



ACLEIDE MARIA SANTOS CARDOSO

**CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA,
BIOLÓGICA E PATOGÊNICA DE ESPÉCIES
DO COMPLEXO *Fusarium solani* ASSOCIADAS
À PODRIDÃO DO COLO DO
MARACUJAZEIRO**

**LAVRAS - MG
2015**

ACLEIDE MARIA SANTOS CARDOSO

**CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA, BIOLÓGICA E PATOGÊNICA
DE ESPÉCIES DO COMPLEXO *Fusarium solani* ASSOCIADAS À
PODRIDÃO DO COLO DO MARACUJEIRO**

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

Dr. Ludwig H. Pfenning

Departamento de Fitopatologia - UFLA

(Orientador)

Dra Sarah da Silva Costa Guimarães

Departamento de Fitopatologia - UFLA

(Coorientadora)

LAVRAS - MG

2015

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e Serviços
da Biblioteca Universitária da UFLA**

Cardoso, Acleide Maria Santos.

Caracterização filogenética, biológica e patogênica de espécies do complexo *Fusarium solani*-FSSC associadas à podridão do colo do maracujazeiro / Acleide Maria Santos Cardoso. – Lavras: UFLA, 2015.

72 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning.

Bibliografia.

1. *Fusarium solani* species complex. 2. *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. 3. Filogenia molecular. 4. Mating population. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD –

ACLEIDE MARIA SANTOS CARDOSO

**CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA, BIOLÓGICA E PATOGÊNICA
DE ESPÉCIES DO COMPLEXO *Fusarium solani* ASSOCIADAS À
PODRIDÃO DO COLO DO MARACUJEIRO**

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

APROVADA em 26 de fevereiro de 2015.

Dra. Adelica Aparecida Xavier

UNIMONTES

Dr. César Júnior Bueno

APTA/IB-CEIB

Dr. Jorge Teodoro de Souza

UFLA



Dr. Ludwig H. Pfenning
(Orientador)

Dr Sarah da Silva Costa Guimarães
(Coorientadora)

LAVRAS – MG
2015

Aos meus pais, Levi e Cleusa; as minhas irmãs, Erica, Eva e
Bruna e aos meus sobrinhos,
DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, saúde e paz em todos os momentos.

À Universidade Federal de Lavras, em especial aos funcionários, professores e estudantes.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

Ao meu orientador, professor Dr. Ludwig H. Pfenning, pelos ensinamentos passados e por todo apoio.

À minha coorientadora, Sarah da Silva Costa Guimarães, pela amizade, confiança e ensinamentos.

Aos amigos do mestrado e do doutorado em fitopatologia, em especial a Gizeli, Lívia, Poliana e Cristian, pelos momentos de estudos e descontração.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Sistemática e Ecologia de fungos, em especial a Elismara e Edson Luís Rezende, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Levi e Cleusa e ao meu padrasto Antunes; as minhas irmãs, Erica, Eva e Bruna; aos meus sobrinhos João Vitor, Rafaela e Giovanna e aos demais familiares, pela confiança e por não medirem esforços para que este trabalho se realizasse.

Ao meu namorado Manoel, por todo amor, carinho e confiança.

A todos que, de certa forma, contribuíram para que mais esta etapa da minha vida fosse cumprida.

Obrigada!

RESUMO

O Brasil destaca-se como o maior produtor mundial de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). Entretanto, doenças como a podridão do colo, provocam redução significativa à produtividade e constante migração da cultura para regiões supostamente livres do patógeno. Neste trabalho foi investigado se o agente causal da podridão do colo pertence a uma espécie biológica e filogenética distinta dentro do complexo de espécies *Fusarium solani* – FSSC. Foi obtida uma coleção de 98 isolados de nove diferentes estados (BA, CE, MG, SP, RJ, GO, PA, MA e PI). Isolados monospóricos foram submetidos a análises de filogenia molecular de duas regiões gênicas *TEF- 1α* e *RPB2*, teste de patogenicidade, teste de compatibilidade sexual e avaliação dos marcadores morfológicos. Para verificar a existência de barreira reprodutiva entre isolados, isolados de *mating types* opostos foram cruzados para indução da fase sexuada. A análise filogenética de Máxima Parcimônia de sequências combinadas das regiões *TEF- 1α* e *RBP2*, os isolados avaliados agruparam em nove linhagens distintas dentro do clado 3 do do FSSC. O teste de patogenicidade revelou que os isolados de sete dessas linhagens causam doença em maracujazeiro. Duas destas linhagens são formadas por isolados auto-férteis (homotáticos), FSSC 21, conhecida como *F. striatum*, e uma nova linhagem, ainda não descrita na literatura, preliminarmente denominada de FSSC 40. As outras cinco linhagens que causaram sintomas da podridão do colo em *Passiflora* foram FSSC 3 + 4 ("*F. falciforme*"), FSSC 5, FSSC 20, FSSC25 e FSSC 41, outra nova linhagem ainda não relatada na literatura. Isolados de *mating types* opostos de cinco linhagens heterotáticas foram cruzados com os isolados da mesma linhagem, isolados de outras linhagens, e representantes das *mating populations* conhecidos dentro do FSSC. Isolados das linhagens FSSC 3 + 4, FSSC 34 e da nova linhagem heterotático FSSC 41 formaram peritécios férteis quando cruzados entre si, mas não com isolados de outras linhagens e representantes de outras *mating populations*, apoiando o seu reconhecimento como três espécies biológicas distintas. Caracteres morfológicos específicos não foram identificados para diferenciar as linhagens associadas ao maracujazeiro. Em conclusão, sete linhagens distintas dentro Clade 3 do FSSC pode causar podridão do colo do maracujazeiro, incluído duas novas linhagens, FSSC 40 e FSSC 41. Duas outras linhagens, ocorrem em associação ao maracujazeiro, mas sua patogenicidade não foi estudada. Estes resultados contribuirão para um diagnóstico mais confiável do agente etiológico da podridão do colo. E os programas de melhoramento que visam resistência genética também poderão se beneficiar desse conhecimento sobre a verdadeira diversidade do patógeno.

Palavras-chave: *Fusarium solani* species complex. *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Filogenia molecular. *Mating population*.

ABSTRACT

Brazil is one of the most important producers of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). However, diseases such as collar rot cause significant reduction in productivity, and result in constant migration of the crop to regions supposedly free of the pathogen. We investigated whether the causal agent of collar rot belongs to a distinct phylogenetic and biological species within the *Fusarium solani* species complex - FSSC. Ninety eight isolates with morphological characteristics of *F. solani* were obtained from diseased plants with symptoms of collar rot collected in the nine different states (BA, CE, MG, SP, RJ, GO, PA, MA, and PI). Monospore isolates were subjected to phylogenetic analyses of partial *TEF-1 α* and *RPB2* sequences, crossing experiments, pathogenicity tests, and evaluation of morphological markers. Maximum Parsimony analysis of combined *TEF-1 α* and *RPB2* sequences grouped the isolates into nine distinct lineages within Clade 3 of the FSSC. Pathogenicity tests revealed that isolates from seven of these lineages caused disease. Two of these lineages are formed by self-fertile (homothallic) isolates, FSSC 21, known as *F. striatum*, and a new lineage, not yet reported in the literature, preliminarily numbered FSSC 40. The other five lineages with isolates that caused collar rot on *Passiflora* are FSSC 3+4 ("*F. falciforme*"), FSSC 20, and FSSC 41, another new lineage not yet reported in the literature. Isolates of opposite mating types from five heterothallic lineages were crossed with isolates of the same lineage, isolates of other lineages, and representatives of known mating populations within the FSSC. Strains of FSSC 3 + 4, FSSC 34 and the new heterothallic lineage FSSC 41 formed fertile perithecia only when crossed with members of the same lineage, supporting their recognition as three distinct biological species. Specific morphological characters could not be assigned to the different phylogenetic lineages identified in association with passion fruit. In conclusion, seven distinct lineages within Clade 3 of the FSSC can cause collar rot of passion fruit, including two new lineages, FSSC 40 and FSSC 41. Other two lineages occur in association with *Passiflora*, but did not pathogenicity have been studied. These findings will contribute to a more reliable diagnosis of the etiological agent of collar rot. Breeding programs looking for genetic resistance will also benefit from this knowledge about the true diversity of the pathogen.

Key words: *Fusarium solani* species complex. *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Molecular phylogeny. Mating population.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	ESTADO DA ARTE	12
3	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1	Obtenção dos isolados	16
3.2	Extração de DNA	16
3.3	Análise filogenética	17
3.3.1	Amplificação por PCR	17
3.3.2	Análise de sequências de nucleotídeos	18
3.4	Teste de homotalismo	19
3.5	Determinação de <i>mating type</i> por PCR e indução da fase sexuada	20
3.6	Teste de patogenicidade	21
3.7	Avaliação de marcadores da fase assexuada e sexuada	23
4	RESULTADOS	25
4.1	Obtenção de isolados	25
4.2	Análise filogenética	25
4.3	Teste de homotalismo	31
4.4	Determinação de <i>mating type</i> por PCR e indução da fase sexuada	31
4.5	Teste de patogenicidade	33
4.4	Marcadores morfológicos da fase assexuada e sexuada	38
5	DISCUSSÃO	43
6	CONCLUSÕES	49
	REFERÊNCIAS	50
	APÊNDICES	55

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de maracujá amarelo (*Passiflorae edulis* f. *flavicarpa*) com produção de 838.244 t em uma área de 57.277 ha (IBGE, 2013). Essa produção se concentra na região Nordeste, sendo o Estado da Bahia o maior produtor, seguido do Ceará, Espírito Santo, Minas Gerais e Sergipe (IBGE, 2013). Entretanto, um dos fatores da baixa produtividade é a ocorrência de doenças, dentre elas a podridão do colo e da raiz.

A podridão do colo e da raiz é observada geralmente em plantas adultas. O processo de doença inicia-se com o amarelecimento e perda de turgescência dos brotos, seguida de murcha e seca da planta, resultado da podridão do colo e do sistema radicular (Fischer *et al.*, 2005). O controle da doença é preventivo, não havendo até o momento métodos curativos eficientes, quando a mesma é constatada no pomar (Viana *et al.*, 2003).

O agente etiológico da podridão do colo e da raiz é conhecido na literatura como *Fusarium solani* ou *Nectria haematococca*. Em estudo recente o agente etiológico da podridão do colo foi descrito como uma nova *forma specialis*, *F. solani* f. sp. *passiflorae*, baseado em patogenicidade e em análise filogenética das regiões *ITS-5.8S rDNA* e *TEF-1 α* de oito isolados (Bueno *et al.*, 2014).

Fusarium solani se destaca como patógeno de inúmeras culturas e apresenta mais de 20 nomes de *formae speciales* conhecidas, ou seja, formas específicas com patogenicidade à determinada planta. Algumas *formae speciales* foram descritas como espécies biológicas ou *mating populations* há mais de 30 anos, entretanto sem receber nomes formais (Matuo & Snyder, 1973). Análises de filogenia molecular evidenciaram que *F. solani* engloba várias espécies

filogenéticas distintas (O'Donnell, 2000; O'Donnell *et al.*, 2008). Dessa forma, atualmente, refere-se na literatura a esse grupo de fungos como *Fusarium solani species complex* - FSSC.

Espécies deste complexo apresentam comportamento reprodutivo com populações homotáticas e heterotáticas. Quando populações apresentam a reprodução sexuada, observada no campo ou induzida em laboratório por meio de cruzamentos, permite a distinção de espécies pela aplicação do conceito de espécie biológica (Matuo & Snyder, 1973; Covert *et al.*, 2007).

Em *Passiflora*, populações homotáticas de *F. solani* foram apontadas como patogênicas (Ploetz, 1991; Nirenberg & Brielmaier-Liebetanz, 1996; Pegg *et al.*, 2002), mas nenhuma menção é feita a populações heterotáticas. Portanto, testamos a hipótese de que outras formas ou populações podem ocorrer e serem patogênicas.

O conhecimento gerado permitirá uma identificação do patógeno com segurança e confiabilidade, e estabelecer medidas preventivas e fitossanitárias. Além disso, o eventual desenvolvimento de técnicas moleculares de identificação também depende dessa caracterização. Vale ressaltar que em todos os solos ocorrem formas sapróbias de *F. solani*. Mais da metade dos isolados obtidos de plantas de pimenta-do-reino com sintoma de fusariose não pertenciam ao agente etiológico da doença (Vaz, 2013) evidenciando claramente que a identificação por marcadores morfológicos é insuficiente.

Diante do exposto, este trabalho se propõe a responder às seguintes questões: (i) Quantas linhagens do FSSC estão associadas a *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e são patogênicas (ii) o agente causal da podridão do colo pertence a uma espécie biológica e filogenética distinta dentro do complexo de espécies *Fusarium solani* FSSC? (iii) ocorrem populações homotáticas ou heterotáticas, capazes de induzir doença no maracujazeiro? Os resultados gerados neste

trabalho permitirão realizar diagnose e o monitoramento do patógeno de forma consistente e confiável, além de viabilizar estratégias de identificação de fontes de resistência para o melhoramento genético em *Passiflora edulis*, visando tornar a produção brasileira cada vez mais competitiva.

2 ESTADO DA ARTE

Dentre as frutíferas de expressão econômica no Brasil, o maracujazeiro tem se destacado nos últimos anos no agronegócio e vem desempenhando uma importante função social nas regiões onde é explorada, garantindo um nível de emprego tanto no campo quanto na indústria. O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de maracujá amarelo (*Passiflorae edulis* f. *flavicarpa*) com produção de 838.244 t em uma área de 57.277 ha (IBGE, 2013). Essa produção se concentra na região Nordeste do país, sendo o Estado da Bahia o maior produtor da fruta com 355.020 t em uma área colhida de 29.695 ha, seguido de Ceará, Espírito Santo, Minas Gerais e Sergipe (IBGE, 2013).

Apesar do crescimento dos cultivos observado nos últimos anos à ocorrência de doenças, dentre elas a podridão do colo e da raiz, que mata precocemente as plantas (Viana *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2010) é responsável pela baixa produtividade e tem se apresentando como um entrave a difusão dessa cultura.

A doença denominada podridão do colo e da raiz é observada geralmente em plantas adultas, mas plantas novas podem sucumbir ao ataque dos patógenos em áreas com histórico da doença ou em condições favoráveis de elevada temperatura e umidade (Ponte *et al.*, 1998). Esta doença está dispersa por todos os Estados brasileiros que produzem a fruta, sendo responsável, pela redução da longevidade dos pomares e, em muitos casos, por constantes migrações da cultura (Ponte *et al.*, 1998; Fischer *et al.*, 2005).

