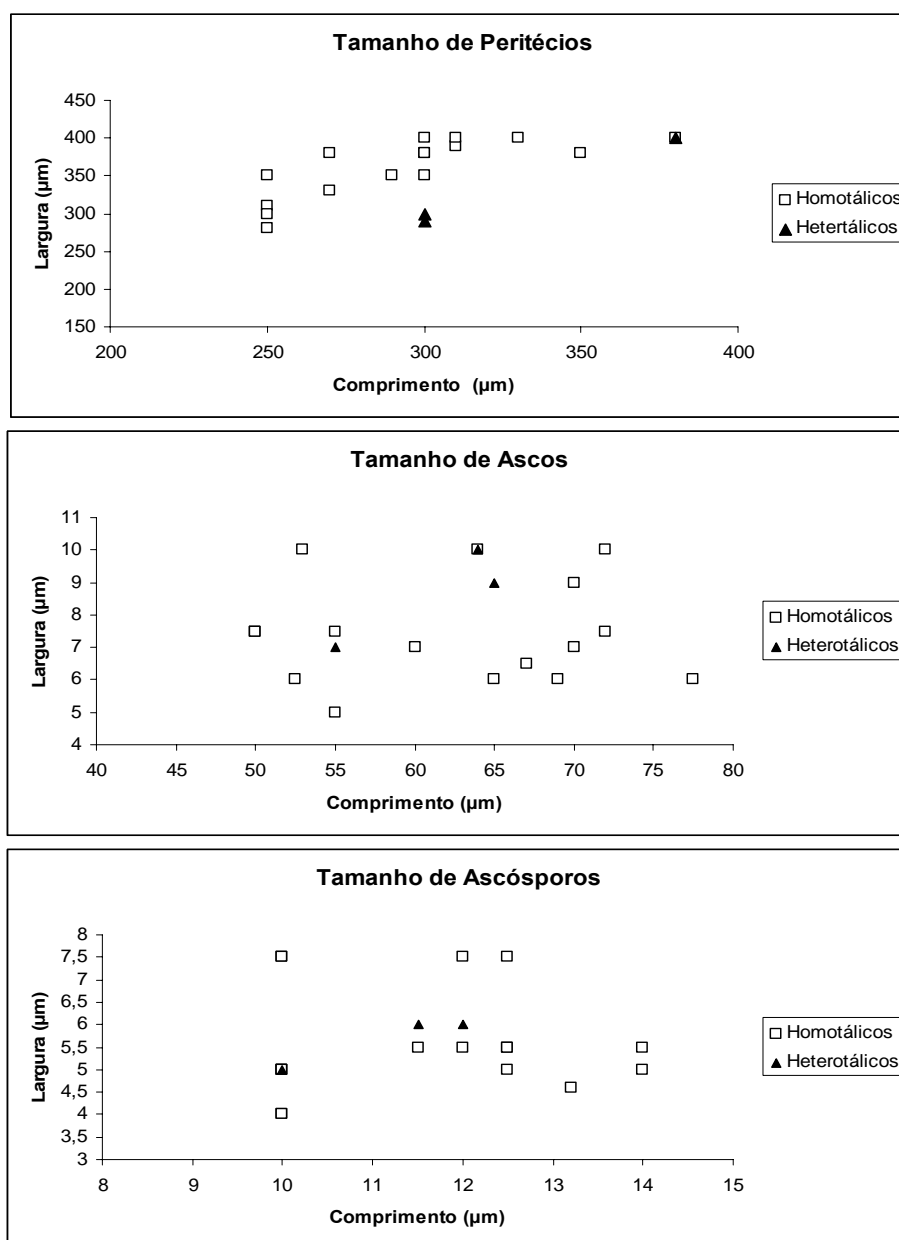


Figura 11 Comprimento e largura (μm) de peritécios, ascos e ascósporos obtidos após testes de homotalismo

Nota: (\blacktriangle) Isolados heterotáticos e (\square) Isolados homotáticos de *F. solani*.

