



**JULIANA MOREIRA SOARES**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA,  
MOLECULAR E PATOGÊNICA DO AGENTE  
ETIOLÓGICO DA FUSARIOSE DO  
ABACAXIZEIRO NO BRASIL**

**LAVRAS – MG**

**2011**

**JULIANA MOREIRA SOARES**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E  
PATOGÊNICA 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/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, 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**

Soares, Juliana Moreira.

Caracterização morfológica, molecular e patogênica do agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro no Brasil / Juliana Moreira Soares. – Lavras : UFLA, 2011.

58 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning.

Bibliografia.

1. *Ananas comosus*. 2. Patogenicidade. 3. Complexo *Gibberella fujikuroi*. 4. Filogenia. 5. *Fusarium guttiforme*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.43

**JULIANA MOREIRA SOARES**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E  
PATOGÊNICA 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/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 3 de agosto de 2011.

Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende                      UFLA

Dr. Cristiano Souza Lima                                      UFRPE

Dr. Ludwig Heinrich Pfenning  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2011**

*A meu pai querido, Nereu (in memoriam), por existir em minha vida durante 18 anos e por deixar como herança o incentivo para a conclusão dos meus estudos.*

*A minha mãe, Neia; minha irmã, Natália e meu sobrinho, Kaique, pela dedicação e sacrifícios durante a minha formação.*

*A minha avó Lúcia e minha tia Nil, pelo zelo, carinho e amparo.*

*A minha melhor amiga, Kátia, pelo carinho, compreensão e companheirismo.*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar vida e por ter iluminado o meu caminho durante todos esses anos.

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

Ao professor Ludwig H. Pfenning, pela orientação, disponibilidade e acompanhamento durante a execução do trabalho.

Ao Dr. Lucas Magalhães de Abreu, pelo apoio e inspiração no amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos, sem os quais não seria possível a conclusão deste trabalho.

Ao meu amigo e coorientador professor Mário Lúcio Vilela Resende, pelo apoio e ajuda nos momentos em que eu mais precisei.

A todos do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, em especial a minha grande amiga Érica, que sempre esteve ao meu lado.

Às amigas Ana Karla, Stefanny, Angélica e Mariana, pela convivência e os momentos de alegria.

A todos os meus primos (as) e tios (as), que torceram por mim, em especial ao tio Denis, pelo incentivo e ajuda de sempre.

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

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

## RESUMO

*Fusarium guttiforme* pertence ao complexo de espécies *Gibberella fujikuroi* (GFC) e é considerado o agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro e podridão de frutos. Este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar isolados de *F. guttiforme* obtidos de plantas de abacaxi com sintomas de fusariose, coletados em diversas regiões produtoras do país, por meio de análise morfológica, filogenética e teste de patogenicidade. A análise filogenética foi realizada com sequências parciais do gene da beta tubulina (*tub2*) e fator de alongação 1- $\alpha$  (*tef1*), incluindo sequências da linhagem tipo e de isolados de referência de diversas espécies pertencentes ao GFC. O teste de patogenicidade foi realizado em mudas de abacaxizeiro em condições controladas de temperatura e umidade. Os marcadores morfológicos foram avaliados em 49 isolados, todos identificados como *F. guttiforme*. Não foi possível distinguir variantes fenotípicas entre os isolados deste estudo. Todos os isolados identificados como *F. guttiforme* agruparam com isolados de referência de *F. guttiforme* ou *F. ananatum* obtidos do abacaxizeiro. A topologia da árvore combinada dos genes teve maior influência do gene *tub2*. Na análise combinada de máxima parcimônia e inferência bayesiana, foi observado um clado com sequências de *F. ananatum*, descrito recentemente na África do Sul como agente etiológico da podridão de frutos. Foi observado, ainda, um grupo parafilético de isolados para-ananatum. O restante dos isolados deste estudo foi observado em politomias e, sendo assim, não foi possível inferir as relações filogenéticas destes. A maioria dos isolados estudados induziu necrose em mudas de abacaxi da mesma forma que a linhagem tipo. Com base no conjunto de dados avaliado neste estudo, pode-se inferir que, possivelmente, existam pelo menos três linhagens filogenéticas distintas de *Fusarium* associadas à fusariose do abacaxizeiro no Brasil, porém, com base nas regiões gênicas avaliadas, não houve resolução suficiente para suportar essa afirmação.

Palavras-chave: *Ananas comosus*. Complexo *Gibberella fujikuroi*. Filogenia. Patogenicidade.

## ABSTRACT

*Fusarium guttiforme*, a member of *Gibberella fujikuroi* Complex (GFC), is considered the causal agent of fusariosis in pineapple and fruit rot. The objective of this work was to characterize isolates of *F. guttiforme* obtained from plants of pineapple with symptoms of fusariosis collected in different pineapple producing regions using morphological markers, phylogenetics and pathogenicity tests. The phylogenetic analysis was done with partial sequences of the beta tubulin gene (*tub2*) and elongation factor 1 $\alpha$  (*tef1*), including sequences of the type and reference material from different species of GFC. The pathogenicity test was realized in slips of pineapple under controlled condition of temperature and humidity. Forty nine isolates were evaluated morphologically and identified as *F. guttiforme*. It was not possible to identify phenotypic variants among isolates of this study. All of the isolates identified as *F. guttiforme* grouped with representative isolates of *Fusarium* obtained from pineapple. In the combined analysis of maximum parsimony and Bayesian inference, reference sequences of *F. ananatum* were added, a species described recently in South Africa as etiological agent of fruit rot. In addition, a group of isolates, paraphyletic “para-ananatum”, was observed. The rest of the isolates of this study was observed in polytomy, therefore it was not possible to infer the phylogenetic relationships. Most of the isolates studied induced necrosis in slips of pineapple. Based on the results of this study, there is evidence of the existence of three phylogenetically distinct lines of *Fusarium* associated to pineapple in Brazil. However, the genomic regions evaluated did not have sufficient resolution to confirm this hypothesis.

Keywords: *Ananas comosus*. *Gibberella fujikuroi* Complex. Phylogeny. Pathogenecity.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1	Importância da fusariose do abacaxizeiro.....	11
2.2	Diversidade de populações de <i>Fusarium guttiforme</i> em abacaxi.....	12
2.3	Conceitos de espécie no Complexo <i>Gibberella fujikuroi</i> (GFC).....	13
2.4	Métodos para a construção de árvores filogenéticas.....	15
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1	Obtenção dos isolados.....	17
3.2	Caracterização morfológica.....	17
3.3	Extração de DNA.....	18
3.4	Sequenciamento de DNA e análise filogenética.....	19
3.5	Verificação da patogenicidade dos isolados.....	22
4	RESULTADOS.....	24
4.1	Caracterização morfológica.....	24
4.2	Análise filogenética.....	31
4.2.1	Análise do gene da beta tubulina ( <i>tub2</i> ).....	31
4.2.2	Análise do gene do fator de alongação ( <i>tef1</i> ).....	34
4.2.3	Análise combinada dos genes <i>tub2</i> e <i>tef1</i> .....	36
4.3	Verificação da patogenicidade dos isolados.....	40
5	DISCUSSÃO.....	42
5.1	Morfologia.....	43
5.2	Filogenia.....	44
5.2.1	Análise do gene <i>tub2</i> .....	45
5.2.2	Análise do gene <i>tef1</i> .....	46
5.2.3	Análise combinada dos genes <i>tub2</i> e <i>tef1</i> .....	47
5.3	Patogenicidade.....	49
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
7	CONCLUSÕES.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	APÊNDICE.....	58

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o maior produtor mundial de abacaxi e os estados com maior produção são Paraíba, Minas Gerais e Pará (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2010). Os principais problemas enfrentados pela cultura são de ordem fitossanitária, nas fases de produção e pós-colheita. A doença mais importante do abacaxizeiro é a fusariose, causada pelo fungo *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell. O primeiro relato do patógeno associado a esta cultura ocorreu na Argentina, em 1954 (ROHRBACH, 1994) e, dez anos depois, foi observado também no Brasil (KIMATI; TOKESHI, 1964).

*F. guttiforme* pertence ao Complexo *Gibberella fujikuroi* (GFC). Este complexo inclui um conjunto de espécies que compartilham características morfológicas (LESLIE et al., 2007; PLOETZ, 2006). Porém, nem sempre os marcadores morfológicos são caracteres evolutivos conservados e confiáveis para agrupamento de espécies. Além disso, não existem marcadores suficientes para a separação de espécies do gênero *Fusarium* e, logo, a sobreposição de características pode dificultar sua diferenciação (KVAS et al., 2009).

Na década de 1980, verificou-se que muitas espécies descritas com base na morfologia continham populações distintas. Para identificar essas populações foi necessária a avaliação de outras características com base nos conceitos de espécie biológica e filogenética (LESLIE et al., 2007). Apesar de inúmeras tentativas, para muitas espécies do GFC não foi evidenciada a produção de peritécios férteis em cruzamentos (DESJARDINS, 2003).

A filogenia estuda as relações de parentesco entre espécies. Estudos filogenéticos comprovaram que, na maioria das morfoespécies, como *F. solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend. Snyder & Hansen, *F. graminearum*

Schwabe, *F. oxysporum* Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen ocorre grande diversidade intraespecífica (LESLIE et al., 2007; GEISER et al., 2004).

A espécie *F. guttiforme* é responsável pelos sintomas de fusariose e podridão dos frutos de abacaxi (PLOETZ, 2006). A ocorrência desses dois tipos de sintomas em frutos levou a uma reavaliação dos isolados de *F. guttiforme*. Jacobs e colaboradores, em 2010, analisaram as relações filogenéticas e a morfologia de isolados de *Fusarium* associados ao abacaxizeiro no Brasil e na África do Sul. As avaliações mostraram que os isolados africanos representaram uma espécie distinta dos isolados brasileiros de *F. guttiforme*, que foi descrita como *Fusarium ananatum* A. Jacobs, Marasas & van Wyk.

O objetivo geral do estudo foi caracterizar isolados de *Fusarium* associados ao abacaxizeiro, no Brasil, por meio de análise morfológica, filogenética e patogenicidade. Os objetivos específicos foram: i. obter uma ampla coleção de isolados das várias regiões produtoras de abacaxi; ii. analisar e comparar marcadores morfológicos da espécie *F. guttiforme* obtida do abacaxizeiro; iii. inferir as relações filogenéticas de isolados de *Fusarium* associadas ao abacaxizeiro e espécies do complexo *G. fujikuroi* utilizando as sequências parciais dos genes codificantes do fator de alongação 1- $\alpha$  e beta tubulina e iv. verificar a patogenicidade dos isolados.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Importância da fusariose do abacaxizeiro

O abacaxi pertence à família Bromeliaceae, gênero *Ananas*, espécie *A. comosus* (L.) Merrill. O centro de origem da cultura é o hemisfério ocidental, América Tropical e Subtropical, estando as regiões de maior diversidade concentradas no Brasil Central, a partir de onde o abacaxizeiro se disseminou para o mundo (CRESTANI et al., 2010).

Os principais países produtores são Brasil, Tailândia, Filipinas, Indonésia, China e Índia. No Brasil, o abacaxi é produzido em quase todas as regiões e os estados da Paraíba, Minas Gerais e Pará respondem por 54% da produção total do país (IBGE, 2010). Atualmente, a abacaxicultura enfrenta sérios problemas de ordem fitossanitária, sendo as doenças as principais limitações para a produção e a exportação de frutos. A fusariose é considerada a doença mais destrutiva da cultura, com perdas estimadas em até 20% do material de propagação vegetativa e de 30% a 40% no mercado de frutas (VENTURA, 2009; PLOETZ, 2006).

