



**DETECÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS
DA MALFORMAÇÃO DA MANGUEIRA NO BRASIL
POR PCR**

SARAH DA SILVA COSTA

2008

SARAH DA SILVA COSTA

**DETECÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DA MALFORMAÇÃO DA
MANGUEIRA NO BRASIL POR PCR**

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

Orientador

Prof. PhD. Ludwig Heinrich Pfenning

Co-orientador

Dr. Cristiano Souza Lima.

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

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

Costa, Sarah da Silva.

Detecção dos agentes etiológicos da malformação da mangueira no Brasil por
PCR / Sarah da Silva Costa. -- Lavras : UFLA, 2008.

36 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning.

Co-orientador: Cristiano Souza Lima.

Bibliografia.

1. *Fusarium*. 2. Fitodoença. 3. *Primers*. 4. Diagnose. 5. *Gibberella fujikuroi*
species complex. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 582.230488

SARAH DA SILVA COSTA

**DETECÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DA MALFORMAÇÃO DA
MANGUEIRA NO BRASIL POR PCR**

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

APROVADA em 18 de fevereiro de 2008

Prof. Dr. Dauri José Tessmann UEM

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende UFLA

Profa. Dra. Edila Vilela Resende von Pinho UFLA

Prof. PhD. Ludwig Heinrich Pfenning
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos, Dieguinho e Helena,
que são a razão da minha vida, a minha luz e o meu
incentivo para que eu consiga cumprir mais esta etapa,

DEDICO

Ao Diego, aos meus pais e minhas irmãs,
pelo carinho e apoio

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

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

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

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

Ao Cristiano, pelos ensinamentos, incentivo, confiança, paciência e pelas valiosas sugestões na execução deste trabalho

À Camila Rodrigues de Carvalho, Natália Crespo e ao Edson Luis Rezende, que muito contribuíram para a realização deste estudo.

Aos professores PhD. Dauri José Tessmann, PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende e Profa. Dra. Edila Vilela Resende Von Pinho, pelas valiosas sugestões.

À Dra. Magnólia Araújo Campos-Pfenning, pelas sugestões para a execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Antônia Reis, pelo por me acolher em seu laboratório para realizar o trabalho e a Valquíria, pelo apoio e amizade.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia.

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

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.....	01
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	02
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	04
2.1 Importância da malformação da mangueira.....	04
2.2 Sintomatologia.....	06
2.3 Etiologia.....	06
2.4 Diagnose por PCR de doenças fúngicas.....	07
3 BIBLIOGRAFIA CITADA.....	10
CAPÍTULO 2 Detecção dos agentes etiológicos da malformação da mangueira no Brasil por PCR.....	14
RESUMO.....	16
INTRODUÇÃO.....	17
MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
Obtenção dos isolados.....	18
Extração de DNA.....	18
Desenho dos <i>primers</i> específicos e confirmação da homologia dos fragmentos amplificados com o gene <i>fator de alongação 1-α</i>	19
Teste de especificidade dos <i>primers</i>	19
Sensibilidade dos <i>primers</i> na PCR.....	20
Validação do protocolo de PCR utilizando amostras de tecido vegetal.....	20
RESULTADOS.....	21
Seleção, especificidade e sensibilidade dos <i>primers</i> na detecção por PCR....	21
Detecção de <i>Fusarium</i> sp. e <i>F. sterilihyphosum</i> em tecido vegetal.....	22
DISCUSSÃO.....	23
AGRADECIMENTOS.....	26
BIBLIOGRAFIA CITADA.....	26

RESUMO

COSTA, Sarah da Silva. **Deteccção dos agentes etiológicos da malformação da mangueira no Brasil por PCR**. 2008. 36 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

A malformação floral e vegetativa da mangueira é uma das doenças que mais prejudica a produção de frutos no Brasil e em outros países produtores. Essa doença é causada por espécies de *Fusarium*. A espécie *Fusarium mangiferae*, que apresenta distribuição mundial, ainda não foi observada em mangueiras no Brasil. Por outro lado, *Fusarium sterilihyphosum* e *Fusarium* sp. são os agentes etiológicos da malformação no Brasil. *Fusarium* sp. está distribuído em todas as áreas de produção de manga, enquanto que *F. sterilihyphosum* restringe-se, aparentemente, ao Sul de Minas e ao estado de São Paulo. *Fusarium* sp. corresponde a uma nova espécie do complexo *Gibberella fujikuroi*, baseada em caracterização morfológica, filogenia baseada nos genes *fator de alongação 1- α* e *β -tubulina*, compatibilidade sexual e vegetativa, patogenicidade e padrões de AFLP (*amplified fragment length polymorphism*). A diagnose convencional da doença pode demorar semanas e a diferenciação das espécies de *Fusarium* da mangueira, por caracteres morfológicos, é difícil de ser executada. Além disso, o patógeno apresenta período de incubação longo, de 6 a 12 meses, dificultando sua deteção. Nesse sentido, foram desenhados e avaliados dois pares de *primers* a partir de seqüências nucleotídicas do gene que codifica o fator de alongação 1- α . Os *primers* FbraF/FbraR amplificam um fragmento de 380 pb apenas de *F. sterilihyphosum* e para a nova população de *Fusarium*, enquanto que o par FmanF/FmanR amplifica um fragmento específico de 217 pb para *F. mangiferae*. A especificidade dos *primers* foi testada em espécies de fungos que colonizam inflorescências assintomáticas de mangueira, não havendo amplificação para nenhuma delas. A sensibilidade para os *primers* FbraF/FbraR foi de 1 fentograma e, para o FmanF/FmanR, foi de 100 picogramas. O par de *primers* FbraF/FbraR mostrou-se eficaz uma vez que, por meio dele, foi detectado o patógeno antes do aparecimento do sintoma, sendo eficientes na deteção dos agentes etiológicos da doença em tecidos de mangueira, com a confirmação dos resultados pelo isolamento do fungo.

Comitê Orientador: Ludwig H. Pfenning - UFLA (Orientador), Cristiano S. Lima – UFLA (Co-orientador)

ABSTRACT

COSTA, Sarah da Silva. **Detection of the Causal Agents of Mango Malformation in Brazil by PCR.** 2008. 36 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Mango malformation disease in Brazil is caused by *Fusarium* sp. (a new *Fusarium* lineage in the *Gibberella fujikuroi* complex) and *Fusarium sterilihyphosum*. The conventional diagnosis of this disease is difficult due to limitation in morphological markers to differentiate between these pathogens, which have a long incubation period. Polymerase chain reaction (PCR) primers were designed for the specific detection and identification of the causal agents of mango malformation disease in Brazil, and to identify *Fusarium mangiferae*. Two primer sets were selected after analysis of a multiple alignment with translation elongation factor 1- α gene sequences from the target species and species in the *G. fujikuroi* complex. FbraF/FbraR amplifies a specific fragment of 380 bp from the DNA of *F. sterilihyphosum* and *Fusarium* sp., while FmanF/FmanR amplifies a fragment of 217 bp from *F. mangiferae* DNA. Primer specificity was confirmed with fungal species which colonize asymptomatic mango inflorescences. The primers FbraF/FbraR produced a detectable band with 1 fg of target DNA, while FmanF/FmanR produced a detectable band with 100 pg of target DNA. In tests using infected mango tissue the primers FbraF/FbraR were efficient for the detection of the causal agents of mango malformation in Brazil, with the confirmation of the results through the isolation of the pathogens. These primers will greatly facilitate the detection and identification of the causal agents of mango malformation, even before symptom manifestation, avoiding the dissemination of the disease within the Brazilian states and from country to country.

Comitê Orientador: Ludwig H. Pfenning - UFLA (Orientador), Cristiano S. Lima – UFLA (Co-orientador)

CAPÍTULO 1

PERSPECTIVAS NA DIAGNOSE DA MALFORMAÇÃO DA MANGUEIRA

1 INTRODUÇÃO GERAL

A malformação floral e vegetativa da mangueira prejudica a produção de frutos e a formação de mudas em todas as regiões produtoras do Brasil e do mundo. A etiologia da doença está relacionada com três espécies de *Fusarium*: *Fusarium mangiferae*, que apresenta ampla distribuição nos países produtores como Índia e África do Sul, não tendo sido relatado no Brasil (Ploetz, 2001; Lima, 2006; Marasas et al., 2006); *Fusarium sterilihyphosum*, relatado pela primeira vez na África do Sul (Britz et al., 2002) e mais recentemente também no Brasil (Lima, 2006) e *Fusarium* sp. (teleomorfo *Gibberella* sp.), uma nova população do complexo *Gibberella fujikuroi*, que corresponde ao principal agente etiológico da doença no Brasil (Lima, 2006).

