



**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DO AGENTE
ETIOLÓGICO DA FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO NO
BRASIL**

NATÁLIA CASADEI CRESPO

2010

NATÁLIA CASADEI CRESPO

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DO AGENTE ETIOLÓGICO
DA FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO NO BRASIL**

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

Orientador

Prof. Ludwig H. Pfenning

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

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

Crespo, Natália Casadei.

Diversidade genética de isolados do agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro no Brasil / Natália Casadei Crespo. – Lavras : UFLA, 2010.

36 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning.

Bibliografia.

1. Complexo *Gibberella fujikuroi*. 2. *Fusarium guttiforme*. 3. Compatibilidade vegetativa. 4. Marcadores moleculares. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.77494

NATÁLIA CASADEI CRESPO

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DO AGENTE ETIOLÓGICO
DA FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO NO BRASIL**

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

APROVADA em 24 de fevereiro de 2010.

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende UFLA

Profa. Dra. Elaine Aparecida de Souza UFLA

Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), por meio do Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fapemig, órgão financiador do projeto.

Ao Prof. Ludwig H. Pfenning, pela orientação, confiança e constante apoio e amizade.

A José Aires Ventura, pela valiosa contribuição no projeto.

Ao Eng^o Agr^o José Roberto Silva, Coordenador Regional da Emater-MG, Uberlândia-MG, pelos auxílios nas coletas.

A Sarah Costa e a Juliano dos Santos, que muito contribuíram para a realização deste estudo e pelas sugestões na redação.

A Dayana Botrel, Edson Luis Rezende e André Raphael de Castro. pelo auxílio no experimento.

Ao Prof. Dr. Cristiano Souza Lima, pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Eduardo S.G. Mizubuti e a Carlos Bragança, pelos ensinamentos e ajuda na condução de parte do experimento.

Aos professores Mário Lúcio Vilela de Resende e Elaine Aparecida de Souza, pelas sugestões para conclusão do trabalho.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia.

Aos meus grandes amigos do Laboratório de Sistemática e Ecologia dos Fungos, pelo companheirismo e boa convivência.

BIOGRAFIA

Natália Casadei Crespo nasceu em Bebedouro, SP, em 25 de junho de 1985. Filha de Ubiratan Sampaio Neves Crespo e Maria Antônia Casadei Crespo, estudou e concluiu ensino médio em sua cidade natal. Em 2003 ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Lavras, onde se graduou bacharel em 2007. Em 2008 ingressou no mestrado em Agronomia/Fitopatologia pela mesma instituição, encerrando essa etapa profissional com a defesa da presente dissertação.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPITULO 1: Estudo da população do agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro.....	1
1 Introdução Geral.....	2
2 Estado da Arte.....	3
2.1 Importância da fusariose do abacaxizeiro	3
2.2 Determinação de grupos de compatibilidade vegetativa.....	6
2.3 Uso de AFLP em populações de fitopatógenos.....	10
3 Referências bibliográficas.....	12
CAPÍTULO 2: Diversidade genética de isolados do agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro no Brasil.....	16
1 Resumo.....	17
2 Introdução	18
3 Material e Métodos.....	20
3.1 Obtenção de isolados e caracterização morfológica.....	20
3.2 Teste de patogenicidade.....	20
3.3 Identificação de grupos de compatibilidade vegetativa (VCG).....	21
3.4 Análises de AFLP.....	22
4 Resultados.....	23
4.1 Morfologia e patogenicidade.....	23
4.2 Identificação de grupos de compatibilidade vegetativa.....	23
4.3 Análises de AFLP.....	24
5 Discussão.....	24
6 Conclusões.....	28
7 Referências bibliográficas.....	29
8 Agradecimentos.....	32
ANEXOS.....	33

RESUMO

CRESPO, Natália Casadei. **Diversidade genética de isolados do agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro no Brasil**. 2010. 36 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Com o objetivo de conhecer a diversidade genética existente na população de *Fusarium guttiforme*, agente etiológico da resinose ou fusariose do abacaxizeiro, foram realizadas análises de VCG, AFLP e caracterização morfológica em isolados de *F. guttiforme* provenientes de diferentes estados brasileiros. Todos os 130 isolados avaliados apresentaram os marcadores típicos de *F. guttiforme*. Nas análises de VCG, utilizando mutantes *nit*, foram identificados 17 grupos entre 40 isolados. Apenas quatro VCGs abrigaram mais de um isolado. Dois grupos foram formados por isolados de diferentes regiões geográficas, dois de isolados de vários municípios do Espírito Santo. Os demais VCGs apresentaram apenas um isolado. O dendrograma gerado nas análises de AFLP, baseado na diferença de padrões de bandas gerados por duas combinações de *primers*, evidenciou a presença de três grupos. O grupo principal ficou subdividido em seis subgrupos, com isolados de 63% a 100 % de similaridade, incluindo a maioria dos isolados avaliados e o tipo da espécie. Os índices de similaridade foram calculados utilizando-se o coeficiente de Dice. A presença de isolados de diferentes regiões no mesmo VCG e grupo de AFLP indica que o transporte de mudas contaminadas pode ser a principal via de disseminação do patógeno. Ambas as técnicas utilizadas evidenciaram alta diversidade genética na população. Dessa forma, a possibilidade da ocorrência de reprodução sexuada na espécie não pode ser descartada. A caracterização morfológica e o agrupamento obtido nas análises de AFLP confirmam que o principal patógeno da fusariose do abacaxizeiro é *F. guttiforme*. A observação de dois grupos com similaridade abaixo de 40% em relação ao grupo principal sugere que podem existir populações distintas causando fusariose no abacaxizeiro no Brasil.

Palavras chaves: Complexo *Gibberella fujikuroi*, *Fusarium guttiforme*, *Ananas comosus*, fitopatógeno, compatibilidade vegetativa, marcadores moleculares

* Comitê Orientador: Ludwig H. Pfenning – UFLA (Orientador) e Mário Lucio Vilela de Resende – UFLA

ABSTRACT

CRESPO, Natália Casadei. **Genetic diversity of strains of pineapple's fusariose etiologic agent in Brazil.** 2010. 36 p. Dissertation (Master Program in Agronomy) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

In order to know the genetic diversity in the population of *Fusarium guttiforme*, causal agent of Fusarium resinose pineapple, were analyzed in VCG, AFLP and morphological characterization of isolates of *F. guttiforme* from different Brazilian states. All 130 isolates showed the typical markers of *F. guttiforme*. In the analysis of VCG using nit mutants were identified 17 groups of 40 isolates. Four VCGs harbored more than one isolate. Two groups were formed by isolates from different geographical regions, two isolates of several municipalities of the Holy Spirit. The other VCGs had only one isolate. The dendrogram generated from AFLP analysis, based on the difference of band patterns generated by two combinations of primers, revealed the presence of three groups. The main group was subdivided into six subgroups, with isolates of 63% to 100% similarity, including most of the isolates and type species. The similarity indices were calculated using the coefficient of Dice. The presence of isolates from different regions in the same VCG and AFLP group indicates that the transport of infected plants may be the main route of spread of the pathogen. Both techniques showed high genetic diversity in the population. Thus, the possibility of the occurrence of sexual reproduction in species can not be ruled out. Morphological characterization and grouping obtained in the AFLP analysis confirmed that the main pathogen of *Fusarium* wilt of pineapple is *F. guttiforme*. The observation of two groups with a similarity below 40% in relation to main group suggests that there may be distinct populations causing wilt in pineapple in Brazil.

Keywords: *Gibberella fujikuroi* species complex, *Fusarium guttiforme*, *Ananas comosus*, plant pathogen, vegetative compatibility, molecular markers

* Guidance Committee: Ludwig H. Pfenning - UFLA (Major Professor) and Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA

CAPÍTULO 1

ESTUDO DA POPULAÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO DA FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO

1 INTRODUÇÃO GERAL

A fusariose do abacaxizeiro prejudica a produção de abacaxi (*Ananas comosus*) em todas as regiões produtoras do Brasil. *Fusarium guttiforme* foi descrito como agente etiológico da fusariose, por Nirenberg & O'Donnell (1998), por meio de caracterização morfológica e filogenética. O patógeno foi relatado, pela primeira vez, no estado de São Paulo, sendo atualmente encontrado em todos estados brasileiros produtor de abacaxi.

O grande trânsito de material vegetal a partir do Brasil, provavelmente espalhou o patógeno para fora da América do Sul, com espécies de *Fusarium* sendo citadas em associação com *Ananas comosus* em praticamente todas as regiões produtoras de abacaxi do mundo (Ploetz, 2006). A fase sexuada de *F. guttiforme* não é conhecida e, portanto, não se tem conhecimento sobre o comportamento biológico e a diversidade genética do patógeno.

