



**KEDMA DA SILVA MATOS**

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES BIOLÓGICAS  
NO COMPLEXO *Fusarium solani*-FSSC**

**LAVRAS – MG**

**2011**

**KEDMA DA SILVA MATOS**

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES BIOLÓGICAS NO COMPLEXO**  
*Fusarium solani*-FSSC

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

Orientador

Dr. Ludwig Heinrich Pfenning

**LAVRAS – MG**

**2011**

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

Matos, Kedma da Silva.

Identificação de espécies biológicas no complexo *Fusarium solani* - FSSC / Kedma da Silva Matos. – Lavras: UFLA, 2011.  
48 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.  
Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning.  
Bibliografia.

1. *Fusarium solani* species complex. 2. Patógenos de plantas. 3.  
*Haematonectria*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.4

**KEDMA DA SILVA MATOS**

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES BIOLÓGICAS NO COMPLEXO**  
*Fusarium solani*-FSSC

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

APROVADA em 23 de fevereiro de 2011.

Dr. Eustáquio Souza Dias UFLA

Dra. Elaine Aparecida de Souza UFLA

Dr. Ludwig Heinrich Pfenning  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2011**

*“Aos meus pais, MARILENE E ANTONIO, pelo amor, carinho,  
exemplo de coragem e determinação. Sem vocês este sonho  
difícilmente se tornaria possível!!!”*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por ter guiado meus caminhos durante esses anos.

À Universidade Federal de Lavras, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e ao Departamento de Fitopatologia, por permitirem a realização do mestrado.

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

Ao professor Dr. Ludwig H. Pfenning, pela orientação, amizade e confiança.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pelos ensinamentos e por terem confiado em mim.

Aos professores Dr. Eustáquio Souza Dias e Dra. Elaine Aparecida de Souza, pela disposição de participar como membro da banca examinadora.

Aos meus pais, Marilene e Antonio, e a minha irmã, Keicy, por todo amor, carinho e confiança ao longo desses anos em que estivemos longe.

Aos amigos do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos do DFP, Edinho, Cintya, Elaine, Juliana, Ana Karla, André, Natália, Rodrigo, Dayana, Lucas, Érica, Gláucia e Aline, pelos momentos de descontração e colaboração na realização do trabalho. Agradecimento especial a Paula, Sarah e Virgínia, pelo apoio e preciosas ajudas.

As inesquecíveis amigas de Lavras, pela cumplicidade e todas as risadas durante esses anos, Angélica, Aline, Fernanda, Amanda, Renata, Tatiana, Thais e Vanessa.

A todos que contribuíram para essa realização pessoal e profissional.

Muito obrigada!

## RESUMO

O complexo *Fusarium solani* - FSSC (teleomorfo *Haematonectria*) é composto por várias espécies filogenéticas e biológicas que causam doenças em diversas de plantas cultivadas. O objetivo do trabalho foi avaliar a presença de espécies biológicas em uma coleção de 68 isolados pertencentes ao FSSC, obtidos de diferentes espécies de plantas hospedeiras e do solo, por meio de teste de homotalismo, determinação de *mating type*, avaliação da compatibilidade sexual e marcadores morfológicos. Protocolos disponíveis na literatura foram adaptados para o teste de homotalismo e os cruzamentos. No teste de homotalismo, isolados monospóricos foram transferidos para SNA e mantidos em temperatura ambiente para verificar a formação espontânea de peritécios férteis. O *mating type* foi determinado por PCR utilizando *primers* específicos e isolados de tipos opostos foram cruzados em meio cenoura-agar. Dos isolados avaliados, 11 foram homotáticos, compartilharam as mesmas características morfológicas e pertencem à espécie *Haematonectria ipomoeae*. O *mating type* foi determinado para 26 isolados, oito de *MAT-1* e 18 de *MAT-2*. Em 17 cruzamentos foram encontrados peritécios férteis, com isolados obtidos exclusivamente de soja e feijão. Essa espécie heterotática foi identificada como *Haematonectria haematococca*. Cruzamentos com isolados obtidos de outras plantas não formaram peritécios férteis. O tamanho do asco mostrou-se um marcador para a distinção das espécies biológicas, já que foram maiores em *H. haematococca*. Caracteres do anamorfo são variáveis e não permitem seu uso como marcadores morfológicos. A espécie homotática parece ser um patógeno inespecífico de diferentes plantas, enquanto que a espécie heterotática provavelmente representa um patógeno de leguminosas. A identificação de espécies biológicas distintas no FSSC será complementada por análises de filogenia molecular e testes de patogenicidade.

Palavras-chave: *Fusarium solani* species complex. *Haematonectria*. Patógeno de planta.

## ABSTRACT

The *Fusarium solani* species complex - FSSC (teleomorph *Haematonectria*) is an aggregate of several phylogenetic and biological species, which cause disease in a wide range of crop plants. The objective of this work was to evaluate the presence of biological species within a collection of 68 isolates belonging to the FSSC, obtained from different host plants and from soil in Brazil. The mating type was determined by PCR using specific primers, followed by evaluation of sexual compatibility through crossings of isolates belonging to opposite mating types on carrot agar. To check for homothalism, monosporic cultures were plated on SNA and maintained at about 25°C for spontaneous production of fertile perithecia. The presence of differential morphological markers amongst the isolates was also evaluated. Eleven isolates were found to be homothallic and showed morphological characters matching the descriptions of *Haematonectria ipomoeae*. It was possible to determine the mating type of 26 isolates, eight of *MAT-1* and 18 of *MAT-2*. Fertile perithecia were produced in 17 crossings among different isolates from soybean and common bean. This heterothallic species was tentatively identified as *Haematonectria haematococca*. Isolates from others plants did not produce fertile crossings. The size of asci was a useful marker for distinguishing the two biological species, with *H. haematococca* producing bigger asci. Characters of the anamorph were variable and could not be used as morphological markers. The homothallic species seems to be an unspecific pathogen, occurring in different host plants, while the heterothallic species probably represents a pathogen of leguminosae. Identification of biological species will be complemented by phylogenetic analysis and pathogenicity tests.

Keywords: *Fusarium solani* species complex. *Haematonectria*. Plant pathogen.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
<b>2.1</b>	<b>Complexo <i>Fusarium solani</i></b> .....	12
<b>2.2</b>	<b><i>Mating types</i> e o conceito de espécie biológica</b> .....	14
<b>2.3</b>	<b>Reprodução sexual em <i>Fusarium solani</i></b> .....	16
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
<b>3.1</b>	<b>Obtenção dos isolados</b> .....	19
<b>3.2</b>	<b>Caracterização morfológica da fase anamorfa e da fase teleomorfa</b> .....	19
<b>3.3</b>	<b>Testes de homotalismo</b> .....	20
<b>3.4</b>	<b>Extração de DNA</b> .....	20
<b>3.5</b>	<b>Determinação de <i>mating type</i> por PCR</b> .....	21
<b>3.6</b>	<b>Indução da fase sexuada</b> .....	21
<b>3.7</b>	<b>Determinação da viabilidade dos ascósporos</b> .....	22
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	23
<b>4.1</b>	<b>Testes de homotalismo</b> .....	23
<b>4.2</b>	<b>Determinação de <i>mating type</i> e indução da fase sexuada</b> .....	23
<b>4.3</b>	<b>Determinação da viabilidade dos ascósporos</b> .....	26
<b>4.4</b>	<b>Caracterização morfológica da fase anamorfa e da fase teleomorfa</b> .....	29
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	34
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	41
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42
	<b>APÊNDICES</b> .....	45

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Fusarium* compreende várias espécies importantes como patógenos de plantas cultivadas. Existem ainda espécies conhecidas como produtoras de toxinas, que causam doenças em humanos e em animais. Na natureza, ocorrem como saprófitas no solo e em restos vegetais, e como endófitos, colonizando o interior de plantas sem causar sintomas de doença (GERLACH; NIRENBERG, 1982; ZHANG et al., 2006).

Conhecimentos gerados durante as últimas décadas permitiram uma definição mais precisa de espécies e populações que causam doenças em plantas cultivadas. No entanto, o conceito de espécie baseado principalmente em caracteres morfológicos não reflete a real diversidade de espécies e populações nesse gênero. O conceito de *forma specialis* foi adotado, em *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, para identificar populações específicas de determinadas plantas hospedeiras (BAAYEN et al., 2000; O'DONNELL et al., 1998). Em *F. solani*, mais de 20 nomes de *formae speciales* são conhecidos. Entretanto, várias dessas populações representam espécies biológicas e filogenéticas distintas.

Estudos baseados em sequências de DNA indicam que o FSSC é composto por pelo menos 47 espécies filogeneticamente distintas, distribuídas em três clados. O clado 2 é formado pelos isolados associados à podridão vermelha de raiz na soja (PVR), provenientes da América do Sul, enquanto os patógenos de outras plantas e espécies de importância clínica formam o clado 3, encontradas na África, na Ásia e na América do Sul (O'DONNELL, 2000; O'DONNELL et al., 2010).

A reprodução sexual no complexo *F. solani* pode ser heterotática ou homotática e o teleomorfo é conhecido como *Haematonectria* ou *Neocosmospora* (Hypocreales, Ascomycota). Cruzamentos podem ser realizados

em laboratório, controlando o papel de cada parental e sua habilidade em produzir peritécios ou gametas (ETTEN, 1978; LESLIE; SUMMERELL, 2006). Em testes de homotalismo e de cruzamentos em laboratório, as condições de temperatura, luminosidade e tempo de incubação podem variar para cada espécie de fungo (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Por isso, pode ser necessário adaptar protocolos já descritos na literatura para a determinação de *mating types* e *mating populations* para a espécie ou população em estudo, essencial na observação de espécies biológicas.

A identificação de espécie biológica ou *mating population* (MP) pode ser útil quando não há marcadores morfológicos suficientes para delimitar espécies. O procedimento permite também obter conhecimento sobre o nível de troca genética entre as populações de fungos (LESLIE, 1995; O'DONNELL et al., 1998; ROSSMAN et al. 1999).

Em testes de compatibilidade sexual e análises filogenéticas de sequências de DNA com *formae speciales* e raças em *F. solani*, constatou-se que o FSSC é composto de sete *mating populations* (MP-I a MP-VII), que também correspondem a sete espécies filogenéticas. As duas raças de *F. solani* f. sp. *cucurbitae* conhecidas revelaram-se como duas *mating populations* distintas MP-I e MP-V e, posteriormente, como espécies filogenéticas diferentes. A caracterização de espécie biológica e as análises filogenéticas permitiram a delimitação mais precisa das espécies de fungos que têm número insuficiente de caracteres morfológicos, tanto no anamorfo como no teleomorfo, como é o caso das espécies pertencentes ao complexo *F. solani* (MATUO; SNYDER, 1973; O'DONNELL, 2000).