O diagnóstico rápido e preciso da malformação é imprescindível para a adoção de medidas de controle da doença antes que cause grandes perdas à produção de manga. Porém, o método convencional de isolamento e cultivo do fungo em meio de cultura e a identificação por meio de morfologia não satisfazem às condições necessárias para evitar a disseminação da doença por meio de material de propagação, por serem relativamente demorados. Além disso, as espécies que causam a malformação não podem ser identificadas de modo confiável por meio de marcadores morfológicos.

Por outro lado, a técnica de detecção de fitopatógenos por PCR (*polimerase chain reaction*) vem sendo utilizada em diagnoses precisas de doenças de plantas. No método, são utilizadas seqüências gênicas específicas e é altamente sensível e eficaz na detecção do patógeno antes do surgimento dos sintomas, com a vantagem de não necessitar do isolamento e do cultivo em meio de cultura. Além disso, contribui na adoção de medidas de controle da doença, na

rápida execução de procedimentos de erradicação e no monitoramento da distribuição do patógeno pela detecção deste no tecido das plantas.

O estabelecimento de pomares de mangueira é demorado pelo fato de esta ser uma espécie arbórea e perene. Portanto, é imprescindível o plantio de mudas certificadas para evitar um posterior comprometimento de árvores devido a doenças como a malformação. Dessa forma, objetivou-se, com este trabalho, desenvolver *primers* específicos para a detecção dos agentes etiológicos da malformação da mangueira no Brasil por PCR.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância da malformação da mangueira

No Brasil, as perspectivas de aumento na produção de manga (*Mangifera indica* L.) são evidenciadas pela ampliação da área cultivada e o aumento da produtividade, apresentando grande potencial de expansão dos mercados internos e externos, além de ser um dos poucos países do mundo a produzirem manga na entressafra mundial (Cunha et al., 2000; Terao et al., 2001). No ano de 2006, o Brasil destacou-se como o segundo maior exportador de manga do mundo, com 115.512 toneladas de frutos, atrás apenas do México (Agriannual, 2008).

Uma das doenças mais preocupantes da cultura da mangueira é a malformação floral e vegetativa. A doença foi relatada, pela primeira vez, no distrito de Bihar, Índia, em 1891 (Kumar et al., 1993). Posteriormente, foi relatada na maior parte dos países da África (África do Sul, Egito, Sudão, Suazilândia e Uganda), das Américas (Brasil, EUA e México) e da Ásia (Israel, Malásia e Paquistão), estando presente em praticamente todos os lugares onde a mangueira é cultivada (Kumar et al., 1993; Ploetz, 1994; Freeman et al., 1999; Noriega-Cantú et al., 1999; Steenkamp et al., 2000; Ploetz, 2001; Terao et al., 2001; Britz et al., 2002; Lima, 2006). No Brasil, foi relatada nos estados da Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro e São Paulo e também no Distrito Federal (Cunha et al., 2000; Lima, 2006).

A malformação tem sério impacto na propagação de árvores e na produção comercial de frutos, especialmente em regiões áridas do Brasil e de outros países (Tavares & Lima, 1997; Ploetz, 2001). Na região do submédio São Francisco, a principal região produtora para exportação no Brasil, no ano de

1996, esta doença foi constatada em, aproximadamente, 30% das áreas implantadas, com incidência de até 100% em determinados pomares (Tavares & Lima, 1997). Ela pode ser facilmente disseminada pela utilização de materiais de propagação vegetativa retirados de plantas infectadas, que nem sempre expressam sintoma devido ao longo período de incubação do agente etiológico, que pode ser de 6 a 12 meses. Portanto, mudas afetadas pela malformação não devem ser utilizadas como porta-enxerto, pois, perdas consideráveis são observadas em viveiros mal conduzidos (Ploetz, 2001).

No Egito, em 1998, nas regiões de El Giza, Ismailia e Sharkaia, a incidência de malformação em viveiros variou de 20% a 100 %. Este fato pode ser atribuído à localização dos viveiros situados próximos a locais onde há plantas com ramos e inflorescências malformadas secas, as quais liberam altos níveis de inóculo (Ploetz et al., 2002). Em pomares que possuem plantas com malformação, na casca dos frutos pode ser encontrado o patógeno, principalmente em frutos jovens com dois meses de idade. Isso ocorre pela alta densidade de inóculo em panículas infectadas (Youssef et al., 2007).

A colonização do tecido da planta pelo patógeno foi observada por meio da transformação de *F. mangiferae*, um dos agentes etiológicos da malformação, com GUS (β -glucuronidase). Após a inoculação do fungo, verificou-se que brotos e flores são sítios de infecção primários (Freeman et al., 1999). Além disso, sabe-se que, após afetar o meristema de plantas jovens, o fungo coloniza a planta de forma descendente, do topo à raiz, indicando que o agente etiológico da malformação não é um patógeno de solo e que ele não é translocado sistematicamente da raiz para o meristema.

No México, em estudos realizados em pomares de mangueira da região de Guerrero, constatou-se que o manejo integrado, com a remoção e queima de ramos apresentando malformação e aplicação de fungicidas protetores e acaricidas, foi o método mais eficiente para a redução do progresso da

malformação em um período de avaliação de dois anos, com aumento no rendimento por árvore (Noriega-Cantú et al., 1999). Além disso, acredita-se que a utilização de mudas certificadas e o plantio dessas mudas em áreas onde não haja plantas doentes sejam a melhor forma de estabelecimento de pomares de mangueira (Youssef et al., 2007).

2.2 Sintomatologia

A malformação causa deformações nos tecidos vegetativos e florais das mangueiras devido ao crescimento anormal de inflorescências e de ramos vegetativos. A mangueira produz flores andrógenas e hermafroditas em sua inflorescência. Quando afetadas pela malformação, ocorre aumento da proporção e do tamanho de flores andrógenas em detrimento das hermafroditas. A inflorescência é transformada numa massa compacta de flores estéreis com brácteas anormalmente grandes (malformação floral), além de apresentar eixos principais e secundários curtos, espessos e anormalmente ramificados nas panículas infectadas. No caso da malformação vegetativa, os sintomas caracterizam-se por apresentar ramos apicais e laterais produzindo brotos malformados com internódios curtos e folhas pequenas e recurvadas. Os sintomas de malformação vegetativa aparecem, principalmente, em plantas jovens, enquanto que, na malformação floral, eles são observados somente em plantas na fase de florescimento (Kumar et al., 1993; Ploetz, 2001).

2.3 Etiologia

Vários fatores foram considerados como causas da malformação, como vírus, ácaros, problemas nutricionais, distúrbios fisiológicos ou hormonais, fitoplasmas e fatores desconhecidos (Ploetz, 2001). No entanto, os postulados de Koch foram completados, pela primeira vez, para a malformação

da mangueira com *Fusarium moniliforme* Sheldon (Summanwar et al., 1966). Depois de oito anos, o sintoma de malformação floral foi reproduzido por meio da inoculação de *F. moniliforme* var. *subglutinans* Wollenweber & Reinking (Varma et al., 1974). Posteriormente, o agente etiológico da malformação foi identificado como *Fusarium subglutinans* (Wollenweber & Reinking) Nelson et al., (Ploetz, 2001; Terao et al., 2001).

Entretanto, dados de seqüenciamento do gene histona H3 revelaram a existência de dois grupos filogeneticamente distintos em isolados de *F. subglutinans* associados à malformação da mangueira (Steenkamp et al., 2000). Esses dois táxons foram descritos, por Britz et al. (2002), como novas espécies de *Fusarium* na seção *Liseola*, que são *Fusarium mangiferae* Britz et al., que está presente em vários países produtores, porém, ainda não foi relatado no Brasil e *Fusarium sterilihyphosum* Britz et al., que foi encontrado apenas na África do Sul e, mais recentemente, no Brasil, restringindo-se, aparentemente, à segunda maior região produtora de manga do Brasil: Sul de Minas Gerais e estado de São Paulo (Lima, 2006).

No Brasil, o principal agente etiológico da malformação corresponde a uma nova população do complexo *Gibberella fujikuroi*, que foi descoberta após estudo de uma coleção de mais de 100 isolados de diversas regiões produtoras do país, utilizando caracterização morfológica, filogenia baseada nos genes β -*tubulina* e *fator de alongação 1- α* , teste de compatibilidade sexual, teste de patogenicidade e análise de padrões de AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) (Lima, 2006).

2.4 Diagnose por PCR de doenças fúngicas

A diagnose convencional da malformação pode demorar semanas, além de ser difícil a diferenciação das espécies de *Fusarium* da mangueira com a utilização de caracteres morfológicos. Em contrapartida, nos serviços de

inspeção fitossanitária, é necessária a utilização de métodos de diagnose que sejam rápidos e precisos, para evitar a entrada de patógenos exóticos nas regiões produtoras. A técnica de detecção de fitopatógenos por PCR é uma ferramenta eficaz em casos nos quais a diagnose precisa ser realizada em curto prazo, quando há grande volume de material a ser investigado ou quando não há marcadores morfológicos disponíveis.

