



**ERICA SFALSIN**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E  
MOLECULAR DE *Fusarium decemcellulare*,  
AGENTE ETIOLÓGICO DA GALHA-FLORAL  
EM CACAUEIRO**

**LAVRAS – MG**

**2012**

**ERICA SFALSIN**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Fusarium  
decemcellulare*, AGENTE ETIOLÓGICO DA GALHA-FLORAL EM  
CACAUEIRO**

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

Orientador

Dr. Ludwig Heinrich Pfenning

**LAVRAS – MG**

**2012**

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

Sfalsin, Erica.

Caracterização morfológica e molecular de *Fusarium  
decemcellulare* agente etiológico da galha-floral do cacauzeiro / Erica  
Sfalsin. – Lavras: UFLA, 2012.

37 p.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning.

Bibliografia.

1. *Theobroma cacao*. 2. *Albonectria rigiduscula*. 3. Filogenia. 4.  
Fungos Fitopatogênicos. 5. Ascomycota. I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título.

CDD – 632.43

**ERICA SFALSIN**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Fusarium  
decemcellulare*, AGENTE ETIOLÓGICO DA GALHA-FLORAL EM  
CACAUEIRO**

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

APROVADA em 24 de fevereiro de 2012.

Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende      UFLA

Dr. Cristiano Souza Lima                      UFRPE

Dr. Ludwig Heinrich Pfenning

Orientador

**LAVRAS - MG**

**2012**

*Aos meus pais, Geraldo e Evani, por existirem em minha vida e me incentivar à  
conclusão dos meus estudos.*

*Aos meus irmãos, Eduardo Sfalsin e Eliana Sfalsin, pelo carinho e atenção de  
sempre.*

*Ao meu noivo, Henrique Beluti, pela compreensão e carinho de todos os dias.*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças e iluminar os meus caminhos.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao programa de Pós-Graduação em Fitopatologia e ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Ludwig H. Pfenning, pela orientação, disponibilidade, e amizade.

Ao professor Mário Lúcio pelo aprendizado e apoio.

Ao meu grande amigo, Dr. Bezerra, pelo carinho, apoio, disponibilidade de sempre, amizade e eterno aprendizado.

Aos pós-doctors, Dr. Lucas Magalhães de Abreu e Dr<sup>a</sup> Sarah Costa Guimarães, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho e pela amizade do dia a dia.

A todos da CEPLAC pelo apoio e disponibilidade nas coletas

A todos do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, pelo companheirismo e aprendizado.

A Filipe Sandin pela amizade e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos que serão para sempre, Katia, Juliana, Ana Karla, Davi, Iara e Douglas, pela convivência e momentos de alegria.

A todos os meus primos (as) e tios (as), que torceram por mim, em especial à tia Domingas, pelo incentivo e ajuda de sempre.

À D. Vilma, por me acalmar nos momentos de aflição e angústia.

A todos os amigos do NEFIT, pelo convívio, amizade, força e carinho.

A todos que, de uma forma ou de outra, possibilitaram a conclusão deste trabalho, a minha sincera gratidão.

## RESUMO

Este trabalho foi realizado com o propósito de gerar conhecimentos sobre a morfologia e biologia do fungo causador da galha floral do cacau e inferir a posição filogenética do patógeno. Foi realizada uma ampla coleção de isolados a partir de material vegetal de cacau com e sem sintomas de galha floral, e de plantas de outras famílias, nos estados do Amazonas, Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais. Isolados provenientes do México foram incluídos no estudo para fins de comparação. Os isolados foram submetidos à avaliação de marcadores morfológicos, testes de homotalismo para a indução da fase sexual em laboratório e análise filogenética com sequências parciais do gene fator de alongação-1 $\alpha$  (*tefl*). Os 49 isolados avaliados apresentaram marcadores morfológicos característicos de *F. decemcellulare*. No teste de homotalismo, cinco isolados produziram peritécios. A ocorrência e as características do teleomorfo são registrados pela primeira vez no Brasil. A análise filogenética das sequências do gene *tefl* deu indícios de que todos os isolados obtidos no Brasil pertencem à mesma espécie filogenética.

Palavras-chave: *Theobroma cacao*. Ascomycota. *Albonectria rigidiuscula*.

## ABSTRACT

The study aimed to generate knowledge about the morphology and biology of the fungus that causes the cacao flower cushion galls and to infer about the phylogenetic position of the pathogen. An extensive collection of isolates was made from cacao plant material with and without symptoms of flower galls, and plants of the other families in the states of Amazonas, Bahia, Espirito Santo and Minas Gerais. Isolates from Mexico were included for comparison. The isolates were evaluated for morphological markers, homothallism tests for induction of the sexual phase in the laboratory and molecular phylogenetic analysis with partial sequences of the gene elongation factor-1 $\alpha$  (*tef1*). The 49 isolates analyzed showed morphological markers characteristic of *F. decemcellulare*. In the homothallism test five isolates produced perithecia. The occurrence and characteristics of the teleomorph are reported for the first time in Brazil. Phylogenetic analysis of partial sequences *tef1* gave evidence that all of the isolates obtained in Brazil belong to the same phylogenetic species.

Keywords: *Theobroma cacao*. Ascomycota. *Albonectria rigidiuscula*.



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	9
2	ESTADO DA ARTE.....	11
2.1	Principais doenças do cacaueteiro no Brasil .....	11
2.2	Galha-floral do cacaueteiro .....	11
2.3	Etiologia.....	13
2.4	<i>Fusarium decemcellulare</i> em outras plantas .....	14
2.5	Comportamento sexual de <i>F. decemcellulare</i> .....	16
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	17
3.1	Obtenção dos isolados .....	17
3.1.1	Coleta do material vegetal e isolamento .....	17
3.2	Caracterização morfológica dos isolados .....	17
3.3	Teste de Homotalismo .....	18
3.4	Extração de DNA .....	18
3.5	Sequenciamento e análise filogenética .....	19
4	RESULTADOS .....	24
4.1	Obtenção dos isolados .....	24
4.1.1	Coleta do material vegetal e isolamento .....	24
4.2	Caracterização Morfológica .....	26
4.3	Teste de Homotalismo .....	26
4.4	Análise filogenética .....	27
5	DISCUSSÃO .....	29
6	CONCLUSÕES .....	32
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
	REFERÊNCIAS .....	34

## 1 INTRODUÇÃO

Entre as doenças que causam prejuízo na cultura do cacaueteiro, a vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Philips-Mora, é considerada a de maior importância no Brasil. Porém, existem outras doenças que podem afetar o cacaueteiro sem causar danos econômicos expressivos, mas podem representar uma ameaça potencial à cultura, caso sejam disseminadas e encontrem condições favoráveis para seu estabelecimento e desenvolvimento. A galha-floral, causada pelo fungo *Fusarium decemcellulare* Brick, é considerada fator limitante para produção em alguns países, mas no Brasil, a relevância econômica da galha-floral para a cultura do cacaueteiro ainda não foi devidamente avaliada. Existem evidências de que clones de cacaueteiro com boas características agrônômicas e resistência ao principal patógeno, *M. perniciosa*, apresentem suscetibilidade ao patógeno responsável pela galha-floral (OLIVEIRA; LUZ, 2005).