As populações do FSSC são agentes etiológicos de várias doenças de plantas de importância agrícola, principalmente na região tropical e subtropical, inclusive no Brasil, e causam doenças como podridão de raízes, murcha ou fusariose em soja, feijão, maracujá, curcubitáceas, algodão, café, batata, cacau,

pimenta, pimentão e citrus, entre outras (O'DONNELL, 2000; O'DONNELL et al., 2008). Na soja (*Glycine max* L.), a podridão vermelha da raiz é uma doença causada por várias espécies pertencentes ao FSSC, anteriormente descritas como uma única espécie, denominada de *Fusarium solani* f.sp. *glycines*. De acordo com estudos recentes, três delas ocorrem supostamente no Brasil, *Fusarium tucumaniae*, *Fusarium brasiliense* e uma espécie ainda não identificada, *Fusarium* sp. (AOKI et al., 2003; AOKI; O'DONNELL; SCANDIANI, 2005). Os resultados dos estudos foram baseados em número pequeno de isolados, não representando a variabilidade real da população existente no país. Há fortes evidências de que um número considerável de novas espécies pode existir nas regiões tropicais e subtropicais do Brasil e outros países (O'DONNELL, 2000).

Outro patossistema que tem como agente causal *Fusarium solani* é a fusariose da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), uma das principais doenças dessa cultura, de ocorrência restrita ao Brasil. O agente etiológico é conhecido como *Fusarium solani* f.sp. *piperis*, o qual pode representar uma espécie diferente (ALBUQUERQUE et al., 2001).

Diante disso, o conhecimento sobre a diversidade de populações dentro do FSSC existentes no país ainda é limitado. Neste trabalho, pretende-se responder às seguintes questões: (i) No Brasil, existem espécies ou populações distintas no FSSC, obtidas de diferentes plantas cultivadas e do solo? (ii) É possível distinguir essas espécies por meio de marcadores morfológicos tanto no anamorfo como no teleomorfo? (iii) Podem ser encontradas uma ou mais espécies biológicas em plantas distintas?

Os objetivos foram: i. verificar a presença de espécies homotáticas por meio de teste de homotalismo; ii. identificar, por PCR, os *mating types* existentes dentro da coleção de isolados; iii. induzir a formação da fase sexuada em laboratório e iv. identificar marcadores morfológicos para populações distintas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Complexo *Fusarium solani*

O complexo *Fusarium solani*-FSSC (teleomorfo *Haematonectria*, Hypocreales, Ascomycota, *Fusarium*, Seção *Martiella*) é composto por diversas espécies importantes como patógenos de várias plantas cultivadas, além de patógenos de humanos e de animais. Existem, ainda, algumas espécies produtoras de toxinas, endófitas e saprófitas (GERLACH; NIRENBERG, 1982; ZHANG et al., 2006).

As populações do FSSC são responsáveis por doenças em plantas economicamente importantes, como podridão vermelha da raiz na soja, causada por *F. tucumaniae*, *F. brasiliense*, *F. virguliforme* e uma espécie ainda não identificada, *Fusarium* sp., anteriormente denominadas como *F. solani* f. sp. *glycines*. Em feijoeiro, ocorre uma doença conhecida como podridão radicular seca do feijoeiro, ocasionada por *Fusarium* f. sp. *phaseoli* e *F. cuneirostrum*.

Outra fusariose importante ocorre em pimenta-do-reino causada pelo fungo *F. solani* f.sp. *piperis*. Há, ainda, registros de doenças causadas por *Fusarium solani* em podridão de frutos em *Cucurbita* spp., ocasionada por *F. solani* f. sp. *cucurbitae* raça 1 e raça 2. Fusariose em ervilha, cujo patógeno é denominado de *F. solani* f. sp. *pisi* e podridão seca e murcha em batata-doce, causada por *F. solani* f. sp. *batatas*. A diversidade das populações é evidenciada pela quantidade de *formae speciales*, patogenicidade específica a determinada planta (BAAYEN et al., 2000; ETTEN, 1978; MATUO; SNYDER, 1973; O'DONNELL et al., 1998, 2010).

Em *F. solani* existem mais de 20 nomes de *formae speciales* conhecidos, os quais representam várias espécies biológicas e filogenéticas distintas (O'DONNELL, 2000; O'DONNELL et al., 2008). A tradicional classificação e

identificação de espécies dentro do FSSC baseia-se em caracteres morfológicos do anamorfo, morfologia da colônia em meio de cultura, patogenicidade de hospedeiro, produção de metabólitos secundários e, em menor escala, nas estruturas do teleomorfo, quando a fase sexuada é encontrada (O'DONNELL; GRAY, 1995).

O conceito de espécie baseado principalmente em caracteres morfológicos e *formae speciales* pode não refletir a diversidade real de espécies e populações no FSSC, pois os marcadores morfológicos são escassos tanto para o anamorfo como para o teleomorfo. Além disso, pode omitir as verdadeiras relações filogenéticas, a distribuição geográfica e a variedade de hospedeiro desses patógenos (O'DONNELL et al., 2008, 2010). Por isso, conhecimentos adquiridos durante as últimas décadas por meio de filogenia molecular e conceitos biológicos permitiram uma definição mais acurada no sistema de classificação de espécies e populações no FSSC que causam doenças em plantas cultivadas (GEISER et al., 2004; LESLIE; SUMMERELL, 2006; NIRENBERG; O'DONNELL, 1998; SUMMERELL et al., 2001). Existem fortes evidências de que, nas regiões tropicais e subtropicais do Brasil e de outros países, pode existir um número considerável de novas espécies (O'DONNELL et al., 2010).

Análises filogenéticas de sequências de DNA confirmaram que *Fusarium solani* é um complexo de espécies, composto por pelo menos 47 espécies filogeneticamente distintas, anteriormente desconhecidas devido à semelhança morfológica entre elas (O'DONNELL, 2000; O'DONNELL et al., 2008). Estudos baseados em filogenia evidenciaram que as populações do FSSC são distribuídas em três clados distintos: o clado 1, composto por isolados da Nova Zelândia; o clado 2, formado por isolados associados à PVR provenientes da América do Sul e o clado 3, composto por patógenos de outras plantas e espécies de importância clínica dentro do FSSC, encontradas na África, Ásia e América do Sul (O'DONNELL, 2000; O'DONNELL et al., 2010).

## 2.2 *Mating types* e o conceito de espécie biológica

O ciclo de reprodução sexual em fungos, assim como nos demais eucariotos, passa pelos processos de acasalamento (*mating*) e meiose. A terminologia utilizada para descrever um sistema de cruzamento entre fungos é denominada de *mating type*. O mecanismo básico de *mating type* é de um loco *MAT* e dois idiomorfos, *MAT-1* e *MAT-2*, sequências não relacionadas presentes na mesma posição do cromossomo. Os genes do loco *MAT* têm regiões conservadas entre espécies distantes, que codificam proteínas denominadas HMG-box (high mobility group) e  $\alpha$ -box. O que torna os fungos sexualmente distintos é a existência de certas sequências genéticas em um parceiro e não no outro. Em espécies de ascomicetos heterotálicas ou autoestéreis, só é possível o cruzamento entre dois isolados geneticamente diferentes, ou seja, *mating types* opostos, *MAT-1* e *MAT-2* (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Isolados heterotálicos que interagem para formar a fase sexual e resultam na formação de peritécios férteis, com exsudação de ascósporos, são denominados compatíveis. Já os que não são capazes de formar estruturas sexuais ou formam, mas não são férteis, são isolados incompatíveis. Em espécies homotálicas, os dois idiomorfos estão presentes em único genoma. Estas espécies completam o ciclo de vida a partir de um único esporo, por isso, são consideradas autoférteis (LESLIE; SUMMERELL, 2006; O'DONNELL, 2000). Espécie biológica ou *mating population* (MP) é definida pela capacidade de produzir cruzamentos férteis entre isolados de uma mesma MP e esterilidade, quando cruzados com membros de MPs diferentes. O conceito biológico é importante para auxiliar nas limitações que surgem na identificação, quando entidades biológicas distintas são morfologicamente muito similares, como é o caso das espécies pertencentes ao complexo *F. solani*. (LESLIE, 1995).

Técnicas baseadas em *polymerase chain reaction*, ou PCR, foram desenvolvidas para facilitar a determinação de *mating types* e, assim, evitar o trabalho laborioso de fazer numerosos cruzamentos em laboratório, testando várias condições de temperatura, luminosidade, nutrição e de receptividade do micélio. Após determinar os *mating types*, o cruzamento é realizado somente com isolados opostos (COVERT et al., 1999; STEENKAMP et al., 2000).

Indução da fase sexuada em laboratório com nove *formae speciales* e duas raças de *F. solani* revelou que o FSSC é composto de sete *mating populations* (MATUO; SNYDER, 1973) (Tabela 1).

O sucesso de cruzamentos em ascomicetos depende da fertilidade dos isolados parentais. Isolados que têm a habilidade de formar peritécio são denominados “fêmea fértil”, enquanto os isolados capazes de produzir gametas férteis, tipicamente na forma de conídios, são denominados de “macho fértil”. Os isolados que apresentam habilidade de produzir peritécios e conídios servem tanto como parental feminino ou masculino e são denominados de hermafroditas.

Tabela 1 Espécies biológicas ou *mating populations* (MP) no complexo *Fusarium solani* obtidas por Matuo e Snyder (1973)

<b>Espécies de <i>Fusarium solani</i></b>	<b><i>Mating populations</i></b>
f. sp. <i>cucurbitae</i> race 1	MP-I
f. sp. <i>batatas</i>	MP-II
f. sp. <i>mori</i>	MP-III
f. sp. <i>xanthoxyli</i>	MP-IV
f. sp. <i>cucurbitae</i> race 2	MP-V
f. sp. <i>lisi</i>	MP-VI
f. sp. <i>robineae</i>	MP-VII



Em laboratório, cruzamentos podem ser realizados controlando o papel de cada parental e sua habilidade em produzir peritécios ou gametas. Além disso, é fundamental o desenvolvimento e o aperfeiçoamento de protocolos viáveis nos testes de homotalismo e de cruzamentos em laboratório, para a determinação de *mating types* e *mating populations* importantes na identificação de espécies homotáticas e heterotáticas (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

### 2.3 Reprodução sexual em *Fusarium solani*

Ao longo dos anos, diversos nomes e sinônimos para o teleomorfo de espécies do FSSC foram propostos, como *Hypomyces* sp., *Nectria* sp., *Neocosmospora* sp. e *Haematonectria* sp. Análises filogenéticas utilizando sequências de DNA revelaram que '*Nectria*' *haematococca* e *Neocosmospora vasinfecta* formaram um grupo irmão de *Nectria cinnabarina*. Assim, as espécies de '*N.*' *haematococca* e de *Fusarium* (seção *Martiella*) foram incluídas no gênero *Neocosmospora*. No entanto, estudos posteriores revelaram que existiam diferenças no anamorfo e no teleomorfo de '*N.*' *haematococca* e espécies relacionadas com *Neocosmospora*. O anamorfo de *N. vasinfecta* é denominado de *Acremonium* e possui conídios e ascósporos não septados. Possivelmente, isolados de *Acremonium* perderam a habilidade de produzir macroconídios e ascósporos septados (O'DONNELL; GRAY, 1995).