Vários *primers* específicos já foram publicados para diversos fungos, como, por exemplo: *Fusarium mangiferae* (Zheng & Ploetz, 2002), *Fusarium poae* (Parry & Nicholson, 1996), *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Filion et al., 2003), *Fusarium solani* f. sp. *glycines* (Li & Hartman, 2003), *Fusarium sporotrichioides* (Kulik et al., 2004), *Tilleta indica* (Smith et al., 1996), *Colletotrichum coccodes* (Cullen et al., 2002), *Phakopsora pachyrhizi* e *P. meibomiae* (Frederick et al., 2002), *Phytophthora ramorum* e *Phytophthora pseudosyringae* (Tooley et al., 2006).

Primers específicos para a detecção de *Fusarium mangiferae* foram desenvolvidos por Zheng & Ploetz (2002). Entretanto, como esta espécie parece não estar presente no Brasil, um kit diagnóstico, desenvolvido com base neste estudo, seria de utilidade apenas para uso em programas quarentenários. Portanto, torna-se necessário o desenho de *primers* específicos para a detecção dos agentes etiológicos da malformação da mangueira no Brasil.

A técnica de PCR é altamente sensível e eficaz na detecção do patógeno antes do surgimento dos sintomas, por utilizar seqüências gênicas específicas (*primers*). O fato de não necessitar do isolamento e de cultivo em meio de cultura é uma vantagem adicional da detecção por PCR, em comparação à diagnose convencional. Com isso, se tornam possíveis a adoção de medidas de controle da doença, a rápida execução de procedimentos de erradicação em áreas afetadas e o monitoramento da distribuição do patógeno pela detecção deste no tecido das plantas (Lee et al., 2001;). O resultado obtido com a técnica de PCR é

de fácil interpretação porque se baseia na presença ou na ausência de um fragmento de DNA (Smith et al., 1996).

No desenvolvimento de *primers* específicos, devem ser levados em consideração alguns critérios, como: a variabilidade genética da população da espécie em estudo, o número de nucleotídeos que compõe o *primer*, *primers* com mais de 24 nucleotídeos a especificidade é menor, temperatura de anelamento e porcentagem de CG guanina e citosina (Ma & Michailides, 2006).

A especificidade dos *primers* deve ser testada com isolados de espécies filogeneticamente próximas à espécie em estudo e demais fungos que colonizem o mesmo substrato. Adicionalmente, é realizada uma série de diluições do DNA alvo, para verificar a sensibilidade da reação utilizando os *primers* desenvolvidos e assim determinar a menor concentração de DNA que os *primers* são capazes de detectar (Lee et al., 2001; Frederick et al., 2002).

A detecção de fitopatógenos por PCR, muitas vezes, pode ser inibida por polissacarídeos e compostos fenólicos, presentes nos tecidos das plantas. Estes podem inibir a PCR por quelarem o Mg^{2+} , que é o co-fator da enzima *Taq* polimerase ou por se ligarem ao DNA alvo, interferindo na atividade da polimerase. Para atenuar os efeitos dos inibidores, diluições devem ser feitas no DNA extraído da planta (Ma & Michailides, 2006).

O uso de *primers* específicos para detecção e identificação rápida de fitopatógenos por PCR em viveiros, para a certificação de mudas e para a produção das mesmas por meio do controle de qualidade das plantas matrizes, contribui para evitar a disseminação de doenças por meio de material de propagação.

3 BIBLIOGRAFIA CITADA

AGRIANUAL. **Manga**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2008.

BRITZ, H.; STEENKAMP, E. T.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, M. J. Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation. **Mycologia**, New York, v. 94, p. 722-730, Apr. 2002.

CULLEN, D. W.; LEES, A. K.; TOTH, I. K.; DUNCAN, J. M. Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers by conventional and quantitative real-time PCR. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, p. 281-292, May/June 2002.

CUNHA, M. N.; SANTOS FILHO, H. P.; NASCIMENTO, A. S. **Manga**: fitossanidade. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2000. 104 p.

FILION, M.; St-ARNAUD, M.; JABAJI-HARE, H. S. Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli* in Mycorrhizal Bean plants and Surrounding Mycorrhizosphere soil using Real-Time Polymerase Chain Reaction and direct isolation on selective media. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 2, p. 229- 235, Feb. 2003.

FREDERICK, R. D.; SNYDER, C. L.; PETERSON, G. L.; BONDE, M. R. Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 2, p. 217-227, Feb. 2002.

FREEMAN, S.; MAIMON, M.; PINKAS, Y. Use of GUS transformants of *Fusarium subglutinans* for determining etiology of mango malformation disease. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, p. 456-461, June 1999.

KULIK, T.; FORDONSKI, G.; PSZEZÓLKOWSKA, A.; PŁODZEIEN, K.; MLAPINSKI, M. Development of PCR assay based on ITS2 rDNA polymorphism for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 239, n. 1, p. 181-186, 2004.

KUMAR, J.; SINGH, U. S.; BENIWAL, S.P.S. Mango malformation: one hundred years of research. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 217-232, 1993.

LEE, H.K.; TEWARI, J.P.; TURKINGTON, T.K. A PCR-based assay to detect *Rhynchosporium secalis* in barley seed. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, p. 220-225, Feb. 2001.

LI, S.; HARTMAN, G. L. Molecular detectin of *Fusarium* f. sp. *Glycines* in soybean roots and soil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, n. 1, p. 74-83, Jan./Feb. 2003.

LIMA, C. S. **Caracterização Biológica e molecular de espécies de *Fusarium* envolvidas na etiologia da malformação da mangueira**. 2006. 111 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MA, Z. H.; MICHAILIDES, T. J. Approaches for eliminating PCR inhibitors and desingning PCR primers for the detectin of phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 145-161, 2006.

NORIEGA-CANTÚ, D.H.; TÉLIZ, D.; MORA-AGUILERA, G.; RODRÍGUEZ-ALCAZAR, J.; ZAVALETA-MEJÍA, E.; OTERO-COLINAS, G.; LEE CAMPBELL, C. Epidemiology of mango malformation in Guerrero, Mexico with traditional and integrated management. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n. 3, p. 223-228, Mar. 1999.

PARRY, D. W.; NICHOLSON, P. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. **Plant Pathology**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 383-391, Mar./Apr. 1996.

PLOETZ, R. C.; Malformation: a unique and important disease of mango, *Mangifera indica* L. In: SUMMERELL, B. A.; LESLIE, J. F.; BACKHOUSE, D.; BRYDEN, W. L.; BURGESS, L. W. **Fusarium**: Paul E. Nelson Memorial Symposium. St. Paul: APS Press, 2001. p. 233-247.

PLOETZ, R. C.; ZHENG, Q. I.; VÁSQUEZ, Á.; ABDEL SATTAR, M. A. Current status and impact of mango malformation in Egypt. **International Journal of Pest Management**, London, v. 48, n. 4, p. 279-285, Oct./Dec. 2002.

SMITH, O. P.; PETERSON, G. L.; BECK, R. J.; SCHAAD, N. W.; BONDE, M. R. Development of a PCR-based method for identification of *Tilletia indica*, causal agent of Karnal bunt of wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, n. 1, p. 115-122, Jan. 1996.

STEENKAMP, E. T.; BRITZ, H.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, M. J. Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 1, n. 3, p. 187-193, May 2000.

SUMMANWAR, A. S.; RAYCHAUDHURI, S. P.; PHATAK, S. C. Association of the fungus *Fusarium moniliforme* Sheld. With the malformation in mango (*Mangifera indica* L.). **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 19, p. 227-228, 1966.

TAVARES, S. C. C. H.; LIMA, J. A. S. Isolamento do agente causal da malformação vegetativa em mangueira no Sub-médio São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, 1997. Suplemento.

TERAO, D.; OLIVEIRA, S. M. A.; TAVARES, S. C. C. H.; MENEZES, M. Identificação do agente causal da malformação floral e vegetativa da mangueira no Nordeste brasileiro. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 328-331, ju./set. 2001.

TOOLEY, P. W., MARTIN, F. N., CARRAS, M. M.; FREDERICK, R. D. Real-time fluorescent polymerase chain reaction detection of *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora pseudosyringae* using mitochondrial gene regions. **Phytopathology**, St. Paul, v. 96, n. 4, p. 336-345, Apr. 2006.

VARMA, A.; LELE, V. C., RAYCHAUDURI, S. P.; RAM, A.; SANG, A. Mango malformation: A fungal disease. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, n. 2, p. 254-257, Feb. 1974.