5 DISCUSSÃO

Considerando que foram analisados 238 isolados do tipo *Fusarium solani*, quanto à morfologia e comportamento reprodutivo. Destes, somente 17 isolados mostraram-se homotáticos e foram testados quanto à patogenicidade e filogenia baseada nas sequências parciais dos genes TEF e RPB2.

Fusarium solani é o agente causal de doenças em diversas plantas, como a podridão vermelha da raiz da soja, murcha do maracujazeiro e fusariose da pimenta do reino (ALBUQUERQUE; FERRAZ, 1976; BUENO et al., 2010; O'DONNELL, 2000). Na maioria dos casos, as populações de *F. solani* patogênicas são heterotáticas ou não possuem teleomorfo conhecido (PLOETZ, 2006). No teste de patogenicidade do presente estudo, os isolados homotáticos não foram patogênicos a nenhuma das plantas testadas. Resultados semelhantes já haviam sido observados por Matuo e Snyder (1973), que caracterizaram os isolados homotáticos de *F. solani* oriundos do Japão e Estados Unidos como sendo saprofitos. Um caso semelhante acontece com *Fusarium decemcellulare* (teleomorfo *Albonectria rigdiuscula*) que é o agente causal da malformação, super brotamento e galhas do cacaueteiro (*Theobroma cacao*), mangueira (*Mangifera indica*) e cafeeiro (*Coffea arabica*). As linhagens homotáticas e heterotáticas de *F. decemcellulare* estão associadas ao cacaueteiro, porém, somente isolados heterotáticos foram descritos como patogênicos (PLOETZ, 2006).

O isolado de referência BBA 64379, homotático, que no trabalho de Nirenberg e Brielmaier-Liebetanz (1996) havia sido patogênico ao maracujá e berinjeleira, no presente estudo não induziu sintomas de podridão radicular nas plantas nas condições testadas. Portanto acredita-se que o método de inoculação de corte de raiz utilizado por Nirenberg e Brielmaier-Liebetanz (1996), pode ter sido muito drástico, levando isolados não patogênicos a colonizar a área

lesionada e conseqüentemente obtendo um resultado falso positivo. Existem também outras possibilidades, como: o isolado pode ter-se degenerado e perdido a capacidade de causar doença, uma cultivar diferente da utilizada pelos autores.

O teleomorfo de *Fusarium solani* homotático é amplamente distribuído em solos com capacidade saprofítica elevada (PLOETZ, 2006). Sua capacidade parasitária e patogênica não foi comprovada. Os dados obtidos neste estudo fornecem evidências de que os isolados homotáticos não são patogênicos e representam uma espécie filogenética distinta dentro do Complexo *Fusarium solani*. Há sem dúvida, novos Táxon em *Fusarium*, bem como novas doenças que aguardam a descoberta. Mais trabalhos em patossistemas tropicais se justificam, uma vez que podem revelar muito sobre a evolução de patógenos de plantas, endófitos e saprofitas.

Fusarium striatum é o nome dado aos isolados homotáticos de '*Fusarium solani*', cujo teleomorfo é "*Nectria ipomoeae*" (NIRENBERG; BRIELMAIER-LIEBETANZ, 1996; ROSSMAN; SAMUELS, 1999). Porém, a descrição original de *F. striatum* por Sherbakoff (1915) foi realizada com base apenas nas características morfológicas da fase anamórfica, a partir de isolados oriundos de *Solanum tuberosum*. McClure (1951) relatou a fase sexuada de *F. solani* f. sp. *batatas*, heterotático, patogênica a *Ipomoea batatas* e atribuiu o nome de *Hypomyces ipomoeae* ao teleomorfo. Nas análises filogenéticas realizadas por O'Donnell (2000), *Fusarium striatum* (NRRL 20101) considerado homotático, não se agrupou com outros isolados homotáticos nem com *F. solani* f. sp. *batatas*, sugerindo que seria algo diferente.