A determinação de grupos compatibilidade vegetativa (VCG) é uma ferramenta muito utilizada para a avaliação da diversidade genética em espécies de *Fusarium*. Isolados pertencentes ao mesmo VCG são considerado geneticamente semelhantes, enquanto isolados de diferentes VCGs geneticamente distintos. Dessa forma, a presença de vários VCGs na população indica maior a diversidade genética, assim como presença de vários isolados em um único VCG pode ser um indicador da ocorrência de linhagens clonais. A determinação de grupos de compatibilidade vegetativa é uma opção para um agrupamento infraespecífico de isolados, que reflete a existência de grupos geneticamente distintos na população (Leslie, 1993; Leslie & Summerell, 2006).

A utilização de marcadores moleculares, como AFLP, permite determinar se isolados de um mesmo VCG são clones ou calcular a similaridade genética entre isolados de diferentes VCGs. Os marcadores de AFLP são utilizados com sucesso no estudo da estrutura populacional e na identificação de espécies. Espécies do

gênero *Fusarium* ajudam a elucidar os complexos de espécies e servem como marcadores para populações morfologicamente iguais, mas com genótipos diferentes (Zeller et al., 2003; Leslie & Summerell, 2006).

Devido à alta produção e comercialização de abacaxi e às grandes perdas na cultura ocasionadas pela fusariose, é necessário o conhecimento da diversidade genética do agente etiológico da principal doença do abacaxizeiro. Assim, objetivou-se compor uma coleção representativa de *Fusarium* associado à fusariose do abacaxizeiro no Brasil, para avaliar marcadores morfológicos e estudar a diversidade da população por meio de AFLP e VCG, sendo esperado alta diversidade nessa população.

2 ESTADO DA ARTE

2.1 Importância da fusariose do abacaxizeiro

O abacaxi, *Ananas comosus*, originário na América do Sul, é uma planta típica de regiões tropicais e subtropicais. A cultura tem grande destaque entre os frutos tropicais, sendo utilizado para consumo *in natura* ou para industrialização.

O Brasil é o maior produtor mundial de abacaxi, seguido de Tailândia e Filipinas. Os estados brasileiros que se destacam na produção são Minas Gerais, Paraíba e Pará, os quais são responsáveis por 55,95% do total da produção brasileira (Anuário da Agricultura Brasileira, AGRIANUAL, 2009).

Entre as doenças que afetam a produção do abacaxi, a fusariose é a principal, considerada fator limitante à cultura, cujas perdas podem atingir a totalidade da produção. Também conhecida como gomose ou resinose fúngica, afeta todas as partes da planta, sendo mais destrutiva quando ocorre no fruto. Os primeiros países onde a doença foi observada foram a Argentina e o Brasil. Acredita-se que a doença disseminou-se para fora da América do Sul por meio de

exportações de frutos brasileiros infectados (Ventura & Zambolim, 2002; Ploetz, 2006).

A fusariose foi relatada pela primeira vez, no Brasil, por Kimati & Tokeshi(1964), na variedade ‘Smooth Cayenne’, no estado de São Paulo. Por meio de material de plantio infectado, o patógeno disseminou-se rapidamente para todas as regiões produtoras de abacaxi do país. O sintoma característico do patógeno é a exsudação de goma. Além da exsudação, podem-se observar curvatura no ápice do talo, formação de frutos anormais, encurtamento do talo, redução do sistema radicular e folhas que ficam amareladas e de consistência flácida (Ventura & Zambolim, 2002).

A infecção das mudas ocorre quando elas ainda estão aderidas à planta, observando-se uma lesão necrótica na parte basal da muda. A incidência do patógeno nos frutos varia com a época de produção, aumentando significativamente se o desenvolvimento do fruto ocorrer em períodos favoráveis à doença, além de alta umidade relativa e temperaturas entre 15° e 25°C. Os sintomas iniciais são quase imperceptíveis, o que leva o agricultor a plantar e comercializar mudas infectadas. A comercialização de mudas infectadas com *F. guttiforme* é uma das principais formas de disseminação da doença (Ventura & Zambolim, 2002).

Durante o ciclo da cultura, o período crítico para infecção ocorre após a indução floral, quando os conídios são transportados pelo vento e infectam a inflorescência na fase inicial. A incidência da doença apresenta variações ao longo do ano, conforme a época de indução floral e de colheita. A maior incidência do patógeno é no Espírito Santo e na Bahia (Ventura, 1994; Ventura & Zambolim, 2002).

O patógeno é altamente destrutivo. As principais medidas de controle são a utilização de mudas comprovadamente sadias, a eliminação de restos de plantio anterior onde ocorreu alta incidência da doença, inspeção e erradicação de plantas doentes. As variedades de uso comercial Pérola e Smooth Cayenne são suscetíveis

ao patógeno, sendo a resistência uma alternativa para o controle da doença (Reinhardt et al., 2000). Em 2006, o Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural, INCAPER, (2009) lançou a cultivar Vitória, que apresenta resistência a fusariose.

Inicialmente, o agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro foi denominado *Fusarium subglutinans*, considerando as características morfológicas, fisiológicas e genéticas. Em testes de inoculação cruzada de isolados de *F. subglutinans sensu lato* do abacaxi e de outros hospedeiros foi demonstrado que a população que causa a fusariose é específica do abacaxizeiro, o que resultou na proposição da *forma specialis F. subglutinans f. sp. ananas* (Ventura et al., 1993). Análises de sequências do DNA de fragmentos dos genes que codificam a beta tubulina, fator de alongação 1-alfa e calmodulina e a observação de marcadores morfológicos revelaram que a população responsável pela fusariose do abacaxizeiro pertence a uma espécie única, a qual foi denominada *F. guttiforme* (Nirenberg & O'Donnell, 1998).

F. guttiforme pertence ao complexo *Gibberella fujikuroi*, o qual é composto, atualmente, por nove espécies biológicas com o teleomorfo descrito. Entretanto, para *F. guttiforme*, ainda não se conhece a fase teleomórfica (Leslie & Summerell, 2006). *Fusarium subglutinans* é caracterizado por formar conídios em falsas cabeças e polifialídes. O marcador morfológico que diferencia *F. guttiforme* de *F. subglutinans* são os microconídios, geralmente asseptados em formato de gota. Os macroconídios são típicos do complexo *Gibberella fujikuroi*, produzidos em pouca quantidade, apresentando, geralmente, de três a cinco septos (Nirenberg & O'Donnell, 1998).

As espécies de *Fusarium*, por muito tempo, foram separadas apenas por características morfológicas e especificidade com hospedeiro. No entanto, a aplicação prática do conceito de espécie biológica e a análise de sequências de DNA revolucionaram a forma como espécies de *Fusarium* são definidas

atualmente, possibilitando uma descrição de espécies mais detalhada e confiável (Nirenberg & O'Donnell, 1998; Leslie et al., 2001; Kvas et al., 2009).

2.2 Determinação de grupos de compatibilidade vegetativa

A determinação de grupos de compatibilidade vegetativa é uma ferramenta utilizada para a avaliação da diversidade genética nas espécies de fitopatógenos. Isolados são considerados vegetativamente compatíveis quando são capazes de sofrer anastomose e formar um heterocário estável. Heterocário consiste na condição de núcleos geneticamente distintos em uma mesma célula (Leslie, 1993).

A formação de heterocário é mediada por uma série de locos *vic* (incompatibilidade vegetativa), também conhecidos como locos *het* (incompatibilidade de heterocário). Sua formação é possível quando os isolados são idênticos em todos esses locos. Esses locos são responsáveis pelo controle da interação das hifas e pela estabilidade do heterocário e, se houver diferença em algum alelo, o heterocário formado é instável e transitório, resultando na morte das células que formaram heterocário. Quando os isolados compartilham os mesmos alelos nos locos *vic*, o heterocário formado é estável e esses isolados pertencem a um mesmo grupo de compatibilidade vegetativa (VCG) (Leslie & Summerell, 2006).

Leslie & Zeller (1996) propuseram quatro etapas relacionadas com a formação de heterocário e compatibilidade vegetativa. Primeiro ocorre a pré-fusão, que pode estar relacionada com locos denominados heterocário autoincompatível (HSI). Depois ocorre a fusão das hifas, controlada pelos locos *vic* ou *het*, a pós-fusão, etapa da manutenção do heterocário e, por fim, a etapa de rejeição, quando pode ocorrer a morte das células, caso tenha alguma diferença nos locos *vic*.

A compatibilidade vegetativa é independente do sistema de cruzamento ou *mating*, podendo ser uma forma de fungos assexuados se beneficiarem do estado diploide proporcionado pela heterocariose. A heterocariose é considerada um

recurso para gerar variabilidade genética dentro dessas populações, formadas entre isolados geneticamente distintos. Ela permite a troca de elementos citoplasmáticos e o contato de núcleos para que haja recombinação mitótica (Leslie, 1993; Glass et al., 2000).