A galha-floral do cacaueteiro se caracteriza pelo intumescimento anormal das almofadas florais, ocupando os sítios de floração e frutificação que prejudica a produção, já que as inflorescências afetadas não produzem frutos (PLOETZ, 2006).

*F. decemcellulare*, teleomorfo *Albonectria rigidiuscula* (Berk. & Broome) Rossman & Samuels é um fungo pertencente ao Filo Ascomycota, Ordem Hypocreales e Família Nectriaceae. Esse fungo é considerado saprófita e também agente etiológico de doenças em espécies das famílias Anacardiaceae, Annonaceae, Malvaceae, Apocynaceae, entre outras, causando a morte de ponteiro, cancro, galha, podridão dos frutos e superbrotamento (ROSSMAN et al., 1999). *F. decemcellulare* também ocorre como endófito em plantas aparentemente sadias de cacaueteiro e de outras espécies vegetais e a provável

existência de populações patogênicas e não patogênicas precisa ser melhor estudada (ROSSMAN et al., 1999; MEIJA et al., 2008).

O presente trabalho foi realizado com o propósito de gerar conhecimentos sobre a morfologia e biologia do fungo causador da galha floral do cacauero e inferir sobre a sua posição filogenética. O objetivo geral do estudo foi caracterizar isolados de *F. decemcellulare* associados ao cacauero, por meio de análise morfológica, biológica e filogenética. Os objetivos específicos foram: i. coletar material vegetal de cacauero e de plantas de outras famílias nos estados do Amazonas, Bahia e Espírito Santo, obter culturas puras de *F. decemcellulare* e compor uma coleção representativa de isolados; ii. analisar e comparar marcadores morfológicos da espécie *F. decemcellulare*; iii. realizar testes de homotalismo e caracterizar o teleomorfo *A. rigidiuscula*; iv. inferir as relações filogenéticas de isolados de *F. decemcellulare*, utilizando sequências parciais do gene codificante do fator de alongação-1 $\alpha$ .

## **2 ESTADO DA ARTE**

### **2.1 Principais doenças do cacauero no Brasil**

A podridão-parda dos frutos ou podridão de *Phytophthora* permaneceu durante anos como a principal doença do cacauero, com estimativas de perdas de 20 a 30% da produção anual. Logo depois, com o aparecimento da “vassoura-de-bruxa” (*Moniliophthora perniciosa*), a “podridão-parda” passou para um segundo plano. As condições ambientais da região cacauera são favoráveis à “vassoura-de-bruxa”, a qual se disseminou rapidamente, atingindo proporções epidêmicas, provocando em um curto espaço de tempo sérios problemas econômicos e sociais na região cacauera da Bahia (OLIVEIRA; LUZ, 2005).

Para conter o avanço da vassoura-de-bruxa, o emprego de variedades resistentes e de alta produtividade tem sido a opção adequada. As primeiras pesquisas de melhoramento do cacauero para resistência à vassoura-de-bruxa, em Trinidad e no Equador, na década de 40, foram conduzidas com os clones SCA 6 e SCA 12 (BARTLEY, 1983).

Os híbridos originados do programa de melhoramento, resistentes à vassoura-de-bruxa, são cada vez mais utilizados e distribuídos pela CEPLAC, no entanto, alguns desses híbridos mostram-se susceptíveis à galha-floral do cacauero (OLIVEIRA; LUZ, 2005).

### **2.2 Galha-floral do cacauero**

A doença conhecida como galha-floral, galha da almofada floral, ou “buba floral” existe na maioria dos países produtores de cacau. Foi relatada pela primeira vez na República da Guiana em 1905. A ocorrência da doença foi posteriormente registrada na Nicarágua, Costa Rica, Colômbia, Papua-Nova

Guiné e Venezuela (WOOD; LASS, 1985). Na Venezuela foram identificados plantios com elevada incidência e severidade, onde cerca de 90% das plantas encontravam-se afetadas e com a produção praticamente nula (REYES, 1978). Atualmente a galha-floral está amplamente distribuída nos países produtores de cacau (PLOETZ, 2007). No Brasil, há registros da galha-floral na região Amazonica e no Sul da Bahia (OLIVEIRA; LUZ, 2005).

Os danos causados são de difícil avaliação, pois há variação no comportamento dos materiais genéticos em diferentes regiões. Atualmente, a doença manifesta-se com maior frequência, em função dos novos plantios e da clonagem de materiais genéticos os quais, embora resistentes à vassoura-de-bruxa, apresentam alguma susceptibilidade a essa doença. Esse fato foi registrado na Costa Rica, onde alguns clones de cacauero (UF) mostraram-se resistentes, enquanto outros apresentaram diferentes níveis de susceptibilidade (OLIVEIRA; LUZ, 2005).

O principal sintoma é caracterizado por hipertrofias as quais se manifestam tanto no tronco quanto nos galhos do cacauero, conhecidas como galhas de ponto verde, galha de botão, galha de disco ou, ainda, galha de leque (LAWRENCE; CAMPÊLO; FIGUEIREDO, 1991). O desenvolvimento das galhas ocorre nas almofadas florais, ocupando os sítios de floração e frutificação que prejudica a produção, uma vez que as inflorescências afetadas não produzem frutos (PLOETZ, 2006).

As galhas são formadas por inúmeras gemas que não se desenvolvem, permanecendo compactas, com a aparência de couve-flor, ligadas à planta por um pedúnculo curto e lenhoso. O tamanho varia normalmente entre 10 e 15 centímetros de diâmetro, porém já foram relatadas galhas com 48 cm de diâmetro e pesando três kg (PLOETZ, 2006).

Os tecidos internos à galha-floral apresentam coloração clara e textura macia, ramificando-se lateralmente a partir do pedúnculo central. As galhas

podem permanecer verdes, durante quatro a cinco meses e depois desse tempo começam a secar e adquirir uma coloração castanha. As galhas-florais parecem estar associadas à ativação das almofadas florais durante as etapas iniciais de produção (OLIVEIRA; LUZ, 2005).