Diante disso, foi proposto um novo gênero a partir de '*N.*' *haematococca*, denominado de *Haematonectria* Samuels & Nirenberg, caracterizado por peritécios globosos ou piriformes vermelhos, asco clavado com oito ascósporos, ascósporos elipsoides, com um septo e estriado (ROSSMAN et al., 1999). Três espécies estão incluídas no gênero *Haematonectria*: *Haematonectria haematococca*/*F. solani*, *Haematonectria ipomoeae*/*Fusarium striatum*' e *Haematonectria illudens*/*Fusarium illudens*. A

reprodução sexual de populações do complexo *F. solani* pode ser heterotálica ou homotálica. Em *H. haematococca*, populações heterotálicas têm sido encontradas em várias plantas cultivadas e podem representar espécies distintas, principalmente devido à rápida especiação em resposta às atividades agrícolas. Em *H. ipomoeae*, são encontradas espécies homotálicas ou autoférteis e o anamorfo é denominado de *F. striatum*, que corresponde a um sinônimo de *F. solani* (O'DONNELL, 2000; O'DONNELL; GRAY, 1995; ROSSMAN et al., 1999).

Testes de compatibilidade sexual e análises filogenéticas de sequências de DNA revelaram que o FSSC é composto de sete espécies biológicas, que correspondem a sete espécies filogenéticas distintas. Algumas espécies do complexo não têm a fase teleomórfica descrita. No mesmo estudo, as *formae speciales* não formam um grupo (clado) monofilético e as duas raças de *F. solani* f. sp. cucurbitae, MP-I e MP-V, representam espécies distintas. Espécie biológica, identificada por meio de cruzamentos realizados em laboratório, pode auxiliar na identificação de *formae speciales* em adição a testes de patogenicidade (MATUO; SNYDER, 1973; O'DONNELL, 2000). As relações filogenéticas de 247 isolados do FSSC, por meio de análise combinada de sequências de ITS, 28S rDNA e EF-1 $\alpha$ , revelaram 26 grupos filogenéticos distintos, dos quais 15 são heterotálicos, 7 são homotálicos e 4 são supostamente mitospóricos (O'DONNELL, 2000).

Estudos com a indução da fase sexuada em laboratório com isolados associados à PVR revelaram que *F. tucumaniae* tem alta diversidade genética devido à sua reprodução sexual, cujo teleomorfo foi descoberto. Porém, o teleomorfo de *F. virguliforme* não foi encontrado, sugerindo sua reprodução clonal (COVERT, et al., 2007). Até o momento, não há relato na literatura de estudos sobre a diversidade genética e a ocorrência da fase sexuada para os demais isolados associados a PVR da soja.

O agente causal da fusariose da pimenta-do-reino, identificado como *N. haematococca* f sp. *piperis* (anamorfo - *F. solani* f. sp. *piperis*), é considerado patógeno específico apenas a esta cultura. No entanto, em 1994, foi isolado, pela primeira vez, *N. haematococca* f sp. *Piperis*, de ramos infectados de *Piper aduncum*, uma espécie nativa de piperáceas. Cruzamentos entre isolados de *N. haematococca* obtidos de *P. aduncum* com clones-teste do mesmo fungo, obtido de *Piper nigrum*, foram capazes de produzir peritécios férteis, confirmando a presença do mesmo fungo em espécies de plantas diferentes (ALBUQUERQUE et al., 2001).

A importância do estabelecimento de isolados testadores, aqueles que possuem alta fertilidade de cada *mating type* para a indução da reprodução sexuada em laboratório, é de grande valia na geração posterior de uma base de conhecimento sobre a genética da espécie fúngica e para o desenvolvimento de técnicas avançadas tanto para a detecção do patógeno antes do plantio, quanto para estudos de resistência e melhoramento genético (LESLIE, 1995).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Obtenção dos isolados**

Os 68 isolados de *Fusarium solani* utilizados no presente estudo foram obtidos de várias espécies de plantas cultivadas, da vegetação natural e do solo, provenientes de várias regiões geográficas do Brasil e isolados de referência cedidos de outros países (Tabela 1A, APÊNDICE). Os isolados estão preservados em microtubos e em água destilada esterilizada à temperatura ambiente (25°-27°C) e criopreservados em suspensão de esporos, 15% glicerol a -80°C (SMITH; ONIONS, 1994) na Coleção Micológica de Lavras (CML), Laboratório de Sistemática e Ecologia de fungos da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Minas Gerais, Brasil.

#### **3.2 Caracterização morfológica da fase anamorfa e da fase teleomorfa**

Os isolados foram cultivados em meio *potato-dextrose-ágar* (PDA) para observação da taxa de crescimento, pigmentação da colônia e formação do micélio aéreo, após quatro dias de incubação a 25°C, no escuro. Em *synthetic nutrient-poor Agar* (SNA), após 10 a 14 dias de incubação a 20°C, com fotoperíodo de 12 horas de luz branca fluorescente e 12 horas no escuro, foram observadas as características micromorfológicas, como a presença ou não e a coloração de esporodóquios; frequência, tamanho, formato e origem de microconídios e macroconídios; e tipos de fiálides e de clamidósporos (AOKI et al., 2003). As estruturas da fase sexuada foram caracterizadas e fotografadas, realizando a medição do diâmetro do peritécio, comprimento e largura dos ascos e de ascósporos e verificação do número de septos. Foram tomadas 30 medidas de cada estrutura, as quais serviram para a posterior comparação com as outras

espécies biológicas de *F. solani*, já descritas na literatura (COVERT et al., 2007; ROSSMAN et al., 1999).

### **3.3 Testes de homotalismo**

O teste de homotalismo foi realizado seguindo dois protocolos, aperfeiçoados a partir de Covert et al. (2007) e Leslie e Summerell (2006). No primeiro protocolo, isolados monoconidiais foram cultivados em placas de Petri de poliestireno (60 x 15 mm) contendo o meio de cultura cenoura-ágar (CA) e incubados a 25°C no escuro, por sete dias. Após o período de incubação, foram transferidos 2 mL de solução de Tween 80 a 2,5% (v/v) na superfície da colônia e espalhada utilizando-se uma alça de Drigalski, de modo a umedecer completamente o micélio. As culturas foram incubadas a 22°-23°C, sob luz constante, por aproximadamente 30 dias, em vez de 18°C, como descrito na literatura (COVERT et. al., 2007). O segundo protocolo consistiu em transferir os isolados para tubos e placas contendo o meio SNA e tubos contendo meio completo (CM), incubados à temperatura ambiente e a 20°C, sob 12 horas de luz fluorescente, combinada com 12 horas de escuro, por aproximadamente 30 dias. Os testes foram repetidos, para a confirmação dos resultados.

### **3.4 Extração de DNA**

Os isolados foram cultivados em meio completo líquido, incubados em um agitador (150 rpm) por três dias em temperatura ambiente (25° a 28°C). O micélio foi filtrado e a extração de DNA foi realizada pelo método CTAB, de acordo com o protocolo de Leslie e Summerell (2006). O DNA extraído foi analisado em gel de agarose 1% e seu peso molecular e concentração,

determinados por comparação com um marcador de comprimentos de fragmentos de 1 Kb.

### 3.5 Determinação de *mating type* por PCR

O *mating type* de isolados monospóricos foi determinado por meio da amplificação do alelo *MAT-1*, utilizando os *primers fusALPHAfor* (CGCCC TCTKAAYGSCTTCATG) e *fusALPHArev* (GGARTARACYTTAGCAATYAGGGC), gerando um fragmento de 200 pb e do alelo *MAT-2*, utilizando os *primers fusHMGfor* (CGACCTCCCAAYGCTACAT) e *fusHMGrev* (TGGGCGGTACTGGTARTCRGG), gerando um fragmento de 260 pb (KERÉNYI et al., 2004). Para determinar o *mating type* dos isolados, temperatura de anelamento e tempo de extensão dos *primers* foram ajustados, na tentativa de otimizar a reação da PCR, pois são descritas variações de 55° a 60°C, para anelamento e 0,5 a 5 minutos, a 72°C, para extensão dos *primers* (KERÉNYI et al., 2004). O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% para a visualização dos resultados. O comprimento dos fragmentos amplificados foi comparado com um marcador de comprimentos de fragmentos 1 Kb.

### 3.6 Indução da fase sexuada

Para a indução da fase sexuada em laboratório, o protocolo descrito por Leslie e Summerell (2006) foi adaptado. Cada isolado foi testado como parental masculino e como parental feminino em cruzamentos recíprocos. Os isolados de um determinado *mating type*, testados como parentais masculinos foram cultivados em tubo de ensaio contendo meio completo e incubados a 20°C sob fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. Os isolados do outro *mating type*, para

testados como parentais femininos, foram cultivados em placas de Petri de poliestireno (60 x 15 mm) em meio CA, incubados a 25°C, no escuro, por sete dias. Após o período de incubação, foi preparada uma suspensão de esporos no tubo de ensaio pela adição de 2 mL de solução Tween 80 a 2,5% (v/v), utilizando uma pipeta de Pasteur. Em seguida, a suspensão foi transferida para uma placa contendo o isolado de *mating type* oposto e, com o auxílio de uma alça de Drigalski, foi espalhada de modo a umedecer completamente o micélio.

Após os cruzamentos, condições de incubação, como temperatura e luminosidade, foram ajustadas a partir do protocolo descrito em Leslie e Summerell (2006). Os cruzamentos foram incubados a 22°-23°C, com luz branca fluorescente constante, por um período de até seis semanas, avaliados semanalmente e considerados férteis quando produziram peritécios com exsudação de ascósporos. Os cruzamentos foram repetidos, para confirmação dos resultados.

### **3.7 Determinação da viabilidade dos ascósporos**

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

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Testes de homotalismo

O protocolo utilizando placas contendo meio de cultura SNA à temperatura ambiente foi considerado mais prático e eficaz na formação dos peritécios. Onze isolados homotáticos foram encontrados, provenientes de algodão, crisântemo, pimentão, pimenta, erva de passarinho, café, batata, cacau e solo. Os peritécios foram formados entre 15 e 20 dias após a transferência dos isolados para placas de Petri com SNA e a exsudação de ascósporos ocorreu por volta de 10 dias após a formação dos peritécios. Houve formação abundante de peritécios vermelhos, solitários e agrupados, subglobosos a piriformes, medindo 310-400 x 250-330  $\mu\text{m}$ . O asco possui formato cilíndrico, clavado, contendo oito ascósporos, medindo 52-70 x 5-8  $\mu\text{m}$ . Os ascósporos são hialinos, de formato elipsoide, com um septo e estriado, medindo 10-14 x 4-5,5  $\mu\text{m}$  (Tabela 1B, APÊNDICE). Com base nas características morfológicas, todos os isolados homotáticos pertencem à mesma espécie biológica, identificada como *Haematonectria ipomoeae* (Halst.) Samuels & Nirenberg (ROSSMAN et al., 1999) (Figura 1).