Com base nos resultados do presente estudo no qual foram utilizadas sequências dos isolados de *F. striatum* (NRRL 20101) e *F. striatum* / *Nectria ipomoeae* de Nirenberg e Brielmaier-Liebetanz (1996) (BBA 64379), e *F. solani* f. sp. *batatas* (NRRL 22402 / BBA 64954), estes não agruparam. A maioria dos isolados homotáticos estudados agrupou-se com o isolado homotático de

Nirenberg e Brielmaier-Liebetanz (1996) (BBA 64379) do maracujá, e os isolados homotáticos de tomate, maracujá e *Lotus corniculatum* do Japão (AOKI; SCANDIANI; O'DONNELL, 2010). Esses resultados demonstram a inconsistência da identificação de espécies baseadas somente em características morfológicas e dos nomes empregados. O gene TEF no presente estudo mostrou que a maioria dos isolados homotáticos estudados formam um grupo monofilético com o isolado homotático de *F. striatum* / *Nectria ipomoeae* BBA 64379 (NIRENBERG; BRIELMAIER-LIEBETANZ, 1996), oriundo do maracujá, além de outros isolados homotáticos obtidos de planas de tomate, maracujá e *Lotus corniculatum* no Japão (AOKI; SCANDIANI; O'DONNELL, 2010). Neste grupo monofilético encontra-se o isolado de *F. striatum* (NRRL 20101) *sensu stricto*, caracterizado como homotático por O'Donnell (2000). Isso indica que *F. striatum sensu lato* corresponde a um grupo monofilético, embora provavelmente contenha mais de uma espécie filogenética (Apêndice C, Figura 3). *F. solani* f. sp. *batatas* (NRRL 22402 / BBA 64954) não se agrupou com os isolados de *F. striatum*, mostrando que esta linhagem heterotática é um grupo distinto. Assim como no trabalho de O'Donnell (2000), alguns isolados homotáticos do presente trabalho, estão distribuídos no clado 3.

Os isolados homotáticos obtidos são provenientes de vários substratos como: solo da Amazônia, plantas de pimenta do reino, pimentão, algodão, crisântemo, erva de passarinho, batata e maracujá. Todos estes isolados apresentaram as mesmas características morfológicas como: tamanho e septação de macro e microconídios e célula conidiogênica do anamorfo e tamanho de peritécios, ascos e ascósporos e septação deste último, mesmo alguns tendo se posicionado em ramos diferentes do clado 3 de FSSC (Tabela 3). A inexistência de marcadores morfológicos para membros de FSSC pode ocultar a real diversidade de FSSC, assim como já observado por O'Donnell (2000).

Muitas vezes, apenas uma característica fácil de reconhecer foi usada para classificação de fungos nos séculos 19 e início do 20. Com o auxílio de ferramentas moleculares é possível determinar as relações entre fungos com base em sequências moleculares o que acelera o processo de classificação e nomenclatura dos fungos (ROSSMAN; SAMUELS, 1999). Os dados de análise filogenética e patogenicidade poderiam ser usados para propor uma nova espécie homotática de *Fusarium*. Visto que todos os nove isolados homotáticos que representam a nova espécie dentro do complexo *Fusarium solani* compartilham as características morfológicas do anamorfo e teleomorfo.

6 CONCLUSÕES

A maioria dos isolados homotáticos representa uma espécie filogenética distinta dentro do complexo *Fusarium solani*.

Os isolados homotáticos estudados não induzem sintomas de podridão radicular em plantas de ervilha, berinjela, maracujá e melão e supõe-se que estão associados a plantas como saprofitas, endófitos ou oportunistas.

A resolução do gene RPB2 foi inferior à resolução do gene TEF.