O primeiro relato da doença ocorreu na Argentina, em 1954 e, dez anos depois, foi observada no Brasil (ROHRBACH, 1994). Atualmente, o patógeno encontra-se disseminado na Bolívia, Paraguai e Uruguai (PLOETZ, 2006). No Brasil, o primeiro relato da doença foi no estado de São Paulo, na variedade 'Smooth Cayenne' (KIMATI; TOKESHI, 1964) e, por meio de material de plantio infectado, o patógeno disseminou-se rapidamente para todas as regiões produtoras de abacaxi do país (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

O principal sintoma da fusariose do abacaxizeiro é a formação de goma característica a partir dos tecidos infectados. Podem ser observados também curvatura no ápice do talo, encurtamento do talo, redução no desenvolvimento

da planta, morte do meristema apical e clorose (PIRES DE MATOS, 1995; PLOETZ, 2001). Nos estádios iniciais, os sintomas da doença são quase imperceptíveis, levando os agricultores a utilizarem material propagativo doente no plantio. Sendo assim, a comercialização de mudas contaminadas é a principal forma de disseminação do patógeno (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002)

## **2.2 Diversidade de populações de *Fusarium guttiforme* em abacaxi**

O gênero *Fusarium* representa um dos grupos de fungos mais importantes do filo Ascomycota. Esses patógenos estão distribuídos por diversos tipos de habitats e inúmeros *taxa* (PLOETZ, 2006; LESLIE; SUMMERELL, 2006). Neste contexto, o conhecimento da etiologia de patógenos é essencial para traçar estratégias de controle (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

Segundo o conceito de espécie morfológica, atribuiu-se o nome *F. subglutinans* ao agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro (NELSON; TOUSSON; MARASAS, 1983). Os marcadores morfológicos que agruparam as espécies foram microconídios formados em falsas cabeças, nunca em cadeias e a partir de monofiálides ou polifiálides. Após confirmação da especificidade do patógeno ao abacaxizeiro, por meio de testes de inoculação cruzada com *F. subglutinans sensu lato* do abacaxi e provenientes de outros hospedeiros, foi proposta a *forma specialis F. subglutinans f. sp. ananas* (VENTURA; ZAMBOLIM; GILBERTSON, 1993).

Posteriormente, o patógeno foi renomeado como *F. guttiforme*, baseado na análise filogenética das sequências parciais dos genes que codificam as proteínas da beta tubulina, fator de alongação 1- $\alpha$ , calmodulina e características morfológicas, como formato obovoide dos microconídios, polifiálides com, no máximo três aberturas conidiogênicas e em maior quantidade que monofiálides, conidióforos eretos ou prostrados. Neste trabalho, foram utilizados nove isolados

de *Fusarium* do abacaxi (NIRENBERG; O'DONNELL, 1998; O'DONNELL; CIGELNIK; NIRENBERG, 1998).

A espécie *F. guttiforme* é responsável pelos sintomas de fusariose e podridão dos frutos de abacaxi (PLOETZ, 2006). A ocorrência destes dois tipos de sintomas em frutos de abacaxi levou a uma reavaliação dos isolados de *F. guttiforme*. Jacobs et al. (2010) analisaram morfologia e relações filogenéticas entre isolados de *Fusarium* obtidos de frutos de abacaxi do Brasil e da África do Sul, assim como outras espécies do complexo *G. fujikuroi*, com base nas sequências parciais dos genes codificantes do fator de alongação 1- $\alpha$ , histona H<sub>3</sub> e  $\beta$ -tubulina. As avaliações mostraram que os isolados africanos representam uma espécie distinta dos isolados brasileiros, que foi descrita como *F. ananatum* sp. nov. Os sintomas associados a ambos, *F. guttiforme* e *F. ananatum*, eram bastante similares, porém, menos severos no caso de *F. ananatum*. Os sintomas de *F. guttiforme* nos frutos incluíam, inicialmente, descoloração dos tecidos infectados que se tornavam rebaixados com esporulação rosa e exsudação de goma. Similar descoloração dos tecidos ocorria em *F. ananatum*; a área rebaixada aparecia em forma de “V” e não era observada exsudação de goma (JACOBS et al., 2010).

### **2.3 Conceitos de espécie no Complexo *Gibberella fujikuroi* (GFC)**

A maioria das espécies de *Fusarium* foi descrita antes da década de 1990, pelo conceito de espécie morfológica. Com base nesse conceito acreditava-se que cada espécie, como *F. solani*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* e *F. subglutinans*, representava uma única espécie cosmopolita (O'DONNELL et al., 2008; LESLIE et al., 2007; GEISER et al., 2004). Atualmente, devido à grande diversidade intraespecífica, sabe-se que cada morfoespécie compreende, na verdade, um complexo de espécies. *F. guttiforme* pertence ao GFC, que inclui

numerosas espécies micotoxicogênicas e/ou fitopatogênicas (AQUIJI et al., 2010; PLOETZ, 2006).

Dentro do conceito de espécie morfológica, os marcadores não necessariamente são características conservadas e confiáveis para diferenciar a maioria das espécies de *Fusarium*. Além disso, não existem marcadores morfológicos suficientes para a separação dessas espécies. Logo, pode ocorrer sobreposição, dificultando esta diferenciação (KVAS et al., 2009).

Na década de 1980, verificou-se que muitas espécies descritas morfológicamente continham populações distintas que poderiam ser diferenciadas pela aplicação de outras técnicas ou conceitos de espécie. A ferramenta mais valiosa para delimitar espécies aplicando o conceito biológico é o cruzamento, no qual a geração de descendentes férteis seria condição essencial para isolados serem considerados de uma mesma espécie (LESLIE et al., 2007).

Atualmente, o GFC inclui dez espécies biológicas ou *mating populations* (MPs) bem caracterizadas, que vão desde MPA até MPJ. Porém, apesar de inúmeras tentativas, para muitas espécies do GFC ainda não foi observada a produção de peritécios férteis (DESJARDINS, 2003).

Sendo assim, para agrupar indivíduos de populações que não são capazes de formar peritécios, o conceito de espécie filogenética tem sido amplamente utilizado. Em estudos de filogenia comprovou-se que a classificação com base em morfologia subestimava muito a verdadeira diversidade dentro do gênero (O'DONNELL et al., 2008).

A análise filogenética de genes permite estabelecer taxonomia por meio do arranjo de três ou mais genes que possuam sinal filogenético. Este conjunto de dados pode ser usado para inferências filogenéticas e/ou estudos de populações. A análise filogenética de genes provou ser bastante útil para delimitar com precisão espécies do gênero *Fusarium* e, sendo assim, o conceito

de espécie filogenética revolucionou a taxonomia de fungos (O'DONNELL et al., 2010).

Foi observado, por Lima et al. (2009), que os sintomas da malformação da mangueira estão associados a pelo menos três agentes etiológicos: *F. sterilihyphosum*, *F. mangiferae* e *Fusarium* sp., nova linhagem descrita por estes autores, que foi posicionada no clado Americano do GFC. Essas espécies podem ser distinguidas apenas por meio de análise filogenética (LIMA et al., 2009).

#### **2.4 Métodos para a construção de árvores filogenéticas**

A filogenia estuda as relações de parentesco entre espécies. Todas as inferências em biologia comparativa dependem da precisão dos métodos para o estudo das relações evolutivas (KOLACZKOWSKI; THORNTON, 2004). Para analisar um conjunto de dados, árvores filogenéticas compostas de nós e ramificações são geradas. Os nós externos representam os táxons e os nós internos inferem a espécie ancestral dos respectivos táxons. As ramificações conectam os nós e representam a quantidade de alteração genética que ocorreu entre nó ancestral e seu descendente (HALL, 2007).

Para a construção de árvores filogenéticas existem inúmeros programas computacionais com funcionamento baseado em algoritmos. Os métodos mais frequentemente utilizados são: (i) métodos baseados na distância evolutiva, em que um programa converte as sequências alinhadas em uma matriz de distância baseada em comparações das sequências par a par. A partir dessa matriz será computado o comprimento dos ramos da árvore e (ii) métodos baseados em caracteres: (1) método baseado em máxima parcimônia, no qual um programa de computador procura pela topologia que apresenta o menor número de substituições nucleotídicas para representar aquele conjunto de dados e (2) inferência bayesiana, utiliza modelos de evolução e programas para procurar

pela melhor árvore, consistente com ambos, o modelo e o alinhamento (HUELSENBECK et al., 2001; MAU; NEWTON, 1997; SAITOU; NEI, 1987; SWOFFORD; BERLOCHER, 1987).

Os métodos baseados em distâncias são *neighbor-joining* (NJ) e *minimum evolution* (ME).

Atualmente, NJ (SAITOU; NEI, 1987) praticamente substituiu UPGMA, por ser mais eficiente e simples. Este método analisa as sequências do alinhamento par a par e constrói uma matriz de distâncias evolutivas, a partir da qual será gerada uma árvore bifurcada (GASCUEL; STEEL, 2006). Em NJ, o comprimento dos ramos da árvore está relacionado com o número de substituições de nucleotídeos ocorridas entre duas sequências em um alinhamento múltiplo. Quanto menor este comprimento, menor a quantidade de substituições. Este método, geralmente, é explorado para gerar hipótese evolutiva inicial entre um dado número de espécies (TAMURA; NEI; KUMAR, 2004).

Métodos de ME e NJ praticamente não se diferenciam na topologia das árvores geradas, porém, como as árvores do ME são mais curtas e facilmente criadas, são menos precisas que NJ. Sendo assim, o método de NJ explica melhor um conjunto de dados (GASCUEL; STEEL, 2006).

Os métodos baseados em caracteres são máxima parcimônia (MP), *maximum likelihood* (ML) e inferência bayesiana. MP avalia diversas árvores geradas *a priori* para selecionar a topologia com um número mínimo de mudanças nos estados dos caracteres. ML e inferência bayesiana representam uma abordagem estatística probabilística de filogenia. Este critério seleciona a topologia que tem uma maior probabilidade de ocorrer em um conjunto de dados. A probabilidade é calculada com referência em um modelo evolutivo a partir do qual se assume que todos os dados se enquadram (KOLACZKOWSKI; THORNTON, 2004).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção dos isolados

Neste estudo foram utilizados 68 isolados de *Fusarium* associados ao abacaxizeiro, incluindo 4 cedidos pela coleção de culturas *National Centre for Agricultural Utilization Research*, Pretoria, IL, USA (NRRL); 10 cedidos pela coleção de culturas do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper); 37 da Coleção Micológica de Lavras (CML) e 21 obtidos recentemente de plantas e frutos de abacaxi, coletados no Espírito Santo e em Minas Gerais, depositados também em CML.

O isolamento do material coletado no ES e MG foi realizado após a fragmentação dos tecidos com sintomas, desinfestação superficial e plaqueamento em meio malte 2% sólido. As culturas com morfologia típica de *Fusarium* foram transferidas para placas de Petri contendo meio SNA a partir de onde as culturas monospóricas foram obtidas. Essas culturas foram preservadas por dois métodos: (i) em água destilada esterilizada e armazenada a 10°C, no escuro (CASTELLANI, 1939) e (ii) criopreservação a partir de suspensão de esporos em 15% glicerol a -80°C (SMITH; ONIONS, 1994), na Coleção Micológica de Lavras (CML), Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA).

#### 3.2 Caracterização morfológica

Neste estudo foram caracterizados morfológicamente 49 isolados, incluindo em 4 da coleção NRRL, 18 da CML, 10 da coleção INCAPER e 21 coletados para este estudo. Os isolados NRRL25295, NRRL 25297, NRRL 25298 e NRRL 25624, previamente classificados como *F. guttiforme*, foram

utilizados como referência (NIRENBERG; O'DONNELL, 1998); os que foram coletados e cedidos pelo Incaper foram caracterizados para identificação e depósito na coleção (CML) e os 18 CML foram recharacterizados para a comparação com os isolados coletados.