Os primeiros estudos de compatibilidade vegetativa foram com *Neurospora crassa*, em que foram identificados dez *loci vic* mediando a formação de heterocário nessa espécie. A técnica já foi descrita para diferentes Ascomicetos, como *Aspergillus*, *Cercospora*, *Cryphonectria*, *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Podospora*, *Fusarium* e outros. Geralmente, em ascomicetos, são encontrados entre 10-15 locos *vic* (Leslie & Summerell, 2006; Martins et al., 2008).

Para espécies de *Fusarium* são estimados entre 10-15 locos *vic*. Quando duas hifas se fundem para formar o heterocário, uma avaliação mútua é feita para cada alelo desses locos. Em uma população de acasalamento ao acaso, as chances de identidade entre esses alelos são poucas. Se houver 10 genes *vic* segregando, a reprodução sexuada pode gerar milhões de VCGs diferentes. Em uma população assexuada, na qual os isolados são de origem clonal, certamente poucos VCG serão identificados. A presença de vários isolados no mesmo VCG pode indicar a ocorrência de linhagens clonais, uma vez que os clones, certamente, serão classificados no mesmo VCG (Chulze et al., 2000; Leslie & Summerell, 2006).

Portanto, em fungos que não possuem fase sexuada conhecida, a diversidade genética pode ser analisada por meio da determinação de VCGs, sendo alta diversidade genética na população expressa por meio da presença de vários VCGs. A identificação de VCGs é utilizada com sucesso para avaliar a estrutura de populações de espécies do gênero *Fusarium* (Leslie, 1993; Leslie & Summerell, 2006).

É possível prever a similaridade genética entre isolados utilizando grupos de compatibilidade vegetativa, uma vez que isolados pertencentes ao mesmo VCG são mais similares em relação aos isolados de diferentes VCG. Porém, não é

possível estabelecer a distância genética entre os isolados. Isolados morfológica e evolutivamente diferentes certamente serão classificados em diferentes VCGs (Leslie & Summerell, 2006; Ramirez et al., 2006).

Em *Fusarium*, a compatibilidade vegetativa é observada em isolados auxotróficos, nos quais o heterocário é identificado por apresentar crescimento prototrófico. A determinação de VCGs é feita a partir de mutantes *nit*. A técnica foi descrita por Puhalla (1985), ao classificar isolados de *F. oxysporum* com base na compatibilidade vegetativa. Mutantes *nit* são mutantes espontâneos, resistentes ao clorato de potássio com diferente crescimento em diferentes fontes de nitrogênio. Para observação do heterocário e a determinação de VCGs, mutantes *nit* são pareados. Esses mutantes são incapazes de utilizar nitrato como única fonte de nitrogênio. Para a indução dos mutantes é utilizado clorato de potássio (KClO₃), um análogo tóxico do nitrato. Setores com crescimento resistente ao KClO₃ são selecionados. Para a recuperação dos mutantes, é utilizado meio com nitrato como única fonte de nitrogênio, em que os mutantes *nit* apresentam um crescimento auxotrófico por serem incapazes de fazer a redução do nitrato (Puhalla, 1985; Correll et al., 1987).

Os mutantes *nit* podem ser classificados fenotipicamente, de acordo com a maneira em que a via de assimilação do nitrogênio foi alterada. Em *Fusarium*, o nitrato é reduzido a nitrito por meio da enzima nitrato redutase. Para reduzir o nitrito a amônia, que é uma forma de nitrogênio prontamente assimilável, o fungo utiliza a enzima nitrito redutase. Outra via de assimilação de nitrogênio ocorre por meio da enzima purina desidrogenase, que transforma a hipoxantina em ácido úrico. A nitrato redutase e a purina desidrogenase necessitam de um cofator molibdênio para a sua completa funcionalidade. Em mutantes *nit1*, a mutação ocorre no loco estrutural da nitrato redutase, afetando a assimilação de nitrato. Nos mutantes *nit3*, a mutação ocorre no loco estrutural da nitrito redutase, em que os mutantes pertencentes a essa classe fenotípica não conseguem reduzir nitrito a amônia. Já nos

mutantes NitM, a mutação ocorre em um conjunto de locos, resultando na não formação do cofator molibdênio, essencial para a atividade da nitrato redutase e da purina desidrogenase, portanto, não sintetizam a hipoxantina. Dessa forma, meios seletivos são utilizados para a classificação fenotípica dos mutantes, utilizando o nitrito e a hipoxantina como fontes alternativas de nitrogênio (Correll et al., 1987).

Esses mutantes podem ser autocompatíveis ou autoincompatíveis. Quando dois mutantes *nit* induzidos a partir do mesmo isolado selvagem formam um heterocário estável, estes são considerados autocompatíveis. Por outro lado, se o heterocário não é formado, estes mutantes são denominados heterocário autoincompatível (HSI) e são incapazes de formar heterocário com qualquer indivíduo, portanto, não são utilizados na determinação de VCGs (Bowden & Leslie, 1994).

As espécies de *Fusarium* podem ser subdivididas em *formae speciales*, com base nos sintomas e na especificidade a um grupo de hospedeiros. Essas *formae speciales* podem, ainda, ser divididas em raças, com base na variação quanto à virulência em cultivares do hospedeiro. Porém, essas divisões não devem ser utilizadas para agrupamentos infraespecíficos, pois sofrem influência do ambiente, da fisiologia do hospedeiro e do método de inoculação (Correll et al., 1987).

Em um estudo da filogenia de *formae speciales* de *F. oxysporum* foi observado que a maioria não forma grupos monofiléticos, impedindo o seu uso para classificação intraespecífica (Baayen et al., 2000) e mostrando a necessidade da utilização de outras ferramentas para estudar a população de patógenos. A determinação de grupos de compatibilidade vegetativa seria uma opção para um agrupamento infraespecífico de isolados (Leslie, 1993).

2.3 Uso de AFLP em populações de fitopatógenos

Como a identificação com base apenas em características morfológicas e patogênicas não possibilita diferenciar isolados em âmbito subespecífico, técnicas bioquímicas e moleculares, utilizando isoenzimas, PCR, sequências de DNA, RFLP, RAPD e AFLP, atualmente, são muito utilizadas na identificação e no estudo da variabilidade de populações. Em espécies do gênero *Fusarium*, ajudam a elucidar os complexos de espécies e servem como marcadores para populações fenotipicamente iguais, mas com genótipos diferentes (Bogale et al., 2006; Leslie & Summerell, 2006).

O AFLP (polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados) tem sido muito utilizado para espécies de *Fusarium*, por apresentar resultados consistentes ao avaliar a diversidade genética dentro e entre as espécies do gênero. Em espécies do complexo *Gibberella fujikuroi*, é possível separar as espécies considerando o conceito de espécie biológica ou *mating populations*, em que a similaridade genética máxima de 40% é utilizada na separação dessas espécies (Baayen et al., 2000; Zeller et al., 2003; Leslie & Summerell, 2006).

A técnica de AFLP é baseada na detecção de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição. O DNA genômico é digerido por duas enzimas de restrição, uma enzima de corte raro e uma de corte frequente, gerando fragmentos de tamanhos diferentes. Os fragmentos são amplificados por *primers* específicos e são revelados em gel desnaturante de poliacrilamida. A avaliação dos resultados é feita considerando a presença ou a ausência de bandas, sem levar em consideração o tamanho dos fragmentos. Uma matriz binária é gerada, em que 0 representa a ausência de banda e 1, a presença (Vos et al., 1995).

A vantagem da técnica, é que o AFLP amplifica o genoma inteiro. Como o genoma é amplamente utilizado, um grande número de marcas polimórficas é obtido, as quais podem ser utilizadas para estabelecer grupos em um conjunto de isolados da mesma espécie, inferindo, assim, sobre a diversidade genética da

população. Quando o padrão de bandas gerado possui mais que 60%-70% de similaridade, os indivíduos analisados são considerados da mesma espécie; quando esse padrão gerado apresenta menos que 40% de similaridade, são espécies diferentes. O padrão de bandas intermediário, entre 40% a 60%, indica que pode ter ocorrido alguma diferenciação taxonômica entre os grupos e que esses mantiveram algumas características em comum (Summerell et al., 2003; Leslie et al., 2005).

É possível correlacionar análises de AFLP com características morfológicas e patogênicas, assim como com técnicas como VCG e filogenia. Análises de AFLP separaram isolados de *F. semitectum* em dois grupos, que apresentaram diferenças na morfologia e na patogenicidade, mostrando que essa população é formada por dois grupos diferentes (Zaccardeli et al., 2006). Ao caracterizar *F. oxysporum* utilizando SSR, AFLP e sequências de DNA, três grupos foram formados, para as três técnicas, com resultados consistentes entre as duas metodologias (Bogale et al., 2006). Os grupos definidos por AFLP entre isolados causadores da malformação floral e vegetativa da mangueira mostraram uma espécie diferente, *F. 'subglutinans'* das conhecidas *F. mangiferae* e *F. stheriliphosum*, para a etiologia da doença, confirmado por filogenia utilizando sequências de DNA de *tub2* e *tef1* (Lima et al., 2009).