### 4.2 Determinação de *mating type* e indução da fase sexuada

Para determinar o *mating type* dos isolados, a melhor temperatura de anelamento foi de 60°C e o melhor tempo de extensão dos *primers* foi de 2 minutos. Após os testes de homotalismo, 49 isolados que não formaram peritécios espontaneamente foram testados para a determinação de *mating type*. Utilizando os *primers* descritos por Kerényi et al. (2004) foi possível determinar os *mating types* de 24 isolados. Oito isolados foram identificados como *MAT-1* e



16 isolados como *MAT-2* (Tabela 1A, APÊNDICE). Três isolados homotáticos (CML 582, CML 1746 e CML 2055) também foram testados para verificar a presença de ambos os *mating types* no mesmo isolado. No entanto, não houve amplificação dos fragmentos. O *mating type* de outros dois isolados foi determinado por meio de uma série de cruzamentos.

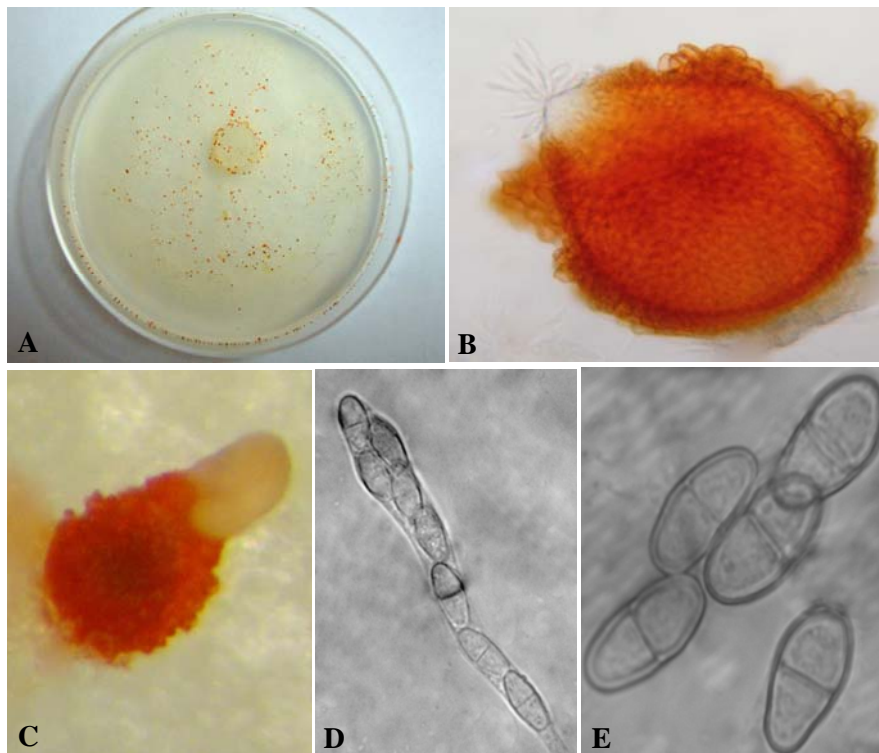


Figura 1 *Haematonectria ipomoeae* A. Cultura monoconidial, com formação abundante de peritécios em placa de Petri contendo meio SNA; B. Peritécio; C. Peritécio exsudando ascósporos; D. Asco contendo oito ascósporos; E. Ascósporos

As condições de incubação dos cruzamentos aperfeiçoadas neste estudo, como temperatura de 22°-23°C e luminosidade, com luz branca fluorescente constante, foram eficientes na formação de peritécios férteis entre isolados de *F.*

*solani*. Os cruzamentos foram avaliados semanalmente quanto à formação de peritécios e exsudação de ascósporos. No final da avaliação, foram encontrados 17 cruzamentos distintos que formaram peritécios férteis típicos do gênero *Haematonectria* (Tabela 3). Após duas semanas de incubação, peritécios foram observados nos cruzamentos entre isolados da soja e entre isolados da soja com feijão. A exsudação de ascósporos ocorreu de 3 a 5 semanas após a formação dos peritécios. Os isolados CML 1835 e CML 860 foram capazes de produzir peritécios férteis com mais de um parceiro sexual (Tabela 3).

Tabela 3 Compatibilidade sexual entre isolados do complexo *Fusarium solani* avaliados após cruzamentos em laboratório a 22°-23°C/luz constante

♀ (MAT-1) <sup>a</sup>		♂ (MAT-2) <sup>b</sup>	♀ (MAT-2) <sup>c</sup>		♂ (MAT-1) <sup>d</sup>
CML 1830	X	CML 1835	CML 1835	x	CML 1830
CML 1830	X	CML 860	CML 1835	x	CML 1833
			CML 1835	x	CML 1343
CML 1343	X	CML 1835	CML 1835	x	CML 526
			CML 860	x	CML 1830
CML 1833	X	CML 1835	CML 860	x	CML 1833
			CML 860	x	CML 1343
			CML 860	x	CML 526
CML 526	X	CML 860	CML 860	x	CML 1834
			CML 860	x	CML 2048
CML 1829	X	CML 1992	CML 2028	x	CML 526

<sup>a</sup> ♀ (MAT-1) indica os isolados do *mating type* MAT-1 férteis como fêmea

<sup>b</sup> ♂ (MAT-2) indica os isolados do *mating type* MAT-2 férteis como macho

<sup>c</sup> ♀ (MAT-2) indica os isolados do *mating type* MAT-2 férteis como fêmea

<sup>d</sup> ♂ (MAT-1) indica os isolados do *mating type* MAT-1 férteis como macho

Cruzamentos entre o isolado CML 1835 com CML 2045 (*F. solani* f. sp. *phaseoli*) e CML 1882 (*F. cuneirostrum*), e CML 1830 com CML 1889 (*F. solani* f. sp. *cucurbitae* MP-I) formaram peritécios, entretanto, não ocorreu exsudação de ascósporos. Após os resultados dos cruzamentos, os isolados CML 526, CML 860, CML 1343, CML 1830, CML 1833 e CML 1835 foram

selecionados para cruzamentos com isolados de *F. solani* provenientes de outras plantas cultivadas e isolados que não tiveram o *mating type* definido por PCR. O *mating type* dos isolados CML 1834 e CML 2048, provenientes do feijão, foi identificado por meio do cruzamento com o isolado CML 860. Não foi observada a formação de peritécios férteis entre isolados da soja e do feijão com isolados de *F. solani* obtidos de outros hospedeiros.

O teleomorfo induzido apresentou peritécios vermelhos, solitários ou agregados, superficial, não estromático, globosos para piriforme, verrugosos, medindo 205-370 x 200-340  $\mu\text{m}$ , não papilado ou com ápice agudo, 80-100  $\mu\text{m}$  de altura e 100-150  $\mu\text{m}$  de largura até a base. Massa de células do perídio circular para angular. Asco cilíndrico para clavado, 65-95 x 8-15  $\mu\text{m}$ , contendo oito ascósporos, organizados obliquamente. Ascósporos hialinos, elipsoides, um septo e estriado, medindo 10-16 x 4-7  $\mu\text{m}$  (Tabela 1B, APÊNDICE). As avaliações das características morfológicas do teleomorfo observado nos cruzamentos permitiram identificá-lo como *Haematonectria haematococca* (Berk. & Broome) Samuels & Nirenberg (Figura 2).

A espécie heterotática possui ascos e ascósporos maiores do que os da espécie homotática. No entanto, a pequena diferença no tamanho de ascósporos não permitiu a diferenciação entre as duas espécies. Pelos resultados, é possível diferenciá-las pelo tamanho dos ascos, podendo ser observados dois grupos distintos (Gráfico 1).

### **4.3 Determinação da viabilidade dos ascósporos**

Ascósporos exsudados por peritécios de todos os cruzamentos férteis foram transferidos em agar-água 2% e mostraram-se viáveis, germinando após 24 a 32 horas de incubação (Figura 2).

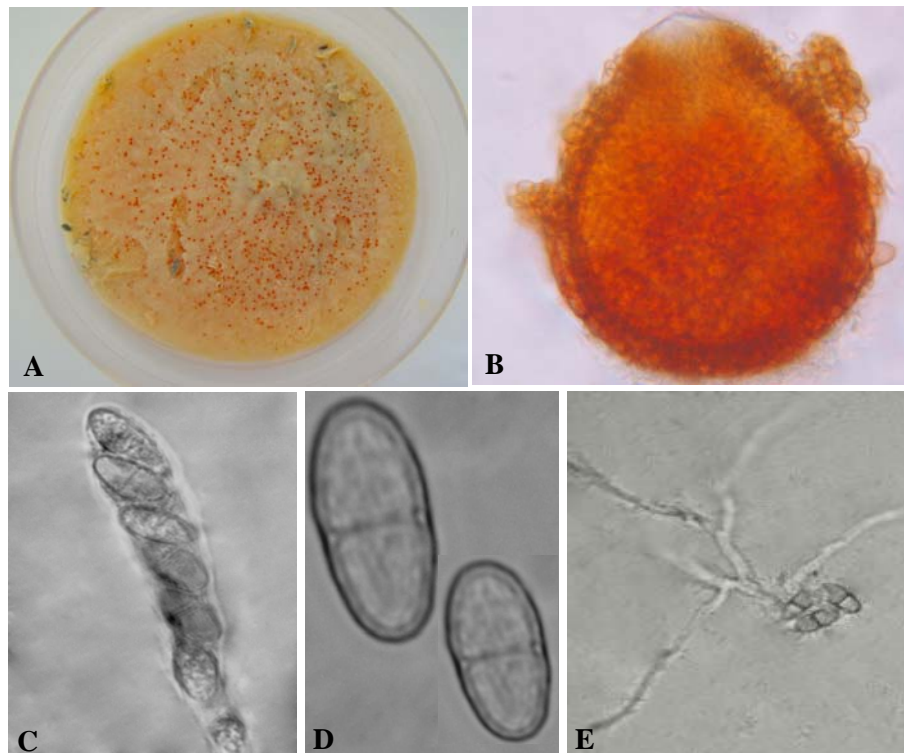


Figura 2 *Haematonectria haematococca* A. Cruzamento fértil com formação abundante de peritécios em meio CA; B. Peritécios; C. Asco contendo ascósporos; D. Ascósporos; E. Ascósporos germinados