A caracterização morfológica dos isolados deste estudo foi realizada de acordo com Nirenberg e O'Donnell (1998). Os isolados foram crescidos em meios batata dextrose ágar (BDA), *synthetic low nutrient agar* (SNA) com folha de cravo e incubados, a 20°C, em câmara de crescimento tipo BOD, no escuro e sob fotoperíodo de 12 horas, respectivamente. A morfologia e a taxa de crescimento das colônias foram avaliadas em BDA após quatro dias da inoculação. A pigmentação foi avaliada em BDA 14 dias após inoculação. Foram utilizadas três repetições por isolado.

As características micromorfológicas foram avaliadas em SNA com folha de cravo, entre 10 e 14 dias após a inoculação. Analisaram-se o tamanho, o formato e a septação dos conídios produzidos no micélio aéreo e esporodóquio. A medição dos conidióforos (polifíalides e monofíalides) e a contagem do número de aberturas conidiogênicas foram realizadas com auxílio de microscópio óptico.

### **3.3 Extração de DNA**

A extração de DNA foi realizada pelo protocolo de Leslie e Summerell (2006), adaptado pelo Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), utilizando o tampão CTAB. O fungos foram cultivados em meio líquido à base de extrato de malte 2%, por três dias, em temperatura ambiente e sob agitação de 100 rpm. O micélio foi filtrado, macerado em nitrogênio líquido, transferido para microtubos de 1,5 mL contendo tampão CTAB 2% e mantido em banho-maria, a 65°C, por 20 minutos.

Foram adicionados 600 µL de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) à mistura, que foi centrifugada. A fase aquosa foi recuperada e a ela foram adicionados 400 µL de isopropanol gelado. A mistura permaneceu no freezer por 20 minutos e foi centrifugada. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado (*pellet*) foram adicionados 500 µL de etanol 70%. A suspensão foi centrifugada e o etanol sobrenadante descartado. O pellet foi seco em estufa a 60°C e o DNA ressuspendido em solução tampão TE 1x (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

### **3.4 Sequenciamento de DNA e análise filogenética**

Foram selecionados 61 isolados de *Fusarium* associados ao abacaxizeiro com base em diferentes regiões de coleta, para o sequenciamento do fragmento do gene *tub2* (O'DONNELL; CIGELNIK, 1997). Um total de 30 isolados, selecionados a partir dos grupos gerados na análise de *tub2*, foram utilizados para análise filogenética do gene *tef1* (O'DONNELL; CIGELNIK; NIRENBERG, 1998). Na análise individual dos genes, foram utilizadas 22 sequências do gene *tub2* e 28 sequências do gene *tef1* como referência. Essas sequências pertencem ao GFC e foram adquiridas a partir do GenBank (Tabela 1). Para a análise combinada dos genes *tef1* e *tub2* pelos métodos de NJ, MP e inferência bayesiana, foram utilizados 27 isolados deste estudo e 17 de referência de outras espécies do GFC do GenBank (Tabela 1).

Tabela 1 Sequências de referência utilizadas na análise filogenética

Espécie	ªCódigo de acesso	Acesso GenBank	
		<sup>b</sup> tub2	<sup>c</sup> tef1
<i>F. ananatum</i>	CMW 18685 ( <i>ex-type</i> )	DQ282174*	DQ282167
	CMW 18688	DQ282175*	DQ282168
	CMW 18687	DQ282176*	DQ282169
	CMW 18686	DQ282178*	DQ282171
	CMW 28597	EU668309	EU668312
	CMW 28598	EU668310	EU668313
	CMW 28599	EU668311	EU668314
	NRRL 53131		HM347128
<i>F. anthophilum</i>	NRRL 13602	U61541	AF160292
<i>F. begoniae</i>	NRRL 31851	AY329045	AY329036
	NRRL 25300 ( <i>ex-type</i> )		AF160293
<i>F. bulbicola</i>	NRRL 13618 ( <i>ex-type</i> )	U61546	AF160294
<i>F. concentricum</i>	NRRL 29944	AF333951	AF333935
<i>F. guttiforme</i>	NRRL 22945	U34420	AF160297
	KSU 05035	AY222291	
	MRC 7539 ( <i>ex-type</i> )	DQ282172*	DQ282165
	MRC 6783	DQ282173*	DQ282166
	MRC 6782	DQ282177*	DQ282170
<i>F. nygamai</i>	NRRL 13448 ( <i>ex-type</i> )	U34426	AF160273
<i>F. oxysporum</i>	NRRL 26374	AF008518	AF008483
<i>F. proliferatum</i>	NRRL 53578	GU737292	GU737400
<i>F. phyllophilum</i>	NRRL 13617	U34432	AF160274
<i>F. pseudocircinatum</i>	NRRL 22946	U34427	AF160271
<i>F. subglutinans</i>	NRRL 22016	U34417	AF160289
<i>F. sacchari</i>		U34414	HM347125
<i>F. succisae</i>	KSU 03832	AY222289	
	NRRL13613		AF160291
<i>F. mangiferae</i>		HM135539	HM135531
<i>G. moniliformes</i>	KSU 12911	AY665679	AY662325
<i>F. bulbicola</i>	NRRL 13618	U61546	AF160294
<i>F. sterilihyphosum</i>	NRRL 54011	GU737307	GU737415
<i>G. circinata</i>	NRRL 29945	AF333946	AF333930
<i>G. circinata</i>	NRRL 26432	AF333945	

<sup>a</sup>Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; MRC: Medical Research Council, Tygerberg, Cidade de Cape, África do Sul. NRRL: *National Centre for Agricultural Utilization Research*, Peoria, IL, USA. CMW: Coleção micológica de Mike Wingfield, TPCP, FABI, Universidade da Pretoria, KSU: Kansas State University, Manhattan, Kansas, USA; <sup>b</sup>Sequências do gene *tub2* obtidas do GenBank, NCBI; <sup>c</sup>Sequências do gene *tef1* obtidas do GenBank, NCBI; \*Sequências que não se alinharam

Para a amplificação do fragmento do gene *tef1* foram utilizados os *primers* Ef-1 (forward; 5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') e Ef-2 (reverse; 5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') (O'DONNELL et al., 1998). Na reação para amplificação do gene *tub2*, os *primers* utilizados foram T1 (forward; 5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3') e T2 (reverse; 5'-TAGTGACCCTTGCCCAAGTTG-3') (O'DONNELL; CIGELNIK, 1997).

As reações de PCR foram realizadas no termociclador My Cycler™ (BIO-RAD). As condições de ciclo para *tef1* foi de acordo com os seguintes passos: (1) desnaturação, a 94°C, por 1 minuto; (2) seguido por 34 ciclos de desnaturação, a 94°C, por 30 segundos; (3) anelamento, a 62°C, por 45 segundos; (4) extensão, a 72°C, por 1 minuto e (6) extensão final, a 72°C, por 5 minutos (O'DONNELL et al., 1998). Para *tub2*, o programa de ciclos foi: (1) desnaturação, a 94°C, por 1 minuto; (2) seguido por 34 ciclos de desnaturação, a 94°C, por 30 segundos; (3) anelamento, a 61°C, por 45 segundos, (4) extensão, a 72°C, por 1 minuto e (6) extensão final, a 72°C, por 5 minutos (O'DONNELL; CIGELNIK, 1997).

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

O sequenciamento dos fragmentos gênicos foi realizado em sequenciador automático MEGA BACE®, no Laboratório de Genômica da Universidade Federal de Viçosa (UFV), nas direções senso e antissenso. No programa SeqAssem (HEPPERLE, 2004), os eletroferogramas do material sequenciado foram analisados visualmente e editados. As sequências geradas foram comparadas com o banco de dados GenBank do *National Center for Biotechnological Information* (NCBI), utilizando o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>). Sequências de referência correspondentes aos genes *tub2* e *tef1*,

das espécies do GFC, previamente depositadas no GenBank, foram acrescentadas às análises (Tabela 1).

Alinhamentos múltiplos das sequências nucleotídicas foram gerados utilizando-se o programa CLUSTALW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994), implementado pelo programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* 5 (MEGA 5) (TAMURA et al., 2011) e corrigidos manualmente.

A análise filogenética bayesiana foi realizada com o programa MrBayes 3.1 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003), utilizando o modelo de substituição nucleotídica K2+E (*KIMURA with Equal distribution*) para a análise combinada das sequências de *tef1* e *tub2*. Foram realizadas duas análises, cada qual contendo quatro cadeias de Markov avaliadas durante 10.000.000 de gerações e amostradas a cada 100 gerações. Vinte e cinco por cento das 10.000 árvores geradas foram descartadas (*25% of burning*) e a árvore de consenso calculada foi visualizada com o auxílio do programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011).

### **3.5 Verificação da patogenicidade dos isolados**

Os ensaios para determinar a patogenicidade dos isolados de *Fusarium* foram conduzidos no Instituto Capixaba de Pesquisa e Extensão Rural, Incaper, em Vitória, ES, de fevereiro a junho/2011. O teste foi realizado em câmara de crescimento com mudas de abacaxizeiro, de acordo com Ventura (1994). Devido ao alto padrão de suscetibilidade, foram utilizadas, em todos os testes, mudas da cultivar Pérola, sem aplicação de fungicida, da Fazenda Experimental do Incaper em Sooretama, ES.

O isolado NRRL25624 de *F. guttiforme* foi utilizado como referência dos sintomas incitados pelo patógeno. Alguns isolados de *F. subglutinans*, como isolados ATCC 38933, patogênico ao sorgo e ATCC 201270 e ATCC 201271, patogênico ao milho, foram utilizados como tratamento adicional ou controle

negativo dos sintomas. A testemunha absoluta foi inoculada com água destilada autoclavada.

O teste foi realizado com 16 isolados deste estudo (Tabela 3). Na base das mudas de abacaxi foram feitas perfurações. Para a padronização do tamanho dos ferimentos, foi utilizando uma ferramenta adaptada. Sobre as perfurações, foi aplicada uma suspensão de conídios com concentração ajustada para  $2 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>. As mudas inoculadas foram mantidas em câmara de crescimento tipo BOD, a 25°C, por 20 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições.

No final do período de avaliação, o diâmetro das lesões no ponto de inoculação foi medido. Os valores de severidade da doença foram calculados por meio da escala de notas de Ventura (1994), sendo: (-) ausência de tecidos necróticos; (+) lesões limitadas ao local da inoculação, menores que 2 mm; (++) lesões abrangendo extensão de 3 a 9 mm; (+++) lesões que se estendem de 10 até 15 mm e (++++) lesões com mais de 15 mm.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica foi realizada com 49 isolados, sendo 18 da CML, 10 da coleção Incaper e 21 coletados para este estudo deste estudo (Tabela 2). Os isolados NRRL25295, NRRL 25297, NRRL 25298 e NRRL 25624, da espécie *F. guttiforme*, foram utilizados como referência (NIRENBERG; O'DONNELL, 1998).

Dentre os isolados que foram obtidos de coletas recentes em MG e ES, 21 apresentaram marcadores morfológicos típicos de *F. guttiforme*, como microconídios obovóides (em formato de gota), geralmente sem septo, produzidos a partir do micélio aéreo em falsas cabeças, polifíalides e ausência de clamidósporo (APÊNDICE). Estes isolados foram depositados na CML como *F. guttiforme*.

O diâmetro médio das colônias de 43 isolados deste estudo e 4 isolados de referência, após quatro dias de incubação no escuro, a 20°C, em BDA, variou de 3,5 a 5,5 cm. Os quatro isolados de referência apresentaram taxa de crescimento maior que 4 cm. Dentre os isolados deste estudo, 39 apresentaram crescimento da colônia maior que 4 cm e oito foram menores que 4 cm (Tabela 2).