YOUSSEF, S.A; MAYMON,M; ZVEIBIL, A;KLEIN-GUETA, D; SZTEJNBERG, A; SHALABY, A. A; FREEMAN, S. Epidemiological aspects of mango malformation disease caused by *Fusarium mangiferae* and source of infection in seedlings cultivated in orchards in Egypt. **Plant Pathology**, Oxford, v. 56, n. 2, p. 257-263, Mar./Apr. 2007.

ZHENG, Q.; PLOETZ, R. Genetic diversity in the mango malformation pathogen and development of a PCR assay. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 208-216, Mar./Apr. 2002

CAPÍTULO 2

DETECTION OF THE CAUSAL AGENTS OF MANGO MALFORMATION IN BRAZIL BY PCR

(Preparado de acordo com as normas da revista “*Journal of Phytopathology*”)

Detection of the Causal Agents of Mango Malformation in Brazil by PCR

S. S. COSTA¹, C. S. LIMA¹, M.A. CAMPOS², C. R. CARVALHO³, AND L. H. PFENNING¹

Authors' address:¹Departamento de Fitopatologia; ²Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG; ³UNILAVRAS, Lavras, MG (Corresponding author: ludwig@ufla.br)

Key words: *Fusarium*, fitodoença, *primers*, diagnose, *Gibberella fujikuroi* *species complex*

Resumo

Foram desenvolvidos *primers* que permitem a detecção dos agentes etiológicos da malformação da mangueira no Brasil, *Fusarium sterilihyphosum* e para uma nova população filogeneticamente distinta de *Fusarium mangiferae* e *Fusarium sterilihyphosum*. A ocorrência da malformação da mangueira prejudica a propagação de árvores e a produção comercial de frutos. Devido à limitação no uso de caracteres morfológicos para a separação destas espécies e ao período de incubação prolongado, a diagnose convencional da doença torna-se difícil. *Primers* específicos foram desenvolvidos para a diagnose da malformação da mangueira e a detecção das três espécies que, comprovadamente, causam esta doença: *Fusarium mangiferae*, *Fusarium sterilihyphosum* e *Fusarium* sp., por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram desenhados e avaliados dois pares de *primers* a partir de seqüências nucleotídicas do gene que codifica o fator de alongação 1- α . Os *primers* FbraF/FbraR amplificam um fragmento de 380 pb apenas para *F. sterilihyphosum* e para *Fusarium* sp., enquanto que o par FmanF/FmanR amplifica um fragmento específico de 217 pb para *F. mangiferae*. A especificidade dos *primers* foi testada em espécies de fungos que colonizam inflorescências assintomáticas de mangueira, não havendo amplificação para nenhuma delas. A sensibilidade da reação de PCR para os *primers* FbraF/FbraR foi de 1 fg e para FmanF/FmanR foi de 100 pg. Os *primers* foram eficientes na detecção dos agentes etiológicos da doença em tecidos de mangueira, com a confirmação dos resultados pelo isolamento dos fungos. Estes *primers* são de grande utilidade na detecção do patógeno e diagnose da doença em plantas matrizes e mudas antes do surgimento dos sintomas, evitando-se o transporte de mudas infectadas para novas áreas.

Introdução

O Brasil destacou-se, no ano de 2006, como o segundo maior exportador de manga do mundo, com 115.512 toneladas de frutos (Agrianual, 2008). Porém, a malformação da mangueira tem causado sério impacto na propagação de árvores e na produção comercial de frutos, especialmente em regiões áridas do Brasil e de outros países (Tavares & Lima, 1997; Ploetz, 2001). Na região do submédio São Francisco, a principal região produtora para exportação no Brasil, no ano de 1996, esta doença foi constatada em, aproximadamente, 30% das áreas implantadas, com incidência de até 100% em determinados pomares (Tavares & Lima, 1997).

A malformação pode ser facilmente disseminada pela utilização de materiais de propagação vegetativa retirados de plantas infectadas que nem sempre expressam sintoma, devido ao longo período de incubação do agente etiológico, que pode ser de 6 a 12 meses. Portanto, faz-se necessário o controle de qualidade das plantas matrizes para a produção mudas e a certificação das mesmas para evitar a disseminação de doenças por meio de material de propagação. Além disso, não há um controle químico eficiente para se controlar a malformação.

Até o momento, duas espécies de *Fusarium* são conhecidas como agentes etiológicos da malformação da mangueira: *Fusarium mangiferae*, que apresenta ampla distribuição nos países produtores, como Índia e África do Sul, não tendo sido relatada no Brasil (Ploetz, 2001; Lima, 2006; Marasas et al., 2006) e *Fusarium sterilihyphosum*, a qual foi relatada, pela primeira vez, na África do Sul (Britz et al., 2002), mais recentemente também no Brasil (Lima, 2006). Lima (2006) também identificou uma nova população do complexo *Gibberella fujikuroi*, *Fusarium* sp. (teleomorfo *Gibberella* sp.), a qual é

filogeneticamente distinta de *F. mangiferae* e *F. sterilihyphosum* e corresponde ao principal agente etiológico da doença no Brasil.

Primers específicos para a detecção de *Fusarium mangiferae* foram desenvolvidos por Zheng & Ploetz (2002). Entretanto, como esta espécie parece não estar presente no Brasil, torna-se necessário desenvolver *primers* específicos para a detecção dos agentes etiológicos da malformação da mangueira no Brasil.

A diagnose convencional da doença pode demorar semanas, além da possibilidade de levar à identificação incorreta do agente etiológico, devido à ausência de caracteres morfológicos típicos para a separação das espécies. Além disso, há uma diversidade de fungos que pode ser encontrada em tecidos assintomáticos de mangueira, enquanto que *Fusarium* predomina em tecidos com malformação. O diagnóstico rápido e preciso do patógeno é imprescindível para a adoção de medidas de controle da doença, além da rápida execução de procedimentos de erradicação em áreas afetadas (Frederick et al., 2002; Ma & Michailides, 2006).

Desde que se disponha de *primers* específicos, a técnica de PCR permite o monitoramento da distribuição e a detecção do patógeno no tecido da planta hospedeira, sem a necessidade do isolamento e do cultivo em meio de cultura, antes do surgimento dos primeiros sintomas da doença (Lee et al., 2001; Ippolito et al., 2002; Ma et al., 2003).

Desse modo, objetivou-se, com este trabalho, desenvolver *primers* específicos para a detecção dos agentes etiológicos da malformação da mangueira no Brasil por PCR.

Materiais e Métodos

Obtenção dos isolados

Os isolados foram obtidos de tecidos de mangueira com e sem sintomas de malformação de diferentes regiões do Brasil e preservados em água destilada esterilizada e armazenados a 10°C, no escuro, na Coleção Micológica de Lavras (CML), Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), (KSU) *Kansas State University* (KSU), Manhattan, Kansas, EUA e *Medical Research Council* (MRC), Tygerberg, África do Sul (Tabela 1). Para a avaliação da especificidade dos *primers* desenvolvidos foram utilizadas espécies de fungos encontradas em tecidos da mangueira, como patógenos e endófitos (Tabela 2).

Extração de DNA

O DNA foi extraído dos tecidos de mangueira e dos fungos avaliados, utilizando-se protocolo baseado em CTAB (Murray & Thompson, 1980). Na extração de DNA dos isolados de fungos, o micélio foi cultivado em extrato de malte líquido (2%) em agitação (100 rpm), por 2 dias, na temperatura de 25°-28°C. Adicionalmente, foi coletado material vegetal, o qual foi lavado em água de torneira e detergente e imediatamente submetido à extração de DNA.

Cerca de 150 mg de micélio dos fungos e de material vegetal de mangueiras foram macerados com nitrogênio líquido e ressuspensos em tampão de extração CTAB (Tris-HCl [pH 8,0] 100 mM; NaCl 500 mM; EDTA [pH 8,0] 50 mM; CTAB 2%), sendo 1 µL de β-mercaptoetanol e 1% de polivinilpirrolidone (PVP), adicionado juntamente ao tampão de extração. O DNA extraído foi quantificado em gel e, posteriormente, diluído para 10 ng µL⁻¹.

Desenvolvimento de *primers* específicos e confirmação da homologia dos fragmentos amplificados com o gene *fator de elongação 1- α*

Foram gerados alinhamentos das seqüências parciais do gene fator de elongação *1- α* (*tef1*) de isolados das espécies de *Fusarium* previamente identificados como agentes etiológicos da malformação da mangueira (Lima, 2006) e outras espécies do complexo *Gibberella fujikuroi*. Regiões únicas das seqüências dos agentes etiológicos da malformação foram utilizadas no desenho de *primers* específicos (Tabela 3). O desenvolvimento dos *primers* foi realizado utilizando-se o software PRIMER 3 (Rozen & Skaletsky, 2000). As seqüências dos *primers* foram comparadas, por meio do programa BLAST, para verificar sua homologia com seqüências previamente depositadas no GenBank (NCBI). Os *primers* foram utilizados em uma reação de PCR com DNA de *Fusarium* da mangueira e, posteriormente, seqüenciados para confirmar sua homologia com o gene *tef1*.