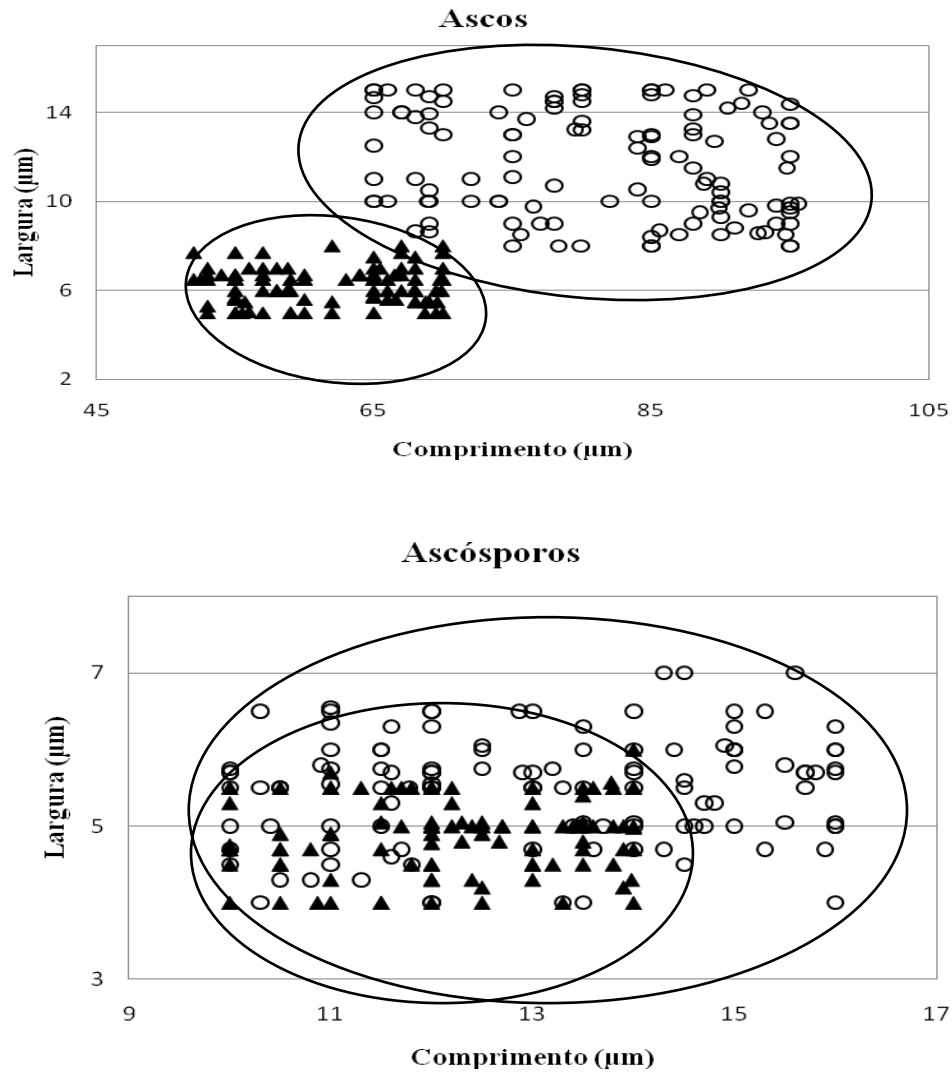


Gráfico 1 Valores do comprimento e largura ( $\mu\text{m}$ ) de ascos e ascósporos obtidos após teste de homotalismo em temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{-}27^{\circ}\text{C}$ ) e cruzamentos em laboratório a  $22^{\circ}\text{-}23^{\circ}\text{C}$ /luz constantes, ( $\blacktriangle$ ) Isolados homotáticos e ( $\circ$ ) Isolados heterotáticos

#### 4.4 Caracterização morfológica da fase anamorfa e da fase teleomorfa

Na caracterização morfológica em SNA, a maioria dos isolados apresentou características semelhantes, incluindo a presença de clamidósporos, macro e microconídios agregados em falsas cabeças no micélio aéreo e macroconídios no esporodóquio. Dois tipos de macroconídios foram observados. O primeiro tipo apresenta formato cilíndrico a falcado, sem a presença de célula pé evidente e o segundo tipo apresenta formato falcado, com célula pé evidente. Os macroconídios, quando observados no micélio aéreo, apresentaram de 3 a 4 septos, ocasionalmente 5 septos e, quando observados no esporodóquio, tinham de 3 a 6 septos (Figura 3 e 4).

A espécie heterotática apresentou microconídios de formato elipsoidal-oblongo, ocasionalmente reniforme, contendo de 0 a 2 septos, medindo de 12-24 x 2,5-6  $\mu\text{m}$ . O comprimento dos macroconídios com 3 a 5 septos variou de 26-62 x 4-5,5  $\mu\text{m}$  (Tabela 1B, APÊNDICE; Gráfico 2). A espécie homotática apresentou microconídios de formato elipsoidal-oblongo, contendo de 0 a 1 septo, sendo a maioria não septada, medindo de 10-17,5 x 3,7-5  $\mu\text{m}$  e macroconídios com 3 a 4 septos, medindo entre 36-70 x 3,7-6  $\mu\text{m}$ . Foram observadas pequenas diferenciações morfológicas entre o anamorfo das espécies. Como exemplo, alguns isolados homotáticos apresentam macroconídios maiores e microconídios menores e em maior quantidade no micélio aéreo do que os isolados heterotáticos, porém, alguns isolados de ambas as espécies compartilham essas duas características (Tabela 1B, APÊNDICE; Gráfico 2). O isolado CML 1746 não tem a presença de macroconídio no micélio aéreo. O isolado CML 1346 (*F. striatum*) possui a maioria dos macroconídios formados no esporodóquio com 5 e 6 septos, assim como os isolados CML 2050, CML 2053 e CML 2054. Isolados da espécie heterotática, quando comparados com isolados de referência (CML 1889 MP-I, CML 1893 MP-III e CML 1895 MP-V),

apresentaram características morfológicas semelhantes, como tamanho, formato e número de septos de macroconídios e microconídios. Essas semelhanças morfológicas também foram observadas entre os isolados de referência.

Com base na célula conidiogênica de todos os isolados, dois grupos foram observados. O primeiro grupo, composto por 41 isolados, apresentou somente fiálides longas e simples, enquanto o outro grupo, possuindo 27 isolados, apresentou fiálides longas, simples e conidióforos ramificados (Tabela 1A, APÊNDICE; Figura 3 e 4). As fiálides da espécie homotática apresentaram comprimento máximo de 135  $\mu\text{m}$  e da espécie heterotática, de 120  $\mu\text{m}$ . A avaliação da taxa de crescimento em meio PDA permitiu a separação dos isolados em dois grupos distintos. O primeiro grupo, composto por 48 isolados, apresentou taxa de crescimento micelial igual ou superior a 30 mm e o segundo grupo apresentou taxa de crescimento micelial inferior a 30 mm, composto por 20 isolados.

De modo geral, a coloração das colônias variou entre branca, creme, roxa e verde-azulada. Os clamidósporos abundantes, globosos e lisos encontravam-se arranjados de maneira simples ou aos pares. Duas colorações de esporodóquios foram observadas, amarelo e azul. A variação da coloração das colônias não mostrou correlação com a taxa de crescimento dos isolados. Características como ramificação do conidióforo, taxa de crescimento e coloração da colônia em PDA, não diferenciaram as espécies biológicas analisadas.

A caracterização morfológica da fase teleomorfa foi baseada nas medidas das estruturas da fase sexuada, como comprimento e largura, formato de peritécios, ascos e ascósporos. De acordo com as características morfológicas observadas, foi possível encontrar duas espécies biológicas distintas, que correspondem ao gênero *Haematonectria* (ROSSMAN et al., 1999) (Tabela 1B, APÊNDICE).

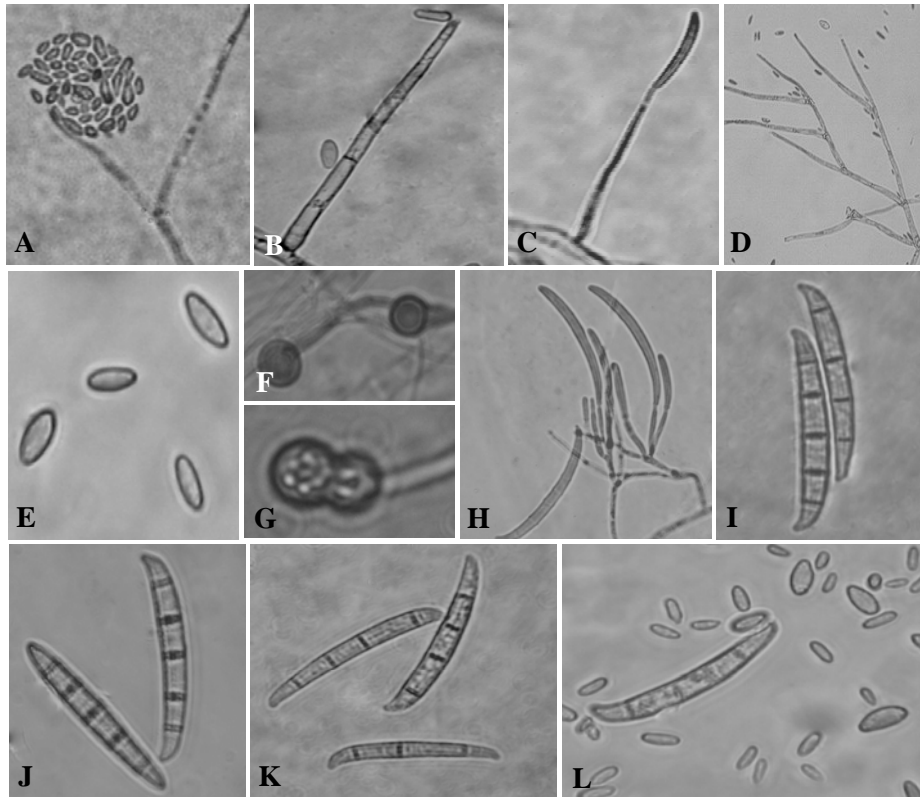


Figura 3 *Haematonectria ipomoeae*, características do anamorfo A. Microconídio em falsas cabeças; B. Fiálide longa e simples; C. Conídio falcado formado em longo conidióforo; D. Conidióforo ramificado; E. Microconídios; F-G. Clamidósporos; H. Conídio no conidióforo, formado em esporodóquio; I. Macroconídio formado em esporodóquio; J. Macroconídio cilíndrico a falcado, sem a presença de célula pé e macroconídio falcado, com célula pé. K-L. Macroconídio e microconídio no micélio aéreo