O processo de doença inicia-se com o amarelecimento e perda de turgescência dos brotos, seguida de murcha dos ponteiros, acompanhada de alteração na coloração da folha para um verde-pálido, ocorrendo, posteriormente, murcha drástica, desfolha e morte das plantas, em virtude do

completo anelamento necrótico do colo da planta. Normalmente, a necrose estende-se acima do nível do solo de 2 a 10 cm, podendo progredir ao longo das raízes. São também descritos intumescimento e rachaduras da casca, na região do colo afetado, exibindo uma coloração arroxeada nas bordas das lesões e, sob condições de elevada umidade, pode-se observar peritécios do patógeno, que representam a fase perfeita do fungo (Fischer *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2010; Dariva, 2011). O processo infeccioso é favorecido por ferimentos. Vários autores só foram capazes de reproduzir os sintomas da doença na presença de ferimentos (Emechebe & Mukiibi, 1976; Cedeño *et al.*, 1990; Fischer *et al.*, 2005). O controle da doença é preventivo, não havendo até o momento métodos curativos eficientes, quando a mesma é constatada no pomar (Viana *et al.*, 2003).

O agente etiológico da podridão do colo é conhecido na literatura como *Fusarium solani* ou *Nectria haematococca*, ou ainda *Haematonectria ipomoeae* (Nirenberg & Brielmaier-Liebetanz, 1996) com base em caracteres morfológicos. Recentemente o mesmo agente etiológico foi descrito como uma nova forma *specialis*, *F. solani* f. sp. *passiflorae*, baseado em patogenicidade e em análise filogenética das regiões *ITS-5.8S rDNA* e *TEF-1 α* de oito isolados (Bueno *et al.*, 2014). Essa variação de nomes atribuídos ao longo do tempo ao mesmo agente etiológico reforça a necessidade do uso de ferramentas mais acuradas, que sejam capazes de distinguir entre populações próximas.

Conhecimentos gerados nas últimas décadas, por meio de filogenia molecular e conceitos biológicos, permitiram uma definição mais acurada no sistema de identificação das espécies que anteriormente eram descritas apenas como *F. solani* (Matuo & Snyder, 1973; O'Donnell, 2000). Análises de filogenia molecular baseada nas regiões gênicas *TEF-1 α* , *28S rDNA* e *ITS* evidenciaram que isolados com características gerais de *F. solani* formam um complexo, que

engloba cerca de 50 espécies filogenéticas distintas, agrupadas em três clados principais, algumas delas definidas também como espécies biológicas ou *mating populations* (MP) (O'Donnell, 2000; O'Donnell *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2006; Nalim *et al.*, 2011). Dessa forma, atualmente, refere-se na literatura a esse grupo de organismos como *Fusarium solani species complex* - FSSC.

O Clado 1 é representado por isolados da Nova Zelândia, o Clado 2 é formado por patógenos associados à soja e ao feijão provenientes da América do Sul e da Ásia e o Clado 3, o mais diverso, é composto por patógenos de várias plantas cultivadas como maracujá, pimenta do reino, feijão, soja, solanáceas e patógenos oportunistas de humanos (O'Donnell, 2000; O'Donnell *et al.*, 2008).

Quando populações apresentam a reprodução sexuada, seja ela observada no campo ou induzida em laboratório por meio de cruzamentos, permite a distinção de espécies pela aplicação do conceito da espécie biológica (Matuo & Snyder 1973; Covert *et al.*, 2007). Quando possível, o uso do conceito da espécie biológica é uma ferramenta valiosa, levando em consideração que a distinção de espécies por meio de marcadores morfológicos não é possível em muitos casos. No FSSC já foram descritas oito espécies biológicas ou *mating populations*, que eventualmente são reconhecidas espécies filogenéticas (Matuo & Snyder 1973; Covert *et al.*, 2007). A mais recente *Fusarium tucumaniae*, um dos agentes etiológicos da Síndrome da Morte Súbita da Soja (SDS) (Covert *et al.*, 2007).

No FSSC as espécies biológicas podem ser heterotáticas e homotáticas. A terminologia utilizada para descrever um sistema de cruzamento entre fungos é denominada de *mating type*. Existe um loco *MAT* com dois idiomorfos *MAT-1* e *MAT-2*, que são sequências não relacionadas, presentes na mesma posição do cromossomo (Leslie & Summerell, 2006; Turgeon & Yoder, 2000). Em espécies heterotáticas ou autoestéreis, a reprodução ocorre entre dois isolados de *mating*

types opostos, enquanto que em espécies homotáticas, os dois idiomorfos coexistem no mesmo genoma, completando o ciclo de vida a partir de um único esporo, por isso são consideradas autoférteis (Leslie & Summerell, 2006).

Em *Passiflora*, espécies homotáticas do FSSC foram apontadas como patogênicas (Ploetz 1991; Nirenberg & Brielmaier-Liebetanz 1996; Pegg *et al.*, 2002). E mais recentemente no Brasil o mesmo agente etiológico foi descrita como uma nova *forma specialis*, *F. solani* f. sp. *passiflorae* (Bueno *et al.*, 2014). Contudo, o estudo não esclarece quais populações, homotáticas ou heterotáticas, foram utilizadas no estudo. Estudos complementares podem esclarecer se a população, que causa a doença no Brasil é composta apenas por linhagens homotáticas ou se ambas as formas podem ocorrer e serem patogênicas. No patossistema da fusariose da pimenta do reino, por exemplo, a análise filogenética evidenciou dez linhagens distintas, entretanto o patógeno era representado por uma espécie heterotática do FSSC, com alta fertilidade feminina observada em campo (Vaz *et al.*, 2012).

O conhecimento gerado permitirá identificar o patógeno com segurança e confiabilidade, e estabelecer medidas de prevenção ou fitossanitárias. Procedimentos duradouros de melhoramento genético e o eventual desenvolvimento de técnicas moleculares de identificação também dependem dessa caracterização. Vale ressaltar que em todos os solos ocorrem formas sapróbias de *F. solani*. Mais da metade dos isolados obtidos de plantas da pimenta-do-reino com sintoma de fusariose não pertenciam ao agente etiológico da doença (Vaz, 2013) evidenciando claramente que a identificação por marcadores morfológicos é insuficiente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos isolados

Foram utilizados neste estudo isolados de *Fusarium solani* obtidos de plantas de maracujazeiro com sintomas de podridão do colo das principais regiões produtoras do Brasil nos Estados da BA, CE, MG, SP, RJ, GO, PA, MA e PI. (Tabela 1, Apêndice A). As raízes, radículas e fragmentos do coleto das plantas foram lavadas em água. Em seguida foram desinfestadas com álcool 96% e hipoclorito de sódio 1% e os fragmentos de aproximadamente 2 mm foram plaqueados em meio *Malt extract agar 2% - MA2* (Tuite, 1969), em número de 15 fragmentos por planta.

Os isolados que apresentaram características morfológicas de *F. solani* foram submetidos a cultivo monospóricos e preservados em água destilada esterilizada e armazenados a 10 °C, no escuro e criopreservados em suspensão de esporos em 15% glicerol a -80 °C, e depositados na Coleção Micológica de Lavras (CML), Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.2 Extração de DNA

Os isolados foram cultivados em meio malte 2% líquido (Leslie & Summerell, 2006), incubados em um agitador a 100 rpm, por três dias, à temperatura ambiente (25 °C a 28 °C). O micélio foi filtrado, macerado em nitrogênio líquido e a extração de DNA foi realizada através do kit Wizard® Genomic DNA purification (Promega do Brasil), de acordo com as especificações do fabricante. As concentrações de DNA foram estimadas

utilizando-se o aparelho NanoDrop 2000 e, visualmente, em gel de agarose 1,2%, por comparação da intensidade de banda com um marcador de tamanho de fragmentos de 1 Kb (Invitrogen).

3.3 Análise filogenética

Foram selecionados 55 isolados, dos diferentes Estados produtores de maracujá amarelo do Brasil, para o sequenciamento do fragmento do gene fator de alongação 1- α (*TEF-1 α*) (O'Donnell *et al.*, 1998). Foi realizada a análise preliminar e com base nos agrupamentos gerados na árvore de *TEF-1 α* , na origem geográfica e no tipo de *mating type*, foram selecionados 42 isolados para o sequenciamento do fragmento do gene da segunda maior subunidade da RNA polimerase (*RPB2*) (O'Donnell *et al.*, 2008). Na análise filogenética combinada foram selecionados 40 isolados com base nas sequências das duas regiões gênicas, *TEF-1 α* e *RPB2*.

3.3.1 Amplificação por PCR

Para a amplificação de fragmentos do gene fator de alongação - 1 α (*TEF-1 α*) foram utilizados os *primers* Ef-1 (*forward*; 5-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3) e Ef-2 (*reverse*; 5-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3) (O'Donnell *et al.*, 1998). Na amplificação do fragmento da segunda maior subunidade da RNA polimerase (*RPB2*), utilizaram-se os *primers* 5F2 (*forward*; 5-GGGGWGAYCAGAAGAAGGC-3) e 7cR (*reverse*; 5-CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT-3) (O'Donnell *et al.*, 2008).

As reações de PCR foram realizadas no termociclador My Cycler™ (BIO-RAD). As condições para a amplificação de *TEF-1α* foram: 94 °C, por 1 minuto; 34 ciclos: 94 °C, por 30 segundos; 62 °C, por 45 segundos; 72 °C, por 1 minuto e 72 °C, por 5 minutos (O'Donnell *et al.*, 1998). Para *RPB2* foram: 94 °C, por 90 segundos; 40 ciclos: 94 °C, por 30 segundos; 55 °C, por 90 segundos; 68 °C, por 2 minutos e 68 °C, por 5 minutos (O'Donnell *et al.*, 2008). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com GelRed (Biotium®), com posterior visualização realizada em fotodocumentador MiniBis Pro (Uniscience). Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o kit GenElute PCR Clean-up Kit (Sigma-Aldrich) para, posterior sequenciamento.

3.3.2 Análise de sequências de nucleotídeos

Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente com o por meio do programa SeqAssem (Hepperle, 2004) e as sequências editadas foram comparadas com a base de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information – NCBI, por meio do programa BLAST (<http://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>) e com a base de dados FUSARIUM-ID v. 1.0, específica para o gênero *Fusarium* (Geiser *et al.*, 2004).

Nas análises filogenéticas sequências de referência do FSSC correspondentes ao *TEF-1α* e *RPB2*, previamente depositadas no GenBank, foram acrescentadas as análises (Tabela 2, Apêndice B). As análises filogenéticas foram realizadas de forma individual *TEF-1α*, (581 pb), *RPB2* (621 pb) e combinadas das duas regiões gênicas (1.201 pb). Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos foram gerados utilizando-se a ferramenta CLUSTALW ((Thompson *et al.*, 1994), implementado pelo programa MEGA 5

e foram corrigidos manualmente. A análise filogenética foi realizada pelo método de Máxima Parcimônia (*Maximum Parsimony* - MP) por meio do programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011). Sequências de *Fusarium illudens* (NRRL 22090) e *Fusarium plagianthi* (NRRL 22632) foram utilizadas como *outgroup*, com base nos resultados obtidos por O'Donnell *et al.* (2008).

3.4 Teste de homotalismo

Para evitar resultados falsos positivos nos cruzamentos, os isolados em estudo foram submetidos ao teste de homotalismo. O teste foi realizado por meio de dois protocolos. No primeiro protocolo, isolados monospóricos foram cultivados em placas de Petri de poliestireno (60 x 15 mm), contendo o meio de cultura *Cenoura agar* - CA (Tuite, 1969) e incubados a 25 °C no escuro por sete dias. Após o período de incubação, 2 mL de solução de Tween 80 a 2,5% (v/v) foi adicionada à colônia e espalhados com uma alça de Drigalsky, para promover estresse nos isolados e homogeneizar o micélio. As culturas foram incubadas a 22-23 °C sob luz constante por 30 dias (Covert *et al.*, 2007). O segundo protocolo consistiu em transferir os isolados para tubos e placas contendo o meio *Synthetic nutrient poor agar* - SNA (Nirenberg, 1981) e tubos contendo meio completo - MC (Leslie & Summerell, 2006), incubados a temperatura ambiente e a 20 °C com fotoperíodo de 12 horas de luz branca fluorescente combinada com luz negra e 12 horas no escuro, respectivamente, por 30 dias. Os testes foram repetidos duas vezes, para a confirmação dos resultados (Leslie & Summerell, 2006). Os isolados que não apresentavam homotalismo foram submetidos à determinação de *mating type* e ao cruzamento para indução da fase sexual.

3.4 Determinação de *mating type* por PCR e indução da fase sexual

A determinação de *mating type* foi realizada a partir da extração do DNA fúngico de isolados monospóricos utilizando o kit Wizard[®] Genomic DNA purification (Promega do Brasil), de acordo com as especificações do fabricante.

A amplificação do idiomorfo *MAT-1* foi realizada utilizando os *primers* *FsolMat1F* (CGCCCTCTKAAYGSCTTCATG) e *FsolMat1R* (GGAGTAGACCTTAGCAATYAGGGC), e as condições de PCR de acordo com Matos (2014), gerando um fragmento de 200 pb, e do idiomorfo *MAT-2* utilizando os *primers* *fusHMGfor* (CGACCTCCCAAYGCTACAT), e *fusHMGrev* (TGGGCGGTACTGGTARTCRGG), e condições de PCR de acordo com Kerényi *et al.* (2004), gerando um fragmento de 260 pb. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,2%, para a visualização dos resultados. O comprimento dos fragmentos amplificados foi comparado com um marcador DNA ladder 1 Kb.

Após a determinação dos *mating type* dos isolados, foram realizados cruzamentos entre os isolados de *F. solani* encontrados em *P. edulis* f. *flavicarpa*, e entre estes e isolados representantes das *mating populations* descritas por Matuo & Snyder (1973) descritos na Tabela 1, Apêndice A. Foram incluídos nesse ensaio os isolados CML 860 (*MAT-2*), CML 1830 (*MAT-1*), CML 1833 (*MAT-1*), representantes da espécie biológica, que induz sintomas de PVR em *Glycine max* no Brasil (Guimarães, 2011) e os isolados CML 2187 (*MAT-1*) e CML 2186 (*MAT-2*), representantes da espécie biológica que causa fusariose em *Piper nigrum* (Vaz *et al.*, 2012) na Tabela 1, Apêndice A.

Isolados de *mating type* opostos foram testados tanto como parental feminino e parental masculino. O isolado testado como parental feminino foi transferido para placa de Petri de 60 mm de diâmetro contendo meio CA, incubado por sete dias no escuro a 25 °C. O isolado testado como parental masculino foi transferido para tubos com meio MC, incubado por uma semana com fotoperíodo de 12 horas de luz branca fluorescente combinada com luz negra e 12 horas no escuro, a uma temperatura de 20 °C. Após esse período, 2 mL de solução Tween 80 a 2,5% (v/v) foram adicionados nos tubos, o micélio aéreo foi friccionado com uma pipeta de Pasteur, formando uma suspensão de esporos concentrada. A suspensão de esporos foi transferida para a placa contendo um isolado de *mating type* oposto, e espalhada com uma alça de Drigalski de modo a homogeneizar os micélios presentes na superfície da placa.

Os cruzamentos foram incubados a 25 °C com fotoperíodo com luz branca fluorescente constante, por um período de até seis semanas (Leslie & Summerell, 2006). As avaliações foram realizadas semanalmente e os cruzamentos foram considerados férteis quando os peritécios produzidos exsudam ascósporos. Os cruzamentos foram repetidos três vezes, para confirmar os resultados.