Não existem marcadores morfológicos claros para as variedades de *Phoma exigua*, as quais são estabelecidas apenas com base no hospedeiro e na região geográfica. Análises de AFLP mostraram a existência de grupos geneticamente distintos, correlacionados a seis variedades de *P. exigua* avaliadas (Alben et al., 2002). Ao estudar populações de *Colletotrichum coccodes*, principal patógeno em batatas, AFLP e VCG apresentaram os mesmos resultados ao mostrarem alta diversidade genética na população (Heilmann et al., 2006).

A reprodutibilidade das análises de AFLP e a correlação com outras técnicas evidenciam a confiabilidade dos resultados, podendo ser utilizadas com

sucesso no estudo da estrutura genética de populações de fitopatógenos (Bogale et al., 2006; Kvas et al., 2009).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBEN, E. C. A.; STAX, A. M.; GRUYTER, J. de. Genetic differentiation of *Phoma exigua* varieties by means of AFLP fingerprints. **Mycology Research**, Oxford, v. 106, n. 4, p. 419-426, Apr. 2002.

ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. **Abacaxi**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2009. p. 144-152.

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

BOGALE, M.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J.; STEENKAMP, E. T. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from Ethiopia using AFLP, SSR and DNA sequence analyses. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 23, p. 51-66, Oct. 2006.

BOWDEN, R. L.; LESLIE, J. F. Diversity of *Gibberella zea* (*Fusarium graminearum*) at small spatial scales. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, p. 1140-1147, Nov. 1994.

CHULZE, S.; RAMIREZ, M. L.; TORRES, A.; LESLIE, J. F. Genetic variation in *Fusarium* section liseola from no-till maize in Argentina. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 12, p. 5312-5315, Dec. 2000.

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

GLASS, N. L.; JACOBSON, D. J.; SHIU P. K. T. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 34, n. 1, p. 165-186, Dec. 2000.

HEILMANN, L. J.; NITZAN, N.; JOHNSON, D. A.; PASCHE, J. S.; DOETKOTT, C.; GUDMESTAD, N. C. Genetic variability in the potato pathogen *Colletotrichum coccodes* as determined by amplified fragment length polymorphism and vegetative compatibility group analyses. **Phytopathology**, St. Paul, v. 96, n. 10, p. 1097-1107, Oct. 2006.

HIDALGO, O. B.; MATOS, A. P. D.; CABRAL, R. S.; TUSSEL, R. T.; ARZOLA, M.; SANTOS, R.; PEREZ, M. C. Phytotoxic effect of culture filtrate from *Fusarium subglutinans* the causal agent of fusariose of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr). **Euphytica**, Wageningen, v. 104, n. 2, p. 73-77, Dec. 1998.

INSTITUTO CAPIXABA DE PESQUISA, ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENÇÃO RURAL. **Lançado abacaxi vitória, resistente a fusariose**. Disponível em: <www.incaper.es.gov.br>. Acesso em: 12 set. 2009.

KIMATI, H.; TOKESHI H. Nota sobre a ocorrência de *Fusarium* sp. causando resinose fúngica em abacaxi. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 39, n. 3, p. 131-133, set. 1964.

KVAS, M.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J.; STEENKAMP, E. T. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 34, p. 1-21, Jan. 2009.

LESLIE, J. F. Fungal vegetative compatibility. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 127-150, Sept. 1993.

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

LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A. Heterokaryon incompatibility in fungi – more than just another way to die. **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 75, n. 3, p. 415-424, Dec. 1996.

LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; LAMPRECHT, S. C.; RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O. Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of Five species of *Fusarium* from Sorghum and Millet. **Phytopathology**, St. Paul, v. 95, n. 3, p. 275-283, Mar. 2005.

LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; SUMMERELL, B. A. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, n. 3, p. 107-117, Sept. 2001.

LIMA, C. S.; MONTEIRO, J. H. A.; CRESPO, N. C.; COSTA, S. S.; LESLIE, J. F.; PFENNING, L. H. Vegetative compatibility and amplified fragment length polymorphism analyses of *Fusarium* spp. associated with mango malformation. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 123, n. 1, p. 17-26, Jan. 2009.

MARTINS, R. B.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Genetic variability of *Cercospora coffeicola* from organic and conventional coffee plantings, characterized by vegetative compatibility. **Phytopathology**, St. Paul, v. 98, n. 11, p. 1205-1211, Nov. 2008.

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

PLOETZ, R. C. *Fusarium*-induced diseases of tropical, perennial crops. **Phytopathology**, St. Paul, v. 96, n. 6, p. 648-652, June 2006.

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

RAMIREZ, M. L.; REYNOSO, M. M.; FARNOCHI, M. C.; CHULZE, S. Vegetative compatibility and mycotoxin chemotypes among *Fusarium graminearum* (*Gibberella zea*) isolates from wheat in Argentina. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 115, n. 2, p. 139-148, June 2006.

REINHARDT, D. H.; SOUZA, L. F. S.; CABRAL, J. R. S. **Abacaxi produção e aspectos técnicos**. Brasília: Ministério da Agricultura e Abastecimento, Frutas do Brasil/EMBRAPA, 2000. 77 p.

SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 2, p. 117-128, Feb. 2003.

VENTURA, J. A. **Fusariose do abacaxizeiro**: caracterização do patógeno, epidemiologia da doença, resistência e micro-propagação do hospedeiro *In Vitro*. 1994. 111 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

VENTURA, J. A.; ZAMBOLIM, L. Controle das doenças do abacaxizeiro. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. do; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas**: fruteiras. Viçosa, MG: UFV, 2002. v. 1, p. 445-510.

VENTURA, J. A.; ZAMBOLIM, L.; GILBERTSON, R. L. Proposição de nova forma *specialis* em *Fusarium subglutinans* no abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 280, set. 1993.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. van der; HORNES, M.; FRITERS, A.; POT, J.; PALEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, Jan. 1995.

ZACCARDELLI, M.; BALMAS, C.; ALTOMARE, V.; CORAZZA, L.; SCOTTI, C. Characterization of Italian Isolates of *Fusarium semitectum* from Alfalfa (*Medicago sativa* L.) by AFLP analysis, morphology, pathogenicity and toxin. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 154, n. 7/8, p. 454-460, Aug. 2006.

ZELLER, K. A.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S.; LESLIE, J. F. *Gibberella konza* (*Fusarium konzum*) sp. nov., a new biological species within the *Gibberella fujikuroi* species complex from prairie grass. **Mycologia**, Lawrence, v. 95, n. 5, p. 943-954, Sept./Oct. 2003.

CAPÍTULO 2

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DO AGENTE ETIOLÓGICO DA FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO NO BRASIL

(Será transcrito no formato do Periódico Científico **Journal of Phytopathology** e encaminhado para submissão)

1 RESUMO

Com o objetivo de conhecer a diversidade genética existente na população de *Fusarium guttiforme*, agente etiológico da resinose ou fusariose do abacaxizeiro, foram realizadas análises de VCG, AFLP e caracterização morfológica em isolados de *F. guttiforme* provenientes de diferentes estados brasileiros. Todos os 130 isolados avaliados apresentaram os marcadores típicos de *F. guttiforme*. Nas análises de VCG, utilizando mutantes *nit*, foram identificados 17 grupos entre 40 isolados. Apenas quatro VCGs abrigaram mais de um isolado. Dois grupos foram formados por isolados de diferentes regiões geográficas, dois de isolados de vários municípios do Espírito Santo. Os demais VCGs apresentaram apenas um isolado. O dendrograma gerado nas análises de AFLP, baseado na diferença de padrões de bandas gerados por duas combinações de *primers*, evidenciou a presença de três grupos. O grupo principal ficou subdividido em seis subgrupos, com isolados de 63% a 100% de similaridade, incluindo a maioria dos isolados avaliados e o tipo da espécie. Os índices de similaridade foram calculados utilizando-se o coeficiente de Dice. A presença de isolados de diferentes regiões no mesmo VCG e grupo de AFLP indica que o transporte de mudas contaminadas pode ser a principal via de disseminação do patógeno. Ambas as técnicas utilizadas evidenciaram alta diversidade genética na população. Dessa forma, a possibilidade da ocorrência de reprodução sexuada na espécie não pode ser descartada. A caracterização morfológica e o agrupamento obtido nas análises de AFLP confirmam que o principal patógeno da fusariose do abacaxizeiro é *F. guttiforme*. A observação de dois grupos com similaridade abaixo de 40% em relação ao grupo principal sugere que podem existir populações distintas causando fusariose no abacaxizeiro no Brasil.