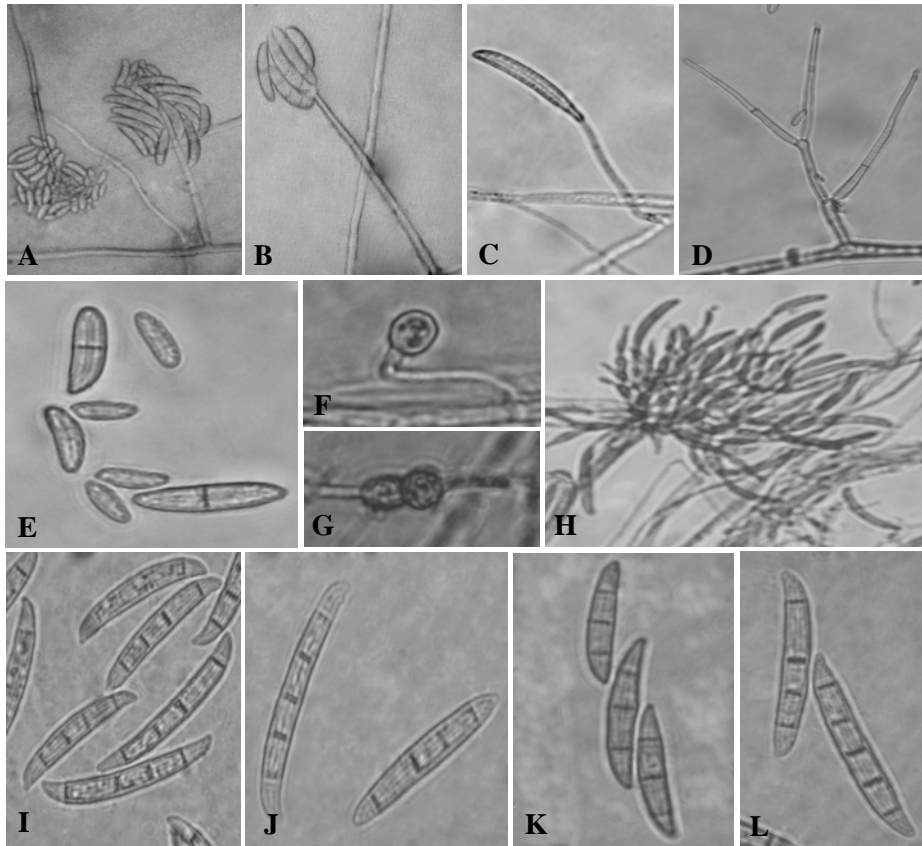


Figura 4 *Haematonectria haematococca*, características do anamorfo A. Macroconídio e microconídio em falsas cabeças; B-C. Conídios formados em fiáldes longas; D. Conidióforo ramificado; E. Microconídios; F-G. Clamidósporos; H. Conídio no conidióforo, formado no esporodóquio; I. Macroconídio formado no esporodóquio; J. Macroconídio cilíndrico a falcado, sem a presença de célula pé e macroconídio falcado, com célula pé. K-L. Macroconídio no micélio aéreo

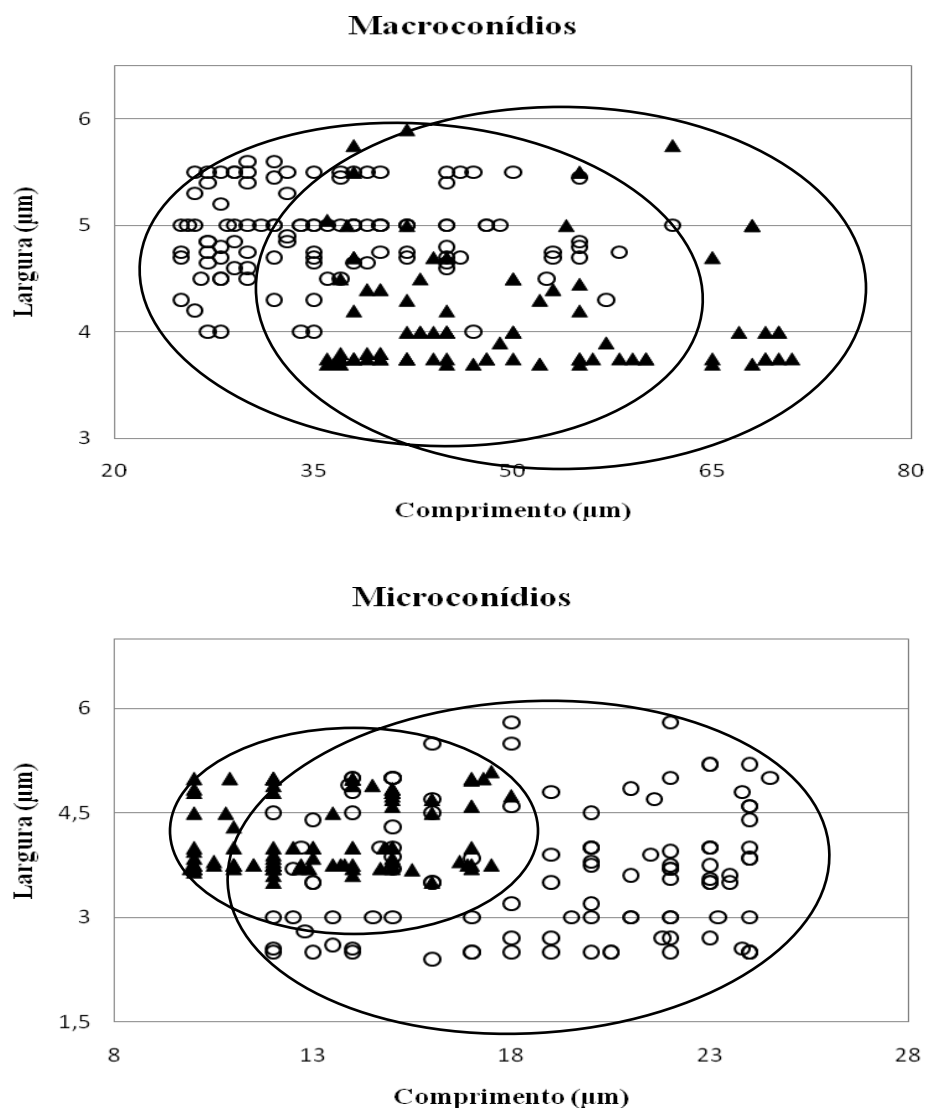


Gráfico 2 Valores do comprimento e largura ( $\mu\text{m}$ ) de macroconídios com 3-5 septos e de microconídios com 0-1 septo, avaliados após 10-14 dias de incubação em SNA a  $20^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas, (▲) Isolados homotáticos e (○) Isolados heterotáticos

## 5 DISCUSSÃO

Em uma coleção contendo 68 isolados do complexo *Fusarium solani* obtidos de diferentes espécies de plantas cultivadas e do solo no Brasil, foi possível observar a presença de duas espécies biológicas distintas, que pertencem ao gênero *Haematonectria*. A espécie homotática encontrada, identificada como *H. ipomoeae*, é representada por isolados de algodão, crisântemo, pimentão, pimenta, erva-de-passarinho, café, batata, cacau e solo. Em *H. ipomoeae*, populações homotáticas foram descritas em cucurbitáceas, maracujá, berinjela e batata (NIRENBERG; BRIELMAIER-LIEBETANZ, 1996), o que demonstra a grande diversidade de plantas hospedeiras que esses isolados podem ser encontrados. A espécie heterotática encontrada, *H. haematococca*, é composta por isolados obtidos de soja e de feijão. Em *H. haematococca*, populações heterotáticas têm sido observadas em várias plantas cultivadas e podem representar espécies distintas, principalmente devido à rápida especiação em resposta às atividades agrícolas (O'DONNELL, 2000; O'DONNELL; GRAY, 1995; ROSSMAN et al., 1999).

Os protocolos aperfeiçoados no presente estudo, para teste de homotalismo e indução da fase sexuada, foram eficientes na determinação de espécies biológicas dentro do FSSC. O número de peritécios formados foi alto em ambas as espécies, o que demonstra a alta fertilidade dos isolados analisados e a eficácia dos protocolos. Nos testes de homotalismo foi utilizado o meio SNA, considerado meio “pobre”, assim como ágar-água ou outro meio definido ou semidefinido, sugeridos para verificar a formação espontânea de peritécios em isolados homotáticos, pois, na natureza, a escassez de nutrientes pode induzir o ciclo sexual (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Por meio do protocolo aperfeiçoado para cruzamentos em *F. solani*, a reprodução sexuada foi induzida em laboratório, indicando que, possivelmente,

possa ocorrer recombinação sexual no campo. O meio de cultura utilizado com sucesso nos cruzamentos foi o meio cenoura-ágar, que apresenta bons resultados em estudos de fertilidade com espécies de *F. solani* (COVERT, et al., 2007; ETTEN, 1978). Em estudos de reprodução sexual em fungos, diversos fatores podem estar envolvidos no sucesso dos cruzamentos, como meio de cultura, condições de temperatura, luminosidade e tempo de incubação, que podem variar para cada espécie (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Além disso, devem-se considerar uma ampla amostragem, o substrato e a distribuição geográfica dos isolados, a utilização de isolados testadores e o aprimoramento dos protocolos para a espécie ou a população em estudo.

Após os cruzamentos, as condições de incubação, como luminosidade e temperatura, foram ajustadas a partir dos protocolos descritos em outros trabalhos (COVERT et al., 2007; LESLIE, SUMMERELL, 2006). Esses dois parâmetros exercem papel fundamental na formação de peritécios férteis. Temperaturas em torno de 25°-27°C e abaixo de 20°C podem comprometer o desenvolvimento de peritécios. Se a temperatura ótima para uma determinada espécie é desconhecida, sugere-se utilizar, para cruzamentos, temperatura de 22°-23°C (LESLIE, SUMMERELL, 2006).

Dos onze isolados homotáticos encontrados, dois (CML 576 e CML 2055) apresentaram macroconídios maiores e quatro (CML 582, CML 1346, CML 2050 e CML 2054) possuem microconídios menores quando comparados com isolados da espécie heterotática. Porém, essas diferenças não foram suficientes para a diferenciação entre as espécies (Gráfico 2). A característica que permitiu diferenciá-las foi baseada no teleomorfo. A espécie heterotática possui ascos maiores do que os da espécie homotática. O tamanho dos ascos indica ser um bom marcador morfológico para a separação das espécies biológicas do FSSC (Tabela 1B, APÊNDICE; Gráfico 1).

Para distinguir as *formae speciales* de *F. solani*, quatro tipos de macroconídios foram observados, com base no número de septos (MATUO; SNYDER, 1973). Porém, a morfologia do macroconídio varia de acordo com as condições culturais e a diferença entre eles não é significativa. Somente cruzamentos fornecem uma identificação mais precisa para separar essas *formae speciales*. Diversas espécies do FSSC com características morfológicas semelhantes representam espécies filogenéticas e biológicas distintas (O'DONNELL, 2000; O'DONNELL et al. 2008).