O padrão de coloração da parte superior e inferior das colônias foi avaliado nos 49 isolados crescidos em BDA, a 20°C, fotoperíodo 12 horas luz/12 horas escuro. Todos os isolados analisados apresentaram coloração branca, tanto na superfície superior das colônias quanto do micélio aéreo.

A coloração da superfície inferior das colônias variou de branco a púrpura. Uma mistura das cores púrpura e branca foi observada em dois dos isolados de referência (NRRL 25295 e NRRL 25298) e mais quinze isolados. O

isolado NRRL 25624, juntamente com nove isolados avaliados, apresentou coloração rosa-claro. A coloração rosa-escuro foi observada no isolado NRRL 25297 e em mais três isolados deste estudo; 13 isolados apresentaram coloração púrpura e 12 apresentaram coloração branca (Tabela 2).

Alguns isolados crescidos nas mesmas condições e meios de cultura, porém, em épocas diferentes, não mantiveram o padrão de coloração. Na presente avaliação, cinco isolados apresentaram coloração rosa-claro e os isolados CML 2099 e CML 2079, coloração branca e púrpura, respectivamente. Em outra avaliação, realizada três meses após avaliação anteriormente mencionada, o isolado CML 2079 apresentou coloração branca e o isolado CML 2099, coloração púrpura em uma repetição e branca nas outras duas repetições. Os outros cinco isolados mantiveram o padrão de coloração rosa-claro, nos dois experimentos.

Foi realizada a caracterização micromorfológica em SNA, a 20°C, fotoperíodo 12 horas, com 38 isolados deste estudo e 4 isolados de referência. Foram mensurados micro, macroconídios e polifíalides. A maioria dos isolados apresentou polifíalides com duas aberturas conidiogênicas, tendo apenas seis deles apresentado de uma a três aberturas.

Os isolados NRRL 25295 e NRRL 25298 e mais cinco isolados caracterizados apresentaram polifíalides medindo de 11  $\mu\text{m}$  a 30  $\mu\text{m}$  de comprimento. O restante dos isolados apresentou polifíalides medindo, no mínimo, 15  $\mu\text{m}$  a 40  $\mu\text{m}$ . Todos os isolados avaliados apresentaram polifíalides tanto prostradas quanto eretas, inclusive um isolado de referência NRRL 25298 (Tabela 2).

Os microconídios mensurados apresentaram formato obovoide e/ou oval, sem septo em sua maioria ou ocasionalmente com um septo. O tamanho dos microconídios, na maioria dos isolados, variou de 7  $\mu\text{m}$  a 20  $\mu\text{m}$  de comprimento (APÊNDICE). Um isolado apresentou microconídios maiores

variando de 15  $\mu\text{m}$  a 28  $\mu\text{m}$  de comprimento. A largura dos conídios de todos os isolados avaliados variou de 2  $\mu\text{m}$  a 3  $\mu\text{m}$ .

Os esporodóquios de coloração laranja foram observados em apenas cinco isolados e em pequena quantidade, exceto pelos isolados CML 2078 e CML 2079 (APÊNDICE). Os macroconídios apresentaram formato quase reto, com célula apical cônica e célula pé, exibiram de 3 a 5 septos e mediram de 30-60 x 3-4  $\mu\text{m}$ .

Os macroconídios, em sua maioria, foram produzidos no micélio aéreo. Esses esporos apresentaram laterais retas, sem distinção de célula pé e célula apical, medindo 35-55 x 3-4  $\mu\text{m}$  de largura, contendo 3 a 4 septos. Macroconídios maiores, de 35-70 x 3-4  $\mu\text{m}$  e 3 a 7 septos, foram observados em seis isolados. Não foi relatada a produção de clamidósporos e não foi constatada a presença de morfotipos entre os isolados avaliados neste estudo.

Tabela 2 Análise morfológica dos isolados associados ao abacaxizeiro

CML <sup>a</sup>	Outro cod <sup>a</sup>	Origem	Macromorfologia			Micromorfologia		
			<sup>c</sup> Coloração	<sup>d</sup> Tx cresc	Micro	Polifálide	Macro	Septos
**1063	NRRL25295	Brasil, ES	púrpura+branco	4,5 x 4,3	7-20 x 2-3	22-30	40-60 x 3-4	3-6
<sup>h</sup> *1064	NRRL25297	Brasil, ES	rosa escuro	4,6 x 4,3	7-20 x 2-3	25-35	<sup>e</sup> 40-50 x 3-4	3-6
*1065	NRRL25298	Brasil, ES	púrpura+branco	4,3 x 4,4	7-25 x 2-3	20-30	35-40 x 3-4	3-6
*1067	NRRL25624	Brasil, ES	rosa claro	4,7 x 4,5	9-22 x 2-3	25-37	37-42 x 3-4	3-4
902		Presidente Kennedy, ES	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
903		Presidente Kennedy, ES	branco	3,3 x 3,2	Nd	Nd	Nd	Nd
905		Presidente Kennedy, ES	púrpura+branco	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
<sup>h</sup> 906		Presidente Kennedy, ES	púrpura+branco	4,2 x 4,5	Nd	Nd	Nd	Nd
907		Fazenda Jaqueira, ES	púrpura+branco	4,3 x 4,5	Nd	Nd	Nd	Nd
<sup>h</sup> 910		Fazenda Jaqueira, ES	rosa escuro	4,4 x 4,2	9-21 x 2-3	22-35	35-55 x 3-4	3-4
911		Fazenda Jaqueira, ES	púrpura+branco	4,5 x 4,4	7-20 x 2-3	22-33	37-50 x 3-4	3-4
<sup>h</sup> 912		Marataízes, ES	púrpura	4,3 x 4,4	7-20 x 2-3	25-35	35-40 x 3-4	3-4
913		Marataízes, ES	púrpura+branco	4,5 x 4,6	Nd	Nd	Nd	Nd
<sup>h</sup> 914		Marataízes, ES	rosa escuro	4,2 x 4,0	7-25 x 2-3	22-33	35-40 x 3-4	3-4
915		Marataízes, ES	rosa escuro	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
916		Marataízes, ES	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
918		Marataízes, ES	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
919		Marataízes, ES	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

Tabela 2, continuação

CML <sup>a</sup>	Outro cod <sup>a</sup>	Origem	Macromorfologia		Micromorfologia			
			<sup>c</sup> Coloração	<sup>d</sup> Tx cresc	Micro	Polifálide	Macro	Septos
<sup>h</sup> 921		Marataízes, ES	branco	4,5 x 4,3	7-22 x 2-3	22-33	35-55 x 3-4	3-4
923		Jegoriuma, ES	branco	4,2 x 4,0	7-20 x 2-3	20-35	35-45 x 3-4	3-4
<sup>h</sup> 924		Jegoriuma, ES	branco	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
925		Jegoriuma, ES	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
926		Brejo dos Patos, ES	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
930		Santa Rita, PB	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
1023		Canaã, ES	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
1026		Canaã, ES	púrpura+branco	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
1027		Canaã, ES	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
1030		Itaberaba, BA	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
<sup>h</sup> 1034	E 197	São Paulo	púrpura+branco	3,3 x 3,2	7-23 x 2-3	20-32	40-70 x 3-4	3-6
<sup>h</sup> 1035	E 199	Mato Grosso do Sul	púrpura+branco	3,6 x 3,5	7-25 x 2-3	<sup>f</sup> 20-32	45-70 x 3-4	3-6
<sup>h</sup> 1037	E 269	Janaúba, MG	púrpura+branco	4,2 x 4,0	7-23 x 2-3	20-32	40-70 x 3-4	3-6
1041		Itaberaba, BA	branco	4,3 x 4,0	7-25 x 2-3	22-35	35-40 x 3-4	3-6
1043		Santa Rita, PB	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
1044		Santa Rita, PB	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
1045		Santa Rita, PB	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
1051		Espírito Santo	púrpura+branco	3,3 x 3,5	Nd	Nd	Nd	Nd
1053		Bahia	púrpura+branco	4,2 x 4,0	Nd	Nd	Nd	Nd

Tabela 2, continuação

CML <sup>a</sup>	Outro cod <sup>a</sup>	Origem	Macromorfologia			Micromorfologia		
			<sup>c</sup> Coloração	<sup>d</sup> Tx cresc	Micro	Polifialide	Macro	Septos
1057		Fruta, MG	púrpura+branco	4,3 x 4,1	Nd	Nd	Nd	Nd
2078		Monte Alegre, MG	púrpura	3,4 x 3,3	7-25 x 2-3	11-28	<sup>g</sup> 30-45 x 3-4	3-4
<sup>h</sup> 2079		Monte Alegre, MG	púrpura	3,4 x 3,3	10-21 x 2-3	15-35	<sup>g</sup> 35-60 x 3-4	3-4
<sup>h</sup> 2085		Marataízes, ES	branco	4,5 x 4,4	7-20 x 2-3	22-30	<sup>g</sup> 35-40 x 3-4	3-4
<sup>h</sup> 2086		Marataízes, ES	rosa claro	4,6 x 4,4	7-25 x 2-3	<sup>f</sup> 23-31	36-42 x 3-4	3-4
<sup>h</sup> 2087		Marataízes, ES	rosa claro	4,3 x 4,2	10-20 x 2-3	25-32	35-40 x 3-4	3-4
2089		Marataízes, ES	rosa claro	4,3 x 4,1	10-23 x 2-3	20-32	35-60 x 3-4	3-6
<sup>h</sup> 2092		Marataízes, ES	rosa claro	4,6 x 4,5	7-19 x 2-3	22-32	35-50 x 3-4	3-5
2093		Marataízes, ES	rosa claro	Nd	7-20 x 2-3	Nd	Nd	Nd
2095		Marataízes, ES	branco	Nd	9-20 x 2-3	Nd	Nd	Nd
2097		Marataízes, ES	púrpura	Nd	10-21 x 2-3	Nd	Nd	Nd
2098		Marataízes, ES	rosa claro	Nd	7-25 x 2-3	Nd	Nd	Nd
<sup>h</sup> 2099		Marataízes, ES	branco	Nd	7-20 x 2-3	Nd	Nd	Nd
<sup>h</sup> 2100		Cach. Itapemirim, ES	branco	Nd	7-25 x 2-3	Nd	Nd	Nd
2101		Cach. Itapemirim, ES	púrpura	Nd	10-25 x 2-3	Nd	Nd	Nd
2103		Cach. Itapemirim, ES	púrpura	Nd	10-22 x 2-3	Nd	Nd	Nd
2105		Cach. Itapemirim, ES	púrpura	Nd	10-20 x 2-3	Nd	Nd	Nd
2106		Sooretama, ES	púrpura	Nd	7-23 x 2-3	Nd	Nd	Nd
2109		Sooretama, ES	púrpura	Nd	15-28 x 2-3	Nd	Nd	Nd

Tabela 2, conclusão

CML <sup>a</sup>	Outro cod <sup>a</sup>	Origem	Macromorfologia		Micromorfologia			
			<sup>c</sup> Coloração	<sup>d</sup> Tx cresc	Micro	Polifialide	Macro	Septos
2114		Sooretama, ES	púrpura	Nd	7-22 x 2-3	Nd	Nd	Nd
2118		Sooretama, ES	púrpura	Nd	7-23 x 2-3	Nd	Nd	Nd
2119		Jaguaré, ES	púrpura	Nd	8-25 x 2-3	Nd	Nd	Nd
2130	E433	Ceará	branco	Nd	9-19 x 2-3	Nd	Nd	Nd
2144	E447	Ceará	púrpura+branco	Nd	7-20 x 2-3	Nd	Nd	Nd
2146	E449	Ceará	púrpura+branco	Nd	7-22 x 2-3	Nd	Nd	Nd
2149	E452	Ceará	rosa claro	Nd	10-22 x 2-3	Nd	Nd	Nd
2150	E453	Ceará	rosa claro	Nd	8-20 x 2-3	23-37	Nd	Nd
2153	E456	Ceará	púrpura	Nd	9-21 x 2-3	22-32	Nd	Nd
2154	E457	Ceará	branco	Nd	7-15 x 2-3	23-30	Nd	Nd
2159	E477	Ceará	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
2160	E480	Ceará	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

<sup>a</sup>Código de acesso das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; E = Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural - Incaper, Vitória, Espírito Santo, Brasil; NRRL = *National Centre for Agricultural Utilization Research*, Peoria, IL, USA. <sup>c</sup>Coloração das colônias: culturas crescidas em BDA, a 20°C, com fotoperíodo de 12 horas; <sup>d</sup>Média de três repetições das medições da taxa de crescimento das colônias em cm. Culturas crescidas em BDA, a 20°C, escuro; <sup>f</sup>Polifialides com número de aberturas conidiogênicas variando de 1 a 3; <sup>g</sup>Isolados que produziram esporodóquio em folha de cravo; <sup>h</sup>Isolados com polifialides eretas e prostadas; \*Isolados de referência da coleção NRRL; \*\*Isolado ex-holotype; Nd – Isolado não analisado quanto a essa característica

## 4.2 Análise filogenética

A princípio, nenhum agrupamento entre os isolados deste estudo foi gerado devido à falta de variabilidade morfológica. Para reunir argumentos suficientes da ocorrência de diversidade dentro da amostragem realizada, foram inferidas as relações filogenéticas entre os isolados deste estudo e isolados de referência do GFC. As regiões gênicas utilizadas foram beta tubulina (*tub2*) e fator de alongação 1 $\alpha$  (*tef1*).