Keywords: *Gibberella fujikuroi* species complex, *Fusarium guttiforme*, *Ananas comosus*, plant pathogen, vegetative compatibility, molecular markers.

2 INTRODUÇÃO

O abacaxi (*Ananas comosus*) ocupa um segmento considerável no mercado internacional de frutas tropicais. O Brasil é o maior produtor mundial de abacaxi, com áreas de cultivo em praticamente todos os estados (Anuário da Agricultura Brasileira, AGRIANUAL, 2009).

Apesar de sua constante expansão, a cultura tem consideráveis perdas na produção devido à fusariose, principal doença, conhecida também como gomose ou resinose fúngica, que afeta todas as partes da planta. Os sintomas iniciais são imperceptíveis, o que facilita a disseminação do patógeno por meio de transporte de mudas infectadas. Os primeiros países em que a doença foi observada foram Argentina e Brasil. O Espírito Santo e a Bahia são os estados brasileiros com maior incidência do patógeno (Ventura & Zambolim, 2002; Ploetz, 2006).

O agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro era reconhecido, até 1998, como *Fusarium subglutinans*, com base em características morfológicas, fisiológicas e genéticas. O posterior estabelecimento da *forma specialis* *F. subglutinans* f. sp. *ananas*, baseado em testes de inoculação cruzada de isolados de *F. subglutinans sensu lato* do abacaxi e outros hospedeiros, já forneceu evidências da especificidade do patógeno (Ventura et al., 1993). Com base em análise de morfologia e filogenia de sequências do DNA de fragmentos dos genes que codificam a beta tubulina (*tub2*), fator de alongação 1-alfa (*tef1*) e calmodulina de nove isolados provenientes do Brasil, a espécie *F. guttiforme* foi proposta como agente etiológico (Nirenberg & O'Donnell, 1998).

Não há estudos sobre a diversidade genética da população de *Fusarium* que ocorre em associação com *Ananas comosus*. A determinação de grupos de compatibilidade vegetativa (VCG) pode fornecer indícios sobre a diversidade genotípica de populações de patógenos. O elevado número de VCGs numa

população é um indicador de alta diversidade genética, permitindo inferências sobre a ocorrência de reprodução sexuada na população (Leslie, 1993). Isolados com morfologia e histórico evolutivo diferentes, provavelmente, serão classificados em diferentes VCGs (Chulze et al., 2000; Leslie & Summerell, 2006). A correlação entre VCGs e distribuição geográfica de isolados permite a elaboração de hipóteses sobre como ocorre a disseminação do patógeno (Zheng & Ploetz, 2002; Leslie & Summerell, 2006).

Polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) é um marcador para populações fenotipicamente semelhantes, mas geneticamente distintas (Vos et al., 1995). O AFLP é muito utilizado em análises de variação genética dentro e entre espécies de *Fusarium* e, para diferenciar, com sucesso, espécies biológicas do complexo *Gibberella fujikuroi*, com base na similaridade do padrão de bandas.

O uso de AFLP permite determinar se isolados de um mesmo VCG são clones e também calcular a distância genética entre isolados de diferentes VCGs (Reynoso et al., 2009). Na caracterização genética em populações de *F. verticillioides* associado ao milho na Argentina, ao utilizar VCG e AFLP, verificou-se a presença de clones em VCGs formados por vários isolados (Reynoso et al., 2009). Em isolados associados à malformação da mangueira, foram identificados seis grupos, pelas análises de AFLP e VCG, e evidenciada a ocorrência de uma espécie diferente no Brasil, resultado confirmado por filogenia utilizando sequências de DNA de *tub2* e *tef1* (Lima et al., 2009a,b).

Estudos sobre a diversidade genética de população de fitopatógenos fornecem informações importantes, auxiliando no entendimento da interação planta-patógeno e no melhoramento genético. Medidas fitossanitárias necessárias podem ser adotadas somente com base em conhecimentos sobre a diversidade populacional do patógeno e sua distribuição geográfica. Considerando a importância econômica da cultura no Brasil, o conhecimento da diversidade

genética do patógeno é imperativo para programas de melhoramento e controle da doença. Este trabalho foi desenvolvido com os objetivos de compor uma coleção representativa de *Fusarium* associado à fusariose do abacaxizeiro, verificar marcadores morfológicos e a patogenicidade, além de avaliar a diversidade genética da população por meio de VCG e AFLP.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de isolados e caracterização morfológica

Plantas de abacaxi com sintomas de fusariose foram coletadas em diversas regiões produtoras do Brasil. O isolamento do patógeno foi feito a partir de folhas e frutos. Culturas puras de *Fusarium* foram caracterizadas e identificadas segundo Nirenberg & O'Donnell (1998). Culturas monospóricas dos isolados foram preservadas, a -80°C, em água destilada esterilizada e depositadas na Coleção Micológica de Lavras (CML) da Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil. Os marcadores morfológicos, como tamanho e septação de conídios, taxa de crescimento e pigmentação da colônia, foram avaliados em meio de cultura BDA e SNA. O DNA de isolados representativos foi extraído utilizando Qiagen DNeasy Plant Mini DNA kit.

3.2 Teste de patogenicidade

Folhas destacadas de abacaxi foram lavadas e desinfestadas. Uma gota de suspensão de conídios 100µL na concentração de 2×10^6 conídio.mL⁻¹ foi posicionada sobre perfurações feitas na base de cada folha. As folhas inoculadas foram mantidas em câmara úmida, no escuro, a 25°C, durante seis dias. Para os testes de patogenicidade foram utilizados isolados representativos de *F. guttiforme* da CML e isolados de *F. subglutinans* obtidos da malformação da mangueira.

3.3 Identificação de grupos de compatibilidade vegetativa (VCG)

Para a identificação de grupos de compatibilidade vegetativa (VCG) seguiram-se protocolos de Correll et al. (1987) e Leslie & Summerell (2006), que usam mutantes *nit*, com pequenas adaptações. Quarenta e quatro isolados de *Fusarium* foram cultivados em meio mínimo modificado (MM), por um período de sete dias, em temperatura entre 23° e 27°C. A seguir, as culturas foram transferidas, em três repetições por isolado, para meio mínimo contendo clorato de potássio (KClO₃), visando à indução de mutantes *nit*. A concentração de KClO₃ foi aumentada (de 1,5% a 2,5%), quando o isolado não formava mutante NitM na menor concentração (Puhalla, 1985). Para aumentar a porcentagem de mutantes NitM, treonina (1,4 g L⁻¹) foi adicionada ao meio mínimo com clorato (MMC), como fonte alternativa de nitrogênio (Lima et al., 2009a). Entre 14 a 21 dias, observou-se a produção de setores, que foram transferidos novamente para meio mínimo para a obtenção dos mutantes. Os isolados que apresentaram crescimento auxotrófico em MM foram considerados mutantes *nit*; aqueles que apresentaram crescimento robusto foram descartados (Leslie & Summerell, 2006).

Para a fenotipagem, foi utilizado meio mínimo com 0,5 g L⁻¹ de hipoxantina (MMX) ou 0,4 g L⁻¹ de nitrito (MMN). Isolados que só manifestaram crescimento robusto em meio de cultura contendo hipoxantina foram classificados como *nit3*; isolados que manifestaram crescimento robusto apenas no meio contendo nitrito foram classificados como NitM e isolados que cresceram nos dois meios foram classificados como *nit1* (Correll et al., 1987; Leslie & Summerell, 2006). Nove isolados de mutantes *nit* foram transferidos para placas de 90 mm de diâmetro com MMX e MMN; três isolados de classes fenotípicas conhecidas foram utilizados como controle (Figura 1a).

Os testes de compatibilidade vegetativa foram realizados em placas de Petri de 90 mm de diâmetro com MM. Mutantes do tipo *nit1*/NitM ou *nit1/nit3* do mesmo isolado foram pareados para constatar se o isolado era autocompatível. Para

a determinação de VCGs, um isolado classificado como NitM foi transferido no centro de uma placa de Petri e, ao redor, posicionados quatro isolados *nit1* de tipo selvagem diferente (Figura 1b). Em isolados para os quais não foi possível obter mutante NitM, o pareamento foi realizado entre mutantes *nit1* e *nit3*. Os pareamentos foram mantidos entre 23° e 27°C, por sete a dez dias. Isolados que formaram uma linha densa no encontro das hifas (heterocário) foram considerados vegetativamente compatíveis e pertencentes ao mesmo grupo de compatibilidade vegetativa. O heterocário formado nos testes de complementação foi transferido para meio mínimo, para observar se o crescimento continuava robusto. A estabilidade do heterocário foi evidenciada por sucessivas transferências (Leslie & Summerell, 2006).