Características do anamorfo e do teleomorfo das espécies biológicas encontradas nesse estudo, como dimensões do macroconídio, microconídio e peritécios, foram mais variáveis quando comparadas com as informações apresentadas na literatura (ROSSMAN et al., 1999). A espécie descrita por Rossman et al. (1999) apresenta número de septos maiores no macroconídio do que a espécie heterotática estudada (Tabela 1B, APÊNDICE).

Os *primers* desenvolvidos por Kerényi et al. (2004) para determinar o *mating type* de espécies do gênero *Fusarium* não forneceram resultado satisfatório para todos os isolados testados de *F. solani*, mesmo quando condições na reação de PCR, como temperatura de anelamento e tempo de extensão dos *primers*, foram ajustadas na tentativa de otimizar a reação. Provavelmente, a funcionalidade dos *primers* pode estar relacionada com a divergência de sequência que pode ocorrer mesmo em regiões conservadas para esse gênero (STEENKAMP et al., 2000). Outro fato a ser considerado é que os *primers* são degenerados, ou seja, não são específicos para espécies de *Haematonectria*. Os *primers* para a identificação do *MAT-2* apresentaram melhor resultado na determinação de isolados. O idiomorfo *MAT-1* é relativamente mais complexo, pois possui três transcritos (*MAT-1-1*, *MAT-1-2* e *MAT-1-3*), sendo que *MAT-1-1* codifica proteína da  $\alpha$ -box com funções importantes na formação de peritécios e ascósporos. *MAT-1-2* e *MAT-1-3*

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

No teste de indução da fase sexuada foram observados cruzamentos férteis entre isolados da soja com isolados de feijão, mas não foi observada a formação de peritécios férteis entre esses isolados com isolados obtidos de outras plantas cultivadas. Os resultados evidenciam que isolados da soja e do feijão são sexualmente compatíveis, podendo ser encontrados em ambos os hospedeiros e pertencendo à mesma espécie biológica, que é reprodutivamente isolada das demais espécies do FSSC obtidas dos outros hospedeiros.

Oliveira e Costa (2003) observaram a existência de compatibilidade vegetativa entre isolados de *F. solani* f. sp. *phaseoli* e *F. solani* f. sp. *glycines*, e verificaram, ainda, que, nos testes de patogenicidade, esses isolados não indicaram especificidade de hospedeiro, tendo sido encontrados isolados de *F. solani* f. sp. *phaseoli* patogênicos à soja, assim como isolados de *F. solani* f. sp. *glycines* patogênicos ao feijoeiro. Se, em alguma circunstância, estes isolados estivessem no mesmo hospedeiro ao mesmo tempo, heterocariose e cruzamentos poderiam ocorrer. A compatibilidade entre esses dois isolados de *formae speciales* diferentes pode ser uma justificativa para a existência de isolados patogênicos a ambas as culturas.

Cruzamentos entre isolados da espécie heterotálica encontrada nesse estudo com alguns isolados obtidos de café, maracujá, tabaco, algodão, cacau, rosa, citros e solo, além dos isolados de referência CML 2045 (*F. solani* f. sp. *phaseoli*), CML 1882 (*F. cuneirostrum*) e CML 1889 (*F. solani* f. sp. *cucurbitae* MP-I), formaram peritécios inférteis, sugerindo que a barreira reprodutiva entre esses isolados ainda não foi totalmente estabelecida.

A inespecificidade de hospedeiro também foi observada em outros estudos. Etten (1978) analisou cruzamentos entre isolados de *F. solani* obtidos de ervilha, grão-de-bico, batata, algodão e alfafa com dois isolados testadores de *Nectria haemacocca* MPVI. De um total de 44 isolados que produziram cruzamentos férteis, 21 foram de ervilha, enquanto os demais isolados foram obtidos das outras plantas cultivadas. Além disso, os isolados de ervilha induziram sintomas em todos os hospedeiros. Romberg e Davis (2007) observaram que *Fusarium solani* f. sp. *eumartii*, conhecido como patógeno da batata, pode causar doença em diferentes culturas, como tomate, pimenta e berinjela. Pela filogenia, os isolados provenientes da batata e do tomate formaram um clado único e distinto das demais *formae speciales* e *mating populations* do FSSC.

Estudos de *mating populations* e filogenia representam valiosas ferramentas na identificação de espécies no FSSC e podem ser utilizados quando marcadores morfológicos são escassos ou mesmo inexistentes. Em testes de patogenicidade, há evidências de que ocorrem espécies inespecíficas em relação ao hospedeiro. Por isso, para classificar uma espécie heterotática, a designação de *mating population* pode ser mais apropriada do que a de *formae speciales*.

Entre as várias *formae speciales* conhecidas em *F. solani*, o teleomorfo tem sido descrito para apenas cinco delas e duas raças, representando sete distintas *mating populations* (*cucurbitae* race 1 MP-I, *batatas* MP-II, *mori* MP-III, *xanthoxyli* MP-IV, *cucurbitae* race 2 MP-V, *pisi* MP-VI e *robineae* MP-VII). Todos esses teleomorfos são heterotáticos e os isolados podem cruzar somente dentro de cada MP (MATUO; SNYDER, 1973). No entanto, nesse estudo foram utilizados isolados provenientes somente do Japão e dos Estados Unidos, não representando a verdadeira diversidade de espécies biológicas que podem ser encontradas no FSSC. Seria necessário um estudo mais abrangente, com uma ampla coleção de isolados de diversas regiões geográficas do mundo.

No Brasil, não há estudos suficientes com *mating populations* em *F. solani* e variedade de espécies presentes no FSSC que podem ser encontradas em diversas plantas cultivadas, informações importantes para identificação dos agentes etiológicos, controle de doenças e sobre o nível de troca genética entre as populações de fungos. Além disso, novas espécies de *F. solani* podem existir no país (O'DONNELL, 2000). Como exemplo, *F. solani* f. sp. *piperis*, agente etiológico da fusariose da pimenta-do-reino, de ocorrência restrita ao Brasil, pode representar uma espécie diferente (ALBUQUERQUE et al., 2001).

Em soja, uma das principais culturas do país, quatro espécies estão associadas à podridão vermelha da raiz e três delas encontram-se no Brasil, *F. tucumaniae*, *F. brasiliense* e uma espécie não identificada, *Fusarium* sp. A outra espécie denominada de *F. virguliforme* está presente nos Estados Unidos e na Argentina (AOKI et al., 2003; AOKI; O'DONNELL; SCANDIANI, 2005). De todas essas espécies, somente o teleomorfo de *F. tucumanie* foi descoberto por meio de cruzamentos em laboratório (COVERT et al., 2007). O trabalho foi realizado nos EUA e foram utilizados apenas seis isolados provenientes do Brasil.

De acordo com os resultados deste estudo, os isolados de *Fusarium solani* avaliados, associados a diversas doenças de plantas cultivadas e do solo no Brasil, fazem parte de duas espécies biológicas distintas do gênero *Haematonectria*. Uma mesma espécie biológica pode ser encontrada em hospedeiros diferentes, demonstrando a inconsistência do conceito de *forma especialis*. Os conhecimentos obtidos sobre a diversidade de populações dentro do FSSC poderão subsidiar programas de seleção e de melhoramento de germoplasma vegetal, visando resistência às doenças e determinações para a vigilância fitossanitária.

Dando continuidade aos estudos, análises de filogenia molecular e testes de patogenicidade com inoculações cruzadas serão realizados, a fim de



confirmar a existência das espécies biológicas distintas encontradas neste estudo. Além disso, isolados testadores da espécie heterotálica serão disponibilizados. Testadores das outras *mating populations* já conhecidas serão adquiridos e utilizados em cruzamentos com outros isolados da coleção de isolados do Brasil, para verificar a presença de outras espécies biológicas no país. Maior número de isolados de outras espécies de plantas cultivadas será utilizado nos cruzamentos para verificar a presença de mais espécies biológicas. O protocolo para determinação de *mating types* pode ser melhorado por meio do aperfeiçoamento dos *primers* específicos para o gênero *Haematonectria*.

## 6 CONCLUSÕES

O teste de homotalismo permitiu a observação de uma espécie homotática entre os isolados de *F. solani*.

A determinação de *mating type* e cruzamentos em laboratório permitiram a identificação de uma espécie heterotática no FSSC.

Os protocolos aperfeiçoados nesse estudo para teste de homotalismo e indução da fase sexuada foram eficientes na observação de espécies biológicas distintas no FSSC.

O tamanho dos ascos mostrou-se um marcador morfológico para a distinção das espécies biológicas.

De acordo com a amostragem dos isolados ainda restrita no presente estudo, a presença de mais espécies biológicas no FSSC no Brasil é provável.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, F. C. et al. Resistência de piperáceas nativas da Amazônia à infecção causada por *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 31, n. 3, p. 341-348, ago. 2001.
- AOKI, T. et al. Sudden death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex *F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. **Mycologia**, Lawrence, v. 95, n. 4, p. 660-684, July/Aug. 2003.
- AOKI, T.; O'DONNELL, K.; SCANDIANI, M. M. Sudden death syndrome of soybean in south America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. **Mycoscience**, Tokyo, v. 46, n. 4, p. 162-183, Dec. 2005.
- BAAYEN, R. P. et al. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and non-monophyletic *formae speciales* causing wilt and rot disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 5, p. 891-900, May 2000.
- COVERT, S. F. et al. Partial MAT-2 gene structure and the influence of temperature on mating success in *Gibberella circinata*. **Fungal Genetics and Biology**, Arkansas, v. 28, n. 2, p. 43-54, June 1999.
- \_\_\_\_\_. Sexual reproduction in the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium tucumaniae*. **Fungal Genetics and Biology**, Arkansas, v. 44, n. 4, p. 799-807, Dec. 2007.
- ETTEN, H. D. van. Identification of additional habitats of *Nectria haematococca* mating population VI. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 68, p. 1552-1556, May 1978.
- GEISER, D. M. et al. Fusarium-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 110, n. 5, p. 473-479, June 2004.
- GERLACH, W.; NIRENBERG, H. **The genus *Fusarium***: a pictorial atlas. Berlin: Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft, 1982. 406 p.

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

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

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

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

NIRENBERG, H. I.; BRIELMAIER-LIEBETANZ, U. *Nectria ipomoeae* Halst., anamorph: *Fusarium striatum* Sherb., an *Passiflora edulis* Sims. **Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes**, Stuttgart, v. 48, n. 2, p. 270-275, May 1996.

NIRENBERG, H. I.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, Lawrence, v. 90, n. 11, p. 434-458, Nov. 1998.