A viabilidade dos ascósporos foi avaliada por meio da germinação em *Ágar água - AA* (Kelman *et al.*, 1967). Com estilete de ponta fina, cirros de ascósporos foram coletados e espalhados sobre a superfície do ágar com uma alça de Drigalski e algumas gotas de água estéril. Posteriormente, a placa de Petri contendo os ascósporos foi incubada no escuro a 25 °C por 24 horas. Após este período de incubação, foi realizada a avaliação da germinação dos ascósporos em microscópio de luz sob aumento de 40 vezes (Lima *et al.*, 2012).

3.5. Teste de patogenicidade

Com base nos resultados obtidos na análise filogenética, foram selecionados 18 isolados para avaliar sua capacidade de causar doenças em mudas de maracujazeiro. Os isolados foram cultivados em placas de Petri de 6 cm, contendo meio MA 2%, e mantidos por dez dias a 25 °C no escuro. Na sequência, mudas com 60 dias pós-germinação da variedade de Maracujá Amarelo Redondo (ISLA[®]), crescidas em vasos contendo 3 litros de solo na proporção 2:1:1 (solo: substrato comercial: areia) tratado com Basamid[®], receberam um ferimento com um furador no coleto a 2 cm do solo. No ferimento foi depositado um disco de micélio com aproximadamente 5 mm de diâmetro. O disco foi fixado com fita adesiva que foi removida cinco dias após a inoculação. A testemunha recebeu apenas um disco contendo meio MA 2% sem o fungo (Fischer *et al.*, 2005). As plantas inoculadas foram mantidas a 28 °C ± 3 em casa de vegetação.

As avaliações foram realizadas diariamente até os 60 dias, para observar murcha, amarelecimento ou morte das plantas. Ao final do experimento os caules foram seccionados para avaliação de colonização vascular, medição do tamanho de lesão. O postulado de Koch foi completado por meio do reisolamento dos isolados inoculados. Os estádios da doença foram avaliados e caracterizados de acordo com uma escala modificada proposta por Bueno *et al.* (2014) com notas que variaram de 0 a 5 (Tabela 3). Foram considerados patogênicos os isolados que causaram sintomas como murcha, redução do porte ou morte das plantas, e ainda aqueles que obtiveram notas ≥ 1 . Os tratamentos (isolados) foram arrançados em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições. O teste de patogenicidade foi realizado duas vezes, para confirmação dos resultados.

Tabela 3 Escala de notas para identificação e avaliação da patogenicidade de isolados de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*)

Notas	Descrição
0	Ausência de lesão
1	Pontuações no local de inoculação ou pequenas lesões (lesão <1 cm)
2	Lesões intermediárias (lesão 1-2cm)
3	Lesões (2,1-3cm)
4	Lesões (lesão >3cm)
5	Desfolha, murcha ou plantas mortas

Adaptado de Bueno *et al.* (2014).

3.6 Avaliação de marcadores da fase assexuada e sexuada

Os isolados foram repicados em meio *Batata dextrose agar* - BDA (Riker & Riker, 1936) e SNA. Em BDA, foi avaliada a taxa de crescimento, pigmentação da colônia e formação do micélio aéreo após incubação no escuro a 25 °C. A medição dos diâmetros das colônias foi realizada aos quatro dias. Em SNA, após 10-14 dias de incubação a 20 °C com fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente combinada com luz negra e 12 horas no escuro, foram observadas as características micromorfológicas, como a presença ou não e cor de esporodóquios; frequência, tamanho, formato e origem de microconídios e macroconídios; tipos de fiálides, presença ou não de clamidósporos, presença ou não de microconídios em falsas cabeças (Aoki *et al.*, 2003).

As estruturas da fase sexuada foram caracterizadas, realizando medição do diâmetro do peritécio, comprimento e largura dos ascos e de ascósporos e verificação do número de septos.

Foram realizadas 30 medições de cada estrutura da fase sexuada e assexuada, para a posterior comparação com as outras espécies biológicas de *F. solani*, já descritas na literatura (Gerlach & Nirenberg, 1982; Rossman *et al.*, 1999; Aoki *et al.*, 2003; Aoki *et al.*, 2005; Leslie & Summerell, 2006; Covert *et al.*, 2007; Nalim *et al.*, 2011)

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção de isolados

Foi obtida uma coleção de 98 isolados de *F. solani* associados ao maracujazeiro dos Estados produtores BA, MG, GO, CE, PI, PA e MA. Destes, trinta e quatro isolados foram cedidos pela Universidade Estadual de Montes Claros Montes. Oito isolados da coleção Micológica Mário Barreto Figueiredo do Instituto Biológico de São Paulo. Além destes, foram incluídos no estudo outros isolados como NRRL 22147 (CML 1346 / BBA 64379) e os representantes das *mating populations* de FSSC (Tabela 1, Apêndice A).

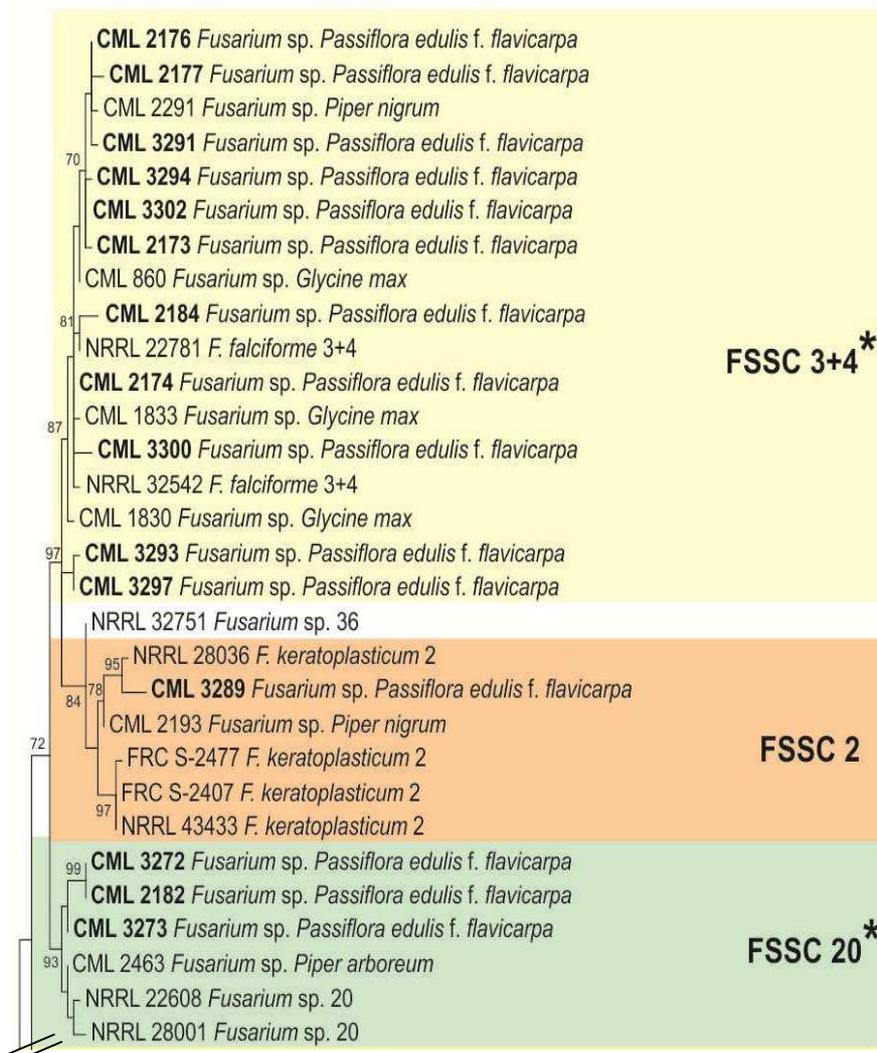
4.2 Análise filogenética

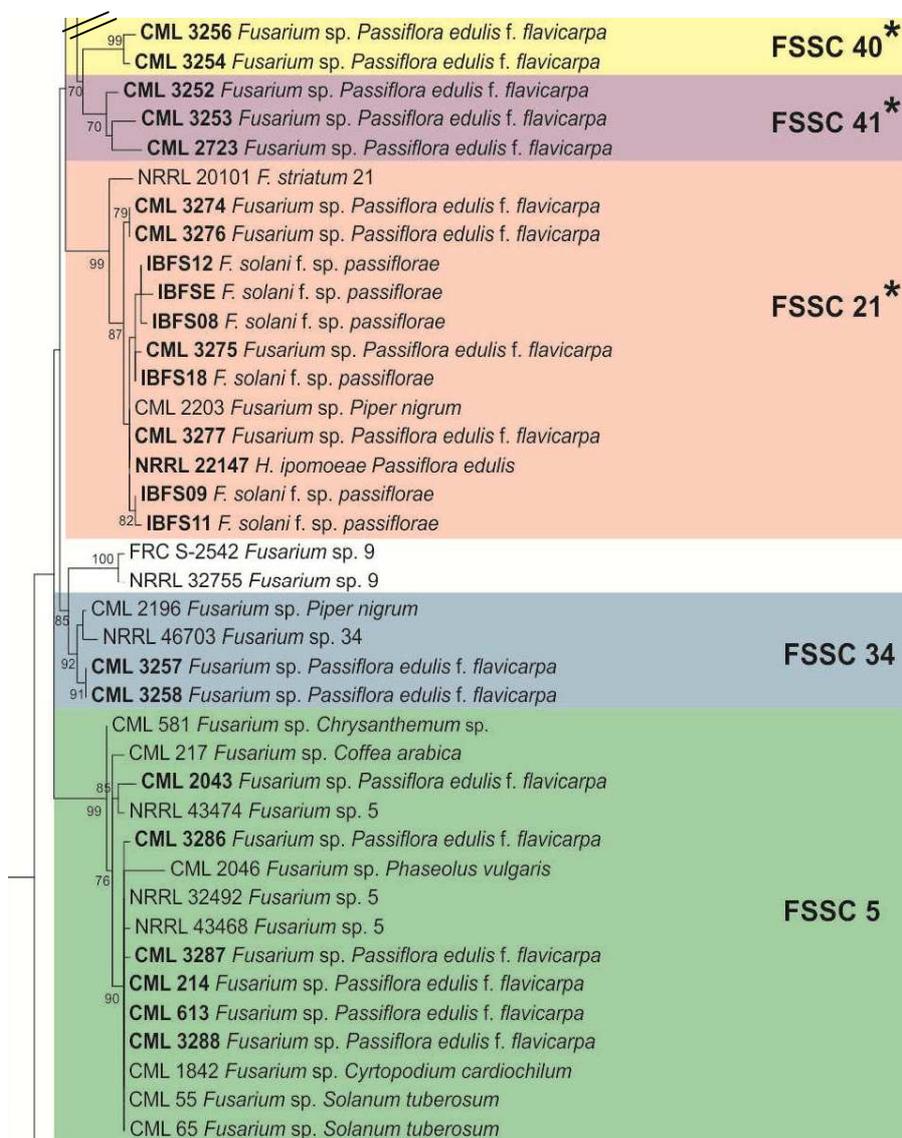
Foram geradas árvores filogenéticas para as regiões gênicas, fator de alongação 1- α (*TEF-1 α*) e a segunda maior subunidade da RNA polimerase (*RPB2*) individualmente e para os dados concatenados das duas regiões gênicas. Primeiro foi realizada a análise de Máxima Parcimônia com 55 sequências parciais do gene *TEF-1 α* de *F. solani* que continha 581 caracteres, sendo 366 conservados, 205 variáveis e destes 146 informativos (Figura 1, Apêndice C). Já a árvore filogenética de Máxima Parcimônia para a região gênica *RPB2* foi composta por 42 sequências de isolados de maracujazeiro e continha 621 caracteres sendo 454 conservados, 167 variáveis e destes 123 informativos (Figura 2, Apêndice D).

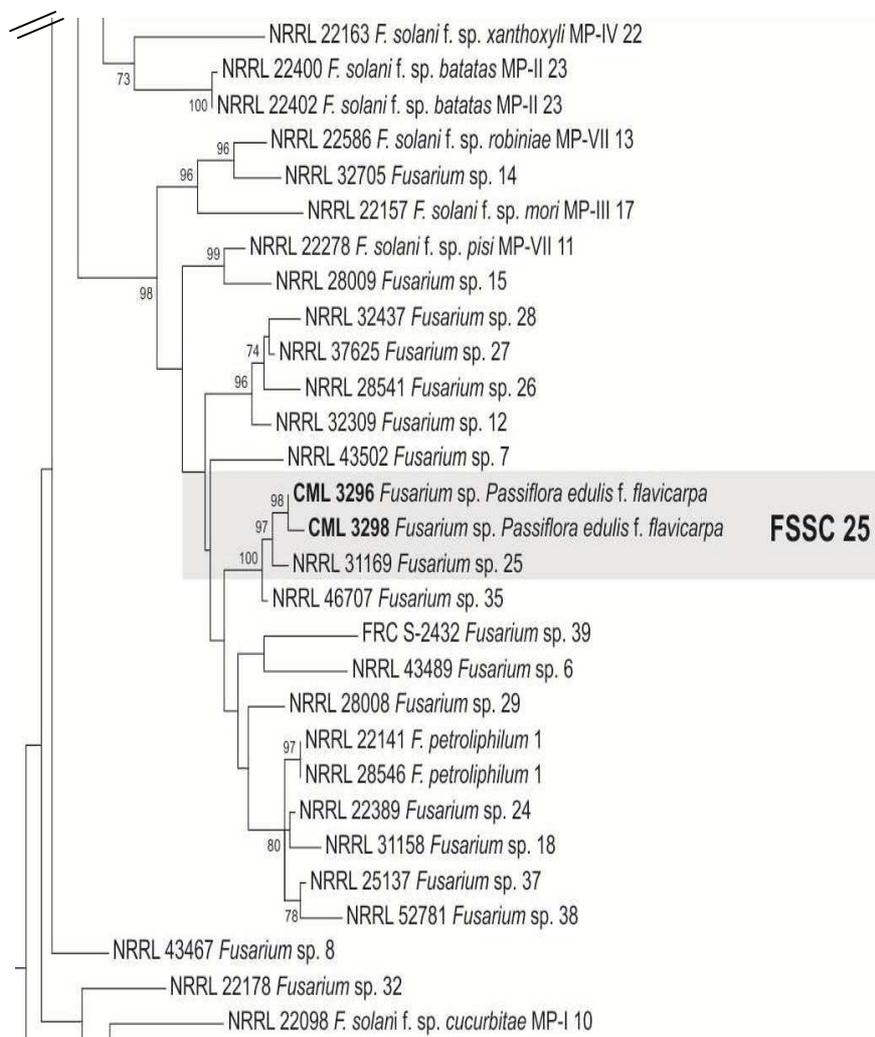
Na análise combinada das duas regiões gênicas foram utilizadas 113 sequências, com 1.201 caracteres (Figura 3). A análise combinada foi congruente com as análises individuais. A topologia gerada mostrou que os

isolados associados ao maracujazeiro estão distribuídos em nove linhagens filogenéticas distintas, FSSC 2, FSSC 3+4, FSSC 5, FSSC 20, FSSC 21, FSSC 25, FSSC 34 e duas novas linhagens, agrupadas no clado 3 do complexo de espécies *Fusarium solani*. Duas linhagens foram compostas por isolados homotáticos. Das linhagens homotáticas, a linhagem FSSC 21 agrupou juntamente com o isolado de referência NRRL 22147 (CML 1346 / BBA 64379) de *Haematonectria ipomoeae* de *Passiflora edulis* (Nirenberg & Brielmaier-Liebetanz, 1996), com suporte de 99% de *bootstrap*. A outra linhagem homotática composta por dois isolados oriundos de maracujazeiro, se distingue de todas as demais linhagens conhecidas, formando um grupo irmão com a FSSC 41 com 99% de *bootstrap*. Esta linhagem recebeu, portanto, a denominação de FSSC 40.