A amplificação dos fragmentos gênicos por PCR gerou produtos de 520 pb e 640 pb, para *tub* e *tef1*, respectivamente. As sequências obtidas foram comparadas com sequências de outras espécies do GFC disponíveis no GenBank. As sequências com mais de 96% de similaridade foram utilizadas como referência. O isolado NRRL 26374 de *F. oxysporum* foi utilizado como *outgroup*, em todas as análises realizadas neste trabalho.

### 4.2.1 Análise do gene da beta tubulina (*tub2*)

Para a análise filogenética do gene *tub2*, um total de 61 isolados, previamente caracterizados morfológicamente, foram sequenciados e 22 sequências do GenBank foram utilizadas como referência. A análise filogenética foi realizada pelos métodos de Neighbor-Joining (NJ) e método de máxima parcimônia (MP). O alinhamento das sequências com inserção de *gaps* gerou 545 caracteres para a comparação das espécies. A exclusão dos caracteres não informativos resultou em um total de 34 caracteres informativos. A procura heurística no conjunto de dados gerou 1.126 árvores parcimoniosamente informativas; neste trabalho foi mostrada a árvore consenso gerada pelo método de MP (Figura 1).

Os isolados avaliados deste estudo formam distribuídos em clado A, clado B e grupo 1 (Figura 1). O clado A, composto de 21 isolados deste estudo com baixo suporte de *bootstrap*, não agrupou a nenhuma sequência de referência utilizada neste trabalho.

No clado B, as sequências de referência de *F. ananatum* se diferenciaram em duas linhagens irmãs. Uma dessas linhagens contém três sequências de *F. ananatum* formando um clado distinto com 63% de *bootstrap* e a outra linhagem foi composta apenas do isolado NRRL 22945. Na base do clado de *F. ananatum*, foi observada uma politomia, em posição parafilética, contendo um isolado de referência de *F. guttiforme*, mais 13 isolados deste estudo, que serão chamados de isolados “para-ananatum”. Pela análise do gene *tub2*, considerando todo o clado B, os isolados de referência de *F. ananatum* e os isolados para-ananatum pertencem à mesma espécie (Figura 1).

O clado C é composto por oito espécies de referência do GFC. Na base deste clado foram observados 22 isolados deste estudo, uma linhagem filogenética contendo três isolados deste estudo e mais dois isolados de referência de *F. guttiforme* em politomia.

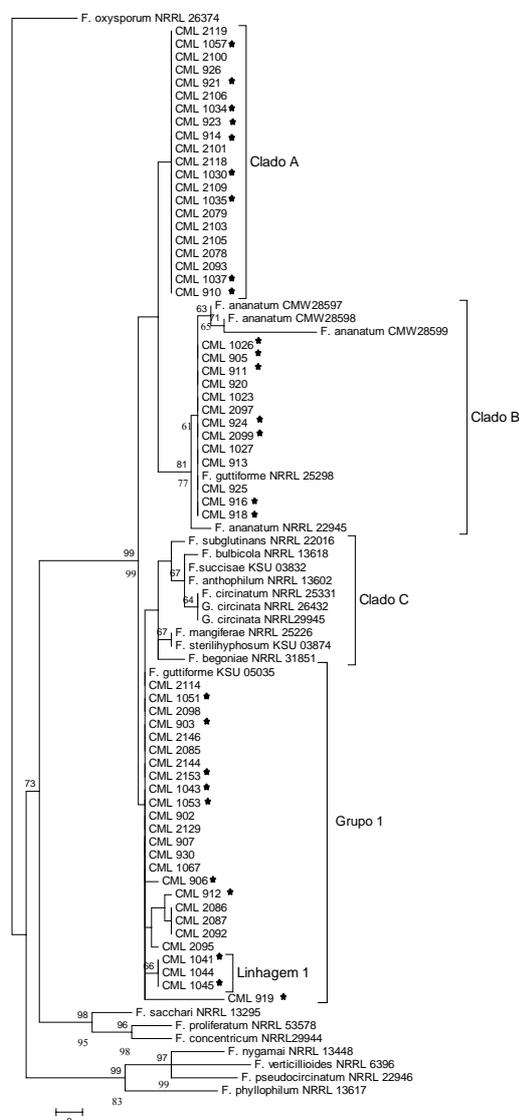


Figura 1 Árvore consenso inferida do alinhamento das seqüências de beta tubulina enraizada com o isolado NRRL26374 de *F. oxysporum*. Os valores de *bootstrap* maiores que 60% obtidos da árvore de MP estão indicados acima dos ramos Os valores de *bootstrap* maiores que 60% obtidos da árvore de NJ estão indicados abaixo dos ramos \*Representa os isolados que contêm seqüências com o gene *tefl*

#### 4.2.2 Análise do gene do fator de alongação (*tef1*)

Na análise filogenética do gene *tef1*, um total de 30 isolados foi utilizado. Na análise realizada pelos métodos de NJ e MP, um total de 28 sequências de referência do GFC foi incluído (Tabela 3).

O alinhamento do gene *tef1* com inserção de *gaps* gerou 428 caracteres para a comparação das espécies. A exclusão dos caracteres não informativos resultou em um total de 22 caracteres informativos. A procura heurística no conjunto de dados gerou 162 árvores parcimoniosamente informativas; neste trabalho foi mostrada a árvore consenso gerada pela análise de MP (Figura 2).

Foi observada a formação de dois clados distintos, clado A e clado B. A maioria dos isolados deste estudo se agrupou no clado A com isolados de referência de *F. guttiforme* (62% de suporte de *bootstrap*). No clado A, foram identificadas duas linhagens filogenéticas e o restante dos isolados formou uma politomia. A linhagem 1 contém o isolado CML 1034 mais um isolado de referência de *F. guttiforme* e a linhagem 2 foi composta por cinco isolados deste estudo. No clado A, além dos isolados de referência de *F. guttiforme*, agruparam-se dois isolados de referência da espécie *F. begoniae*.

O clado B, com alto suporte de *bootstrap* (90%), foi composto de todas as sequências de referência de *F. anatum*, sem isolados deste estudo. Pela análise do gene *tef1*, *F. anatum* é um grupo monofilético distinto de *F. guttiforme* e todos os isolados deste estudo pertencem à espécie *F. guttiforme*.

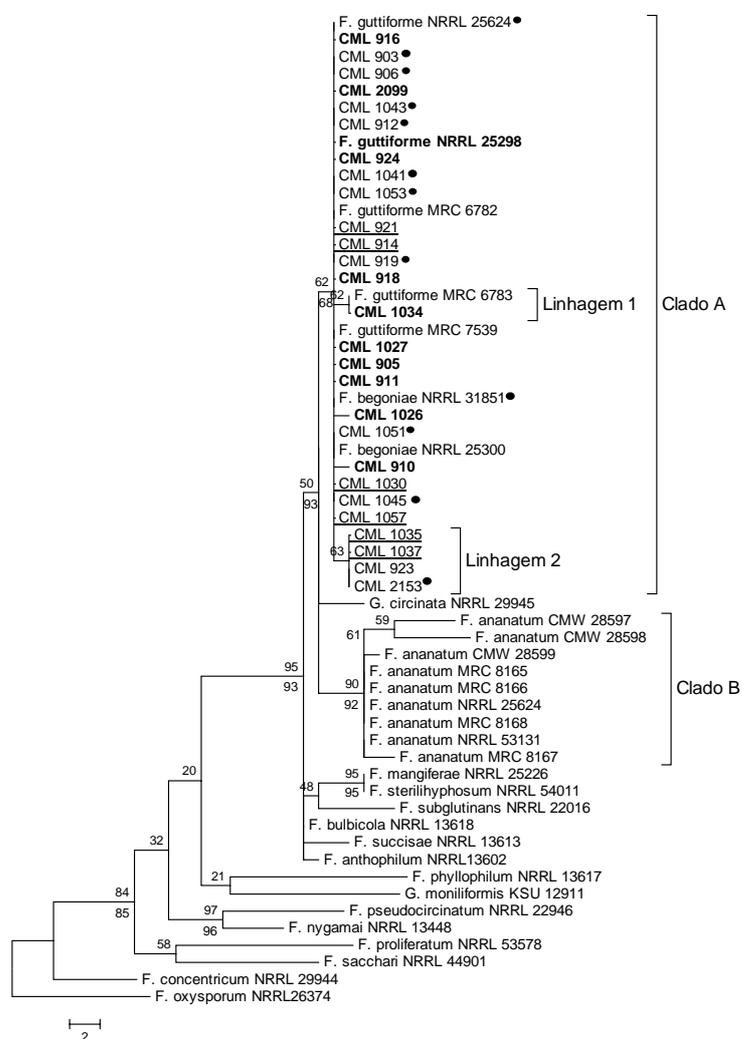


Figura 2 Árvore consenso inferida do alinhamento das sequências do fator de alongação  $1\alpha$ , enraizada com o isolado NRRL 26374 de *F. oxysporum*. Os valores de *bootstrap* maiores que 60% obtidos da árvore de MP estão representados acima dos ramos. Os valores de *bootstrap* maiores que 60% obtidos da árvore de NJ estão representados abaixo dos ramos. As sequências em negrito representam isolados “para-ananatum” da árvore individual de *tub2* (Figura 1). As sequências sublinhadas correspondem aos isolados do clado A da árvore individual de *tub2* (Figura 1) • Corresponde aos isolados do grupo 1 da árvore individual de *tub2* (Figura 1)

### 4.2.3 Análise combinada dos genes *tub2* e *tef1*

Considerando o princípio da concordância genealógica de genes para reconhecimento de espécies filogenéticas (*Genealogical concordance phylogenetic species recognition*, ou GCPSR (Taylor et al., 2000), os alinhamentos dos dois genes (*tub2* e *tef1*) foram combinados, gerando árvores pelos métodos de NJ, MP e por inferência bayesiana. Para a construção das árvores foram utilizados 27 isolados deste estudo e 18 de referência de outras espécies do GFC do GenBank.