Não foram detectados marcadores morfológicos para distinguir a população de homotáticos dentro do FSSC.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, F. C.; FERRAZ, S. Características morfológicas e fisiológicas de *Nectria haematococca* f.sp. *piperis* e sua patogenicidade a pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). **Experientiae**, Viçosa, MG, v. 22, p. 133-151, 1976.
- AOKI, T. et al. Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex – *F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. **Mycologia**, New York, v. 95, n. 5, p. 660-684, Feb. 2003.
- AOKI, T.; O'DONNELL, K.; SCANDIANI, M. M. Sudden death syndrome of soybean in south America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. **Mycoscience**, Tokyo, v. 46, n. 4, p. 162-183, Jan. 2005.
- AOKI, T.; SCANDIANI, M. M.; O'DONNELL, K. Phenotypic, molecular phylogenetic, and pathogenetic characterization of *Fusarium crassistipitatum* sp. nov., a novel soybean sudden death syndrome pathogen from Argentina and Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, n. 1, p. 7-16, Jan. 2010.
- BLAKESLEE, A. F. Sexual reproduction in the *Mucorinae*. **Proceeding of National Academic Science of the United States America**, Washington, v. 40, p. 205-319, 1904.
- BOOTH, C. **The genus *Fusarium***. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 327 p.
- BUENO, C. J. F. et al. Comportamento do maracujazeiro amarelo, variedade afruec, ante uma população de *Fusarium solani*, agente causal da podridão do colo. **Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 533-537, Sept. 2010.
- COVERT, S. F. et al. Sexual reproduction in the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium tucumaniae*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, n. 6, p. 799-807, Dec. 2007.
- DOBZHANSKY, T. Mendelian populations and their evolution. **American Naturalist**, Chicago, v. 84, p. 401-418, 1950.

GERLACH, W.; NIRENBERG, H. **The genus *Fusarium***: a pictorial atlas. Berlin: Biologie Bundesanst für Land-u Forstwirtschaft, 1982. 406 p.

HARTMAN, G. H. et al. Germplasm evaluation of *Glycine max* for resistance to *Fusarium solani*, the causal organism of sudden death syndrome. **Plant Disease**, Quebec, v. 81, n. 5, p. 515-518, May 1997.

HEPPERLE, D. **SeqAssem© Win32-version**: a sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Disponível em: <<http://www.sequentix.de>>. Acesso em: 10 mar. 2012.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Malden: Blackwell, 2006. 420 p.

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

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

NALIM, F. A. et al. New species from the *Fusarium solani* species complex derived from perithecia and soil in the Old World tropics. **Mycologia**, New York, v. 103, n. 10, p. 1302-1330, June 2011.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGICAL INFORMATION. **BLAST**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>>. Acesso em: 10 mar. 2012.

NIRENBERG, H. I.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York, v. 90, n. 3, p. 434-458, Nov. 1998.

NIRENBERG, H. I.; BRIELMAIER-LIEBETANZ, U. *Nectria ipomoeae* Halst., anamorph: *Fusarium striatum* Sherb., an *Passiflora edulis* Sims. **Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes**, Stuttgart, v. 48, p. 270-275, 1996.

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

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

_____. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceeding of National Academic Science of the United States America**, Washington, v. 95, n. 8, p. 2044-2049, Dec. 1998.

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

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

ROSSMAN, A. Y.; SAMUELS, G. J. **Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes)**. Wageningen: CBS, 1999. 248 p. (Studies Mycology, 42).

SAMUELS, G. J. A revision of the fungi formerly classified in *Nectria* subg. *Hyphonectria*. **Memoirs New York Botanical Garden**, New York, v. 26, p. 1-126, 1976.

SHERBAKOFF, C. D. *Fusaria* of potatoes. **University Agricultural Experimental Station Memoir**, Ithaca, v. 6, p. 86-270, 1915.

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, n. 10, p. 2731-2739, May 2011.

TAYLOR, J. W. et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 31, n. 1, p. 21-32, Mar. 2000.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 4673-4680, Sept. 1994.