As demais linhagens encontradas foram compostas por isolados heterotáticos. Os isolados CML 3289 e CML 3290 agruparam com FSSC 2 (*F. keratoplasticum*). Onze isolados agruparam com FSSC 3+4 (*F. falciforme*) com 87% de *bootstrap*. Os isolados CML 214, CML 613, CML 2043, CML 3286, CML 3287, CML 3288 agruparam com a linhagem FSSC 5 com suporte de 99%. Os isolados CML 2182, CML 3273 e CML 3272 agruparam com a linhagem FSSC 20. Os isolados CML 3257 e CML 3258 agruparam juntamente com o isolado de referência NRRL 46703 e o isolado CML 2196 de *P. nigrum* na linhagem FSSC 34 com 92% de *bootstrap*. Os isolados CML 3252, CML 3253 e CML 2723 não agruparam com nenhuma das 39 linhagens já descritas, recebendo, portanto, a denominação de linhagem FSSC 41 com 70% de *bootstrap*.







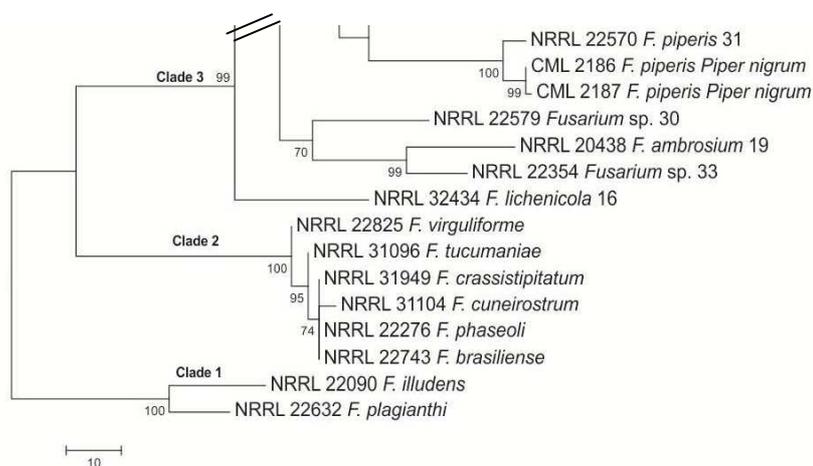


Figura 3 Árvore filogenética de máxima parcimônia das espécies do complexo *Fusarium solani*, usando sequências combinadas de *TEF-1a* e *RPB2*. *F. plagianthi* e *F. illudens*, utilizados como *outgroup*. Sombreados indicam as linhagens filogenéticas em que os isolados de maracujazeiro agruparam. * Indica linhagens patogênicas a *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Os valores de *bootstrap*, 1.000 repetições, são indicados em porcentagem acima e abaixo dos internódios, máxima parcimônia (MP) Abreviações: MP-I a MP-VII - *mating populations*; f. sp. - *formae specialis*; Coleção Micológica Mário Barreto Figueiredo; CML - Coleção Micológica de Lavras; NRRL - Northern Regional Research Laboratory; FRC - Fusarium Research Center.

4.3 Teste de homotalismo

Dos 98 isolados obtidos de *Passiflora*, 17 foram homotáticos (Tabela 1, Apêndice A), sendo que 14 agruparam com o isolado de referência NRRL 22147 / CML 1346 (*Haematonectria ipomoeae*), e foram patogênicos. Um desses isolados foi proveniente de peritécio formado em planta no campo (CML 3274). Três isolados que agruparam juntos formando uma nova linhagem (FSSC 40), e também foram patogênicos. Em ambos os protocolos utilizados, no meio CA e no meio SNA de oito a 10 dias após a incubação ocorreu a formação de peritécios, que exsudaram ascósporos de oito a 16 dias.

4.4 Determinação de *mating type* e indução da fase sexuada

Dos 81 isolados heterotáticos, 53 tiveram seus *mating types* determinados por PCR. Destes, 31 isolados pertencem ao idiomorfo *MAT-1* e 22 isolados ao idiomorfo *MAT-2* (Tabela 1, Apêndice A, Figura 4). Em relação à proporção de *mating type* das regiões com coletas onde houve maior número de coletas, verificou-se que dos 27 isolados obtidos em Minas Gerais e Bahia a proporção de *MAT-1* e *MAT-2* para a linhagem FSSC 3+4 foi de 63:37, respectivamente. Analisando cada Estado individualmente nota-se que em Minas a proporção foi de 66:34, enquanto que na Bahia foi de 60:40.

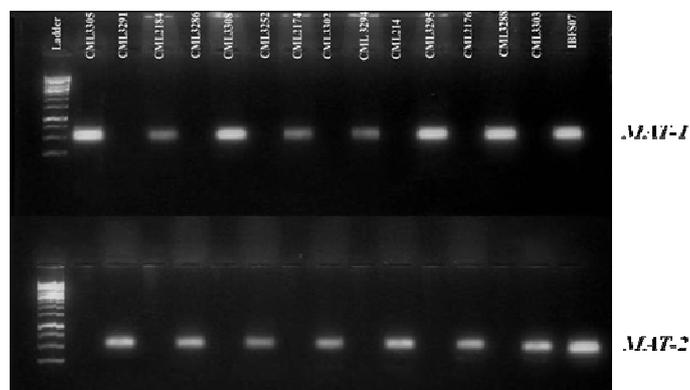


Figura 4 Amplificação dos idiomorfo *MAT-1* e *MAT-2* de isolados de *Fusarium solani* de maracujazeiro. Linha 1: ladder; Linha 2 a 14: isolados heterotáticos; *MAT-1*: CML 3305, CML 2184, CML 3308, CML 2174, CML 3294, CML 3295 e CML 3288; *MAT-2*: CML 3291, CML 3286, CML 3252, CML 3302, CML 214, CML 2176 e CML 3303; Linha 15: isolado homotático, IBFS 07.

A partir dos *mating types* determinados e dos agrupamentos das linhagens baseados nas sequencias de *TEF-1 α* foram realizados cruzamentos apenas entre isolados de uma mesma linhagem. Dos 1000 cruzamentos realizados entre isolados de *mating types* opostos, foi obtido um total de 28 cruzamentos férteis (Tabela 5) das linhagens FSSC 3+4, FSSC 34 e FSSC 41. As linhagens FSSC 3 + 4, FSSC 34 e FSSC 41 formaram peritécios férteis quando cruzados entre si, mas não com isolados de outras linhagens e representantes de outras *mating populations* descritas por Matuo e Snyder (1973), bem como com os isolados CML 2187 (*MAT-1*) e CML 2186 (*MAT-2*) que causa fusariose em *P. nigrum* no Brasil, apoiando o seu reconhecimento como três espécies biológicas distintas do FSSC.

Tabela 4 Combinação de isolados de cruzamentos férteis.

♀ <i>MAT-1</i> ^a	♂ <i>MAT-2</i> ^b	♀ <i>MAT-2</i> ^c	♂ <i>MAT-1</i> ^d
FSSC 3+4			
CML 3260	X	CML 860	CML 860 X CML 2042
CML 3260	X	CML 3261	CML 860 X CML 2184
CML 3260	X	CML 3262	CML 860 X CML 3260
CML 3260	X	CML 3263	CML 860 X CML 2178
CML 3260	X	CML 3268	CML 860 X CML 3265
CML 3260	X	CML 3269	CML 860 X CML 3267
CML 3260	X	CML 3291	CML 860 X CML 3270
CML 3260	X	CML 3306	CML 860 X CML 2173
CML 3260	X	CML 3293	CML 860 X CML 3271
			CML 860 X CML 3305
			CML 860 X CML 3294
FSSC 41			
CML 2723	X	CML 3252	CML 3252 X CML 2723
CML 3253	X	CML 3252	CML 3252 X CML 3253
FSSC 34			
CML 3258	X	CML 2196	CML 3257 X CML 3258
CML 3258	X	CML 3257	CML 2196 X CML 3258

^a♀ *MAT-1* os isolados do mating type *MAT-1* férteis como parental feminino.

^b♂ *MAT-2* os isolados do mating type *MAT-2* férteis como parental masculino.

^c♀ *MAT-2* os isolados do mating type *MAT-2* férteis como parental feminino.

^d♂ *MAT-1* os isolados do mating type *MAT-1* férteis como parental masculino.

4.5 Patogenicidade

De acordo com os resultados da análise filogenética preliminar da região *TEF-1α* foram selecionados 18 isolados de sete linhagens distintas (FSSC 3+4, FSSC 5, FSSC 20, FSSC 21, FSSC 25, FSSC 40 e FSSC 41) para realizar o teste de patogenicidade. Todos esses isolados foram testados pelo método de disco de

micélio com ferimento no colo da planta, sob as mesmas condições de temperatura, luminosidade e irrigação. Foram considerados patogênicos os isolados que causaram sintomas como murcha, redução do porte ou morte das plantas, e ainda aqueles que obtiveram notas ≥ 1 . Das sete linhagens testadas todas foram patogênicas ao maracujazeiro. Duas linhagens, FSSC 2 e FSSC 34 não tiveram isolados submetidos ao teste de patogenicidade neste estudo.

As plantas inoculadas com a linhagem homotática FSSC 21, representada pelos isolados CML 3274, IBSFE, CML 1346, CML 2183 e o isolado de *P. nigrum* CML 2203 apresentaram sintomas visíveis cinco dias após a inoculação no primeiro e no segundo experimento. As plantas apresentavam lesões no colo de coloração marrom avermelhada intensa e deprimida, e anelamento acompanhada de murcha da parte aérea que culminou na morte de plantas de 40%, 20%, 60%, 60%, e 20% respectivamente, no primeiro experimento. As plantas inoculadas com esses isolados homotáticos que não morreram apresentavam calo compensatório formado no local de inoculação como forma de evitar tombamento. Quando seccionadas as plantas apresentaram degradação do tecido vascular e lesões marrons avermelhadas que se estenderam até a raiz principal chegando a 8,4 cm (Figura 5). Os mesmos sintomas foram induzidos pela outra linhagem homotática, FSSC40, representada pelos isolados CML 3256 e CML 3254, com 60% de plantas mortas, também no primeiro experimento. As plantas inoculadas que não morreram apresentaram porte reduzido e amarelecimento, e calo compensatório em relação à testemunha.

As linhagens heterotáticas ao contrário das homotáticas, não apresentaram lesões externas tão visíveis. Os sintomas iniciaram a partir dos 20 dias após a inoculação. Apresentavam coloração no colo marrom escura, contudo sem presença de anelamento. Os isolados CML 3273 e CML 3272 representantes da linhagem FSSC 20 causaram murcha, entretanto, as plantas

foram capazes de recuperar a turgidez. As linhagens FSSC 3+4 (CML3291, CML 3260) e FSSC 41 (CML 2723), causaram morte de plantas 20% e 20%, respectivamente, no primeiro experimento. No segundo experimento a quantidade de plantas mortas para o isolado CML 2723 aumentou para 40%. Os isolados das linhagens FSSC 5 e FSSC 25 foram patogênicas, entretanto não apresentou sintomas externos, apenas manchamento dos vasos. Os isolados patogênicos reisolados das plantas apresentaram culturas típicas dos isolados inoculados, completando os postulados de Koch. Nenhuma das plantas testemunhas apresentou sintomas (Tabela 5).

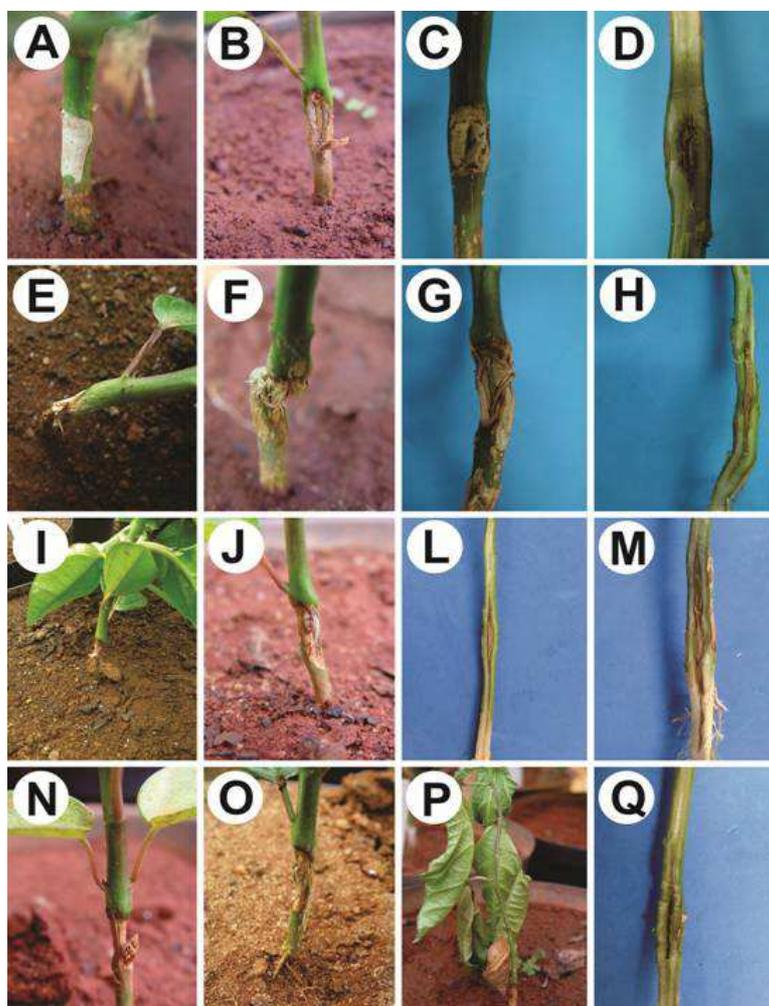


Figura 5 Teste de patogenicidade: (A) Testemunha; (B-D) isolado CML 3291, (B, C) degradação do tecido do colo e consequente anelamento, (D) manchamento marrom avermelhado do tecido seccionado; (E-H) isolado CML 1346, (E, F, G) degradação do tecido do colo e consequente anelamento, (H) manchamento marrom avermelhado do tecido seccionado; (I-M) isolado CML 3274 (I, J) degradação do tecido com consequente anelamento, (L, M) manchamento marrom avermelhado do tecido do solo seccionado, (M) lesão se estende até a raiz principal; ((N-Q) isolado CML 3254, (N, O) degradação do tecido com consequente anelamento, (P) murcha permanente da planta e porte reduzido, (Q) manchamento marrom avermelhado do tecido seccionado.