3.4 Análises de AFLP

O DNA genômico de 22 isolados foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI*, utilizando AFLP Core Reagent kit (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Duas das combinações de *primers* utilizadas por Lima et al. (2009a), *EcoRI* + TT/*MseI* + AC e *EcoRI* + AA/*MseI* + TT, foram selecionadas para a geração de padrões de bandas. Os fragmentos de AFLP foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida 6% em tampão TBE 1x [100mM Tris Base, 100mM ácido bórico e 2mM EDTA (pH 8,0)], sob corrente constante de 70W, por 3 horas. Os fragmentos de DNA foram marcados com nitrato de prata. Fragmentos entre 200 e 800 pb foram analisados visualmente, sendo gerada uma matriz binária, em que 1 corresponde à presença de banda e 0, à ausência. Bandas com mesmo peso molecular em isolados diferentes foram consideradas homólogas. O método de agrupamento de pares não ponderados com base em média aritmética (UPGMA) foi selecionado para análise, no software Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Rolf, 1989) versão 2.11X, com o coeficiente Dice de similaridade para a construção de dendrogramas.

4 RESULTADOS

4.1 Morfologia e patogenicidade

Foi composta uma coleção de isolados de *Fusarium* associados à fusariose do abacaxizeiro, provenientes dos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, Paraíba e São Paulo. Os 130 isolados avaliados apresentaram marcadores morfológicos típicos da espécie *F. guttiforme*, como presença de polifíalides, ausência de clamidósporos e microconídios obovoides (em formato de gota), geralmente sem septo, com comprimento de 8-12 µm. Foram observados macroconídios típicos de espécies do complexo *Gibberella fujikuroi*, formados em pouca quantidade, geralmente com três a cinco septos, com tamanho de 40-50 x 3-5 µm (Nirenberg & O'Donnell, 1998). Nos testes de patogenicidade, todos os isolados de *F. guttiforme* causaram sintomas de fusariose em abacaxi, mas não foram patogênicos à manga, mostrando a especificidade do patógeno. Nenhum isolado obtido da malformação da mangueira foi patogênico ao abacaxi (Figura 2).

4.2 Identificação de grupos de compatibilidade vegetativa

Foram obtidos mutantes *nit1* de todos os isolados em concentração de 1,5% de KClO₃. Trinta e cinco isolados geraram mutante *nit3* e 17 isolados, mutante NitM. Nos testes de autocompatibilidade, todos os isolados que apresentaram pelo menos duas classes fenotípicas de mutantes se mostraram autocompatíveis, tendo quatro isolados gerado apenas mutantes da classe *nit1*, não permitindo o procedimento. Entre 40 isolados analisados, 17 grupos de compatibilidade vegetativa foram identificados (VCG1 a VCG17) (Tabela 1). Doze grupos incluem isolados provenientes exclusivamente do estado de Espírito Santo (VCG2, VCG4, VCG5, VCG6, VCG8 a VCG16); outros dois grupos foram formados por isolados de diferentes estados brasileiros (VCG1 e VCG3) e os grupos VCG7 e VCG17

contiveram apenas um isolado da Bahia, respectivamente. O heterocário permaneceu estável até a oitava transferência em meio mínimo.

4.3 Análises de AFLP

Foram analisadas 170 bandas entre 200 e 800 pb para as duas combinações de *primers* utilizadas (EcoRI + TT/MseI + AC e EcoRI + AA/MseI + TT). Na análise de UPGMA, baseada no padrão de bandas geradas por AFLP, isolados de *F. guttiforme* ficaram divididos em três grupos principais (A-C) (Figura 3). O grupo A ficou subdividido em seis subgrupos (I a VI), todos com mais de 60% de similaridade, de acordo com o coeficiente Dice, incluindo o tipo CML1063 (BBA69661). O grupo B foi formado por dois isolados, CML1003, do Espírito Santo e CML1031, da Bahia, e apresentou 40% de similaridade no padrão de bandas com o grupo A. O grupo C, formado por um isolado de São Paulo, CML1052, teve 38% de similaridade com o grupo A. Os isolados CML904 e CML905 apresentaram o mesmo padrão de bandas. Todos os grupos determinados por AFLP correspondem aos grupos de compatibilidade vegetativa, exceto o isolado CML1629 (Figura 3).

5 DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato da utilização de análises de VCG e AFLP para avaliar a diversidade genética em isolados de *Fusarium* associados à fusariose do abacaxizeiro no Brasil. Entre os 44 isolados utilizados nos testes de compatibilidade vegetativa, apenas 4 geraram mutantes somente da classe *nit1*, não sendo possível realizar os testes de autocompatibilidade e, portanto, não foram utilizados na identificação de VCGs. Os demais isolados agruparam em 17 VCGs. A diversidade de VCGs encontrada em uma única região e a ocorrência de vários VCGs com apenas um isolado evidenciam alta diversidade genética na população.

Treze VCGs identificados tiveram apenas um isolado, sendo um indício da possível reprodução sexuada na espécie. Em espécies de *Fusarium*, pelo menos 10 locos são responsáveis pela incompatibilidade vegetativa (locos *vic*). Devido à interação entre esses locos durante a reprodução sexuada, é esperado um grande número de VCGs em apenas um único ciclo sexual (Leslie, 1993; Leslie & Summerell, 2006).

Os fatores que contribuem para a troca genética em populações de fungos são mutação, fluxo gênico, tamanho da população, seleção e recombinação sexual. A troca genética reflete na alta diversidade genética da população (Mc Donald, 1997). Em um estudo preliminar, foi mostrado que o agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro pode se reproduzir sexuadamente (Góes, 1986), dando mais indícios de que a diversidade genética pode estar sendo gerada por recombinação sexual e que a reprodução sexuada esteja ocorrendo no campo para esta população.

Quatro VCGs e alguns grupos de AFLP foram formados por vários isolados. A presença de vários isolados no mesmo grupo de VCG e AFLP indica alto grau de similaridade genética entre esses isolados. Entre os quatro VCGs identificados com mais de um isolado, o VCG1 agrupou isolados do Espírito Santo, Minas Gerais e Paraíba, e o VCG3, isolados da Bahia, Espírito Santo e Paraíba, evidenciando distribuição geográfica ampla. O mesmo foi observado no subgrupo I, resultante das análises de AFLP, o qual foi correspondente ao VCG1, mas com um isolado de São Paulo não utilizado nos testes de compatibilidade vegetativa. A presença de isolados de diferentes regiões geográficas em um mesmo grupo de VCG e AFLP sugere que houve a disseminação do patógeno de uma região para a outra, por meio de mudas infectadas. Como o abacaxi é cultivado em diversas regiões brasileiras e os sintomas iniciais da fusariose são imperceptíveis, o trânsito de material propagativo com fusariose é frequente, facilitando a disseminação do patógeno.

Isolados da mesma região de municípios do Espírito Santo foram classificados em diferentes VCGs. Foram identificados seis VCGs no município de Marataízes, quatro no município de Presidente Kennedy e três na Fazenda Jaqueira. Da mesma forma, isolados da Fazenda Jaqueira ficaram em grupos distintos de AFLP, assim como isolados de Itaberaba, BA. Diferentes VCGs e grupos de AFLP em uma mesma propriedade sugerem alta variabilidade genética em nível local.

No dendrograma gerado pelas análises de AFLP, o agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro ficou dividido em três grupos principais (A-C). A maioria dos isolados agrupou no grupo A, com o isolado tipo (CML1063, BBA69661), utilizado por Nirenberg & O'Donnell (1998) na descrição da espécie. Esse agrupamento, juntamente com a análise dos marcadores morfológicos, confirma *F. guttiforme* como principal agente etiológico da fusariose no Brasil.

Os diversos subgrupos observados no grupo A tiveram semelhança genética entre 62% e 100%. Esses índices são consistentes com o previamente descrito para variação intraespecífica em isolados pertencentes à mesma espécie do complexo *Gibberella fujikuroi* (Leslie et al., 2007). A similaridade genética entre os isolados que formaram os subgrupos de AFLP, A-I a A-VI, que tiveram grupo de VCG correspondente, variou de 73% a 100% (Figura 3), mostrando que isolados pertencentes ao mesmo VCG são mais similares geneticamente. A formação de diversos grupos nas análises de AFLP reforça os resultados de VCG, mostrando a alta diversidade genética do patógeno. Em sistemas agrícolas, a constante mudança nas condições ambientais, devido à rotação de culturas, à utilização de fungicidas e fertilizantes, e ao plantio de variedades resistentes, faz com que os fitopatógenos estejam em constante mudança para melhor adaptação, sendo a seleção uma forma de gerar variabilidade genética nessas populações (Gally et al., 2007).

Em ascomicetos sem fase sexuada conhecida, a diversidade genética da população pode ser avaliada pela determinação de VCG, que define grupos genéticos em populações morfológicamente homogêneas (Leslie, 1993). Ao avaliar

a diversidade genética de isolados de *F. oxysporum* associados à alface que causam epidemias na Itália, isolados dos Estados Unidos, Itália, Japão e Taiwan agruparam em um mesmo VCG, mostrando pouca diversidade genética entre os isolados, inferindo a predominância de reprodução assexuada nessa população (Pasquali et al., 2005).