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

ANEXO

ANEXO A - TABELA

Tabela 1 - Sequências depositadas no Genbank utilizadas na análise filogenética para o gene (TEF) Fator de alongação 1 α e (RPB2) Segunda maior subunidade da RNA polimerase

| Espécie | Coleção | ^dGenbank TEF | ^eGenbank RPB2 |
|---|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| <i>F. plagianthi</i> | ^a NRRL 22632 | AF178354 | EU329519 |
| <i>F. illudens</i> | ^a NRRL 22090 | AF178326 | EU329488 |
| <i>Fusarium virguliforme</i> | ^a NRRL 34551 | GU170635 | GU170615 |
| <i>Fusarium cuneirostrum</i> | ^a NRRL 31104 | EF408413 | EU329558 |
| <i>Fusarium tucumaniae</i> | ^a NRRL 31096 | AY220181 | GU170600 |
| <i>Fusarium phaseoli</i> | ^a NRRL 22276 | AY220186 | GU329500 |
| <i>Fusarium brasiliense</i> | ^a NRRL 22743 | EF408407 | EU329525 |
| <i>Fusarium striatum</i> | ^a NRRL 20101 | AF178333 | EU329490 |
| <i>F.solani</i> f.sp. <i>cucurbitae</i> MP-I | ^a NRRL 22098 | AF178327 | EU329489 |
| <i>F.solani</i> f.sp. <i>mori</i> MP-III | ^a NRRL 22157 | AF178359 | EU329493 |
| <i>F.solani</i> f.sp. <i>xanthoxyli</i> MP-IV | ^a NRRL 22163 | AF178328 | EU329492 |
| <i>F.solani</i> f.sp. <i>curcubita</i> MP-V | ^a NRRL 22389 | AF178340 | EU329506 |
| <i>F.solani</i> f.sp. <i>pisi</i> MP-VI | ^a NRRL 22278 | AF178355 | EU329532 |
| <i>F.solani</i> f.sp. <i>robiniae</i> MP-VII | ^a NRRL 22161 | AF178330 | EU329494 |
| <i>F.solani</i> f.sp. <i>piperis</i> | ^a NRRL 22570 | AF178360 | EU329513 |
| <i>F.solani</i> f.sp. <i>batatas</i> MP-II | ^a NRRL 22402 | AF178344 | EU329496 |
| <i>Fusarium lichenicola</i> | ^a NRRL 28030 | DQ246877 | EF470161 |
| <i>Fusarium ambrosium</i> | ^a NRRL 22354 | AF178338 | EU32504 |
| <i>Fusarium falciforme</i> | ^a NRRL 43529 | EF452965 | EF470004 |
| <i>Neocosmospora vasinfecta</i> | ^a NRRL 22468 | AF178349 | - |
| <i>Neocosmospora vasinfecta</i> | ^a NRRL 22436 | AF178348 | - |
| <i>Neocosmospora vasinfecta</i> | ^a NRRL 22166 | AF178350 | - |
| <i>Fusarium crassistipitatum</i> | ^b NRRL 31949 | AY320161 | - |
| <i>Nectria haematococca</i> | ^b MAFF840047 | AB513842 | - |
| <i>Fusarium striatum</i> | ^b MAFF237668 | AB513844 | - |
| <i>Fusarium striatum</i> | ^b MAFF240020 | AB426287 | - |

“Tabela 1, continuação”

| Espécie | Coleção | ^dGenbank TEF | ^eGenbank RPB2 |
|---------------------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| <i>Fusarium striatum</i> | ^b MAFF238974 | AB513845 | - |
| <i>Fusarium ensiforme</i> | ^c FRC S1847 | JF433028 | - |
| <i>Fusarium pseudoensiforme</i> | ^c FRC S1834 | DQ247512 | - |
| <i>Fusarium haematococcum</i> | ^c FRC S1832 | DQ247510 | - |
| <i>Fusarium mahasenii</i> | ^c FRC S1840 | DQ247520 | - |
| <i>Fusarium kelerajum</i> | ^c FRC S 1836 | DQ247515 | - |
| <i>Fusarium kurenegalense</i> | ^c FRC S1833 | DQ247511 | - |
| <i>Fusarium rectophorus</i> | ^c FRC S1843 | JF433027 | - |

^a NRRL = Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, EUA

^b MAFF = Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Tsukuba, Ibaraki, Japão

^c FRC S = Fusarium Research Center, Pennsylvania, EUA