Tabela 5 Isolados utilizados no teste de patogenicidade

1° experimento

Código	FSSC	Origem geografica	Substrato	Notas ^e	Patogênico
Testemunha	-	-	-	0,00	Não
CML 1830 ^c	FSSC 3+4	Cristalina, GO	<i>Glycine Max</i>	3,00	Sim
CML 3292	FSSC 3+4	Caraíbas, BA	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	3,80	Sim
CML 3260	FSSC 3+4	Jaíba, MG	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	3,60	Sim
CML 214 ^a	FSSC 5	Carmo da Cachoeira, MG	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2,00	Sim
CML 613	FSSC 5	Rio de Janeiro, RJ	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2,80	Sim
CML 3286	FSSC 5	São Francisco da Glória,	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2,00	Sim
CML 3288	FSSC 5	Cristalina, GO	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2,60	Sim
CML 3296	FSSC 25	Distrito de Uberlândia, MG	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1,00	Sim
CML 1346	FSSC 21	Berlim, DE	<i>P. edulis</i>	4,60	Sim
CML 2183	FSSC 21	Jaíba, MG	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	4,60	Sim
CML 2203 ^d	FSSC 21	Ituberá, MG	<i>P. nigrum</i>	4,20	Sim
CML 3274	FSSC 21	São Francisco da Glória,	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	4,40	Sim
IBFSE ^b	FSSC 21	Borborema, SP	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	4,20	Sim
CML 3273	FSSC 20	Ibiapaba, CE	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2,80	Sim
CML 3272	FSSC 20	Jaíba, MG	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	3,00	Sim
CML 3256	FSSC 40	Belém, PA	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	4,60	Sim
CML 3254	FSSC 40	Jaíba, MG	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	4,60	Sim
CML 2723	FSSC 41	Jaíba, MG	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	4,00	Sim
2º experimento					
Código	FSSC	Origem geografica	Substrato	Notas ^e	Patogênico
Testemunha	-	-	-	0,00	Não
CML 1830 ^c	FSSC 3+4	Cristalina, GO	<i>Glycine Max</i>	2,60	Sim
CML 3291	FSSC 3+4	Caraíbas, BA	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	3,20	Sim
CML 3260	FSSC 3+4	Jaíba, MG	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	3,40	Sim
CML 214 ^a	FSSC 5	Carmo da Cachoeira, MG	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2,80	Sim
CML 613	FSSC 5	Rio de Janeiro, RJ	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1,40	Sim
CML 3286	FSSC 5	São Francisco da Glória,	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	3,40	Sim
CML 3288	FSSC 5	Cristalina, GO	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2,60	Sim
CML 3296	FSSC 25	Distrito de Uberlândia, MG	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1,20	Sim
CML 1346	FSSC 21	Berlim, DE	<i>P. edulis</i>	4,40	Sim
CML 2183	FSSC 21	Jaíba, MG	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	4,60	Sim
CML 2203 ^d	FSSC 21	Ituberá, MG	<i>P. nigrum</i>	4,60	Sim
CML 3274	FSSC 21	São Francisco da Glória,	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	4,40	Sim
IBFSE ^b	FSSC 21	Borborema, SP	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	4,20	Sim
CML 3273	FSSC 20	Ibiapaba, CE	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2,80	Sim
CML 3272	FSSC 20	Jaíba, MG	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	3,60	Sim
CML 3256	FSSC 40	Belém, PA	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	4,20	Sim
CML 3254	FSSC 40	Jaíba, MG	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	4,60	Sim
CML 2723	FSSC 41	Jaíba, MG	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	4,00	Sim

^aCML = Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; ^bColeção Micológica Mário Barreto Figueiredo; ^cIsolado que induz PVR em *Glycine max*; ^dIsolado homotípico de *P. nigrum*; ^eEscala de notas adaptada de Bueno *et al.* (2014).

4.6 Marcadores morfológicos da fase assexuada e sexuada

Foram avaliados 26 isolados representantes das nove linhagens do FSSC em associação a *P. edulis* f. *flavicarpa*. O crescimento em BDA aos quatro dias dos isolados não apresentou correlação entre linhagem e crescimento, em função da plasticidade que esse complexo apresenta. A média de crescimento da linhagem FSSC 2 variou de 4,33-4,53 cm. A linhagem FSSC 3+4 variou de 3,88-4,48 cm. A FSSC 5 de 2,28-4,51 cm. A FSSC 20 de 4,31-4,45 cm. A FSSC 21 de 3,58-4,50 cm. A FSSC 40 de 2,71-4,61 cm. A FSSC 41 de 3,75-4,48 cm. A menor taxa de crescimento foi observada na linhagem FSSC 34 que variou de 1,73-2,28 cm. A coloração variou no verso de branco, creme e no reverso de branco, marrom claro, marrom escuro, creme e salmão. A coloração do esporodóquio também apresentou variação de creme, creme escuro e azul.

As características micromorfológicas da fase assexuada avaliadas em SNA 20 °C, das diferentes linhagens apresentaram características semelhantes, como microconídios agregados em falsas cabeças no micélio aéreo e macroconídios no esporodóquio fiálides longas simples e ocasionalmente ramificadas. Foi observada a presença de clamidósporos lisos e rugosos, solitários, aos pares ou agregados, intercalares ou apicais. A caracterização morfológica da fase sexuada foi baseada no comprimento e largura dos peritécios, ascos e ascósporos (Tabela 6). As características morfológicas da fase assexuada e sexuada das linhagens filogenéticas que correspondem a espécies biológicas, três linhagens heterotáticas, FSSC 3 + 4, FSSC 34 (Figura 6) e FSSC 41 (Figura 7) e uma homotática FSSC 40 (Figura 8) podem ser observadas nas figuras.

Tabela 6 Marcadores morfológicos das fases assexuada e sexuada de linhagens do FSSC associadas a *P. edulis* f. *flavicarpa*

FSSC ^a	Macroconídio ^b		Microconídio ^c		Fiálide	Peritécio	Asco	Ascósporo
	length/Width ^d	septo	length/Width	Septo				
FSSC 3+4	40,0-55,0 x 5,0	3-6	8,0-14,0 x 2,0-4,0	0-3	S/R ^d	-	-	-
FSSC 5	32,5-50,0 x 3,75-5,0	3-5	6,0-17,0 x 2,0-4,5	0-3	S/R	-	-	-
FSSC 20	45,0-62,5 x 5,0	3-5	8,0-16,0 x 2,5-5,0	0-3	S/R	-	-	-
FSSC 21	47,5-80,0 x 2,5-6,25	3-8	5,5-26,0 x 2,0-4,5	0-3	S/R	275,0-400 x 177,5-300,0	55,0-87,5 x 5,0-10,0	12,5 x 5,0-6,25
FSSC 25	45,0-62,5 x 5,0	3-7	6,0-13,0 x 2,0-4,5	0-3	S/R	-	-	-
FSSC 34	37,5-47,5 x 5,0	3-5	6,0-13,0 x 2,5-4,0	0-3	S/R	300,0-460,0 x 210,0-330,0	55,0-72,5 x 5,0-10,0	10,0-15,0 x 3,75-6,25
FSSC 40	55,0-77,5 x 5,0-6,25	3-7	7,0-18,0 x 2,0-4,5	0-3	S/R	350,0-450,0 x 290,0-350,0	55,0-80,0 x 5,0-7,5	10,0-12,5 x 5,0-7,50
FSSC 41	55,0-62,5 x 3,75-5,0	3-8	8,0-12,0 x 2,0-3,5	0-3	S/R	230,0-355,0 x 175,0-290,0	57,5-75,0 x 5,0	10,0-12,5 x 5,0

^a FSSC = corresponde às linhagens do complexo *Fusarium solani*

^b Macroconídio = com 5 septos

^c Microconídio = com 0 septo

^d S/R = fiálide simples ou ramificada

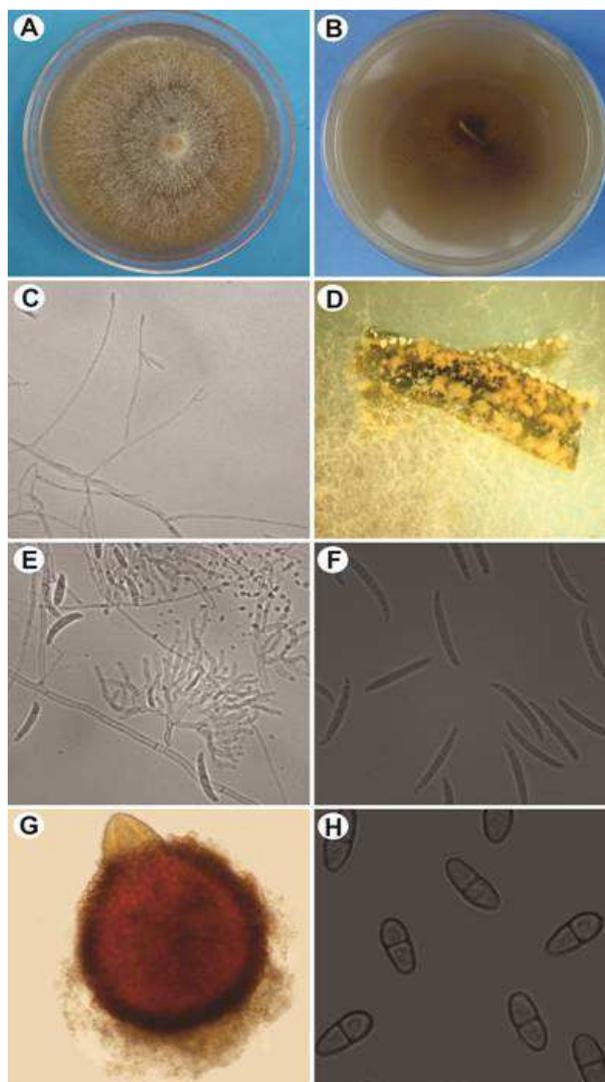


Figura 6 Marcadores morfológicos da fase assexuada e sexuada da linhagem homotática FSSC 34. (A-B) colônias em BDA, verso e reverso da colônia do isolado CML 3258, (C) fiálide simples e ramificada; (D) esporodóquio em folha de cravo em meio SNA; (E) esporodóquio visto em microscópio; (F) macroconídio formado em esporodóquio; (G) peritécio visto em microscópio; (H) ascósporos.

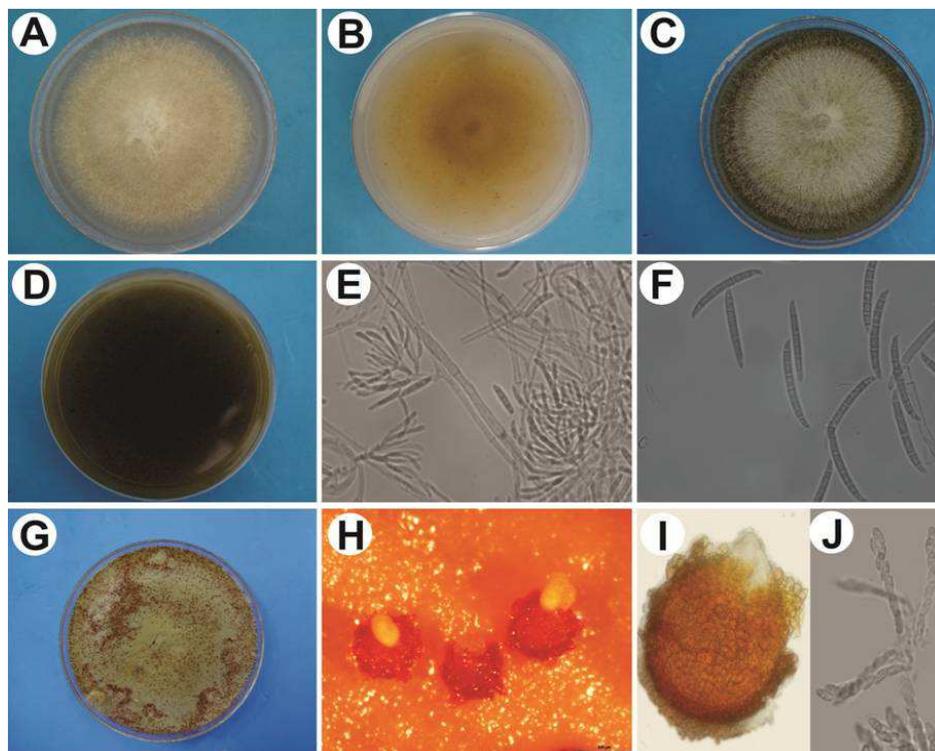


Figura 7 Marcadores morfológicos da fase assexuada e sexuada da linhagem homotática FSSC 41. (A-D) colônias em BDA, (A e B) verso e reverso da colônia do isolado CML 2723, (C e D) verso e reverso da colônia do isolado CML 3252; (E) esporodóquio; (F) macroconídio formado em esporodóquio; (G) peritécios em meio CA; (H) peritécio exsudado em placa; (I) peritécio visto em microscópio; (J) asco contendo ascósporos.