O grande número de VCGs determinados em isolados de *F. verticillioides* associados ao milho na Argentina sugere que a fase sexuada *G. moniliformis*, já relatada, ocorre frequentemente no campo (Chulze et al., 2000; Reynoso et al., 2009). Em um trabalho semelhante com isolados de *F. graminearum*, foram identificados 19 VCGs, apenas na região de Marcos Juarez (província de Córdoba, Argentina), indicando uma considerável diversidade genética entre os isolados, sendo sugerida a importância da reprodução sexuada para a geração de variabilidade nesta população (Ramirez et al., 2006).

Em isolados de *F. 'subglutinans'*, agente etiológico da malformação da mangueira no Brasil, foram observados seis subgrupos entre os isolados, em análises de AFLP e VCG (Lima et al., 2009a). A consistência observada entre as técnicas de VCG, AFLP e filogenia em algumas *formae speciales* de *F. oxysporum* permite sugerir que análises de filogenia podem ser utilizadas para complementar análises de VCG e AFLP (Baayen et al., 2000; Wang et al., 2006).

A baixa similaridade dos grupos B e C, formados por isolados únicos nos respectivos VCGs, em relação ao grupo A (Figura 3), fornece indícios de que os isolados dos grupos B e C pertencem a populações distintas. A análise filogenética de sequências dos genes beta tubulina e fator de alongação1-alfa mostrou que os isolados obtidos de *Ananas comosus* agruparam em três clados (Lima et al., 2008).

Observa-se que isolados de *F. guttiforme* pertencentes a *mating types* opostos produziram protoperitécio em cruzamentos visando à indução da fase sexuada (resultados não apresentados). Portanto, a utilização de cruzamentos

permite definir se existem espécies biológicas nessa população, com suporte de análises filogenéticas e AFLP (Phan et al., 2004).

A composição dos grupos formados nas análises de VCG se repetiu no agrupamento gerado pela análise de UPGMA, baseada em polimorfismo de bandas, mostrando a eficiência de ambas as técnicas para definir grupos distintos em populações de fitopatógenos sem diferenças morfológicas.

Esse trabalho mostra que essas técnicas podem ser utilizadas com sucesso para detectar variação genética intraespecífica na população de *F. guttiforme*.

Os resultados obtidos pelas análises de VCG e AFLP mostraram grupos geneticamente distintos na população causadora da fusariose no abacaxizeiro no Brasil, indicando elevada diversidade genética na espécie. Estes resultados contribuem para o conhecimento da população do patógeno, sendo um subsídio para trabalhos futuros de melhoramento, uma vez que, com a alta diversidade genética do patógeno, a resistência de cultivares é superada facilmente. Este trabalho é o primeiro relato sobre a diversidade genética de *F. guttiforme* associado a abacaxi de diferentes estados brasileiros.

6 CONCLUSÕES

A caracterização morfológica e o agrupamento de AFLP confirmam que o principal patógeno da fusariose do abacaxizeiro no Brasil é *F. guttiforme*.

A alta diversidade genética na população foi evidenciada por ambas as técnicas, de VCG e AFLP.

Os resultados gerados fornecem indícios da ocorrência de reprodução sexuada na espécie.

Os grupos obtidos nas análises de AFLP sugerem que pode haver populações distintas causando fusariose no abacaxizeiro no Brasil.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. **Abacaxi**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2009. p. 144-152.

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

CHULZE, S.; RAMIREZ, M. L.; TORRES, A.; LESLIE, J. F. Genetic variation in *Fusarium* section liseola from no-till maize in Argentina. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 12, p. 5312-5315, Dec. 2000.

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

GALLY, M.; RAMOS, A. M.; DOKMETZIAN, D.; LOPEZ, S. E. Genetic variability of *Phytophthora sojae* isolates from Argentina. **Mycologia**, Lawrence, v. 99, n. 6, p. 877-883, Nov./Dec. 2007.

GÓES, A. de. **Caracterização patogênica, controle químico e obtenção da fase sexuada de *Fusarium moniliforme* Sheld. var. *subglutinans* Wr. e Rg. do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill)**. 1986. 97 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

LESLIE, J. F.; ANDERSON, L.; BOWDEN, R. L.; LEE, Y. Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. **International Journal of Food Microbiology**, Torino, v. 119, n. 1/2, p. 25-32, Oct. 2007.

LESLIE, J. F. Fungal vegetative compatibility. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 127-150, Sept. 1993.

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

LIMA, C. S.; COSTA, S. S.; CRESPO, N. C.; VENTURA, J. A.; PFENNING, L. H. The causal agent of fusariosis on pineapple is genetically diverse in Brazil. **Jornal of Phytopathology**, Berlin, v. 90, suppl. 3p. 17-22, 2008.

LIMA, C. S.; MONTEIRO, J. H. A.; CRESPO, N. C.; COSTA, S. S.; LESLIE, J. F.; PFENNING, L. H. Vegetative compatibility and amplified fragment length polymorphism analyses of *Fusarium* spp. associated with mango malformation. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 123, n. 1, p. 17-26, Jan. 2009a.

LIMA C. S.; PFENNING, L. H.; COSTA, S. S.; CAMPOS, M. A.; LESLIE, J. F. A new *Fusarium* lineage within the *Gibberella fujikuroi* species complex is the main causal agent of mango malformation disease in Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 58, n. 1, p. 33-42, Feb. 2009b.

MC DONALD, B. A. The population genetics of fungi: tools and techniques. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 4, p. 448-453, Apr. 1997.

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

PASQUALI, M.; DEMATHEIS, F.; GILARDI, G.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* from lettuce. **Plant Disease**, Oxford, v. 89, p. 237-240, Mar. 2005.

PHAN, H. T.; BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S.; LIEW, E. C. Y.; SMITH-WHITE, J. L.; CLARKSON, J. R. *Gibberella gaditjirrii* (*Fusarium gaditjirrii*) sp. nov., a new species from tropical grasses in Australia. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 50, p. 261-272, 2004.

PLOETZ, R. C. *Fusarium*-induced diseases of tropical, perennial crops. **Phytopathology**, St. Paul, v. 96, n. 6, p. 648-652, June 2006.

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

- RAMIREZ, M. L.; REYNOSO, M. M.; FARNOCHI M. C.; CHULZE, S. Vegetative compatibility and mycotoxin chemotypes among *Fusarium graminearum* (*Gibberella zea*) isolates from wheat in Argentina. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 115, n. 2, p. 139-148, June 2006.
- REYNOSO, M. M.; CHULZE, S.; ZELLER, K. A.; TORRES, A.; LESLIE, J. F. Genetic structure of *Fusarium verticillioides* populations isolated from maize in Argentina. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 123 n. 2, p. 207-215, Feb. 2009.
- ROLF, F. J. **NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**. New York: Exeter, 1989. Disponível em: www.exetersoftware.com/cat/update_NTSYSpc.html>. Acesso em: 10 nov. 2009.
- VENTURA, J. A.; ZAMBOLIM, L. Controle das doenças do abacaxizeiro. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. do; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: fruteiras**. Viçosa, MG: UFV, 2002. v. 1, p. 445-510.
- VENTURA, J. A.; ZAMBOLIM, L.; GILBERTSON, R. L. Proposição de nova forma specialis em *Fusarium subglutinans* no abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 280, set. 1993.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. van der; HORNES, M.; FRITERS, A.; POT, J.; PALEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, Jan. 1995.
- WANG, B.; BRUBAKER, L. C.; TATE, W.; WOODS, M. J.; MATHESON, B. A.; BRUDON, J. J. Genetic variation and population structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in Australia. **Plant Pathology**, Oxford, v. 55, n. 6, p. 746-755, Dec. 2006.
- ZHENG, Q.; PLOETZ, R. Genetic diversity in the mango malformation pathogen and development of a PCR assay. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 208-216, Apr. 2002.

8 AGRADECIMENTOS

A primeira autora agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudos. Os autores agradecem à Emcapa de João Pessoa, PB, e a José Roberto Silva, da Emater-MG, pelo auxílio nas coletas de material vegetal. O estudo recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo e Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig) (CAG 1476/06 e CAG APQ-5293-3.09/07).