### 2.3 Etiologia

A primeira indicação de que *F. decemcellulare* seja o agente causal de “galhas” em cacau foi relatada nos anos 60 em Gana (BRUNT; WHARTON, 1962). Logo depois, foi feito o primeiro isolamento do fungo de galhas-florais e, também, a observação da ocorrência de peritécios em cascas apodrecidas de galhos de cacau, em plantações com sintomas da doença na América Central e América do Sul (ALEXANDER; COOK, 1965; SNYDER; THOMAS; WATSON, 1972). Ford, Bourret e Snyder (1967) inocularam isolados de *F. decemcellulare* em sementes de cacau e os sintomas de “galhas” apareceram nas mudas após 3 meses da inoculação, porém os autores não completaram postulados de Koch, pois não realizaram o re-isolamento do patógeno.

De acordo com Ploetz (2006), *F. decemcellulare* é considerado um patógeno pouco agressivo, sendo necessária ocorrência prévia de ferimentos para infecção. No patossistema *F. decemcellulare* – *Theobroma cacao* o fungo está associado com algumas pragas (*Distantiella theobromae* e *Sahlbergella singularis*) e fitopatógenos (*Lasiodiplodia theobromae* e *Phytophthora palmivora*) que podem facilitar a infecção do hospedeiro. Esse fungo também está relacionado com a seca de ponteiro no cacaueiro, resultado da interação com outros patógenos e pragas (HOLLIDAY, 1980; PLOETZ, 2006). O fungo foi encontrado em hastes de cacaueiros aparentemente saudáveis, indicando comportamento endofítico (MEIJA et al., 2008).

*Fusarium decemcellulare* (teleomorfo *Albonectria rigidiuscula* (sinônimo: *Calonectria rigidiuscula* (B. & Br.) Sacc.) é um fungo presente principalmente em regiões tropicais, podendo ser endófito ou patogênico a plantas dicotiledôneas. O gênero *Albonectria* pertence à família Nectriaceae, com quatro espécies conhecidas: *A. rigidiuscula* com anamorfo *F. decemcellulare*, *A. albosuccinea*, *A. verrucosa* e *A. albida*. Todas essas espécies possuem anamorfo em *Fusarium* (GUU; JU; HSIEH, 2007; ROSSMAN et al., 2001; SUMMERELL et al., 2010).

*A. rigidiuscula* tem como características o ascoma subgloboso, amarelo ou branco, que não muda de cor em solução de KOH e tem pequenas papilas na superfície ascomatal. Possui ascos clavados, normalmente com quatro a oito ascósporos, elipsoides, hialinos, com três septos e levemente estriados quando maduros, 22-28 x 7-10 µm (ROSSMAN et al., 1999). O anamorfo, *F. decemcellulare*, apresenta pigmentação rosa após três a cinco dias em BDA, possui micélio aéreo algodinoso onde são produzidos microconídios, que podem ser formados em cadeia ou em falsas cabeças, são hialinos, com formato oval, medindo 10-15 x 3-5 µm. Os macroconídios são formados em esporodóquios de coloração amarelada, são curvos, cilíndricos a fusoides com uma parede grossa, exceto para a ponta curvada e célula pé. Quando maduros apresentam de 7-10 septos e medem 55-130 x 6-10 µm (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

#### **2.4 *Fusarium decemcellulare* em outras plantas**

Existem registros da ocorrência de *F. decemcellulare* em espécies de famílias botânicas como Anacardiaceae, Annonaceae, Sterculiaceae, Apocynaceae, Malvaceae em que causam doenças conhecidas como seca de

ponteiro, cancro, galhas, cancro-do-ramo, ou superbrotamentos (LESLIE; SUMMERELL, 2006; ROSSMAN et al., 1999).

*F. decemcellulare* foi relatado, causando galhas em mangueira na Venezuela (MALAGUTI; REYES, 1964), México (ÂNGULO; VILLAPUDUA, 1982) e Estados Unidos (PLOETZ; VAZQUEZ; BENSCHER, 1996). No cerrado, esse fungo foi identificado como o agente causal da cancrose em fruteira-do-conde (*Annona squamosa* L.). A cancrose é uma das doenças de grande importância para a cultura da pinha no cerrado de Goiás, Minas Gerais e Distrito Federal (JUNQUEIRA et al., 2001). No Amazonas, *F. decemcellulare* é um dos principais problemas do guaranazeiro causando superbrotamento (GASPAROTO; PEREIRA; ARAÚJO, 2006). No município de Icoaraci no Pará, esse fungo está associado a superbrotamento nas inflorescências de limão-de-caiena (*Averrhoa bilimbi* L.) (BASTOS; SANTOS, 2001). Existem relatos de *F. decemcellulare*, causando cancrose em *Cateniformis cedrelinga* no Equador. Essa leguminosa ocorre naturalmente nas regiões amazônicas do Equador, Peru e Colômbia (LOMBARD et al., 2008).

Na Guiana, o patógeno foi transmitido para *Mangifera indica* (manga) e *Cajanus* sp.(guandu), utilizando-se inóculo proveniente de cacau (THOROLD, 1975). Em sementes de *Cucumis melo* L. (melão) e *Helianthus annuus* (girassol), inoculadas com suspensões de esporos de um isolado de *A. rigidiuscula* proveniente de cacau, foi possível a reprodução e o desenvolvimento de alguns sintomas da doença (HANSEN, 1966). Da mesma forma, foi observada a formação de pequenas galhas em *Vigna unguiculata* (feijão-fradinho) inoculadas com isolados do cacau, porém as galhas só foram formadas em plantas inoculadas nos brotos (BRUNT; WARTON, 1962).



## 2.5 Comportamento sexual de *F. decemcellulare*

Em cacauero, existem registros de isolados homotáticos e heterotáticos, porém apenas os heterotáticos foram considerados como responsáveis pela formação da galha-floral (REICHLE; SNYDER, 1964). Isolados obtidos de peritécios, formados em frutos apodrecidos de cacauero, mostraram-se homotáticos e não patogênicos (LAWRENCE; CAMPÊLO; FIGUEIREDO, 1991; PLOETZ, 2006). Porém, outros autores descrevem esse fungo apenas como homotático (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Ford, Bourret e Snyder (1967) observaram que isolados homotáticos apresentam quatro ascósporos em seus ascos e não são patogênicos enquanto que isolados heterotáticos apresentam de quatro a oito ascósporos e são patogênicos. Isolados de *F. decemcellulare*, provenientes da África e das Américas, mostraram-se sexualmente compatíveis, evidenciando que pertencem à mesma espécie biológica. Esses isolados causaram sintomas de galha-floral no cacauero (PLOETZ, 2007).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Obtenção dos isolados**

##### **3.1.1 Coleta do material vegetal e isolamento**

Coletas foram feitas em regiões produtoras de cacau dos estados do Amazonas, Bahia e Espírito Santo.