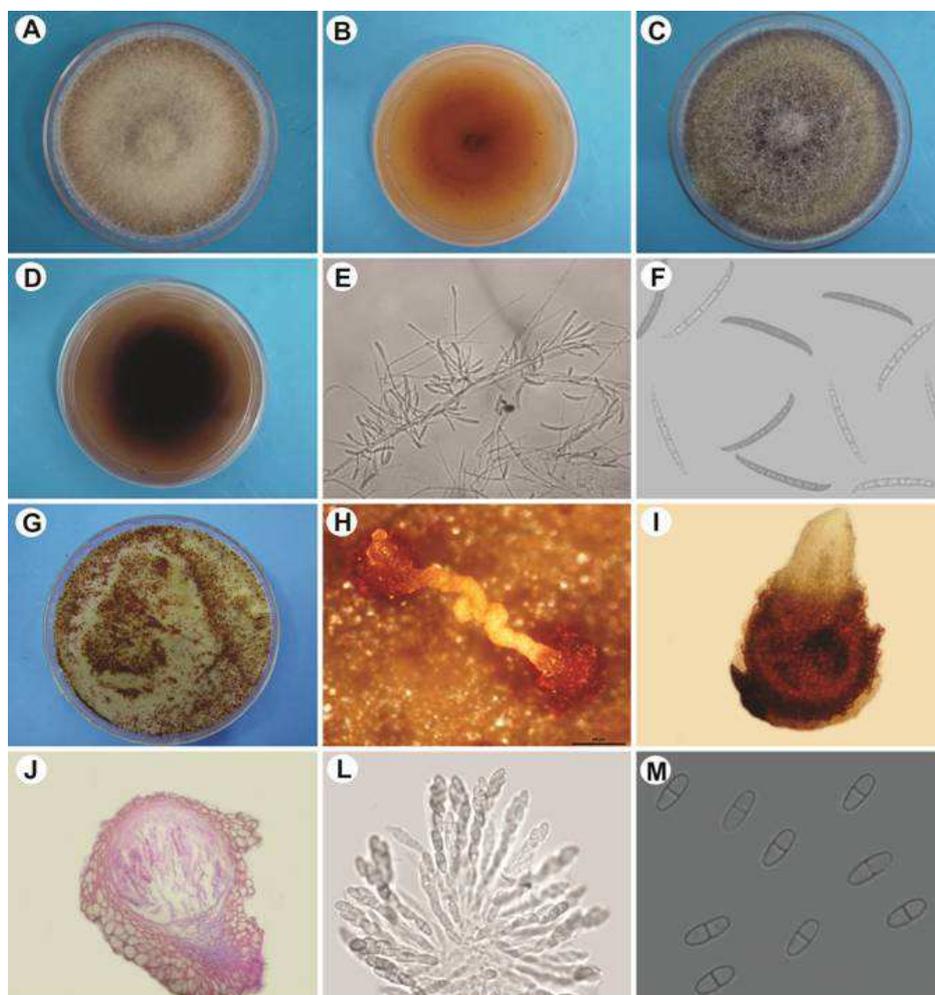


Figura 8 Marcadores morfológicos da fase assexuada e sexuada da linhagem homotática FSSC 40. (A-D) colônias em BDA, (A e B) verso e reverso da colônia do isolado CML 3256, (C e D) verso e reverso da colônia do isolado CML 3254; (E) esporodóquio; (F) macroconídio formado em esporodóquio; (G) peritécios em meio CA; (H) peritécio exsudado em placa; (I) peritécio com visto em microscópio; (J) corte do peritécio visto em microscópio; (L) asco contendo ascósporos; (M) ascósporos.

5 DISCUSSÃO

Uma ampla coleção de isolados obtidos de *P. edulis* f. *flavicarpa* de diferentes regiões produtoras do Brasil foi analisada quanto à posição filogenética dentro do complexo *Fusarium solani* - FSSC, comportamento reprodutivo, patogenicidade e morfologia. Com base nos resultados encontrados, o agente etiológico da podridão do colo é representado por cinco linhagens filogenéticas dentro do FSSC, sendo duas homotáticas e três heterotáticas.

Os resultados da análise filogenética utilizando o método de Máxima Parcimônia das sequências parciais combinadas do gene TEF-1 α e RBP2 foram congruentes com os trabalhos de O'Donnell (2000) e O'Donnell *et al.* (2008) agrupando os isolados do maracujazeiro no clado 3 do FSSC. Análises adicionais das sequências parciais do gene TEF-1 α e do gene RPB2 foram congruentes com os resultados da árvore de combinada.

A linhagem FSSC 2 (*F. keratoplasticum*) representa uma espécie filogenética e biológica distinta no FSSC, associada a infecções em humanos e animais (Zhang *et al.*, 2006; Short *et al.*, 2013). No Brasil foi registrada associada a *P. edulis* f. *flavicarpa* e a *P. nigrum*.

Dentre as linhagens em associação com *P. edulis* f. *flavicarpa*, as FSSC 5 e FSSC 20 são as mais diversas. Além de representantes que causam doenças em humanos nos EUA, Nova Zelândia, Índia e Cuba, (O'Donnell *et al.*, 2008), representantes de solo do Sri Lanka (Nalim *et al.*, 2011), também agrupam nessas linhagens isolados de diversas plantas nativas e cultivadas, como *Piper arboreum*, *Solanum tuberosum*, *Chrysanthemum* sp., *Cyrtopodium cardiochilum*, *Phaseolus vulgaris*, *Piper nigrum* e *Coffea arabica*. A capacidade desses fungos oportunistas de se adaptarem a diferentes ambientes pode refletir sua diversidade metabólica e plasticidade genética (Coleman *et al.*, 2009).

A linhagem homotática FSSC 21, reúne isolados de *P. edulis* e de várias outras plantas como *S. tuberosum*, *P. nigrum*, *Chrysanthemum* sp., *Capsicum annuum*, isolados de solo de diferentes estados brasileiros e ainda os isolados de referências NRRL 22101 utilizado por O'Donnell (2000) e O'Donnell et al. (2008) e o isolado NRRL 22147 / BBA 64379 estudado por (Nirenberg & Brielmaier-Liebetanz, 1996). Os isolados utilizados na formalização de *F. solani* f. sp. *passiflorae*, supostamente específicos ao maracujazeiro (Bueno et al., 2014), pertencem também à linhagem FSSC 21, conhecida como *F. striatum*, um patógeno de batata (Sherbakoff, 1915). Isolados dessa linhagem foram utilizados em testes de patogenicidade e se mostraram patogênicos a *S. tuberosum* e *S. melongena* (Nirenberg & Brielmaier-Liebetanz, 1996). A linhagem FSSC 21 representa, portanto, uma espécie de patógenos inespecíficos, composta por isolados homotáticos.

A linhagem FSSC 34, proposta por O'Donnell et al. (2008), baseada em um único isolado da Espanha obtido de nematoide, foi confirmada por mais dois isolados de *P. edulis* f. *flavicarpa* e um isolado do Brasil de *P. nigrum*. Outras duas novas linhagens foram identificadas, por três isolados *P. edulis* f. *flavicarpa*, em cada uma, e chamadas FSSC 40 e FSSC 41, já que a linhagem FSSC 39 foi à última linhagem proposta na literatura (Short et al., 2013). Este é o primeiro relato das linhagens FSSC40 e FSSC 41. Essas duas linhagens deverão ser formalmente descritas e elevadas ao nível de espécie, pois representam novas espécies filogenéticas e biológicas no complexo do *Fusarium solani*.

Estudo recente sobre o patossistema da fusariose da pimenta do reino revelou que há dez linhagens filogenéticas distintas do FSSC associadas a *P. nigrum*, entretanto destas somente uma foi patogênica (Vaz et al., 2012). Por outro lado, no patossistema de *Passiflora* foram encontradas sete linhagens

patogênicas, homotáticas e heterotáticas, ou seja, existe um complexo de espécies capazes de induzir os mesmos sintomas em plantas de maracujazeiro.

Os isolados mais virulentos pertencem às duas linhagens homotáticas encontradas no estudo. Estes isolados induziram sintomas típicos como lesões deprimidas, anelamento, degradação do tecido do colo, seguida de murcha e morte rápida em pouco tempo quando comparado com as linhagens heterotáticas. Isolados homotáticos já haviam sido apontados com patogênicos ao maracujazeiro (Ploetz, 1991; Nirenberg & Brielmaier-Liebetanz, 1996; Pegg *et al.*, 2002). Os sintomas observados foram semelhantes ao observados por Nirenberg e Brielmaier-Liebetanz (1996). A respeito da degradação do tecido do colo, Bueno *et al.* (2009) já haviam relatado a capacidade de isolados de *F. solani*, associado a maracujazeiro de produzir as enzimas extracelulares amilase, lipase, celulase, proteases, lacase e catalase, as quais durante o período de incubação no hospedeiro, degradam ativamente os componentes presentes no tecido infectado.

A linhagem FSSC 3+4 que corresponde à espécie biológica *Fusarium paranaense* (Guimarães, 2011), patógeno associado à PVR da soja no Brasil, também é patogênico a *P. edulis* f. *flavicarpa*. Provavelmente essa inespecificidade relaciona-se a capacidade desses fungos oportunistas de se adaptarem a diferentes ambientes favorecidos pelo sistema de cultivo do maracujazeiro que em sua maioria é realizado em pequenas propriedades que cultivam em sistema de sucessão com a soja e outras culturas.

Nas plantas inoculadas com os isolados patogênicos heterotáticos, a manifestação dos sintomas foi mais lenta. Externamente, a maioria das plantas não apresentavam sintomas típicos, entretanto o tecido seccionado apresentava lesões marrom avermelhadas, típicas da doença.

No teste de homotalismo, dos 98 isolados obtidos de *P. edulis* f. *flavicarpa* 17 foram homotáticos com produção espontânea de peritécios férteis em culturas monospóricas. Representantes desses isolados homotáticos agruparam com *Haematonectria ipomoeae*, FSSC 21, nas análises filogenéticas e foram patogênicos. Esses resultados foram condizentes com os obtidos por Nirenberg e Brielmaier-Liebetanz (1996), Ploetz (1991) e Pegg *et al.* (2002), que observaram que isolados homotáticos de *F. solani* eram patogênicos ao maracujazeiro. Outra linhagem homotática também foi encontrada em associação ao *P. edulis* f. *flavicarpa* e foi denominada de FSSC 40.

Na determinação de *mating type* verificou-se uma maior proporção do idiomorfo *MAT-1* nas regiões com maior abrangência nas coletas. As proporções encontradas em Minas Gerais e Bahia de 63:37 para a FSSC 3+4 é um indicio que possa ocorrer a reprodução sexuada no campo. Essa proporção é um parâmetro importante para o desenvolvimento de estratégias para o controle de patógenos de plantas, uma vez as medidas de manejo adotadas devem ser diferentes para fungos que se reproduzem sexuadamente, daquelas adotadas para os que se multiplicam por mitoses (Kerényi *et al.*, 2004).

Nos testes de compatibilidade sexual foi comprovado que isolados heterotáticos de *F. solani* representam três espécies biológicas dentro do FSSC que também correspondem a espécies filogenéticas. As espécies quando cruzados com membros das outras *mating populations* e com isolados das demais linhagens filogenéticas associadas a *P. edulis* f. *flavicarpa* não formaram peritécios demonstrando que existe barreira reprodutiva.

A linhagem FSSC 3+4 que corresponde à espécie biológica *Fusarium paranaense* (Guimarães, 2011), patógeno associado à PVR da soja no Brasil, também é patogênico a *P. edulis* f. *flavicarpa*.

Duas linhagens filogenéticas identificadas neste estudo também representam distintas espécies biológicas no FSSC: a linhagem FSSC 34, representada por dois isolados de *P. edulis* f. *flavicarpa* e um de *P. nigrum* e a linhagem FSSC 41, composta por três isolados de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Esse é o primeiro relato dessas *mating populations* do FSSC, posterior a *Fusarium piperis*, patógeno causador da fusariose da pimenta do reino (Vaz *et al.*, 2012), *Fusarium tucumaniae*, patógeno da podridão radicular da soja (Covert *et al.*, 2007) e as sete descritas por Matuo e Snyder (1973). Contudo ressalta-se que uma descrição baseada apenas em três isolados seria antecipada, diante do limitado número de isolados associados. Novas coletas e triagens deverão ser realizadas para embasar as novas descrições.

Com base no estudo da taxa de crescimento observa-se que não houve correlação entre a taxa de crescimento e as linhagens do FSSC estudadas. O mesmo foi observado por Guimarães (2011), evidenciado claramente que a taxa de crescimento não constitui um bom marcador para separar isolados de *Fusarium solani* do FSSC.

Em relação às características micromorfológicas os isolados avaliados apresentaram plasticidade morfológica elevada, não sendo possível encontrar marcadores para as linhagens, pois apresentam muita variação nos caracteres morfológicos tanto do da fase sexuada como da sexuada. Nota-se, por exemplo, que isolados das linhagens FSSC 21 e FSSC 41 compartilham macroconídios falcados com 8 septos e célula apical mais fina que a célula pé.

Assim, concluímos que uso de estudos de filogenia molecular com base em concordância de genes e a aplicação do conceito de espécie biológica são ferramentas eficazes que podem auxiliar estudos de taxonomia, principalmente em complexos de espécies que compartilham características morfológicas, como é o caso do complexo *F. solani*. Muitas linhagens encontradas no FSSC

precisam ser formalmente descritas, pois, entre as 39 linhagens conhecidas na literatura, somente seis foram formalmente descritas até o momento.

6 CONCLUSÕES

O agente etiológico da podridão do colo é representado por sete linhagens do FSSC, representando espécies filogenéticas e biológicas distintas.

As linhagens patogênicas são homotáticas ou heterotáticas. Quais os fatores que determinam a patogenicidade ainda não estão elucidados.

REFERÊNCIAS

- Aoki T, O'Donnell K, Homma Y, Lattanzi AR, 2003. Sudden death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex *F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. *Mycologia* **95**, 660-684.
- Aoki T, O'Donnell K, Scandiani MM, 2005. Sudden death syndrome of soybean in south America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. *Mycoscience* **46**, 162-183.
- Bueno CJ, Fischer IH, Rosa DD, Firmino AC, Harakava R, Oliveira CMG, Furtado EL, 2014. *Fusarium solani* f. sp. *passiflorae*: a new forma specialis causing collar rot in yellow passion fruit. *Plant Pathology* **63**, 382-389.
- Bueno CJ, Fischer IH, Rosa DD, Furtado EL, 2009. Produção de enzimas extracelulares por *Fusarium solani* de maracujazeiro amarelo. *Tropical Plant Pathology* **34**, 343-346.
- Cedeño L, Palacios Pru E, Marques NJ, Tavira ME, 1990. *Nectria haematococca*, agente causal de la muerte repentina de la parchita em Venezuela. *Fitopatología Venezolana* **3**,15-18.
- Coleman JJ, Rounsley SD, Rodriguez-Carres M, et al, 2009. The genome of *Nectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. *PLoS Genetics* **5**, 1-14.
- Covert SF, Aoki T, O'Donnell K, Starkey D, Holliday A, Geiser DM, Cheung F, Town C, Strom A, Juba J, Scandiani MM, Yang XB, 2007. Sexual reproduction in the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium tucumaniae*. *Fungal Genetics and Biology* **44**, 799-807.
- Dariva JM, 2011. *Fusarioses do maracujazeiro: etiologia e sintomatologia*. Janaúba, Minas Gerais: Universidade Estadual de Montes Claros, dissertação de mestrado.
- Emechebe AM, Mukiibi J, 1976. *Nectria* collar and root rot of passion fruit in Uganda. *Plant Disease Rep.* **60**, 227-231.

Fischer IH, Almeida A, Fileti MS, Bertani RMA, Arruda MC, Bueno CJ, 2010. Avaliação de *Passifloraceas*, fungicidas, e *Trichoderma* para o manejo da podridão do colo do maracujazeiro, causada por *Nectria haematococca*. *Revista Brasileira de Fruticultura* **32**, 709-717.

Fischer IH, Lourenço SA, Martins MC, Kimati H, Amorim L, 2005. Seleção de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da podridão do colo do maracujazeiro causada por *Nectria haematococca*. *Fitopatologia Brasileira* **30**, 250-258.

Geiser DM, Gimenez-Gasco MM, Kang S, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward TJ, Zhang N, Kuldau GA, O'Donnell K, 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* **110**, 473-479.

Gerlach W, Nirenberg H, 1982. *The genus Fusarium: a pictorial atlas*. Berlin, Dahlem. Parey: Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft.