O alinhamento combinado do conjunto de dados com inserção de *gaps* gerou 952 caracteres para a comparação das espécies. A exclusão dos caracteres não informativos resultou em um total de 38 caracteres informativos. A procura heurística no conjunto de dados gerou 513 árvores parcimoniosamente informativas; neste trabalho foram mostradas as árvores consenso geradas por MP (Figura 3) e inferência bayesiana (Figura 4).

A topologia das árvores combinadas foi bastante similar à topologia da árvore individual do gene *tub2*. Foi observada a formação de dois clados nas árvores geradas por MP e inferência bayesiana: o clado A, contendo quatro isolados de referência de *F. ananatum* e mais nove isolados para-*ananatum*. Os isolados de *F. ananatum* formaram um grupo monofilético e os isolados para-*ananatum* uma politomia na base clado em posição parafilética (Figura 3 e 4). Este agrupamento foi inferido também na análise individual do gene *tub2*, com alto suporte de *bootstrap* (Clado B, Figura 1).

Na base do clado A foram observados nove isolados deste estudo (Grupo A, Figura 3 e 4). Dentre estes isolados, três formaram uma linhagem filogenética, a linhagem 1 e o restante dos isolados formaram uma politomia. Na

árvore individual do gene *tub2*, os isolados do grupo A correspondem ao clado A (Figura 1).

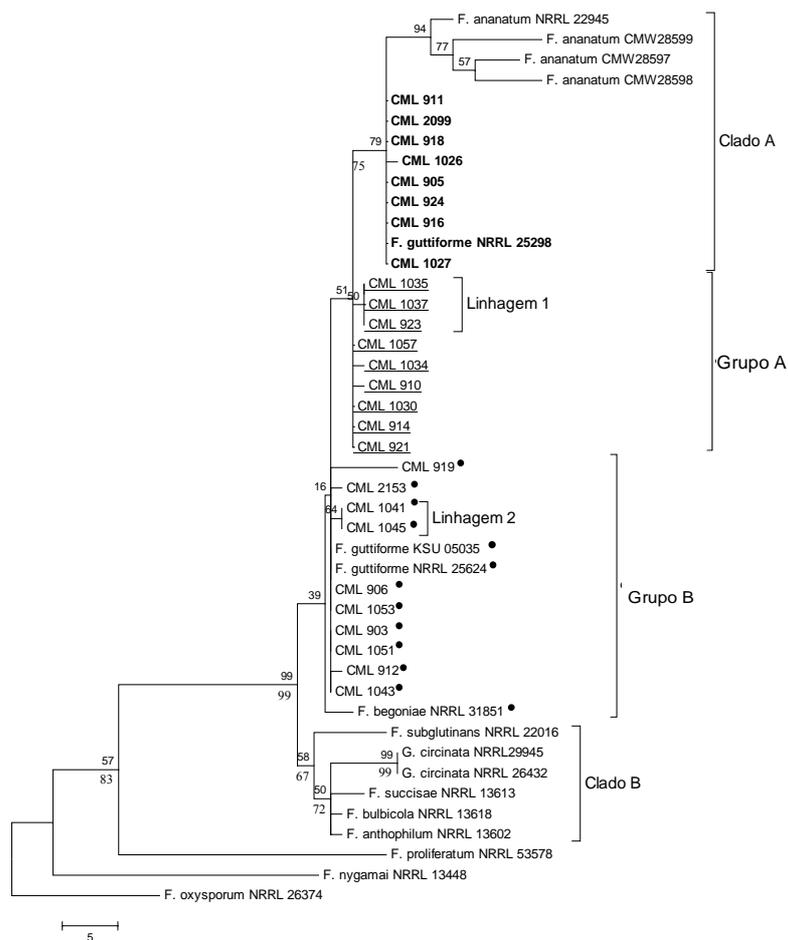


Figura 3 Árvore consenso inferida do alinhamento combinado das sequências de beta tubulina e fator de alongação  $1\alpha$ , enraizada com o isolado NRRL 26374 de *F. oxysporum*. Os valores de *bootstrap* maiores que 60% obtidos da árvore de MP estão representados acima dos ramos. Os valores de *bootstrap* maiores que 60% obtidos da árvore de NJ estão representados abaixo dos ramos. As sequências em negrito representam isolados “para-ananatum” da árvore individual de *tub2* (Figura 1). As sequências sublinhadas correspondem aos isolados do clado A da árvore individual de *tub2* (Figura 1). • Representa os isolados do grupo 1 da árvore individual de *tub2* (Figura 1)

Na base do nó ancestral dos agrupamentos mencionados anteriormente (clado a, grupo A) foram observados oito isolados deste estudo, mais uma linhagem filogenética (2), dois isolados de referência de *F. guttiforme* e um isolado de referência de *F. begoniae*, formando uma politomia (Grupo B, Figura 4 e 5).

Pela análise combinada dos genes, todos os isolados de referência de *F. ananatum* formaram um grupo monofilético. Os isolados para-ananatum formaram um grupo para-filético a este clado.

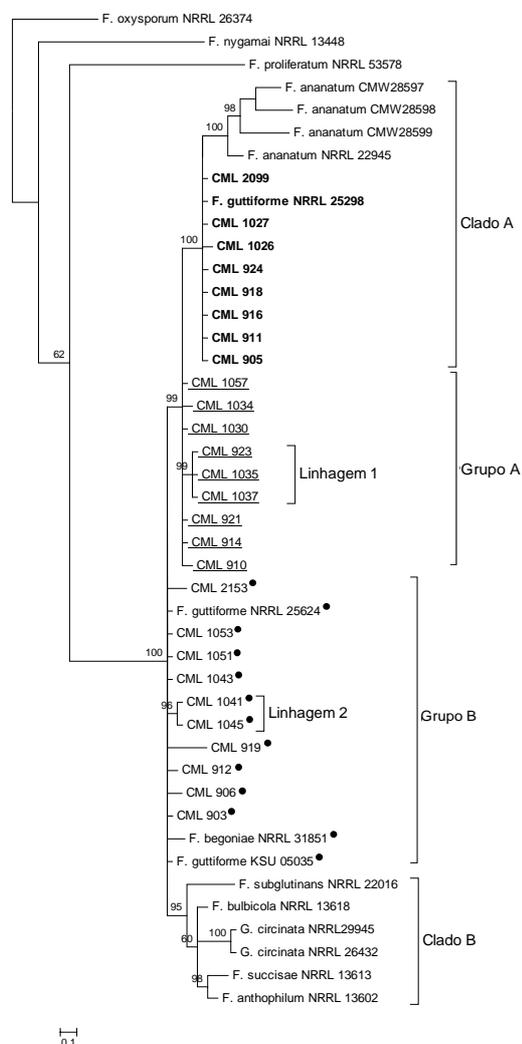


Figura 4 Árvore construída por inferência bayesiana do alinhamento combinado das sequências de beta tubulina e fator de alongação  $1\alpha$ , enraizada com o isolado NRRL 26374 de *F. oxysporum*. Ramificações com mais de 60% de probabilidade posterior bayesiana estão representados acima dos ramos. As sequências em negrito representam isolados “parananatum” da árvore individual de *tub2* (Figura 1). As sequências sublinhadas representam os isolados do clado A da árvore individual de *tub2* (Figura 1) • Indicam isolados do clado A da árvore individual de *tub2* (Figura 1)

### 4.3 Verificação da patogenicidade dos isolados

Foram avaliados 16 isolados deste estudo quanto à patogenicidade. Todas as mudas utilizadas no teste permaneceram em câmara de crescimento tipo BOD, a 25°C, por 20 dias. O isolado NRRL 25624, referência dos sintomas induzidos por *F. guttiforme*, quando inoculado em mudas, incitou sintomas típicos da doença e o tamanho médio das lesões nas três repetições foi de 8,3 mm. Os isolados de outras espécies, utilizados como tratamento adicional, quando aplicados em suspensão sobre os ferimentos, produziram micélio ralo e não foram capazes de provocar necrose dos tecidos (APÊNDICE). A testemunha permaneceu assintomática (Tabela 4).

Os isolados deste estudo induziram lesões necróticas em todas as inoculações, semelhantes às lesões observadas nas mudas inoculadas com o isolado de referência. O tamanho das lesões variou desde lesões limitadas ao ponto de inoculação até necrose com mais de 15 mm de extensão (APÊNDICE).

Para completar os postulados de Koch, foi realizado reisolamento dos fungos a partir das lesões necróticas. Os isolados recuperados apresentaram culturas típicas dos isolados inoculados e a identidade dos fungos foi confirmada por meio da morfologia.

Tabela 3 Teste de patogenicidade dos isolados associados ao abacaxizeiro

CML <sup>a</sup>	Outro cod <sup>a</sup>	Espécie	Hospedeiro	<sup>b</sup> Média das lesões	<sup>c</sup> Nota
	<sup>d</sup> ATCC 38933	<i>F. subglutinans</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	–	–
	<sup>d</sup> ATCC 201270	<i>F. subglutinans</i>	<i>Zea mays</i>	–	–
	<sup>d</sup> ATCC 201271	<i>F. subglutinans</i>	<i>Zea mays</i>	–	–
	<sup>e</sup> NRRL 25624	<i>F. guttiforme</i>	<i>A. comosus</i>	8,3	++++
2159	E477	<i>F. guttiforme</i>	<i>A. comosus</i>	17,7	++++
2160	E480	<i>F. guttiforme</i>	<i>A. comosus</i>	19,3	++++
901		<i>F. guttiforme</i>	<i>A. comosus</i>	18,7	++++
903		<i>F. guttiforme</i>	<i>A. comosus</i>	18,3	++++
905		<i>F. guttiforme</i>	<i>A. comosus</i>	20,3	++++
906		<i>F. guttiforme</i>	<i>A. comosus</i>	8,3	+++
910		<i>F. guttiforme</i>	<i>A. comosus</i>	9,7	++++
912		<i>F. guttiforme</i>	<i>A. comosus</i>	10,7	+++
914		<i>F. guttiforme</i>	<i>A. comosus</i>	27	++++
923		<i>F. guttiforme</i>	<i>A. comosus</i>	1,3	–
1034		<i>F. guttiforme</i>	<i>A. comosus</i>	5,7	+++
1035		<i>F. guttiforme</i>	<i>A. comosus</i>	1,3	+
1041		<i>F. guttiforme</i>	<i>A. comosus</i>	14,7	++++
1051		<i>F. guttiforme</i>	<i>A. comosus</i>	23,3	++++
2099		<i>F. guttiforme</i>	<i>A. comosus</i>	19,7	++++

<sup>a</sup>Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; E = Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural - Incaper, Vitória, Espírito Santo, Brasil; NRRL = *National Centre for Agricultural Utilization Research, Peoria, IL, USA*; ATCC = American Type-Culture Collection; <sup>b</sup>Valor médio do tamanho das lesões das três repetições em milímetros (mm); <sup>c</sup>Nota de severidade de acordo com Ventura, 1994; <sup>d</sup>Controle negativo sintomas não incitados por *F. guttiforme*; <sup>e</sup>Controle positivo dos sintomas incitados por *F. guttiforme* em abacaxizeiro

## 5 DISCUSSÃO

O principal objetivo deste estudo foi inferir as relações filogenéticas de isolados de *Fusarium* associados ao abacaxizeiro e espécies do complexo *G. fujikuroi* (GFC). Estudos anteriores, realizados com o patossistema *Fusarium guttiforme*-abacaxizeiro, utilizando marcadores morfológicos e filogenia, basearam-se em um número restrito de isolados adquiridos de frutos no Brasil, Havai, Inglaterra e África do Sul (O'DONNELL; CIGELNIK; NIRENBERG, 1998; JACOBS et al., 2010). Este é um dos primeiros estudos a abranger uma maior quantidade de isolados de *Fusarium* obtidos de plantas e frutos de abacaxi de regiões produtoras do Brasil.