Teste de especificidade dos *primers*

A especificidade dos *primers* foi testada pela amplificação do DNA genômico, extraído dos agentes etiológicos da malformação e de outras espécies de *Fusarium* relatadas em mangueiras (Tabela1). Foram também incluídos outros patógenos e fungos endófitos presentes em mangueiras (Tabela 2).

Os *primers* desenvolvidos foram testados inicialmente para os agentes etiológicos da malformação e, depois, com as demais espécies (Tabela 3). Diferentes temperaturas de anelamento foram utilizadas nos ensaio de PCR (60°, 65°, 68°, 70° e 72°C). A reação de PCR foi conduzida com 25 μ L: tampão 1x, 2 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP's, 0,25 μ M dos *primers* forward e reverse, 25 U em 25 μ L de Taq polimerase e 20 ng μ L⁻¹ de DNA. As condições de amplificação do DNA foram: 94°C por 1 minuto (desnaturação inicial), 94°C por 30 segundos (desnaturação), 60°, 65°, 68°, 70° e 72°C, por 45 segundos (anelamento), 72°C por 1 minuto (extensão), 34 ciclos e 72°C por 5 minutos

(extensão final). O produto da PCR foi separado em gel de agarose 1%. Antes de se utilizar os *primers* específicos, foi feita uma reação de PCR utilizando os *primers* universais EF1/EF2, com o DNA genômico de todas as espécies utilizadas neste trabalho, para verificar a qualidade do DNA para amplificação e, dessa forma, evitar falsos positivos ou negativos.

Sensibilidade da reação de PCR utilizando os *primers* desenvolvidos

A sensibilidade da reação de PCR utilizando os *primers* foi testada por meio de uma série de 9 diluições do DNA genômico, (20 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10fg, 1 fg) de *Fusarium* sp. agente etiológico da malformação da mangueira (CML 345) e *F. sterilihyphosum* (CML 283) para o par de *primers* FbraF/FbraR, e *F. mangiferae* (CML 413) para FmanF/FmanR. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 1%.

Validação do protocolo de PCR utilizando amostras de tecido vegetal

Um total de 110 mudas de mangueira foi utilizado em experimento de inoculação artificial, para serem testadas quanto à especificidade dos *primers* desenvolvidos neste estudo. Metade das mudas (55) foi inoculada pelo método de disco de ágar e a outra metade com o método de injeção (Freeman et al., 1999). Os isolados CML 263, 264, 345, 383, 387 e 389 de *Fusarium* sp. da malformação da mangueira e os isolados CML 280, 282, 283 e 401 de *F. sterilihyphosum* foram, inicialmente, cultivados em tubos de ensaio contendo meio completo e incubados, a 20°C, por 15 dias, com regime de luz de 12 horas. Após este período, foram inoculados em mudas de mangueira enxertadas com, aproximadamente, 1 m de altura, da variedade Tommy Atkins. A inoculação foi feita por injeção, utilizando-se uma suspensão de 1×10^6 de conídios nas gemas apicais das mudas e a testemunha foi inoculada com injeção de Tween 60, a 2,5%. No método de disco de ágar, um disco de micélio de aproximadamente 5

mm de diâmetro de cada isolado foi retirado da margem da colônia e transferido para um ferimento realizado pela remoção da epiderme próximo à gema apical da muda. Na testemunha, foi utilizado apenas um disco de ágar, num total de cinco mudas. Para cada método foram utilizadas cinco mudas por isolado. Em seguida, foi feita câmara úmida, por dois dias. As mudas foram mantidas em casa de vegetação, com temperatura de 25° a 30°C. As avaliações foram realizadas semanalmente, observando-se a incidência de malformação.

A validação dos *primers* para a detecção dos agentes etiológicos da malformação da mangueira foi conduzida extraindo-se DNA genômico de inflorescências sintomáticas naturalmente infectadas e inflorescências assintomáticas, pecíolo de folhas, pedúnculo e epiderme de frutos, e hastes das mudas de mangueira enxertadas da variedade Tommy Atkins, previamente inoculadas, apresentando sintomas e sem sintomas.

Resultados

Seleção, especificidade e sensibilidade dos *primers* na detecção por PCR

Com base nas diferenças encontradas nas seqüências do gene *fator de alongação 1- α* das três espécies de *Fusarium* que causam malformação, foram desenvolvidos cinco pares de *primers* que amplificam simultaneamente o DNA de *Fusarium* sp. agente etiológico da malformação da mangueira e *F. sterilihyphosum*. Foi também desenvolvido um par de *primers* específico para *F. mangiferae* (Tabela 3). Os *primers* foram testados quanto à sua especificidade na detecção destas espécies. Todos os *primers* produziram um fragmento específico quando foi utilizado o DNA dos agentes etiológicos da malformação da mangueira. Por outro lado, quando foi testado o DNA das outras espécies de fungos que ocorrem na mangueira, não houve amplificação. Foi selecionado o par de *primers* FbraF/FbraR (fragmento: 380 pb; Tm: 72°C) para a detecção de *Fusarium* sp. agente etiológico da malformação da mangueira e *F. sterilihyphosum*, o qual foi

mais sensível do que os outros, e FmanF/FmanR (fragmento: 217 pb; Tm: 68°C) para a detecção de *F. mangiferae*. Estes *primers* não amplificaram DNA de outras espécies de *Fusarium* já relatadas em mangueiras e de outras espécies de fungos endófitos da mangueira (Figura 2). O par de *primers* FbraF/FbraR amplificou até 10 fg de DNA de *F. sterilihyphosum* e até 1 fg de DNA de *Fusarium* sp., enquanto que FmanF/FmanR amplificou até 100 pg de DNA de *F. mangiferae* (Figura 3).

Foram obtidas seqüências de DNA a partir do produto de amplificação dos *primers* FbraF/FbraR e FmanF/FmanR de isolados dos três agentes etiológicos. As seqüências confirmaram a identificação dos isolados, mostrando que os *primers* foram realmente específicos.

Detecção de *Fusarium* sp. e *F. sterilihyphosum* em tecido vegetal

No experimento de inoculação por injeção, quatro mudas apresentaram o sintoma de malformação, começando quatro meses após da inoculação. No experimento de disco de agar, 11 mudas apresentaram o sintoma de malformação, começando um mês após a inoculação.

O par de *primers* FbraF/FbraR foi utilizado para a detecção de *Fusarium* sp. da malformação da mangueira e *F. sterilihyphosum*, em mudas inoculadas, material vegetal naturalmente infectado apresentando malformação, e em material assintomático. Não houve amplificação quando foi utilizado na reação o DNA total não diluído, porém, na diluição de 1:100, foi observada uma banda característica às bandas observadas na amplificação do DNA do patógeno. Os patógenos foram detectados em mudas inoculadas, nas inflorescências naturalmente infectadas e em tecido vegetal assintomático (Figura 4A). No mesmo material vegetal foram testados também os *primers* FmanF/FmanR, específicos para *F. mangiferae*, entretanto, não houve amplificação (Figura 4B). A confirmação dos resultados foi obtida pelo isolamento dos fungos.

Discussão

Neste trabalho, foram desenvolvidos *primers* capazes de detectar os agentes etiológicos da malformação em mangueiras no Brasil. Em alguns casos, a detecção ocorreu antes mesmo do aparecimento dos sintomas. A acurada e rápida diagnose de doenças de plantas é muito importante, pois ela contribui na adoção de medidas de controle da doença, no monitoramento da distribuição do patógeno pela detecção deste no tecido das plantas e na execução de procedimentos de erradicação, além de evitar o transporte de mudas infectadas de uma região para outra (Lee et al., 2001; Tooley et al., 2006).

Primers específicos vêm sendo desenvolvidos com base em genes conservados como o gene *fator de alongação 1-α*, que é um gene codificador de proteína composto de três exons e três íntrons. Neste gene, pode ocorrer uma pequena variação na seqüência de seus nucleotídeos, na terceira posição do códon ou na região do íntron com a taxa de substituição de nucleotídeos relativamente alta, porém, sem alterar o produto gênico (Ma & Michailides, 2006). Dessa forma, podem-se utilizar estas regiões onde ocorrem mutações específicas para a síntese de *primers* específicos para espécies de fungos. Nas comparações entre as seqüências de *Fusarium* sp., agente etiológico da malformação da mangueira e *F. sterilihyphosum*, observaram-se apenas três nucleotídios de diferença, os quais estavam distanciados entre si, o que não permitiu incluir estas regiões no mesmo *primer* (Figura 1). Desse modo, não foi possível desenhar *primers* específicos para separar estas duas espécies.