Guimarães SSC, 2011. *Fusarium solani* associado à soja no Brasil: morfologia, filogenia molecular e patogenicidade. Lavras, Minas Gerais: Universidade Federal de Lavras, tese de doutorado.

Hepperle D, 2004. *SeqAssem*[®]: A sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Win32-Version. Distributed by the author via < <http://www.sequentix.de> >.

IBGE, 2013. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*. Brasília, Brasil. Censo 2013. [www.ibge.gov.br.] Acessado em 10 de janeiro 2015.

Kelman A, eds., 1967. *Sourcebook of laboratory exercises in plant pathology*. San Francisco and London: W.H. Freeman and Company.

Kerényi Z, Moretti A, Waalwijk C, Oláh B, Hornok L, 2004. Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 4419-4423

Klittich CJ, Leslie JF, 1988. Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). *Genetics* **118**, 417-423.

Leslie JF, Summerell BA, 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Malden, USA: Blackwell Publishers.

Lima CS, Pfenning LH, Costa SS, Abreu LM, Leslie JF, 2012. *Fusarium tupiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. *Mycologia* **104**, 1408-1419.

Nirenberg HI, 1981. A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat. *Canadian Journal of Botany* **59**, 1599–1609.

Nirenberg HI, Brielmaier-Liebetanz U, 1996. *Nectria ipomoeae* Halst., anamorph: *Fusarium striatum* Sherb. on *Passiflora edulis* Sims. *Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienstes* **48**, 270–275.

Matos KS, 2014. *Diversidade de espécies filogenéticas e biológicas do complexo Fusarium solani-FSSC no Brasil*. Lavras, Minas Gerais: Universidade Federal de Lavras, tese de doutorado.

MatuoT, Snyder WC, 1973. Use of morphology and mating populations in the identification of *formae speciales* in *Fusarium solani*. *Phytopathology* **63**, 562–565.

Nalim FA, Samuels GJ, Wijesundera RL, Geiser DM, 2011. New species from the *Fusarium solani* species complex derived from perithecia and soil in the Old World tropics. *Mycologia* **103**, 1302–1330.

O'Donnell K, 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* **92**, 919-938.

O'Donnell K, Kistler, HC, Cigelnik E, Ploetz RC, 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, USA* **95**, 2044–2049.

O'Donnell K, Sutton DA, Fothergill A, McCarthy D, Rinaldi MG, Brandt ME, Zhang N, Geiser DM, 2008. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *Journal Clinical Microbiology* **46**, 2477-2490.

Pegg KG, Willingham SL, O'Brien RG, Cooke AW, Coates LM, 2002. Base rot of golden passion fruit caused by a homothallic strain of *Fusarium solani*. *Australasian Plant Pathology* **31**, 305-306.

Ploetz RC, 1991. Sudden wilt of passion fruit in southern Florida caused by *Nectria haematococca*. *Plant Disease* **75**, 1071-1073.

Ponte JJ, Franco A, Aguiar de Holanda YC, Silveira Filho J, 1998. Calagem, adubação orgânica e fungicida de solo no controle da podridão do pé (*Fusarium solani*) do maracujá amarelo. *Fitopatología Venezolana* **12**, 30-31.

Riker AJ, Riker RS, 1936. *Introduction to research on plant diseases*. St Louis, Mo, USA: John S. Swift Co.

Rossmann AY, Samuels GJ, Rogerson CT, Lowen R, 1999. Genera of *Bionectriaceae*, *Hypocreaceae* and *Nectriaceae* (*Hypocreales*, *Ascomycetes*). Wageningen: CBS, *Studies in Mycology* **42**, 1-248.

Sherbakoff CD, 1915. *Fusaria of potatoes*. Ithaca: University Agricultural Experimental Station Memoir.

Tamura K, 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 2731-2739.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.

Tuite J, 1969. *Plant pathology methods*. Fungi and Bacteria. Minneapolis: Burgess Publishing Co.

Turgeon BG, Yoder OC, 2000. Proposed nomenclature for *mating type* genes of filamentous ascomycetes. *Fungal Genetics and Biology* **31**, 1-5.

Vaz AB, 2013. *Caracterização biológica e filogenética do agente etiológico da fusariose da pimenta-do-reino no Brasil*. Lavras, Minas Gerais: Universidade Federal de Lavras, tese de doutorado.

Vaz AB, Elizei VG, Costa, SS, Pfenning LH, Ventura JA, 2012. First Report of Sexual Reproduction of *Fusarium solani* f. sp. *piperis* in Bahia, Brazil. *Plant Disease* **96**, 1581.

Viana FMP, Freire FCO, Cardoso JE, Vidal JC, 2003. *Principais Doenças do Maracujazeiro na Região Nordeste e seu Controle*. Fortaleza, Ceará: Empresa de Pesquisa Agropecuária: Embrapa. 86. (Comunicado Técnico).

Zhang N, O'Donnell K, *et al*, 2006. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infection in both humans and plants are common in the environment. *Journal Clinical Microbiology* **44**, 2186-219

APÊNDICE A

Tabela 1 Isolados de *Fusarium solani* analisados neste estudo

CML ^a	Outro Cod. ^b	Espécie	FSSC ^c	Origem geográfica	Subtrato	Mating type ^d
55*	-	<i>F. solani</i>	FSSC 5	Santa Rita de Caldas, MG	<i>Solanum tuberosum</i>	1
65*	-	<i>F. solani</i>	FSSC 5	Alfenas, MG	<i>Solanum tuberosum</i>	1
214	ARA34	<i>F. solani</i>	FSSC 5	Carmo da Cachoeira, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2
217*	ARA14	<i>F. solani</i>	FSSC 5	Machado, MG	<i>Coffea arabica</i>	1
581*	-	<i>F. solani</i>	FSSC 5	Holambra, SP	<i>Chrysanthemum</i> sp.	2
613	-	<i>F. solani</i>	FSSC 5	Rio de Janeiro, RJ	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2
860*	-	<i>F. paranaense</i>	FSSC 3+4	Distrito Federal	<i>Glycine max</i>	2
1346	NRRL 22147	<i>F. solani</i>	FSSC 21	Berlim, DE	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Hm
1830*	MES24	<i>F. paranaense</i>	FSSC 3+4	Cristalina, GO	<i>Glycine max</i>	1
1833*	MES13	<i>F. paranaense</i>	FSSC 3+4	Campo Mourão, PR	<i>Glycine max</i>	1
1842*	-	<i>F. solani</i>	FSSC 5	Viçosa, MG	<i>Cyrtopodium cardiochilum</i>	2
1883*	NRRL 22142	<i>F. petroliphilum</i> MP-V	FSSC 1	Califórnia, EUA	<i>Cucurbita</i> sp.	2
1884*	NRRL 22163	f. sp. <i>xanthoxyli</i> MP-IV	FSSC 22	Japão	<i>Xanthoxylum piperitum</i>	2
1894*	NRRL 22400	f. sp. <i>batatas</i> MP-II	FSSC 23	Carolina do Norte, EUA	<i>Ipomoeae batatas</i>	2
1895*	NRRL 21141	<i>F. petroliphilum</i> MP-V	FSSC 1	Nova Zelândia	<i>Cucurbita</i> sp.	1
2042	MR01	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Januária, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
2043	MR70B	<i>F. solani</i>	FSSC 5	Sebastião Laranjeiras, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
2046*	MES07	<i>F. solani</i>	FSSC 5	Patos de Minas, MG	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1

Tabela 1, continua

CML ^a	Outro Cod. ^b	Espécie	FSSC ^c	Origem geográfica	Subtrato	Mating type ^d
2047*	-	<i>F. solani</i>	FSSC 5	Lavras, MG	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1
2173	MR71	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Sebastião Laranjeiras, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
2174	MR53	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Sebastião Laranjeiras, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
2176	MR52	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Sebastião Laranjeiras, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2
2177	MR43	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Espinosa, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
2178	MR40	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Espinosa, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
2179	MR26B	<i>F. solani</i>		Nova Porteirinha, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
2180	MR35B	<i>F. solani</i>	Nd	Jaíba, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
2182	MR21	<i>F. solani</i>	FSSC 20	Jaíba, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2
2183	MR13B	<i>F. solani</i>	FSSC 21	Jaíba, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Hm
2184	MR08	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Januária, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
2185	MR17B	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Jaíba, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2
2186*	AV15	f. sp. <i>piperis</i>	FSSC 31	Valença, BA	<i>Piper nigrum</i>	2
2187*	AV17	f. sp. <i>piperis</i>	FSSC 31	Valença, BA	<i>Piper nigrum</i>	1
2192	MR82	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Sebastião Laranjeiras, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
2193*	AV01	<i>F. keratoplasticum</i>	FSSC 2	Nilo Peçanha, BA	<i>Piper nigrum</i>	2
2196*	AV04	<i>F. solani</i>	FSSC 34	Ituberá, BA	<i>Piper nigrum</i>	2
2203*		<i>F. solani</i>	FSSC 21			Hm

Tabela 1, continua

CML ^a	Outro Cod. ^b	Espécie	FSSC ^c	Origem geográfica	Subtrato	Mating type ^d
2291*	AV72	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Sooretama, ES	<i>Piper nigrum</i>	1
2723	MR19	<i>F. solani</i>	FSSC 41	Jaíba, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
3252	AC06	<i>F. solani</i>	FSSC 41	Tanhaçú, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2
3253	AC60	<i>F. solani</i>	FSSC 41	Indianópolis, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
3254	MR93	<i>F. solani</i>	FSSC 40	Jaíba, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Hm
3255	MR94	<i>F. solani</i>	FSSC 40	Jaíba, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Hm
3256	AC64	<i>F. solani</i>	FSSC 40	Belém, PA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Hm
3257	MR07	<i>F. solani</i>	FSSC 34	Januária, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2
3258	MR75	<i>F. solani</i>	FSSC 34	Sebastião Laranjeiras, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
3259	MR05	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Januária, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
3260	MR14	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Jaíba, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
3261	MR28	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Januária, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2
3262	MR29	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Januária, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2
3263	MR34	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Jaíba, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2
3264	MR42	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Espinosa, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
3265	MR45	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Sebastião Laranjeiras, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
3266	MR47	<i>F. solani</i>	Nd	Sebastião Laranjeiras, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
3267	MR50	<i>F. solani</i>	Nd	Sebastião Laranjeiras, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd

Tabela 1, continua

CML ^a	Outro Cod. ^b	Espécie	FSSC ^c	Origem geográfica	Subtrato	Mating type ^d
3268	MR55	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Sebastião Laranjeiras, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2
3269	MR67	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Sebastião Laranjeiras, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2
3270	MR65	<i>F. solani</i>	Nd	Sebastião Laranjeiras, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
3271	MR79	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Sebastião Laranjeiras, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
3272	MR31	<i>F. solani</i>	FSSC 20	Jaíba, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2
3273	AC87	<i>F. solani</i>	FSSC 20	Ibiapaba, CE	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
3274	AC54	<i>F. solani</i>	FSSC 21	São Francisco da Glória, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Hm
3275	AC66	<i>F. solani</i>	FSSC 21	Indianópolis, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Hm
3276	AC84	<i>F. solani</i>	FSSC 21	São Luís, MA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Hm
3277	AC86	<i>F. solani</i>	FSSC 21	Ibiapaba, CE	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Hm
3278	IBFS07	f. sp. <i>passiflorae</i>	FSSC 21	Pederneiras, SP	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Hm
3279	IBFS08	f. sp. <i>passiflorae</i>	FSSC 21	Bauru, SP	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Hm
3280	IBFS09	f. sp. <i>passiflorae</i>	FSSC 21	Pederneiras, SP	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Hm
3281	IBFS11	f. sp. <i>passiflorae</i>	FSSC 21	Jaú, SP	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Hm
3282	IBFS12	f. sp. <i>passiflorae</i>	FSSC 21	Pederneiras, SP	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Hm
3283	IBFS18	f. sp. <i>passiflorae</i>	FSSC 21	Pederneiras, SP	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Hm
3284	IBFSE	f. sp. <i>passiflorae</i>	FSSC 21	Borborema, SP	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Hm
3285	IBFSRJ	f. sp. <i>passiflorae</i>	FSSC 21	Campos dos Goytacazes, RJ	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Hm

Tabela 1, continua

CML ^a	Outro Cod. ^b	Espécie	FSSC ^c	Origem geográfica	Subtrato	Mating type ^d
3286	AC17	<i>F. solani</i>	FSSC 5	São Francisco da Glória, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2
3287	AC51	<i>F. solani</i>	FSSC 5	Cristalina, GO	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2
3288	AC53	<i>F. solani</i>	FSSC 5	Cristalina, GO	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
3289	AC15	<i>F. solani</i>	FSSC 2	São Francisco da Glória, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
3290	AC70	<i>F. solani</i>	FSSC 2	Indianópolis, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
3291	AC02	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Caraíbas, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2
3292	AC11	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	São Francisco da Glória, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
3293	AC56	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Cruzeiro dos Peixotos, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
3294	AC25	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Livramento de Nossa Senhora, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
3295	AC44	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Brumado, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
3296	AC61	<i>F. solani</i>	FSSC 25	Distrito de Uberlândia, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
3297	AC68	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Cruzeiro dos Peixotos, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
3298	AC85	<i>F. solani</i>	FSSC 25	São Luís, MA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
3299	AC88	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Ibiapaba, CE	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
3300	AC89	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Pedro II, PI	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
3301	AC90	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Cascavel, CE	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
3302	AC27	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Livramento de Nossa Senhora, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2
3303	AC39	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Brumado, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2

Tabela 1, continua

CML ^a	Outro Cod. ^b	Espécie	FSSC ^c	Origem geográfica	Subtrato	Mating type ^d
3305	AC03	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Caraíbas, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
3306	AC28	<i>F. solani</i>	Nd	Caraíbas, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2
3307	AC59	<i>F. solani</i>	FSSC 21	Indianópolis, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Hm
-	AC04	<i>F. solani</i>	Nd	Caraíbas, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2
-	AC05	<i>F. solani</i>	Nd	Caraíbas, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
-	AC07	<i>F. solani</i>	Nd	Tanhaçú, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
3308	AC08	<i>F. solani</i>	FSSC 3+4	Tanhaçú, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
-	AC10	<i>F. solani</i>	Nd	São Francisco da Glória, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
-	AC13	<i>F. solani</i>	Nd	São Francisco da Glória, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
-	AC20	<i>F. solani</i>	Nd	São Francisco da Glória, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
-	AC23	<i>F. solani</i>	Nd	Livramento de Nossa Senhora, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
-	AC26	<i>F. solani</i>	Nd	Livramento de Nossa Senhora, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
-	AC30	<i>F. solani</i>	Nd	Caraíbas, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2
-	AC31	<i>F. solani</i>	Nd	Livramento de Nossa Senhora, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
-	AC33	<i>F. solani</i>	Nd	Caraíbas, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2
-	AC36	<i>F. solani</i>	Nd	Brumado, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
-	AC37	<i>F. solani</i>	Nd	Brumado, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
-	AC38	<i>F. solani</i>	Nd	Brumado, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd

Tabela 1, conclusão

CML ^a	Outro Cod. ^b	Espécie	FSSC ^c	Origem geográfica	Subtrato	Mating type ^d
-	AC41	<i>F. solani</i>	Nd	Brumado, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
-	AC42	<i>F. solani</i>	Nd	Brumado, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
-	AC45	<i>F. solani</i>	Nd	Livramento de Nossa Senhora, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
-	AC46	<i>F. solani</i>	Nd	Livramento de Nossa Senhora, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
-	AC47	<i>F. solani</i>	Nd	Brumado, BA	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
-	AC48	<i>F. solani</i>	Nd	Cristalina, GO	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
-	AC52	<i>F. solani</i>	Nd	Cristalina, GO	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1
-	AC57	<i>F. solani</i>	Nd	Cruzeiro dos Peixotos, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd
-	MR36	<i>F. solani</i>	Nd	Jaíba, MG	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nd

^aCML = Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; ^bOutros códigos: AC = Coleção Acleide Cardoso; MR = maracujazeiro, coleção Universidade Estadual de Montes Claros; IBSF = Micoteca Mário Barreto Figueiredo; *Isolados utilizados nos cruzamentos; AV = Coleção Aline Vaz; MES = Micoteca Embrapa Soja, Embrapa Soja, Londrina, Paraná, Brasil; NRRL = Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, EUA; ^cFSSC= linhagem FSSC com base nas regiões gênicas *TEF-1α* + *RPB2*; ^dMAT - Mating type dos isolados identificados por PCR. *MAT-1* = 1; *MAT-2* = 2; Hm = homotálico; Nd = não determinado.