O isolamento do fungo foi realizado a partir de desinfestação superficial (etanol 70%, hipoclorito 2,5%) dos tecidos vegetais do cacauzeiro (SCHULZ; BOYLE, 2005). As culturas com morfologia típica de *F. decemcellulare* foram transferidas para placas de Petri, contendo meio SNA e a partir dessas foram obtidas culturas monospóricas. As culturas foram preservadas em água destilada esterilizada e armazenadas a 10°C, no escuro (CASTELLANI, 1939) e por criopreservação, a partir de suspensões de esporos em 15% glicerol, mantidas a -80°C (SMITH; ONIONS, 1994), na Coleção Micológica de Lavras (CML), Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA).

##### **3.2 Caracterização morfológica dos isolados**

Foi realizada a caracterização morfológica de 49 isolados. A caracterização foi realizada a partir de culturas monospóricas segundo Leslie e Summerell (2006). Os isolados foram transferidos e crescidos em placas de Petri, contendo meio de Batata Dextrose Agar (BDA) e incubados a 20°C, sob fotoperíodo de 12 horas com luz branca fluorescente, para observação da taxa de crescimento e morfologia das colônias. A pigmentação foi observada em tubos

de ensaio com o mesmo meio e sob as mesmas condições anteriores. As características micromorfológicas foram avaliadas em *Synthetic Nutrient-poor Agar* (SNA) a 20° C, sob fotoperíodo de 12 horas com luz branca fluorescente, em um período de 10 a 14 dias de incubação. Analisaram-se o tamanho, o formato e a septação dos conídios, a produção de microconídios em longas cadeias e falsas cabeças e a produção de macroconídios em esporodóquio, bem como a presença das monofalides, com auxílio de microscópio óptico.

### **3.3 Teste de Homotalismo**

Para realização do teste de homotalismo, micélio de culturas monospóricas dos 49 isolados foi transferido para placas com SNA e incubados até o aparecimento dos peritécios, nas seguintes condições: temperatura ambiente (±25°C) e totalmente no escuro, temperatura ambiente (±25°C) e fotoperíodo de 12 horas e sob temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12 horas. Após sete dias de incubação as culturas foram avaliadas diariamente para observar a presença de peritécios (Ford, Bourret e Snyder (1967)). Alguns isolados foram submetidos ao estresse com cortes realizados com estiletos nas culturas. Em todos os testes o período máximo de incubação foi de 45 dias. Foram realizadas duas repetições desse experimento para confirmação dos resultados.

### **3.4 Extração de DNA**

A extração de DNA foi realizada pelo protocolo de Leslie e Summerell (2006), adaptado pelo Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), utilizando o tampão CTAB. Os fungos foram cultivados em meio líquido, à base de extrato de malte 2%, por três dias,

em temperatura ambiente e sob agitação de 100 rpm. O micélio foi filtrado, macerado em nitrogênio líquido, transferido para microtubos de 1,5 mL, contendo tampão CTAB 2% e mantido em banho-maria, a 65°C, por 20 minutos. Foram adicionados 600 µL de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) à mistura, que foi centrifugada. A fase aquosa foi recuperada e a ela foram adicionados 400 µL de isopropanol gelado. A mistura permaneceu no freezer por 20 minutos e foi centrifugada. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado “*pellet*” foram adicionados 500 µL de etanol 70%. A suspensão foi centrifugada e o etanol sobrenadante descartado. O “*pellet*” foi seco em estufa a 60°C e o DNA ressuspenso em solução tampão TE 1x.

### **3.5 Sequenciamento e análise filogenética**

Foram utilizados 47 isolados de *F. decemcellulare*, oriundos do cacaueteiro e outros hospedeiros com base em diferentes regiões de coleta (Tabela 1), para o sequenciamento do fragmento do gene *tef1* (O'DONNELL; CIGELNIK; NIRENBERG, 1998; ZHAO; LUO; ZHUANG, 2010). Na análise foram utilizadas nove sequências do gene *tef1* como referência. Essas sequências foram adquiridas a partir do GenBank (Tabela 2).

Tabela 1 Isolados de *Fusarium decemcellulare*

<b>CML</b>	<b>Outro Código</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Origem</b>
CML 2237	ES 07	Cacaueiro – c/sintomas	Uruçuca, BA
CML 2238	ES 09	Cacaueiro – c/sintomas	Uruçuca, BA
CML 2057	ES14	Cacaueiro – c/sintomas	Ilhéus, BA
CML 2239	ES 15	Cacaueiro – c/sintomas	Ilhéus, BA
CML 2240	ES 16	Cacaueiro – c/sintomas	Ilhéus, BA
CML 2056	ES 17	Cacaueiro – c/sintomas	Uruçuca, BA
CML 2241 <sup>a</sup>	ES 19	Cacaueiro – c/sintomas	Uruçuca, BA
CML 2242	ES 20	Cacaueiro – s/sintomas	Ilhéus, BA
CML 2243	ES 22	Cacaueiro – s/sintomas	Ilhéus, BA
CML 2244	ES 24	Cacaueiro – s/sintomas	Ilhéus, BA
CML 2247	ES 35	Cacaueiro – c/sintomas	Sto. Amaro, BA
CML 2248 <sup>a</sup>	ES 39	Cacaueiro – s/sintomas	Sto. Amaro, BA
CML 2251	ES 43	Cacaueiro – s/sintomas	Brasil, AM
CML 2252	ES 44	Cacaueiro – c/sintomas	Linhares, ES
CML 2253	ES 45	Cacaueiro – s/sintomas	Brasil, AM
CML 2254	ES 46	Cacaueiro – s/sintomas	Brasil, AM
CML 2255	ES 47	Cacaueiro – s/sintomas	Brasil, AM
CML 2256	ES 48	Cacaueiro – c/sintomas	Linhares, ES
CML 2257	ES 49	Cacaueiro – s/sintomas	Brasil, AM
CML 2258	ES 52	Cacaueiro – c/sintomas	Linhares, ES
CML 2259	ES 54	Cacaueiro – c/sintomas	Linhares, ES
CML 2260	ES 56	Cacaueiro – s/sintomas	Brasil, AM
CML 2261	ES 57	Cacaueiro – c/sintomas	Linhares, ES
CML 2262	ES 51	Cacaueiro – c/sintomas	Linhares, ES
CML 2263	ES 50	Cacaueiro – c/sintomas	Linhares, ES
CML 2264	ES 21	Cacaueiro – s/sintomas	Uruçuca, BA
CML 2265	ES 03	Cacaueiro – c/sintomas	Ilhéus, BA
CML 2277	ES 53	Cacaueiro – c/sintomas	Linhares, ES
CML 2278	ES 60	Cacaueiro – c/sintomas	Linhares, ES
CML 2279	ES 55	Cacaueiro – c/sintomas	Linhares, ES
CML 2280	ES 58	Cacaueiro – c/sintomas	Linhares, ES
CML 1694		Cacaueiro	Ilhéus, BA
CML 2266	COL 92	Mangueira	Mexico
CML 2267	COL 09	Mangueira	México
CML 2268	COL 14	Mangueira	México
CML 2269	COL 26	Mangueira	México
CML 2270	COL 44	Mangueira	México
CML 2271	COL 91	Mangueira	México
CML 2272	COL 01	Mangueira	México