ANEXOS

ANEXO A		Página
TABELA 1A	Relação dos isolados utilizados nas análises de VCG e AFLP.....	33
ANEXO B		Página
FIGURA 1B	A. Classificação fenotípica dos mutantes <i>nit</i> em meio de cultura com nitrito de sódio (NO ₂) e hipoxantina (HX); B. Teste de complementação entre mutantes <i>nit</i> . No centro um isolado Nit M e ao redor isolados <i>nit1</i>	34
FIGURA 2B	Teste de patogenicidade em folhas destacadas de abacaxi, avaliado seis dias após inoculação. A-B. <i>Fusarium guttiforme</i> . C. <i>Fusarium subglutinans</i> da manga. D. Testemunha tratada com água.....	34
FIGURA 3B	Dendrograma de similaridade gerado por UPGMA, com base nos padrões de bandas gerado por análises de AFLP; A-C Grupos principais, A-I a A-VI subgrupos formados no grupo A. Os isolados utilizados estão especificados na Tabela 1. A espécie tipo é identificada pela letra T.....	35

TABELA 1A Relação dos isolados utilizados nas análises de VCG e AFLP

Código de acesso ^a	Espécie ^b	Hospedeiro ^c	Origem geográfica	VCG ^d	AFLP ^e
CML 908	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Fazenda Jaqueira, ES	VCG1	A-I
CML 915	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Marataízes, ES	VCG1	A-I
CML 1019	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Minas Gerais	VCG1	A-I
CML 1020	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Burarama, ES	Nd	A-I
CML 1029	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Santa Rita, PB	VCG1	A-I
CML 1034	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	São Paulo	Nd	A-I
CML 1046	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Santa Rita, PB	VCG1	A-I
CML 1063 (BBA 69661)	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Brasil (ex-holotype)	Nd	A-I
CML 1629	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Canaã, ES	VCG2	A-II
CML 904	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Presidente Kennedy, ES	VCG2	A-III
CML 905	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Presidente Kennedy, ES	VCG2	A-III
CML 907	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Fazenda Jaqueira, ES	VCG2	A-III
CML 923	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Jegoriuma, ES	VCG2	A-III
CML 997	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Itaberaba, BA	VCG3	A-IV
CML 998	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Itaberaba, BA	VCG3	A-IV
CML 999	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Itaberaba, BA	VCG3	A-IV
CML 901	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Presidente Kennedy, ES	VCG3	-
CML 926	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Brejo dos Patos, ES	VCG3	-
CML 930	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Santa Rita, PB	VCG3	-
CML 1002	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Espírito Santo	VCG3	-
CML 992	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Itapemirim, ES	VCG4	A-V
CML 993	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Itapemirim, ES	VCG4	A-V
CML 911	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Fazenda Jaqueira, ES	VCG4	-
CML 914	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Marataízes, ES	VCG4	-
CML 916	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Marataízes, ES	VCG4	-
CML 919	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Marataízes, ES	VCG4	-
CML 921	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Marataízes, ES	VCG4	-
CML 922	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Jegoriuma, ES	VCG4	-
CML 994	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Itapemirim, ES	VCG4	-
CML 900	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Presidente Kennedy, ES	VCG4	-
CML 1026	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Canaã, ES	VCG5	A-VI
CML 1003	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Espírito Santo	VCG6	B
CML 1031	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Itaberaba, BA	VCG7	B
CML 1052	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	São Paulo	Nd	C
CML 906	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Presidente Kennedy, ES	VCG8	-
CML 910	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Fazenda Jaqueira, ES	VCG9	-
CML 912	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Marataízes, ES	VCG10	-
CML 913	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Marataízes, ES	VCG11	-
CML 918	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Marataízes, ES	VCG12	-
CML 920	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Marataízes, ES	VCG13	-
CML 927	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Brejo dos Patos, ES	VCG14	-
CML 989	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Canaã, ES	VCG15	-
CML 995	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Burarama, ES	VCG16	-
CML 996	<i>F. gut</i>	<i>A. com</i>	Itaberaba, BA	VCG17	-

^aColeções de culturas: *CML* Coleção Micológica de Lavras; *BBA* Biologische Bundesanstalt für Land – und Forstwirtschaft, Berlin, Germany

^b*F. gut*: *Fusarium guttiforme*

^c*A. com*: *Ananas comosus*

^dNd - VCG não determinado

^eA-C Grupos definidos por análises de UPGMA com base no padrão de bandas gerado por AFLP, A-I a A-VI Subgrupos presentes no grupo A, (-) Isolados não utilizados nas análises de AFLP

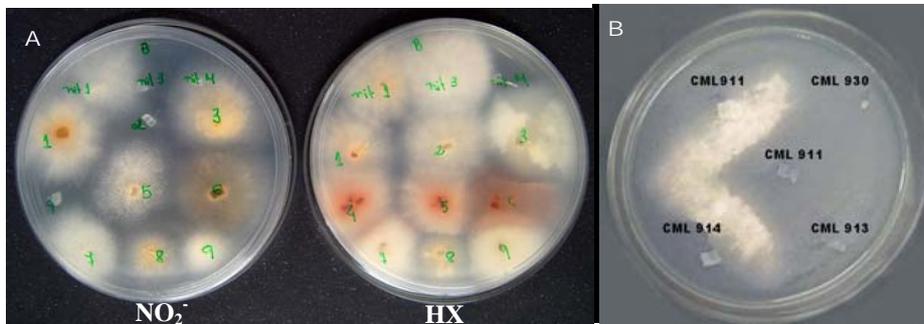


FIGURA 1B A. Classificação fenotípica dos mutantes *nit* em meio de cultura com nitrito de sódio (NO_2^-) e hipoxantina (HX); B. Teste de complementação entre mutantes *nit*. No centro um isolado Nit M e ao redor isolados *nit1*.

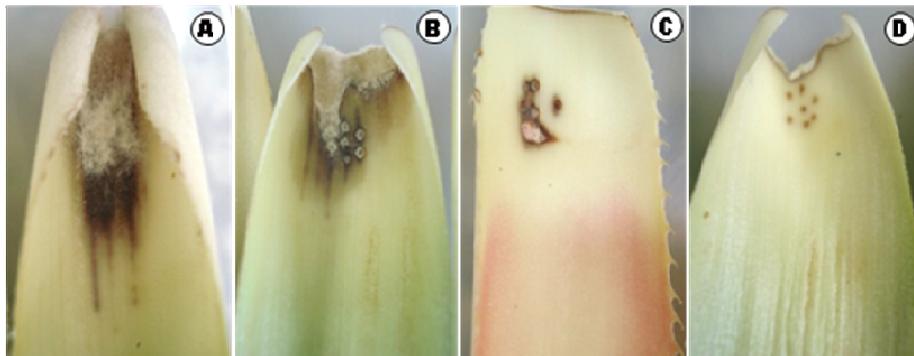


FIGURA 2B Teste de patogenicidade em folhas destacadas de abacaxi, avaliado seis dias após inoculação. A-B. *Fusarium guttiforme*. C. *Fusarium subglutinans* da manga. D. Testemunha tratada com água.

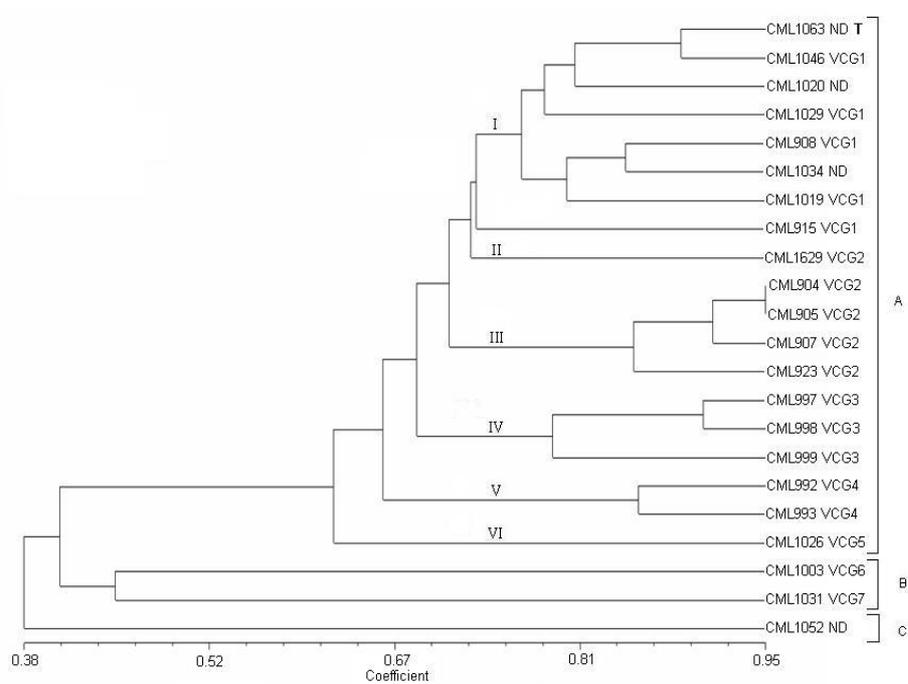


FIGURA 3B Dendrograma de similaridade gerado por UPGMA, com base nos padrões de bandas gerado por análises de AFLP; A-C Grupos principais, A-I a A-VI subgrupos formados no grupo A. Os isolados utilizados estão especificados na Tabela 1. A espécie tipo é identificada pela letra T.