Geralmente, espécies delimitadas pelo conceito morfológico de espécie, como *Fusarium*, são compostas por mais de uma espécie ou linhagem filogenética. A distinção morfológica e filogenética entre isolados de *Fusarium* do abacaxi não foi observada e, sendo assim, toda a população foi reconhecida como única espécie, *F. guttiforme* (O'DONNELL; CIGELNIK; NIRENBERG, 1998; JACOBS et al., 2010).

Em estudo relacionado foram observadas pelo menos nove espécies filogenéticas distintas associadas à malformação distribuídas pelo GFC. No clado Americano, estão presentes cinco dessas espécies (LIMA et al., 2009; COLINA et al., 2010), duas no clado Africano e duas no clado Asiático (COLINA et al., 2010).

Sendo assim, acredita-se que dentro da espécie *F. guttiforme* também existam diferentes espécies filogenéticas que possam ser identificadas utilizando ferramentas moleculares.

## 5.1 Morfologia

Pelo reconhecimento de espécies através da morfologia, os isolados avaliados neste estudo apresentam características típicas de espécies do GFC, tipo *F. guttiforme*.

Foi observada, no presente trabalho, variação na coloração das colônias, de branco a púrpura. A coloração dos isolados CML 2079 e CML 2099 diferenciou-se entre repetições e avaliações em diferentes tempos. Sendo assim, coloração não foi um marcador consistente para caracterização macromorfológica desses isolados.

As polifíalides da espécie *F. guttiforme* podem ser tanto eretas quanto prostradas (O'DONNELL; CIGELNIK; NIRENBERG, 1998). Essa característica foi observada nos isolados deste estudo e no isolado NRRL 25297, referência da espécie *F. guttiforme*. Entretanto, em trabalho relacionado, as características morfológicas da espécie de *F. guttiforme* foram reavaliadas e as polifíalides produzidas por esta espécie foram sempre prostradas. Os autores também descreveram a espécie de *F. ananatum* e relataram que as polifíalides eram apenas eretas (JACOBS et al., 2010). Sendo assim, a posição de polifíalide, de acordo com esses autores, não foi informativa para distinção dos isolados avaliados no presente estudo.

Na descrição da espécie *F. ananatum*, a produção de macroconídios a partir de esporodóquio nunca foi observada. Porém, uma característica típica de *F. guttiforme* é rara produção de esporodóquio. Sendo assim, pela avaliação deste marcador morfológico, não foi possível identificar *F. ananatum* dentre os isolados deste estudo.

Em espécies do gênero *Fusarium* não existem caracteres morfológicos suficientes para distinção da maioria das espécies. Neste estudo, os isolados de *Fusarium* associados ao abacaxizeiro foram identificados como *F. guttiforme*.

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

## 5.2 Filogenia

Como, neste estudo, a análise morfológica não deu indícios de diversidade entre os isolados analisados, foi realizada a análise filogenética utilizando as regiões gênicas *tub2* e *tef1*. Essas regiões foram selecionadas por apresentarem alta capacidade de distinção de espécies filogenéticas dentro do GFC. Ambos os genes são adequados para sistemática em nível de espécie dentro deste complexo (O'DONNELL et al., 2000a; O'DONNELL; CINGELINK, 1997).

Neste estudo, a análise do gene *tub2* dividiu o conjunto de dados em diferentes grupos filogenéticos, porém, o gene *tef1* não apresentou essa mesma capacidade distinção.

Dentre as sequências de referência de *tub2* disponíveis no GenBank, um total de três sequências de *F. ananatum* e três sequências de *F. guttiforme* não puderam ser utilizadas neste trabalho, devido a diferenças no comprimento da região amplificada pelos *primers* utilizados por Jacobs et al. (2010). No presente estudo, os *primers* amplificaram os exons do gene de 1 a 4 e geraram fragmentos em torno de 540 pb. Os *primers* utilizados Jacobs et al. (2010) abrangeram os exons de 1 a 5 e geraram fragmentos de, aproximadamente, 1.330 pb. As sequências dos isolados de *F. ananatum* e *F. guttiforme* foram reduzidas a 220 pb e 348 pb, respectivamente, correspondendo aos exons 4 e 5. Sendo assim, o

encurtamento dessas sequências impossibilitou seu alinhamento com sequências deste estudo. De um total de sete sequências de *F. ananatum* disponíveis, quatro foram utilizadas neste estudo.

### 5.2.1 Análise do gene *tub2*

A análise de MP do gene *tub2* dividiu parte do conjunto de dados em três clados. O clado A, com baixo valor de suporte de *bootstrap*, é composto por 21 isolados deste estudo (Figura 1). Como nenhuma sequência de referência agrupou-se ao conjunto de dados, a espécie que representa este agrupamento não foi definida. Sendo assim, o clado A, possivelmente, representa uma nova linhagem filogenética dentro do GFC. Porém, como os valores de suporte *bootstrap* não foram confiáveis, outras análises devem ser realizadas para testar essa hipótese.

Em estudo relacionado, Lima et al. (2009) relataram uma nova espécie filogenética, nomeada de *Fusarium* sp., associada à malformação da mangueira no Brasil, utilizando AFLP e sequências parciais dos genes *tef1* e *tub2*. *Fusarium* sp. formou um clado único em todas as análises realizadas por esses autores e na árvore combinada dos genes, e o clado *F. sterilihyphosum* formou uma espécie irmã a esta linhagem encontrada. Dessa forma, a técnica de AFLP e o sequenciamento de mais regiões gênicas poderiam ser realizados com os isolados clado A deste estudo, para averiguar a hipótese de nova espécie filogenética.

As sequências de referência de *F. ananatum* agruparam-se no clado B, formando duas linhagens irmãs. Uma linhagem é composta apenas pelo isolado NRRL 22945, antes classificado como *F. guttiforme* (NIRENBERG; O'DONNELL, 1998) e recentemente renomeado para *F. ananatum* (JACOBS et al., 2010). A outra linhagem foi composta por um grupo monofilético contendo

três sequências de referência de *F. ananatum* e 13 isolados para-ananatum, parafiléticos na base deste clado em uma politomia (Figura 1). Os isolados do clado *F. ananatum* compartilham caracteres apomórficos com seu respectivo ancestral, o que define a condição de monofilia. Este clado permanece ligado ao grupo para-ananatum por compartilhar caracteres plesiomórficos.

Cingelink e O'Donnell (1997) analisaram espécies do GFC, antiga secção *Liseola* (NELSON; TOUSSON; MARASAS, 1983), que excluem as espécies produtoras de clamidósporos. Algumas espécies, como *F. dlamini* Marasas, Nelson & Toussoun, *F. napiforme* Marasas, Nelson & Rabie e *F. nygamai* Burgess & Trimboli, apresentam características morfológicas típicas do GFC, porém, são produtoras de clamidósporos, sendo, portanto, chamadas “tipo-liseola”. Na análise filogenética de espécies do GFC utilizando os genes *tub2*, ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e menor subunidade mitocondrial, as espécies tipo-liseola formaram um grupo parafilético. Sendo assim, a produção de clamidósporos é um caráter plesiomórfico compartilhado pelo ancestral comum de espécies do GFC (Secção *Liseola*) e espécies tipo-liseola produtoras de clamidósporo.

### 5.2.2 Análise do gene *tef1*

Pela análise do gene *tef1*, evidenciou-se divisão de *F. guttiforme* e *F. ananatum* em dois cladogramas irmãos: o clado A, com isolados de referência de *F. guttiforme*, *F. begoniae* e 31 isolados deste estudo e o clado B, com 9 isolados de referência de *F. ananatum* (Figura 2). Resultados semelhantes foram observados por Jacobs, et al. (2010) que, a partir da análise filogenética de multilocus, utilizando os mesmos genes avaliados neste trabalho e sequências do gene histona H<sub>3</sub>, relataram essas espécies como grupos irmãos, um grupo contendo isolados de *F. ananatum* da África do Sul e outro grupo, isolados de *F.*

*guttiforme* do Brasil. Porém, a espécie de *F. begoniae* não se agrupou com nenhuma dessas espécies, como ocorreu no presente estudo.

Como a maioria dos isolados deste estudo formou uma politomia na árvore do gene *tef1*, as relações filogenéticas entre estes isolados permaneceram indefinidas.

### 5.2.3 Análise combinada dos genes *tub2* e *tef1*

Para aumentar a confiabilidade da análise filogenética foi construída a árvore combinada dos genes. O gene *tub2* teve mais influência sobre a topologia da árvore que o gene *tef1* (Figura 3 e 4).

Foi observada a formação de dois grupos irmãos com 99% de suporte de *bootstrap* pela análise de MP e por inferência bayesiana: o primeiro grupo, clado B, composto por cinco espécies do GFC e o segundo grupo, composto pelo clado A e politomias.

Na árvore gerada pelo método de MP (Figura 3), o clado com 61% *bootstrap* agrupou somente os isolados associados ao abacaxizeiro, enquanto na árvore construída por inferência bayesiana (Figura 4), no clado constituído pelos isolados do abacaxi, agrupou-se também um isolado de referência de *F. begoniae*.

Dentro do grupo de isolados do abacaxi, foi observada uma politomia na base do clado A (Grupo A, Figura 3 e 4). O clado A, juntamente com os isolados do grupo A, formou um clado maior, com alto suporte estatístico (99% *bootstrap* e 100% probabilidade posterior bayesiana), a partir do que foi observada outra politomia. Sendo assim, não houve resolução para inferir relações entre os isolados que permaneceram em politomia.

O clado A de *F. ananatum* e o grupo de isolados para-ananatum foram também observados na árvore individual de *tub2* (Clado B, Figura 1). A espécie

de *F. ananatum* formou um grupo monofilético e o grupo para-ananatum permanece ligado a este clado por compartilhar caracteres plesiomórficos com a espécie ancestral (Figura 3 e 4).

Como o clado *F. ananatum*, os isolados para-ananatum e um isolado de referência *F. guttiforme* (origem brasileira) surgiram a partir do mesmo nó ancestral. Provavelmente, a espécie ancestral ao clado A é de origem sul-americana. Essa hipótese é baseada no fato de que o centro de origem das plantas cultivadas é considerado o local de maior diversidade genética, tanto da cultura quanto dos patógenos associados. Dessa forma, o centro de diversidade é o local que apresenta maior risco de surgimento de novos patógenos (BANKE; PESCHON; MCDONALD, 2004).

Banke, Peschon e Mcdonald (2004) verificaram alta variabilidade genética *Mycosphaerella graminicola* no centro de origem do trigo. Foram analisadas seqüências de beta tubulina, actina, *sts2* e o padrão de RFLP de isolados de *M. graminicola* coletados no Oriente Médio e na Europa, considerados “mundo velho”, e América do Norte, América do Sul e Austrália, “mundo novo”. Os isolados coletados no mundo velho, centro de origem do trigo, apresentaram maior número de haplótipos que os isolados do mundo novo. Sendo assim, os autores comprovaram que o centro de origem do trigo é o local de maior diversidade genética de *M. graminicola*.

Possivelmente, países da América do Sul exportaram frutos de abacaxi infectados com variantes de *F. guttiforme* para a África do Sul. Devido ao isolamento geográfico, variantes de *F. guttiforme* podem sofrer alterações genéticas em resultado da pressão de seleção do agroecossistema ou aos próprios processos evolutivos das espécies que levaram à emergência de *F. ananatum*.

Segundo O’Donnell et al. (2000b), o trânsito global de material vegetal contribuiu para a distinção de linhagens filogenéticas dentro do clado *F. graminearum* por especiação alopátrica. Em monocultivos de cereais, o processo

de hibridização pode levar ao surgimento de novos genótipos e, com isso, à emergência de novos patógenos. Esses autores evidenciaram a ocorrência de sete linhagens bigeograficamente estruturadas dentro do clado *F. graminearum*, indicando um longo processo evolutivo de isolamento reprodutivo.