Tabela 1, continuação

CML	Outro Código	Hospedeiro	Origem
CML 2273	COL 12	Mangueira	México
CML 2274	COL 19	Mangueira	México
CML 2275	COL 28	Mangueira	México
CML 2276	COL 51	Mangueira	México
CML 2245	ES 32	Espatódea – c/sintomas	Lavras, MG
CML 2246	ES 33	Espatódea – c/sintomas	Lavras, MG
CML 2249	ES 40	Pimenta-do-reino	Brasil, BA
CML 2250 <sup>a</sup>	ES 41	Pimenta-do-reino	Brasil, BA
CML 800 <sup>a</sup>	KSU11411	-----	Marrocos
CML 38 <sup>a</sup>	CCT4048	Solo da Amazonia	Capitão Poço, PA

<sup>a</sup>Isolados homotáticos. Abreviações: CML = Coleção micológica de Lavras; COL = Colima, estado da coleta; ES = Erica Sfalzin, código pessoal do coletor; KSU = Kansas State University; CCT = Coleção de Culturas Tropical

Tabela 2 Sequências de referência utilizadas na análise filogenética

Espécie	<sup>a</sup> Código de acesso	Local	Acesso GenBank <sup>b</sup> tef1
<i>Fusarium decemcellulare</i> (depositado como <i>A.rigidiuscula</i> )	<sup>c</sup> HMAS 183508	China	HM054059
	<sup>c</sup> HMAS 183518	China	HM054060
	<sup>c</sup> HMAS 183135	China	HM054061
	<sup>c</sup> HMAS 183509	China	HM054062
	<sup>d</sup> CMW 18783		EU849670
	<sup>d</sup> CMW 18785		EU849671
<i>Haematonectria haematococca</i>	<sup>c</sup> HMAS 91771	China	HM054071
<i>Fusarium haematococcum</i>	<sup>e</sup> FRC S-1832	Sri Lanka	DQ247510

<sup>a</sup>Abreviações das coleções de culturas: HMAS: Herbarium of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China, NRRL: *National Centre for Agricultural Utilization Research*, Peoria, IL, USA. CMW: Coleção micológica de Mike Wingfield. FRC: *Fusarium Research Center* at Pennsylvania State University, Pennsylvania. <sup>b</sup>Sequências do gene *tef1* obtidas do GenBank, NCBI. <sup>c</sup> Zhao, Luo e Zhuang (2010) <sup>d</sup> Lombard et al. (2008) <sup>e</sup> Nalim et al. (2011)

Para amplificação e sequenciamento do fragmento do gene *tefl*, foram utilizados os *primers* Ef-1 (forward; 5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') e Ef-2 (reverse; 5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3'). As reações de PCR foram realizadas no termociclador My Cycler™ (BIO-RAD). As condições das reações de PCR foram as seguintes: (1) desnaturação, a 94°C, por 1 minuto; (2) seguido por 34 ciclos de desnaturação, a 94°C, por 30 segundos; (3) anelamento, a 62°C, por 45 segundos; (4) extensão, a 72°C, por 1 minuto e (6) extensão final, a 72°C, por 5 minutos (O'DONNELL; CIGELNIK; NIRENBERG, 1998).

O produto amplificado pela PCR foi purificado com o kit GenElute PCR Clean-up Kit (Sigma-Aldrich) e os fragmentos visualizados em transiluminador após eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium®).

O sequenciamento dos fragmentos gênicos foi realizado em sequenciador automático MEGA BACE®, no Laboratório de Genômica da Universidade Federal de Viçosa (UFV), nas direções senso e antissenso. No programa SeqAssem (HEPPERLE, 2004), os eletroferogramas do material sequenciado foram analisados visualmente e editados. As sequências geradas foram comparadas com o banco de dados GenBank do *National Center for Biotechnological Information* (NCBI), utilizando o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI, 2012). Sequências de referência correspondentes ao *tefl*, da espécie *F. decemcellulare*, previamente depositadas no GenBank, também foram acrescentadas às análises. As espécies *Haematonectria haematococca* e *Fusarium haematococcum* foram usadas como outgroup (Tabela 2). Alinhamentos múltiplos das sequências nucleotídicas foram gerados, utilizando-se a ferramenta CLUSTALW (THOMPSON et al., 1994), implementado pelo programa MEGA 5. Os alinhamentos foram corrigidos manualmente. A análise filogenética foi realizada pelo método de

*neighborJoining* utilizando o programa Mega 5 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004).



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Obtenção dos isolados

#### 4.1.1 Coleta do material vegetal e isolamento

As coletas foram realizadas em plantações de cacau dos estados do AM, BA e ES. Na BA e no ES foi observada grande incidência da doença nas áreas com os clones TSH1188 e CCN51, onde cerca de 85% das plantas encontravam-se afetadas pela galha-floral. No estado do AM não foram observadas galhas-florais, porém foi possível obter isolados de *F. decemcellulare* de tecidos aparentemente sadios.

Os sintomas observados foram hipertrofias nas almofadas florais, formando as galhas-florais (Figura 1G) que, depois de alguns meses, adquirem uma coloração castanha escura e apodrecem ainda na planta. Durante a coleta não foram observados peritécios do teleomorfo *A. rigidiuscula* nas galhas-florais nem na casca dos troncos de cacaueteiro.