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

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

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

\_\_\_\_\_. Soybean sudden death syndrome species diversity within north and south America revealed by multilocus genotyping. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, n. 1, p. 58-71, Jan. 2010.

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

OLIVEIRA, V. C. de; COSTA, J. L. da S. Compatibilidade vegetativa de nit-mutantes de *Fusarium solani* patogênicos e não-patogênicos ao feijoeiro e à soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 89-92, jan./fev. 2003.

ROMBERG, M. K.; DAVIS, R. M. Host range and phylogeny of *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* from potato and tomato in California. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, n. 3, p. 585-592, May 2007.

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

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

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

SUMMERELL, B. A. et al. **Nelson memorial symposium**. Saint Paul: APS, 2001. 392 p.

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

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

## APÊNDICES

Tabela 1A Isolados do complexo *Fusarium solani* - FSSC obtidos de diferentes plantas cultivadas e do solo

CML <sup>a</sup>	Espécie	Hosp/substrato	Origem geográfica	Hom <sup>b</sup>	Het <sup>c</sup>	MAT <sup>d</sup>	Morf. <sup>e</sup>
46	<i>F. solani</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Santa Rita de Caldas MG			nd	S
65	<i>F. solani</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Santa Rita de Caldas MG			nd	S/R
217	<i>F. solani</i>	<i>Coffea arábica</i>	Machado MG			nd	S
220	<i>F. solani</i>	<i>Coffea arábica</i>	Lavras MG			nd	S
526	<i>F. solani</i>	<i>Glycine max</i>	Planaltina DF		x	1	S/R
528	<i>F. solani</i>	<i>Glycine max</i>	Passo Fundo RS		x	2	S
575	<i>F. solani</i>	<i>Glycine max</i>	Brasil		x	2	S
576	<i>F. solani</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Planaltina DF	x			S
580	<i>F. solani</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Fazenda Planaltina MS			nd	S/R
581	<i>F. solani</i>	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Holambra SP			nd	S
582	<i>F. solani</i>	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Holambra SP	x			S
595	<i>F. solani</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Brasil			nd	S
853	<i>F. solani</i>	<i>Glycine max</i>	Brasil		x	2	S/R
857	<i>F. solani</i>	<i>Glycine max</i>	Brasil		x	2	S
860	<i>F. solani</i>	<i>Glycine max</i>	Brasil		x	2	S
862	<i>F. solani</i>	<i>Glycine max</i>	Brasil		x	1	S
1143	<i>F. solani</i>	Solo / Citrus sp.	Barretos SP			nd	S
1158	<i>F. solani</i>	Solo / Citrus sp.	Barretos SP			nd	S/R
1241	<i>F. solani</i>	<i>Glycine max</i>	Montividiu GO		x	2	S
1247	<i>F. solani</i>	<i>Glycine max</i>	Montividiu GO		x	2	S
1343							
=BBA 68442	<i>F. brasiliense</i>	<i>Glycine max</i>	Brasília DF		x	1	S
1344							
=BBA 68441	<i>F. brasiliense</i>	<i>Glycine max</i>	Brasília DF			nd	S
1346							
=BBA 64379	<i>F. striatum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Alemanha	x			S
1485	<i>F. solani</i>	<i>Rosaceae</i>	São Benedito CE			nd	S/R

Tabela 1A, continuação

1486	<i>F. solani</i>	<i>Rosaceae</i>	São Benedito CE		nd	S
1746	<i>F. solani</i>	<i>Phoradendron</i>	Lavras MG	x		S/R
1715	<i>F. solani</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Ilhéus BA		nd	S/R
1771	<i>F. solani</i>	<i>Glycine max</i>	Campo N. Parecis MT	x	2	S/R
1780	<i>F. solani</i>	<i>Glycine max</i>	Uberlândia MG	x	2	S
1782	<i>F. solani</i>	<i>Glycine max</i>	Uberlândia MG	x	2	S
1783	<i>F. solani</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Santa Cruz do Sul RS		nd	S/R
1784	<i>F. solani</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Santa Cruz do Sul RS		nd	S/R
1828	<i>F. solani</i>	<i>Glycine max</i>	Nova Ponte MG	x	2	S
1829	<i>F. solani</i>	<i>Glycine max</i>	Tapera RS	x	2	S/R
1830	<i>F. solani</i>	<i>Glycine max</i>	Cristalina GO	x	1	S/R
1832	<i>F. solani</i>	<i>Glycine max</i>	Campo Mourão PR	x	2	S/R
1833	<i>F. solani</i>	<i>Glycine max</i>	Campo Mourão PR	x	1	S/R
1834	<i>F. solani</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Viçosa MG	x	1	S
1835	<i>F. solani</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Viçosa MG	x	2	S
1836	<i>F. solani</i>	<i>Glycine max</i>	Guarapuava PR	x	2	S
1842	<i>F. solani</i>	<i>Orchidaceae</i>	Viçosa MG		nd	S/R
1882						
=NRRL 31949	<i>F. cuneirostrum</i>	<i>Glycine max</i>	Cristalina GO		nd	S
1886						
=NRRL 22678	<i>F. brasiliense</i>	<i>Glycine max</i>	Califórnia USA		nd	S/R
1888	<i>F. solani</i> f. sp.					
= NRRL 22570	<i>piperis</i>	<i>Piper nigrum</i>	Brasil	x		S/R
1889	<i>F. solani</i> f. sp.					
= NRRL 22098	<i>cucurbitae</i> MPI	<i>Cucurbita</i> sp.	EUA		nd	S
1890						
= NRRL 34546	<i>F. tucumanae</i>	<i>Glycine max</i>	Buenos Aires ARG		nd	S/R
1893	<i>F. solani</i> f.					
= NRRL 22230	sp. <i>mori</i> MPIII	<i>Morus alba</i>	Japão		nd	S
1895	<i>F. solani</i> f. sp.					
= NRRL 22141	<i>cucurbitae</i> MPV	<i>Cucurbita</i> sp.	Nova Zelândia		nd	S
1991	<i>F. solani</i>	<i>Glycine max</i>	Lunardelli PR	x	2	S

Tabela 1A, continuação

1992	<i>F. solani</i>	<i>Glycine max</i>	Lunardelli PR	x	1	S
1995	<i>F. solani</i>	<i>Glycine max</i>	Marinalva PR	x	2	S/R
2026	<i>F. solani</i>	Solo / <i>Glycine max</i>	Uberlândia MG		nd	S
2028	<i>F. solani</i>	<i>Glycine max</i>	Ponta grossa PR	x	2	S
2041	<i>F. solani</i>	Solo / Mata Atlântica	São Paulo SP		nd	S
2042	<i>F. solani</i>	<i>Passiflora</i> sp.	Januária MG		nd	S
2043	<i>F. solani</i>	<i>Passiflora</i> sp.	Sebastião laranjeira BA		nd	S
2044						
= NRRL 20487	<i>F. virguliforme</i>	<i>Glycine max</i>			nd	S
2045						
= NRRL 22276	<i>F. phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	EUA		nd	S
2046	<i>F. solani</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pato de Minas MG		nd	S
2047	<i>F. solani</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Minas Gerais		nd	S/R
2048	<i>F. solani</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Minas Gerais	x	1	S/R
2049	<i>F. solani</i>	<i>Caryocar brasiliense</i>	Ingai MG		nd	S
2050	<i>F. solani</i>	<i>Coffea arabica</i>	Minas Gerais	x		S/R
2051	<i>F. solani</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Ilhéus BA	x		S
2052	<i>F. solani</i>	Solo / Amazônia	Amazônia Brasil	x		S/R
2053	<i>F. solani</i>	Solo / Amazônia	Amazônia Brasil	x		S/R
2054	<i>F. solani</i>	Solo / Amazônia	Amazônia Brasil	x		S/R
2055	<i>F. solani</i>	<i>Capsicum annum</i>	Reginópolis SP	x		S/R

<sup>a</sup> CML - Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, UFPA, Lavras, Minas Gerais, Brasil. Código BBA – *Biologische Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft*, Berlin, Alemanha, e NRRL - *Northern Regional Research Laboratory*, Peoria, Illinois, EUA

<sup>b</sup> Hom - isolados homotáticos caracterizados como *Haematonectria ipomoeae*

<sup>c</sup> Het - isolados heterotáticos caracterizados como *Haematonectria haematococca*

<sup>d</sup> MAT - *Mating type* dos isolados identificados por PCR. MAT-1 = 1; MAT-2 = 2; nd = não determinado

<sup>e</sup> Morfotipo encontrado entre os isolados com base na ramificação do conidióforo. S - fíalides simples; S/R - conidióforos ramificados



Tabela 1B Características morfológicas dos isolados do FSSC utilizados no estudo e as descritas por Rossman et al. (1999), medidas em ( $\mu\text{m}$ )

Espécies	Macroconídio		Microconídio		Peritécios	Ascos	Ascósporos
	Comp/Larg <sup>e</sup>	Septos	Comp/Larg	Septos	Comp/Larg	Larg/Comp	Larg/Comp
<i>F. solani</i> homotático <sup>a</sup>	36-70 x 3,7-6 <sup>c</sup>	3-5	10-17,5 x 3,7-5 <sup>c</sup>	0-1	310-400 x 250-330 <sup>d</sup>	52-70 x 5-8 <sup>d</sup>	10-14 x 4-5,5 <sup>d</sup>
<i>H. ipomoeae</i> <sup>b</sup> Rossman et al., 1999	49-64 x 4,8-5,9	5	9,8-14,5 x 4,5-5	0	cerca de 300	60-70 x 8-10	11,5-13 (-14) x (4-) 4,5-5,5 (-6)
<i>F. solani</i> heterotático <sup>a</sup>	26-62 x 4-5,5 <sup>c</sup>	3-5	12-24 x 2,5-6 <sup>c</sup>	0-2	205-370 x 200-340 <sup>d</sup>	65-95 x 8-15 <sup>d</sup>	10-16 x 4-7 <sup>d</sup>
<i>H. haematococca</i> <sup>b</sup> Rossman et al., 1999	15-80 x 4-7	5-7	6-24 x 2,5-5	0-1	(225-) 275- 325	60-90 x 10-17	(9-) 13-16 (-18) x (4-) 6-8 (-9)

<sup>a</sup> Refere-se aos isolados utilizados neste estudo

<sup>b</sup> Refere-se aos isolados descritos por Rossman et. al., 1999

<sup>c</sup> Macroconídio e microconídio do micélio aéreo, caracterizados em SNA a 20°C/fotoperíodo de 12 horas

<sup>d</sup> *Haematonectria ipomoeae*, caracterizada em SNA à temperatura ambiente, 25°-27°C e *Haematonectria haematococca*, caracterizada após os cruzamentos em meio CA a 22°-23°C/ luz constante

<sup>e</sup> Medidas do comprimento e da largura das estruturas morfológicas do anamorfo e do teleomorfo de *F. solani*