Todos os isolados para-ananatum analisados neste estudo foram obtidos a partir de coletas realizadas no Espírito Santo. Sendo assim, provavelmente, os isolados deste grupo estão presentes apenas neste estado ou a amostragem realizada não foi representativa, pois a maioria dos isolados deste estudo foram coletados no estado do Espírito Santo.

Os resultados deste estudo permitem inferir que, possivelmente, dentre o conjunto de dados avaliado, existam pelo menos três linhagens filogeneticamente distintas de *Fusarium* associadas à fusariose do abacaxizeiro no Brasil, porém, não houve resolução suficiente para suportar essa afirmação.

### **5.3 Patogenicidade**

Nos testes de patogenicidade, os isolados deste estudo induziram sintomas de necrose em mudas da cultivar Pérola, igualmente aos sintomas reproduzidos pelos isolados de referência (Tabela 3). Metade dos isolados avaliados apresentou severidade alta, incitando necrose de tamanho superior a 15 mm de comprimento em mudas, vinte dias após a inoculação.

Alta virulência de isolados de *F. guttiforme* inoculados em folhas destacadas da cultivar Pérola foi observada por Aquiji et al. (2010), ao avaliarem respostas de defesa da cultivar Vitória, resistente à fusariose. Foi observado, na cultivar Pérola, um denso crescimento micelial nos locais injuriados. Por meio de análises de microscopia eletrônica foi evidenciada a degradação do mesófilo e, conseqüentemente, necrose dos tecidos suscetíveis. Os mesmos resultados não foram relatados na cultivar Vitória, na qual as hifas fúngicas ficaram restritas ao

ferimento provocado para inoculação da suspensão de esporos e as células vegetais iniciaram o processo de cicatrização e regeneração. Portanto, os isolados de *F. guttiforme* são capazes de causar lesões necróticas na cultivar Pérola, suscetível, utilizada no teste de patogenicidade realizado neste estudo.

Na análise filogenética dos genes *tub2* e *tef1*, todos os isolados patogênicos ao abacaxi agruparam-se com isolados de referência de espécies patogênicas à cultura.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a investigação da hipótese de existência de pelo menos três linhagens filogenéticas distintas de *Fusarium* associadas ao abacaxizeiro no Brasil é necessária a avaliação de pelo menos mais duas regiões gênicas.

As regiões gênicas mais informativas para inferência das relações filogenéticas de espécies do GFC são beta tubulina, fator de alongação calmodulina e histona H<sub>3</sub> (JACOBS et al., 2010; STEENKAMP et al., 2000; O'DONNELL et al., 2000a). Como as duas primeiras já foram analisadas neste estudo, calmodulina e histona H<sub>3</sub> poderiam ser utilizadas para melhorar a resolução para a definição de grupos filogenéticos dentro dos isolados avaliados neste estudo.

## 7 CONCLUSÕES

Pela análise morfológica, os isolados deste estudo foram identificados como *F. guttiforme* e não foi possível distinguir variantes fenotípicos.

Todos os isolados identificados como *F. guttiforme* agruparam-se com isolados *Fusarium* do abacaxi obtidos do GenBank e foram patogênicos a abacaxizeiro.

O gene *tub2* teve maior capacidade de distinção de grupos filogenéticos que o gene *tef1*.

*F. guttiforme* é uma espécie filogenética distinta de *F. anatum*.

Foi observada variabilidade genética dentro da amostragem de isolados avaliada, porém, não houve resolução para inferir as relações filogenéticas entre esses isolados.

## REFERÊNCIAS

AQUIJE, G. M. F. et al. Cell wall alterations in the leaves of fusariosis-resistant and susceptible pineapple cultivars. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, n. 10, p. 1109-1117, Oct. 2010.

BANKE, S.; PESCHON, A.; MCDONALD, B. A. Phylogenetic analysis of globally distributed *Mycosphaerella graminicola* populations based on three DNA sequence loci. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, n. 2, p. 226–238, Feb. 2004.

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

CRESTANI, M. et al. Das Américas para o Mundo: origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 6, p. 1473-1483, jun. 2010.

COLINA, G. O. et al. Identification and characterization of a novel etiological agent of mango malformation disease in Mexico, *Fusarium mexicanum* sp. nov. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, n. 11, p. 1176-1184, Nov. 2010.

DESJARDINS, A. E. Gibberella from A(venaceae) to Z(eae). **Annual Review of phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 177-198, Mar. 2003.

GASCUEL, O.; STEEL, M. Neighbor-Joining Revealed. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 23, n. 11, p. 1997–2000, Nov. 2006.

GEISER, D. M. et al. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 5/6, p. 473-479, June 2004.

HALL, B. G. **Phylogenetic trees made easy**: a how-to manual. Sunderland, MA: Sinauer, 2007.

HEPPERLE, D. **SeqAssem©**: a sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Win32-Version. Klein Raden, 2004. Disponível em: <<http://www.sequentix.de>>. Acesso em: 10 out. 2010.

HUELSENBECK, J. P. et al. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Science**, Washington, v. 294, p. 5550, p. 2310–2314, Dec. 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Banco de dados agregados**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_201009.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201009.pdf)>. Acesso em: 22 fev. 2011.

JACOBS, A. et al. *Fusarium ananatum* sp. nov. in the *Gibberella fujikuroi* species complex from pineapples with fruit rot in South Africa. **Fungal Biology**, Oxford, v. 114, n. 7, p. 515-527, July 2010.

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

KOLACZKOWSKI, B.; THORNTON, J. W. Performance of maximum parsimony and likelihood phylogenetics when evolution is heterogeneous, **Nature**, London, v. 431, n. 7011, p. 980-984, Oct. 2004.

KVAS, M. et al. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 34, n. 1, p.1-21, Jan. 2009.

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

LESLIE, J. F. et al. Inter- and Intra-Specific variation in *Fusarium*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1/2, p. 25-32, Oct. 2007.

LIMA, C. S. et al. 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. 2009.

MAU, B.; NEWTON, M. A. Phylogenetic inference for binary data on dendrograms using Markov chain Monte Carlo. **Journal of Computational and Graphical Statistics**, Alexandria, v. 6, n. 1, p. 122–131, Mar. 1997.

NELSON, P. E., TOUSSON, T. A., MARASAS, W. F. O. **Fusarium species: an illustrated manual for identification**. University Park: Pennsylvania State University Press, 1983.

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

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* are Nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 7, n.1, p. 103-116, Feb. 1997.

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

O'DONNELL, K. et al. A Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**, Tokyo, v. 41, n. 1, p. 61-78, Feb. 2000a.

O'DONNELL, K. et al. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Allahabad, v. 97, n. 14, p. 7905-7910, July 2000b.

O'DONNELL, K. et al. Internet-Accessible DNA Sequence Database for Identifying Fusaria from Human and Animal Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 10, p. 3708-3718, Oct. 2010.

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

PIRES DE MATOS A. Pathological aspects of the pineapple crop with emphasis on the fusariosis. **Revista de la Facultad de Agronomía**, Maracaibo, v. 21, n. 3/4, p. 179-197, 1995.

PLOETZ, R. C. Significant diseases in the tropics that are caused by species of *Fusarium*. In: SUMMERELL, B. A. et al. (Ed.). **Fusarium**: Paul Nelson Memorial Symposium. Saint Paul: Amer Phytopathological Society, 2001. p. 295-309.

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

ROHRBACH, K. G. Fusariosis. In: PLOETZ, R. C. (Ed.). **Compendium of tropical diseases**. Saint Paul: Amer Phytopathological Society, 1994. p. 45-56.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1572–1574, Aug. 2003.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 406–25, July 1987.

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

STEENKAMP, E. et al. Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 1, n. 3, p. 187–193, May 2000.

SWOFFORD, D. L.; BERLOCHER, S. H. Inferring evolutionary trees from gene frequency data under the principle of maximum parsimony. **Systematic Biology**, Washington, v. 36, n. 3, p. 293-325, Sept. 1987.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the Neighbor-Joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 30, p.11030–11035, July 2004.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, May 2011.

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

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

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, 1994.

VENTURA, J. A. Vitoria: new pineapple cultivar resistant to fusariose. **Acta horticulturae**, The Hague, n. 882, p. 51-56, dec. 2009.

VENTURA, J. A.; ZAMBOLIM, L. Controle das doenças do abacaxizeiro. In: ZAMBOLIM, L. et al. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: fruteiras**. Viçosa, MG: UFV, 2002. v. 1. p. 445-510.

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

## APÊNDICE

## APÊNDICE Caracteres morfológicos e teste de patogenicidade

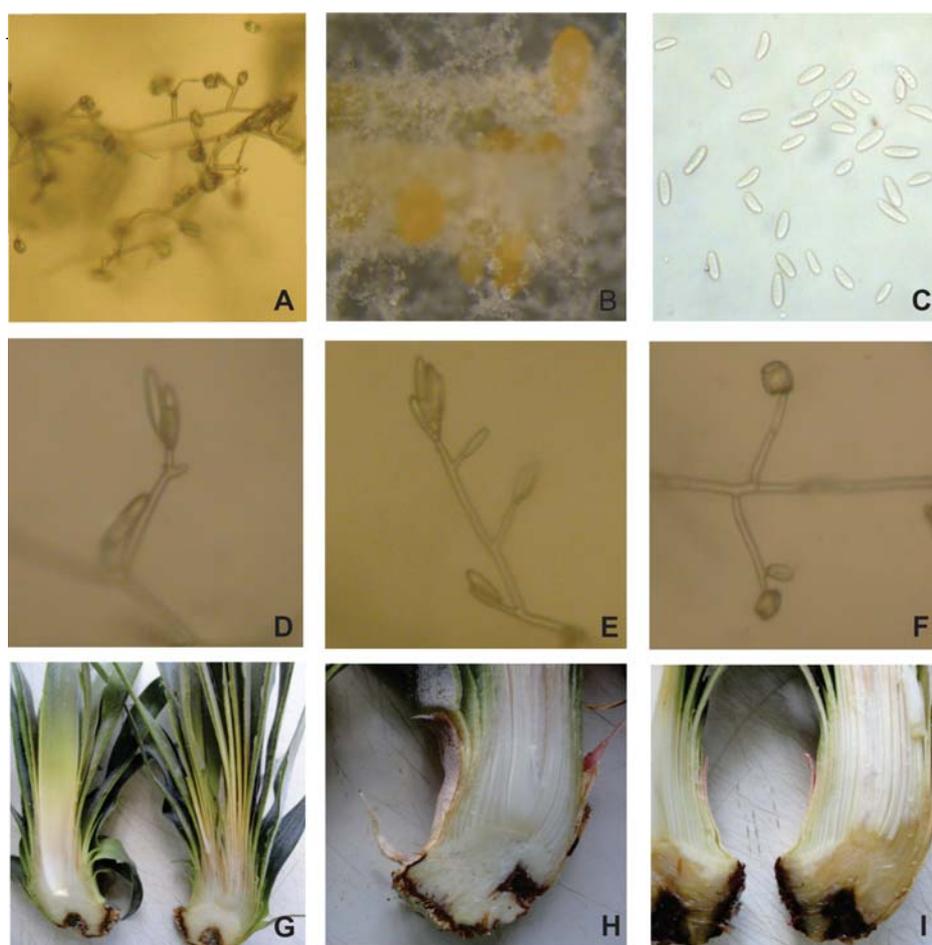


Figura 5 Caracteres morfológicos: (A) micélio aéreo em falsas cabeças; (B) esporodóquio laranja; (C) microconídios; (D) polifiálide ereta; (E) polifiálide prostrada; (F) mono e polifiálides prostradas; Teste de patogenicidade: (G) testemunha; (H) tratamento adicional, isolado ATCC 201271, lesão <2mm; (I) isolado CML2099, lesão >15mm