Neste estudo foram utilizados 49 isolados de *Fusarium decemcellulare*. Destes, 32 estavam associados ao cacaueteiro, provenientes dos estados da Bahia, Espírito Santo e Amazonas, dois associados à pimenta do reino, dois da espatódea (Minas Gerais), um proveniente do Pará, 11 da mangueira, oriundos do México, Colima (MXCOL) cedidos pela Fungal Collection, Plant Pathology Laboratory, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo e o isolado de referência KSU11411 cedido por Dr. John Leslie (Kansas State University) (Tabela 1).

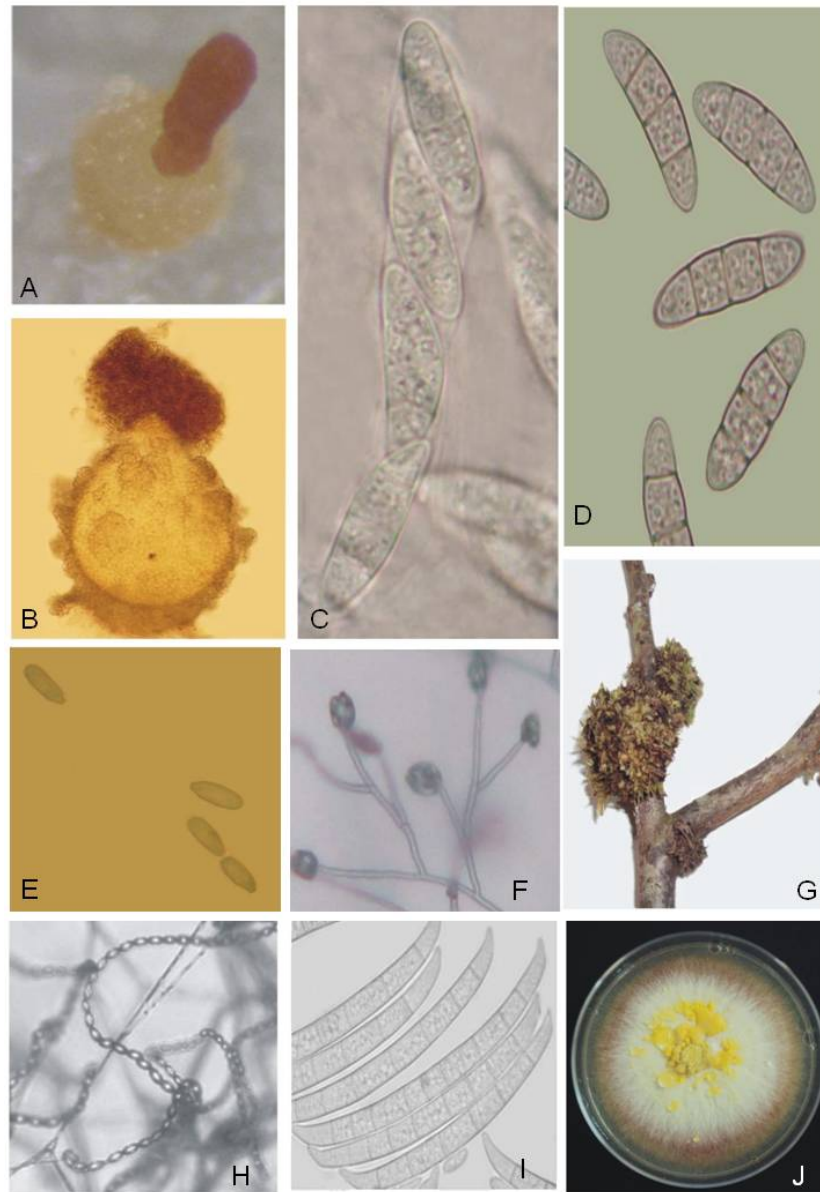


Figura 1 Caracteres morfológicos - (A-B) peritécio; (C) ascos com quatro ascósporos; (D) ascósporos com três septos; (E) microconídios; (F) falsas cabeças de microconídios; (G) galha-floral em hastes de cacauero; (H) cadeias de microconídios; (I) macroconídio; (J) isolado com pigmentação rosa e esporodóquio de coloração amarelada ao centro

## 4.2 Caracterização Morfológica

A caracterização morfológica foi realizada com 49 isolados. Todos os isolados apresentaram marcadores morfológicos típicos de *F. decemcellulare*, de acordo com Leslie e Summerell (2006) como: **microconídios** com formato oval, hialinos, sem septo, mas ocasionalmente com um septo, produzidos a partir do micélio aéreo em falsas cabeças ou em longas cadeias, comprimento variando de 7,9 a 10,8  $\mu\text{m}$  e largura variando de 2,5 a 4  $\mu\text{m}$ ; presença de **monofiálides**; **esporodóquios** de coloração amarelada foram observados em todos isolados; **macroconídios** produzidos em esporodóquio apresentaram formato curvo a cilíndrico, seis a dez septos, comprimento variando de 76 a 95  $\mu\text{m}$  e largura variando de cinco a seis  $\mu\text{m}$ , com célula apical arredondada e célula pé bem característica da espécie (Figura 1). Não foi observada a formação de clamidósporos e nem constatada a presença de morfotipos entre os isolados avaliados neste estudo.

O diâmetro médio das colônias dos 49 isolados deste estudo e do isolado de referência, após quatro dias de incubação sob fotoperíodo de 12 horas a 20°C, em BDA, variou de 16 a 20,5 mm. Em relação ao padrão de coloração das colônias, 31 isolados analisados apresentaram pigmentação rosa e 18 isolados não.

## 4.3 Teste de Homotalismo

Apenas os isolados CML 800, CML 38, CML 2241, CML 2248 e CML 2250 (Tabela 1) produziram peritécios a 20°C e fotoperíodo de 12 horas com luz branca fluorescente, com 35 – 45 dias de incubação. O isolado CML 2246, proveniente de espatódea com galha, produziu um protoperitécio (peritécio não-fértil) sob as mesmas condições descritas anteriormente. Estes isolados

apresentaram como característica comum a produção de pigmento rosa. Os isolados que foram submetidos ao estresse não produziram peritécios.

O teleomorfo *A. rigidiuscula* apresentou o ascoma subgloboso, creme, com pequenas papilas na superfície ascomatal. Os ascos clavados, com quatro ascósporos, elipsoides, hialinos, com três septos quando maduros, 22,5-27,5 x 7,5-10  $\mu\text{m}$  (Figura 1), assim como os isolados descritos por Rossman et al., 1999.

#### **4.4 Análise filogenética**

De acordo com as análises filogenéticas das sequências de *tef1* dos isolados de *F. decemcellulare*, oriundos de diferentes plantas hospedeiras e regiões geográficas distintas do Brasil e do México, todos os isolados formaram um grupo monofilético (98% de *bootstrap*) (Figura 2).