Em estudos com a malformação vegetativa, realizado por Youssef et al., (2007), foi observado que a infecção pelo patógeno é originária da panícula afetando o tecido meristemático com infecção descendente do caule até a raiz. Além disso, por meio dos *primers* desenvolvidos por Zheng & Ploetz (2002) em

reação de PCR, *F. mangiferae* foi detectado em 97% em meristema apical de plantas jovens, declinando gradualmente até 5% de colonização da raiz

Tomando como base o presente estudo e fazendo-se um paralelo com o trabalho de Youssef et al., (2007), os agentes etiológicos da malformação da mangueira no Brasil também foram detectados, com o uso dos *primers* específicos, em várias partes do tecido da planta, como inflorescência, meristema apical, pecíolo da folha, pedúnculo e epiderme de frutos de plantas doentes. O patógeno também foi detectado em hastes de mudas assintomáticas, mostrando que o patógeno está presente na planta em seu estado latente, que pode se estender por um longo período, até que ocorra condição ambiental e fisiológica da planta, propícia para a exteriorização dos sintomas da doença (Tavares & Lima, 1997; Noriega-Cantú et al., 1999; Ploetz, 2001).

A detecção do patógeno no pecíolo da folha e em pedúnculo e epiderme de frutos pode ser explicada pelo fato de as panículas com malformação ficarem retidas na planta, favorecendo o crescimento, a esporulação e a disseminação do fungo para outras partes da planta. Por outro lado, em pomares saudáveis, não foi detectado o patógeno no fruto (Youssef et al., 2007). Plantas testemunhas do experimento em casa de vegetação em que, por meio do *primer*, foi detectada a presença do patógeno, foram infectadas, possivelmente, por esporos do fungo de plantas doentes por meio da disseminação dos mesmos pelo sistema de ventilação local.

Os efeitos de inibidores da reação de PCR comumente encontrados em DNA extraído de plantas foram minimizados pela diluição de 1:100 com água ultrapura autoclavada. As bandas oriundas de produto de PCR com material vegetal apresentaram-se características às bandas observadas na amplificação do DNA do patógeno. Embora todos os *primers* tenham se mostrado específicos para *Fusarium* sp., da malformação da mangueira e *F. sterilihyphosum*, depois da otimização da reação de PCR, o *primer* FbraF/FbraR foi selecionado para

este estudo, devido à sua alta especificidade, sendo capaz de detectar uma quantidade de aproximadamente 1 fg de DNA

Os *primers* foram eficazes na detecção dos agentes etiológicos da doença em tecidos de mangueira, com a confirmação dos resultados pelo isolamento do fungo, indicando que não houve falso positivo por contaminação. Quanto às plantas assintomáticas, em que, por meio do *primer*, foi detectado o patógeno, não houve o reisolamento do mesmo. Isso se deve ao fato de, provavelmente, os outros fungos terem colonizado previamente o tecido da planta e se exteriorizado, primeiramente, em meio de cultura, impedindo que o patógeno fosse recuperado ou que a taxa de colonização do tecido por *Fusarium* foi tão baixa que não foi possível o seu isolamento por método convencional.

Por meio do dois *primers* FmanF/FmanR não foi detectada a presença de *F. mangiferae* em nenhum material vegetal, confirmando que este patógeno, também causador da malformação da mangueira, não está presente no Brasil. Estes *primers* permitiram a amplificação todas as amostras de DNAs genômicos de *F. mangiferae* testadas, sendo eficaz na detecção de até 100 pg do DNA alvo.

Diante dos resultados, os *primers* desenvolvidos no presente estudo (FbraF/FbraR) são eficazes na detecção dos agentes etiológicos da malformação floral e vegetativa da mangueira no Brasil. Estes *primers* serão de grande utilidade na detecção do patógeno e diagnose da doença em plantas matrizes e na certificação de muda, evitando-se o transporte de mudas infectadas de uma região para outra. O plantio de mudas certificadas é imprescindível para evitar um posterior comprometimento de árvores, devido a doenças como a malformação, uma vez que o estabelecimento de pomares de mangueira é demorado, por ela ser uma espécie arbórea. Além disso, os *primers* poderão ser utilizados na correta identificação do agente etiológico da malformação em plantas e os *primers* FmanF/FmanR poderão ser úteis em serviços de quarentena, pois *F. mangiferae* parece não estar presente no Brasil. A utilização

dos *primers* específicos facilitará o monitoramento dos agentes causais da malformação e o estudo epidemiológico da doença nas regiões produtoras de manga.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fapemig, pela bolsa e apoio ao projeto (CAG 1096-03).

Bibliografia Citada

AGRIANUAL. **Manga**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2008.

BRITZ, H.; STEENKAMP, E. T.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, M. J. (2002): Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 4, p. 722-730, Apr. 2002.

FREDERICK, R. D.; SNYDER, C. L.; PETERSON, G. L.; BONDE, M. R. Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 2, p. 217-227, Feb. 2002.

FREEMAN, S.; MAIMON, M.; PINKAS, Y. Use of GUS transformants of *Fusarium subglutinans* for determining etiology of mango malformation disease. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, n. 6, p. 456-461, June 1999.

IPPOLITO, A.; SCHENA, L.; NIGRO, F. Detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. citrophthora* in citrus roots and soils by nested PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 9, p. 855-868, 2002.

KUMAR, J.; SINGH, U. S.; BENIWAL, S. P. S. Mango malformation: one hundred years of research. **Annual Review of Phytopathology**, Palo alto, v. 31, p. 217-232, 1993.

LEE, H. K.; TEWARI, J. P.; TURKINGTON, T. K. A PCR-based assay to detect *Rhynchosporium secalis* in barley seed. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, n. 2, p. 220-225, Feb. 2001.

LIMA, C. S. **Caracterização Biológica e molecular de espécies de *Fusarium* envolvidas na etiologia da malformação da mangueira.** 2006. 111 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MA, Z. H.; LUO, Y.; MICHAILIDES, T. J. Nested PCR Assays for Detection of *Monilinia fructicola* in Stone Fruit Orchards and *Botryosphaeria dothidea* from Pistachios in California. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 151, n. 6, p. 312-322, 2003.

MA, Z. H.; MICHAILIDES, T. J. Approaches for eliminating PCR inhibitors and desingning PCR primers for the detectin of phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 145-161, 2006.

MARASAS, W. F. O.; PLOETZ, R. C.; WINGFIELD, M. J.; Wingfield, B. D.; Steenkamp, E. T. Mango Malformation Disease and Associated *Fusarium* Species. **Phytopathology**, St. Paul, v. 96, p. 667-672, June 2006.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA . **Nucleic Acids Reserch**, Oxford, v. 8, n. 19, p. 4321-4325, Oct. 1980.

NORIEGA-CANTÚ, D.H.; TÉLIZ, D.; MORA-AGUILERA, G.; RODRÍGUEZ-ALCAZAR, J.; ZA VALETA-MEJÍA, E.; OTERO-COLINAS, G.; LEE CAMPBELL, C. Epidemiology of mango malformation in Guerrero, Mexico with traditional and integrated management. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n. 3, p. 223-228, Mar. 1999.

PLOETZ, R.C. Malformation: a unique and important disease of mango, *Mangifera indica* L. In: SUMMERELL, B.A.; LESLIE, J.F.; BACKHOUSE, D.; BRYDEN, W. L.; BURGESS, L. W. **Fusarium**: Paul E. Nelson Memorial Symposium. St. Paul: APS Press, 2001. p. 233-247.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Eds.). **Bioinformatics Methods and Protocols**: methods in molecular biology humana. Totowa: Press, 2000.

TAVARES, S. C. C. H.; LIMA, J. A. S. Isolamento do agente causal da malformação vegetativa em mangueira no Sub-médio São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, ago. Suplemento.

TERAO, D.; OLIVEIRA, S. M. A.; TAVARES, S. C. C. H.; MENEZES, M. Identificação do agente causal da malformação floral e vegetativa da mangueira no Nordeste brasileiro. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 328-331, jul./set. 2001.

TOOLEY, P. W.; MARTIN, F. N.; CARRAS, M. M.; FREDERICK, R. D. Real-time fluorescent polymerase chain reaction detection of *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora pseudosyringae* using mitochondrial gene regions. **Phytopathology**, St. Paul, v. 96, n. 4, p. 336-345, Apr. 2006.

YOUSSEF, S. A.; MAYMON, M.; ZVEIBIL, A.; KLEIN-GUETA, D.; SZTEJNBERG, A.; SHALABY, A. A.; FREEMAN, S. Epidemiological aspects of mango malformation disease caused by *Fusarium mangiferae* and source of infection in seedlings cultivated in orchards in Egypt. **Plant Pathology**, Oxford, v. 56, n. 2, p. 257-263, Mar./Apr. 2007.

ZHENG, Q.; PLOETZ, R. Genetic diversity in the mango malformation pathogen and development of a PCR assay. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 208-216, Mar./Apr. 2002.