Porém, há indícios de que existam diferentes linhagens filogenéticas neste grupo, representadas por alguns grupos monofiléticos com bom suporte estatístico, como o grupo formado pela população de isolados obtidos de mangueira no México suportado por *bootstrap* de 88%. Dois isolados do Equador (sequências do GenBank) formaram um grupo monofilético com 93% de *bootstrap*. Dois isolados da China (sequências do GenBank) formaram um outro grupo monofilético com 98% de suporte estatístico.

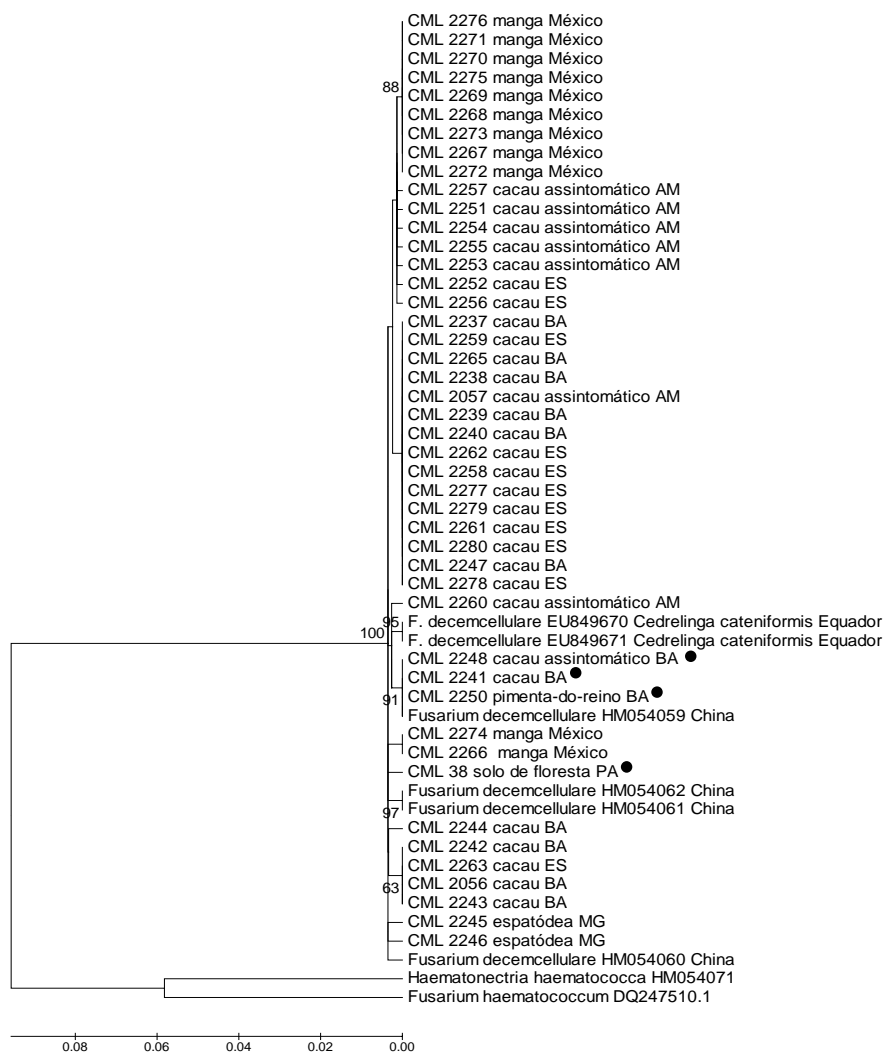


Figura 1 Análise de Neighbor-Joining de sequências TEF-1 de isolados de *F. decemcellulare* oriundos do cacau e outros hospedeiros de diferentes regiões geográficas. Um ponto negro ao lado do código indica que o isolado é homotático. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores do suporte estatístico, *Bootstrap* (1.000 repetições), são indicados acima dos internódios. Essa árvore tem como outgroup *Haematonectria haematococca* e *Fusarium haematococcum*. Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção micológica de Lavras; HMAS = Herbarium of Mycology, Institute of Microbiology

## 5 DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato da produção do teleomorfo *A. rigidiuscula* em condições de laboratório no Brasil e da utilização de análise filogenética em isolados de *F. decemcellulare* associado a galhas-florais no cacaueteiro e a outras famílias botânicas no Brasil.

Por meio das observações realizadas em campo para este trabalho notou-se que os clones de cacaueteiros resistentes à vassoura-de-bruxa, distribuídos pela CEPLAC para conter o avanço desta doença, apresentaram suscetibilidade ao aparecimento da galha-floral, principalmente os clones TSH1188 e CCN51. Esses resultados confirmam relatos de outros pesquisadores, que observaram alguns híbridos susceptíveis à galha-floral do cacaueteiro (OLIVEIRA; LUZ, 2005).

Os isolados avaliados neste estudo apresentam características típicas de *F. decemcellulare*. Entre os isolados, houve variação na produção de pigmento rosa. No entanto essa característica não serviu para diferenciar isolados provenientes de plantas com sintomas de isolados provenientes de plantas aparentemente sadias, ou ainda, isolados homotáticos de isolados supostamente heterotáticos.

Devido à falta de variação na morfologia dos isolados avaliados, não foi possível realizar a distinção de morfotipos. O'Donnell et al. (2008), ao avaliarem marcadores morfológicos de espécies de *Fusarium* associadas ao milho, não conseguiram distinguir *F. aethiopicum* de três outras espécies do complexo *F. graminearum* (*F. graminearum*, *F. vorosii* e *F. asiaticum*). Essas espécies foram separadas apenas por filogenia de multilocos.

Entretanto, a caracterização de populações baseada em marcadores morfológicos do teleomorfo, seja ocorrendo naturalmente, seja induzido em laboratório, torna-se uma ferramenta interessante para a definição de espécies

biológicas (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Neste trabalho, cinco isolados se comportaram como homotáticos, produzindo peritécios a partir de culturas monospóricas, CML 800 (isolado de referência), CML 38, CML 2241, CML 2250 e CML 2248. Esses apresentaram como característica comum a produção de pigmento rosa, porém essa característica não serve como marcador para distinguir homotáticos de heterotáticos. Os isolados homotáticos apresentaram peritécios com quatro ascósporos por asco, confirmando a descrição morfológica do trabalho de Ford, Bourret e Snyder (1967). Os outros isolados que não produziram peritécios no teste de homotalismo são provavelmente heterotáticos. Alguns autores confirmam que associados ao cacaueteiro existem isolados homotáticos e heterotáticos de *F. decemcellulare* (REICHLE; SNYDER, 1964). Porém, outros autores descrevem esse fungo apenas como homotático (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Ford, Bourret e Snyder (1967) observaram que isolados homotáticos formavam quatro ascósporos em seus ascos e não eram patogênicos enquanto que isolados heterotáticos, com quatro a oito ascósporos por asco, comportaram-se como patogênicos. Entretanto, neste estudo, isolados homotáticos foram obtidos também de plantas sintomáticas de cacaueteiro.

Com base na análise filogenética com sequências parciais do gene *tef1*, os isolados de *F. decemcellulare* formam um grupo monofilético com alto suporte estatístico (98% de bootstrap) (Figura 2). Entretanto, só com a análise da região gênica *tef1* não há subsídio suficiente para afirmar que *F. decemcellulare* é uma única espécie filogenética, pois há indícios de separação entre isolados do México e do Brasil, como também há separação de isolados homotáticos de heterotáticos. Espécies delimitadas pelo conceito morfológico de espécie podem ser compostas por mais de uma espécie ou linhagem filogenética como em estudos com outros patossistemas, foram observadas pelo menos nove espécies

filogenéticas distintas associadas à malformação da mangueira distribuídas pelo GFSC.

Para confirmação da hipótese de que *F. decemcellulare* é uma única espécie filogenética, serão necessárias análises com base em regiões gênicas diferentes, como o gene *tub2* (O'DONNELL; CIGELNIK, 1997) para dar um maior suporte a esses resultados. Com base nos resultados aqui obtidos, *F. decemcellulare* pode ser considerado uma espécie filogenética capaz de colonizar uma ampla gama de hospedeiros e presente em uma grande extensão geográfica.



## 6 CONCLUSÕES

Não foram observados morfotipos distintos para os isolados de *F. decemcellulare* avaliados.

*F. decemcellulare* representa uma espécie filogenética de acordo com os resultados obtidos com sequências parciais do gene *tef1*.

A espécie filogenética de *F. decemcellulare* apresenta populações com comportamento reprodutivo homotálico e supostos heterotálicos.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hipótese do presente trabalho foi que poderia haver mais de uma espécie dentro da morfoespécie *F. decemcellulare*, como espécies endofíticas ou ainda espécies homotáticas e heterotáticas. Entretanto, por meio da análise filogenética, há evidências de tudo ser uma única espécie e suas diferentes formas. Os próximos passos seriam utilizar outras regiões gênicas para confirmar os resultados; identificação de *mating types*; cruzamentos; estudo de patogenicidade dos isolados e suscetibilidade dos cultivares por meio de testes de patogenicidade.

## REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, J. V.; COOK, R. J. Fusarium species and Calonectria associated with cushion gall of cacao in Central America. **Cacao**, San Jose, v. 10, n. 1, p. 15-16, 1965.
- ANGULO, S. M.; VILLAPUDUA, J. R. Buba of mango (*Mangifera indica* L.) in the state of Sinaloa, México: abstract the american phytopathological society. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n. 1, p. 171, 1982. Abstract.
- BARTLEY, B. G. D. Retrospect of research on resistance of cacao to *Crinipellis pernicioso*. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON THE WITCHES' BROOM DISEASE, 1., 1983, Manaus. **Proceedings...** Manaus: UFAM, 1983. p. 32-35.
- BASTOS, C. N.; SANTOS, A. Superbrotamento de inflorescências do limão-de-caiena causado por Fusarium decemcellulare. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 222-232, jun. 2001.
- BRUNT, A. A.; WARTON, A. L. Calonectria rigidiuscula (Berk. & Br.) Sacc. in the case of a gall disease of cocoa in Ghana. **Nature**, London, v. 193, p. 903-904, 1962.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic in fungi distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 42, p. 225-226, 1939.
- FORD, E. J.; BOURRET, J. A.; SNYDER, W. C. Biologic specialization in *Calonectria (Fusarium) rigidiuscula* in relation to green point gall of cocoa. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 57, p. 710-712, 1967.
- GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R.; ARAÚJO, J. C. A. Doenças de expressão econômica de culturas exploradas na Amazônia Ocidental. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 37-38, ago. 2006. Suplemento.
- GUU, J. R.; JU, Y. M.; HSIEH, H. J. Nectriaceous fungi collected from forests in Taiwan. **Botanical Studies**, Minneapolis, v. 48, p. 187-203, 2007.
- HANSEN, A. J. Fusaria as agents of cacao green point cushion gall in the Caribbean and in Latin America. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 50, p. 229-233, 1966.

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

HOLLIDAY, P. **Fungus diseases of tropical crops**. Cambridge: Cambridge University, 1980. 624 p.

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

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 150-163, 2004.

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

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

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

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

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

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. 6, p. 1302-1330, Dec. 2011.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **BLAST**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 11 jan. 2012.  
O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous.

**Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 7, n. 1, p. 103-116, Mar. 1997.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematic and phylogeography of the *Gibberella fujikoro* species complex. **Mycologia**, New York, v. 90, n. 3, p. 433-458, June 1998.

O'DONNELL, K. et al. Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 45, n. 11, p. 1514-1522, Nov. 2008.

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

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

PLOETZ, R. C. Cacao diseases: important threats to chocolate production worldwide. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n. 12, p. 1634-1639, Dec. 2007.

\_\_\_\_\_. *Fusarium*-induced diseases of tropical, perennial crops. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 6, p. 648-652, June 2006.

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

REYES, C. L. **Enfermedades del cacao en Venezuela**. Caracas: Fondo Nacional del Cacao, 1978. 79 p.

ROSSMAN, A. Y. et al. Genera of bionectriaceae, hypocreaceae and nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes). **Studies in Mycology**, Wageningen, v. 42, p. 1-260, 1999.

\_\_\_\_\_. Molecular studies of the bionectriaceae using large subunit rDNA sequences. **Mycologia**, New York, v. 93, n. 1, p. 100-110, Feb. 2001.

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

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

SNYDER, W. C.; THOMAS, D. L.; WATSON, A. G. Fusarium: the unrecognized threat to world cacao production. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 4., 1972, Saint Augustine. **Proceedings...** Saint Augustine: Government of Trinidad and Tobago, 1972. p. 487-489.

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

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

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

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

ZHAO, P.; LUO, J.; ZHUANG, W. Practice towards DNA barcoding of the nectriaceous fungi. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 46, n. 1, p. 183-191, 2010.