Tabela 1

Isolados de espécies fúngicas associadas à malformação da mangueira utilizadas neste estudo.

Espécie	Origem geográfica^a	Número de acesso^b	P1^c	P2^d
<i>F. mangiferae</i>	ISRAEL	KSU 11781= MRC 8432 ex-holótipo	-	+
<i>F. mangiferae</i>	EUA, Flórida	KSU 4079	-	+
<i>F. mangiferae</i>	EGITO	KSU 4700	-	+
<i>F. sterilihyphosum</i>	BRAZIL, MG, Ijaci	CML 280	+	-
<i>F. sterilihyphosum</i>	BRAZIL, MG, Itumirim	CML 282	+	-
<i>F. sterilihyphosum</i>	BRAZIL, SP, Piracicaba	CML 283	+	-
<i>F. sterilihyphosum</i>	BRAZIL, MG, Lavras	CML 401	+	-
<i>F. sterilihyphosum</i>	SOUTH AFRICA	MRC 2802 ex holotipo	+	-
<i>F. sterilihyphosum</i>	SOUTH AFRICA	KSU 11782= MRC 8101 ex paratipo	+	-
<i>F. sterilihyphosum</i>	SOUTH AFRICA	KSU 11783= MRC 8095 ex paratipo	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MG, Lavras	CML 258	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MG, Uberlândia	CML 259	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MG, Uberlândia	CML 260	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MG, Uberlândia	CML 261	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MG, Lavras	CML 262	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MG, Uberlândia	CML 263	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MG, Uberlândia	CML 264	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MG, Uberlândia	CML 265	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MG, Uberlândia	CML 266	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, SP, Jaguariúna	CML 267	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MG, Passos	CML 269	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MG, Janaúba	CML 273	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MG, Perdões	CML 274	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MG, Lavras	CML 275	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MG, Eloi Mendes	CML 278	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MG, São João Del Rei	CML 279	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MG, Caxambu	CML 281	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MT, Rondonópolis	CML 345	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, BA, Livramento	CML 346	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, BA, Livramento	CML 349	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MT, Várzea Grande	CML 350	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, CE, Cruz	CML 381	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MG, Nova Porteirinha	CML 382	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MG, Nova Porteirinha	CML 383	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MG, Nova Porteirinha	CML 384	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MG, Nova Porteirinha	CML 385	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, CE, Almofala	CML 386	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, PE, Petrolina	CML 387	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, BA, Juazeiro	CML 388	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, BA, Juazeiro	CML 389	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, PE, Petrolina	CML 390	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MG, Lavras	CML 397	+	-

<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, CE, Pentecoste	CML 271	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, CE, Tururu	CML 379	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, CE, Pentecoste	CML 380	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, CE, Cruz	CML 391	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MG, Nova Porteirinha	CML 396	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	BRAZIL, MG, Guidoal	CML 399	+	-

(+) Amplificação na PCR

(-) Não houve amplificação na PCR

a. BA = isolados do estado da Bahia, Brasil; CE = isolados do estado do Ceará, Brasil; MG = isolados do estado de Minas Gerais, Brasil; MT = isolados do estado de Mato Grosso, Brasil; PE = isolados do estado de Pernambuco, Brasil; SP = isolados do estado de São Paulo, Brasil.

b. Abreviações das coleções de culturas: CM L= Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; KSU = *Kansas State University*, Manhattan, Kansas, EUA; MRC = *Medical Research Council*, Tygerberg, África do Sul.

c. P1 *primer* FbraF/Fbrar

d. P2 *primer* FmanF/FmanR

Tabela 2

Espécies fúngicas associadas à mangueira utilizadas no teste de especificidade

Espécie	Origem geográfica ^a	Número de acesso ^b	P1 ^c	P2 ^d
<i>F. oxysporum</i>	MÉXICO	CML 541	-	-
<i>F. cf. pseudocircinatum</i>	BRAZIL, CE, Fortaleza	CML 270	-	-
<i>F. semitectum</i>	BRAZIL, MG, Araxá	CML 347	-	-
<i>F. proliferatum</i>	desconhecida	KSU4854	-	-
<i>F. sacchari</i>	desconhecida	KSU3852	-	-
<i>F. subgutinans</i>	desconhecida	CML990	-	-
<i>F. decemcellurare.</i>	desconhecida	CML38	-	-
<i>Neocosmospora</i>	desconhecida	CML197	-	-
<i>Phomopsis mangifera</i>	BRAZIL, MG, Lavras	CML1083	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	BRAZIL, MG, Lavras	CML1084	-	-
<i>Epiccocum purpurascens</i>	BRAZIL, MG, Lavras	CML1082	-	-
<i>Fusiccocum mangiferum</i>	BRAZIL, MG, Lavras	CML1088	-	-
<i>Alternaria alternata</i>	BRAZIL, MG, Lavras	CML1081	-	-
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	BRAZIL, MG, Lavras	CML1087	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	BRAZIL, MG, Lavras	CML1085	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	BRAZIL, MG, Lavras	CML1179	-	-
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	BRAZIL, MG, Lavras	CML1086	-	-
<i>Chalara fimbriata</i>	desconhecida	CML153	-	-
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	desconhecida	CML805	-	-
<i>Phoma</i> sp.	desconhecida	CML 805	-	-

(+) Amplificação na PCR

(-) Não houve amplificação na PCR

a. CE = isolados do estado do Ceará, Brasil; MG = isolados do estado de Minas Gerais, Brasil;

b. Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; KSU = *Kansas State University*, Manhattan, Kansas, EUA

c. P1 primer FbraF/Fbrar

d. P2 primer FmanF/FmanR

1-90 pb

Fmangi TCGTCGTCATCGGCCACGTGACTCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACTACCCCTTGATGATGAGCTTATCTGCCATCGT-AATCCTGAC
Fster TCGTCGTCATCGGCCACGTGACTCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACTACCCCTTGATGATGAGCTTATCTGCCATCGT-ATCCCGAC
F sp TCGTCGTCATCGGCCACGTGACTCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACTACCCCTTGATGATGAGCTTATCTGCCATCGT-ATCCCGAC

Fbra F

91 – 180pb

Fmangi CCAA-GATCCGGCGGGGTATATCTC-AAAAGACAATATGCTGACATAGCTTACAGACCCGGTCACTTGATCTACCAAGTGGCGTGGTATCG
Fster CCAA-GATCTGGCGGGGTAT--CACC--AAGATAACATGCTGACATCGCTCCACAGACCCGGTCACTTGATCTACCAAGTGGCGTGGTATCG
F sp CACA-GATCTGGCGGGGTAT--CACC--AAGATAACATGCTGACATCGCTCCACAGACCCGGTCACTTGATCTACCAAGTGGCGTGGTATCG

181-270pb

FmanF

Fmangi ACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTAGTC----TCCCTTCGATCGCGTGTCCCTTT-GCCCGTCG-ATTTTCC-----
Fster ACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTAGTACTTTCCCTTCAATCGCGCGTCCCTTT-GCCCATCG-ATT-CTCC-----
F sp ACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTAGTACTTTCCCTTCAATCGCGCGTCCCTTT-GCCCATCG-ATT-CTCC-----

271- 360pb

Fmangi -----TACGATTGAAACGTGCCCGTACCCC--GCTCGAGACCAAAAATTTT-GCGATA-TGACCGTAATTTTTTTTGGTGGGGCA
Fster -----ATACGACTCGAAACGTGCCCGTACCCC--GCTCGAGACCAAAAATTTT-GCGATA-TGACCGTAATTTTTTTT--GGTGGGGCA
F sp -----ATACGACTCGAAACGTGCCCGTACCCC--GCTCGAGACCAAAAATTTT-GCGATA-TGACCGTAATTTTTTTT--GGTGGGGCA

361-450pb

Fmam R

Fmangi TTTACCCCGCCACTCGAGCGATGG-GCGCG--TT-TGCCCTCT-----CCACAACCTC-AAT-----GAGCGCATCGTCAC
Fster TTTACCCCGCCACTCGAGCGAT---GCGCG-TTTCTGCCCTC-----CATTTTCACAACCTT--CT-----GAGCGCATCGTCAC
F sp TTTACCCCGCCACTCGAGCGAT---GCGCG-TTTCTGCCCTC-----CATTTTCACAACCTG--CT-----GAGCGCA**CCGTCA**C

Fbra R

451-540pb

Fmangi GTGTCAAGCAGTCACTAACCATCCGACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTCTTGACAAGCTCA
Fster GTGTCAAGCAGTCACTAACCATCCGACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTCTTGACAAGCTCA
F sp **GTGTCAAGCAGTCACTAACCATCCGACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTCTTGACAAGCTCA**

541-630pb

Fmangi AGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCCGTCATTGGTATGTT-G
Fster AGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCCGTCATTGGTATGTT-G
F sp AGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCCGTCATTGGTATGTT-G

531-640pb

Fmangi TCGTCAATGC
Fster TCGTCAATGC
F sp TCGTCAATGC

Fig.1 Comparação de seqüências parciais do gene *fator de alongação 1-a* (*tefl*) de isolados das espécies de *Fusarium* previamente identificados como agentes etiológicos da malformação da mangueira. As seqüências escuras correspondem aos *primers*

Tabela 3
Seqüências de *primers* derivadas do gene *fator de alongação 1-a*

Primer	Seqüência do <i>Primer</i> 5'-3'	pb ^a	%CG ^b	Tm (°C) ^c	Tm (°C) Reação ^d	Fa ^e
FsteF	CTACCCTCTACGATGAGC	18	55	60		
Fsp2R	CGCTCAGCAGGTTGTGAA	18	55	69	62	387
FsptF	CGGGGTATACCAAGATAAC	20	50	67		
FstR	ACGATGCGCTCAGAAGGT	18	55	69	68	340
FbraF	CGACCACTGTGAGATCTACCCTTT	24	50	72		
FbraR	GACTGCTTGACACGTGACGC	20	60	72	72	380
FsteF	CGACCACTGTGAGTACTACCCTCT	24	54	72		
FsteR	GACTGCTTGACACGTGACGA	20	60	72	72	390
FspF	TTCACAACCTGCTGAGCG	18	55	69		
FspR	CGCTCAGCAGGTTGTGAA	18	55	69	68	387
FmanF	TGTCCTTTGCCCGTCGATTTTC	22	52	77		
FmanR	CGCTCATTGAGGTTGTGG	18	55	68	68	217

- Pares de base
- Porcentagem de guanina e citosina
- Temperatura de anelamento de cada *primer*
- Temperatura ótima de anelamento para a reação de PCR
- Tamanho do fragmento amplificado

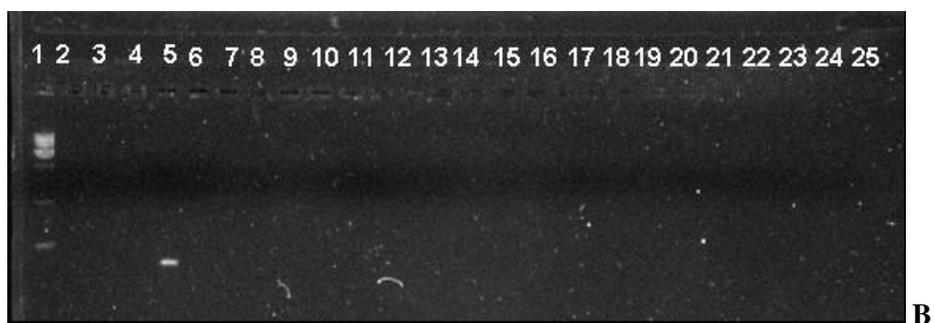
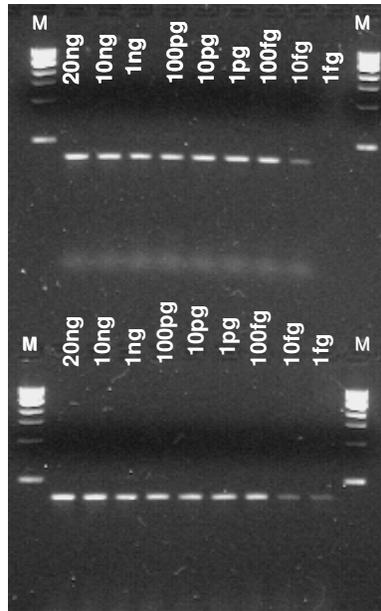
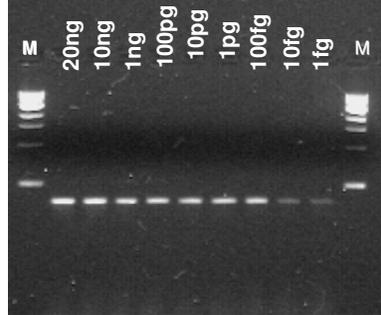


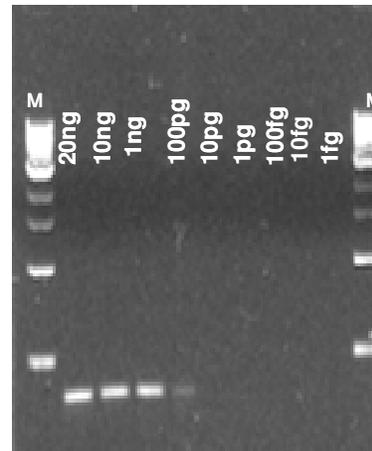
Fig.2 Teste de especificidade: (A) FbraF/FbraR; (B) FmanF/FmanR: . 1. Marcador 2. água; 3. *Fusarium* sp.; 4. *F. sterilihyphosum*; 5. *F. mangiferae*; 6. *F. proliferatum*; 7. *F. sacchari*; 8. *F. subglutinans*; 9. *F. pseudocircinatum*; 10. *F. oxysporum*; 11. *F. semitectum*; 12. *F. decemcellulare*; 13. *Neocosmospora* sp.; 14. *Phomopsis mangifera*; 15. *Cladosporium cladosporioides*; 16. *Epicoccum purpurascens*; 17. *Fusicocum mangiferum*; 18. *Alternaria alternata*; 19. *Colletotrichum gloeosporioides*; 20. *Aspergillus niger*; 21. *Penicillium* sp.; 22. *Pestalotiopsis* sp.; 23. *Chalara fimbriata*; 24. *Lasiodiplodia theobromae*; 25. *Phoma* sp.



A



B



C

Fig.3 Teste de sensibilidade. (A) FbraF/FbraR - *Fusarium sterilihyphosum* (B) FbraF/FbraR – *Fusarium* sp; (C) FmanF/FmanR- *Fusarium mangifera*

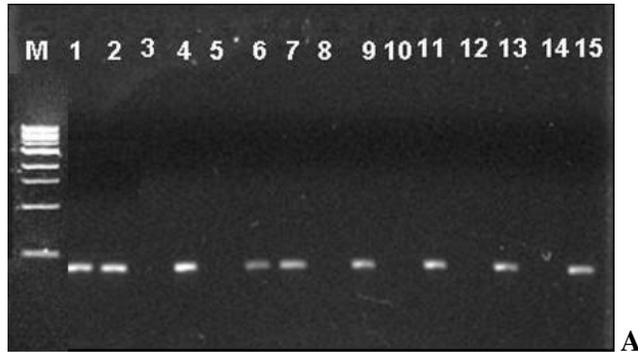


Fig.4 Detecção dos agentes etiológicos em tecidos de mangaueira. **A.** (FbraF/FbraR) 1. *Fusarium* sp.; 2. *Fusarium sterilihyphosum*; 3. *Fusarium mangiferae*; 4. inflorescência com malformação naturalmente infectada; 5. inflorescência assintomática não inoculada; 6. muda com malformação após inoculação com *Fusarium* sp.; 7. muda com malformação após inoculação com *F.sterilihyphosum*; 8. muda assintomática não inoculada; 9. muda assintomática não inoculada; 10. epiderme do fruto (planta sem sintoma); 11. epiderme do fruto (planta com sintoma); 12. pedúnculo do fruto (planta sem sintoma); 13.pedúnculo do fruto (planta com sintoma); 14. folha de mangaueira (planta sem sintoma) e 15. folha de mangaueira (planta com sintoma)

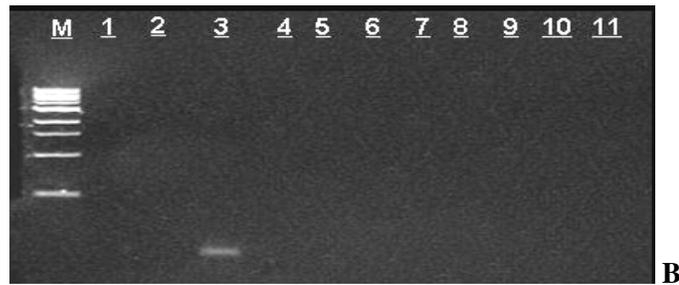


Fig.4 Detecção dos agentes etiológicos em tecidos de mangaueira **B.** (FmanF/FmanR): 1. *Fusarium* sp.; 2. *Fusarium sterilihyphosum*; 3. *Fusarium mangiferae*; 4. inflorescência com malformação naturalmente infectada; 5. inflorescência assintomática não inoculada; 6. muda com malformação após inoculação com *Fusarium* sp.; 7. muda com malformação após inoculação com *F. sterilihyphosum*; 8. muda assintomática não inoculada; 9. epiderme do fruto; 10. pedúnculo do fruto; 11. folha de mangaueira.