APÊNDICE B

Tabela 2 Sequências de isolados de referência obtidas do Genbank utilizadas nas análises filogenéticas

Espécies	FSSC	Código ^a	TEF ^b	RBP2 ^c
<i>F. illudens</i>	-	NRRL 22090	AF178326	JX171601
<i>F. plagianthi</i>	-	NRRL 22632	AF178354	EU329519
<i>F. tucumaniae</i>	-	NRRL 31096	GU170636	EU329557
<i>F. virguliforme</i>	-	NRRL 22825	EF408437	EU329533
<i>F. brasiliense</i>	-	NRRL 22743	AY320145	EU329525
<i>F. crassistipitatum</i>	-	NRRL 31949	AY320161	EU329566
<i>F. cuneirostrum</i>	-	NRRL 31104	AY320159	EU329558
<i>F. phaseoli</i>	-	NRRL 22276	AY220186	JX171608
<i>F. petrophilum</i> MP-V 1-a	FSSC 1	NRRL 28546	DQ246887	EU329544
<i>F. petrophilum</i> MP-V 1-1	FSSC 1	NRRL 22141	AF178329	EU329491
<i>F. keratoplasticum</i> 2-ss	FSSC 2	FRC S-2477	JN235712	JN235897
<i>F. keratoplasticum</i> 2-d	FSSC 2	NRRL 28036	DQ246880	FJ240384
<i>F. keratoplasticum</i> 2-a	FSSC 2	NRRL 43433	DQ790473	DQ790561
<i>F. keratoplasticum</i> 2-tt	FSSC 2	FRC S-2407	JN235713	JN235898
<i>F. falciforme</i> 3+4-f	FSSC 3+4	NRRL 22781	DQ246849	EU329527
<i>F. falciforme</i> 3+4-ii	FSSC 3+4	NRRL 32542	DQ247008	EU329590
<i>Fusarium</i> sp. 5-a	FSSC 5	NRRL 43468	EF452941	EF469980
<i>Fusarium</i> sp. 5-b	FSSC 5	NRRL 43474	EF452945	EF469984
<i>Fusarium</i> sp. 5-c	FSSC 5	NRRL 32492	DQ246990	EU329584
<i>F. ensiforme</i> clade 6-a	FSSC 6	NRRL 43489	DQ790484	DQ790572
<i>F. ensiforme</i> clade 7-a	FSSC 7	NRRL 43502	DQ790488	DQ790576
<i>Neocosmospora</i> sp. 8-a	FSSC 8	NRRL 43467	EF452940	EF469979
<i>N. africana</i> 8-b	FSSC 8	NRRL 22436	AF178348	EU329497
<i>Fusarium</i> sp. 9-a	FSSC 9	NRRL 32755	DQ247073	EU329613
<i>Fusarium</i> sp. 9-d	FSSC 9	FRC S-2542	JN235722	JN235907
<i>F. solani</i> f.sp. <i>cucurbitae</i> MP-I 10-b	FSSC 10	NRRL 22098	AF178327	EU329489
<i>F. solani</i> f.sp. <i>lisi</i> MP-VI 11-a	FSSC 11	NRRL 22278	AF178337	EU329501
<i>F. ensiforme</i> clade 12-d	FSSC 12	NRRL 32309	DQ246937	EU329571
<i>F. solani</i> f.sp. <i>robiniae</i> MP-VII 13-b	FSSC 13	NRRL 22586	AF178353	EU329516
<i>F. ensiforme</i> clade 14-b	FSSC 14	NRRL 32705	DQ247025	EU329594
<i>F. ensiforme</i> clade 15-a	FSSC 15	NRRL 28009	DQ246869	EF470136

Tabela 2, continua

Espécies	FSSC	Código^a	TEF^b	RBP2^c
<i>F. lichenicola</i> 16-b	FSSC 16	NRRL 32434	DQ246977	EF470161
<i>F. solani</i> f. sp. <i>mori</i> MP-III 17-a	FSSC 17	NRRL 22157	AF178359	EU329493
<i>F. ensiforme</i> clade 18-a	FSSC 18	NRRL 31158	DQ246916	EU329559
<i>F. ambrosium</i> 19-a	FSSC 19	NRRL 20438	AF178332	JX171584
<i>Fusarium</i> sp. 20-a	FSSC 20	NRRL 22608	DQ246838	EU329517
<i>Fusarium</i> sp. 20-b	FSSC 20	NRRL 28001	DQ246866	EF470129
<i>F. striatum</i> 21-a	FSSC 21	NRRL 20101	AF178333	EU329490
<i>Haematonectria ipomoeae</i>	FSSC 21	NRRL 22147	DQ247554	-
<i>H. ipomoeae</i>	FSSC 21	MAFF 240020	AB426287	-
<i>H. ipomoeae</i>	FSSC 21	NRRL 22147	DQ247554	+
<i>H. ipomoeae</i>	FSSC 21	MAFF 238974	AB513845	-
<i>H. ipomoeae</i>	FSSC 21	MAFF 237667	AB513843	-
<i>H. ipomoeae</i>	FSSC 21	MAFF 237668	AB513844	-
<i>F. solani</i> f.sp. <i>xanthoxyli</i> MP-IV 22-a	FSSC 22	NRRL 22163	AF178328	EU329492
<i>F. solani</i> f.sp. <i>batatas</i> MP-II 23-a	FSSC 23	NRRL 22400	AF178343	EU329509
<i>F. solani</i> f.sp. <i>batatas</i> MP-II 23-a	FSSC 23	NRRL 22402	AF178344	FJ240381
<i>Fusarium</i> sp. 24-a	FSSC 24	NRRL 22389	AF178340	EU329506
<i>F. ensiforme</i> clade 25-a	FSSC 25	NRRL 31169	DQ246923	EU329564
<i>F. ensiforme</i> clade 26-a	FSSC 26	NRRL 28541	DQ246882	EU329542
<i>F. ensiforme</i> clade 27-a	FSSC 27	NRRL 37625	FJ240353	EU329637
<i>F. ensiforme</i> clade 28-a	FSSC 28	NRRL 32437	DQ246979	EU329581
<i>F. ensiforme</i> clade 29-a	FSSC 29	NRRL 28008	DQ246868	EF470135
<i>F. ensiforme</i> clade 30-a	FSSC 30	NRRL 22579	AF178352	EU329515
<i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> 31-a	FSSC 31	NRRL 22570	AF178360	EU329513
<i>Fusarium</i> sp. 32-a	FSSC 32	NRRL 22178	AF178334	EU329498
<i>Fusarium</i> sp. 33-a	FSSC 33	NRRL 22354	AF178338	EU329504
<i>Fusarium</i> sp. 34-a	FSSC 34	NRRL 46703	HM347126	EU329661
<i>Fusarium</i> sp. 35-a	FSSC 35	NRRL 46707	HM347127	EU329665
<i>Fusarium</i> sp. 36-a	FSSC 36	NRRL 32751	DQ247070	EU329611
<i>Fusarium</i> sp. 37-a	FSSC 37	NRRL 25137	JF740757	JF741084
<i>Fusarium</i> sp. 38-a	FSSC 38	NRRL 52781	JF740849	JF741175
<i>Fusarium</i> sp. 39-a	FSSC 39	FRC S-2432	JN235756	JN235941
<i>F. paranaense</i>	FSSC 3+4	CML 860	KF597814	KF680005
<i>F. paranaense</i>	FSSC 3+4	CML 1830	KF597797	KF680011

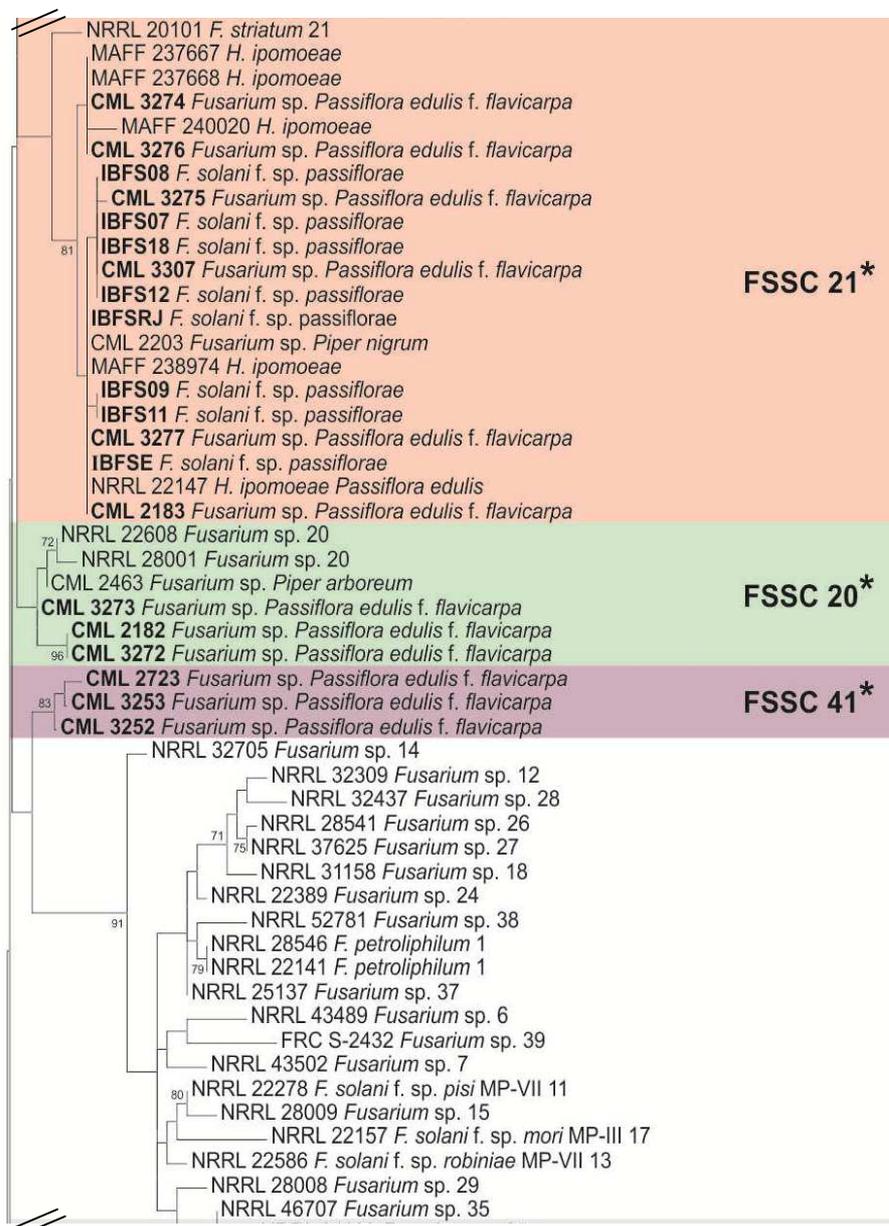
Tabela 2, conclusão

Espécies	FSSC	Código ^a	TEF ^b	RBP2 ^c
<i>F. paranaense</i>	FSSC 3+4	CML 1833	+	KF680012
<i>F. piperis</i>	FSSC 31	CML 2186	KF680027	KF680027
<i>F. piperis</i>	FSSC 31	CML 2187	JX657677	KF680028
<i>F. solani f.sp. passiflorae</i>	FSSC 21	IBFS07	JX524768	+
<i>F. solani f.sp. passiflorae</i>	FSSC 21	IBFSE	JX524774	+
<i>F. solani f.sp. passiflorae</i>	FSSC 21	IBFSRJ	JX524775	+
<i>F. solani f.sp. passiflorae</i>	FSSC 21	IBFS18	JX524773	+
<i>F. solani f.sp. passiflorae</i>	FSSC 21	IBFS12	JX524772	+
<i>F. solani f.sp. passiflorae</i>	FSSC 21	IBFS11	JX524771	+
<i>F. solani f.sp. passiflorae</i>	FSSC 21	IBFS08	JX524769	+
<i>F. solani f.sp. passiflorae</i>	FSSC 21	IBFS09	JX524770	+
<i>Fusarium sp.</i>	FSSC 34	CML 2196	+	+
<i>Fusarium sp.</i>	FSSC 2	CML 2193	+	+
<i>Fusarium sp.</i>	FSSC 21	CML 2203	+	+
<i>Fusarium sp.</i>	FSSC 5	CML 55	+	+
<i>Fusarium sp.</i>	FSSC 5	CML 65	+	+
<i>Fusarium sp.</i>	FSSC 5	CML 217	+	+
<i>Fusarium sp.</i>	FSSC 5	CML 581	+	+
<i>Fusarium sp.</i>	FSSC 5	CML 1842	+	+
<i>Fusarium sp.</i>	FSSC 5	CML 2046	+	+
<i>Fusarium sp.</i>	FSSC 20	CML 2063	+	+

^aAbreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; NRRL = Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, EUA; MAFF= Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Tsukuba, Japão; FRC S= Fusarium Research Center, Pennsylvania, EUA. ^bNúmero de acesso de sequências do gene TEF 1- α = Fator de alongação 1 α obtidas do GenBank, NCBI. ^cNúmero de acesso de sequências da RPB2 = Segunda maior subunidade da RNA polimerase obtidas do GenBank, NCBI. + = Isolados que tiveram a região sequenciada, contudo estas não estão depositadas no GenBank.

APÊNDICE C

<ul style="list-style-type: none"> — CML 3294 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — CML 3301 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — CML 2185 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — CML 2177 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — CML 2173 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — CML 3261 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> 72 — CML 3303 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — CML 2291 <i>Fusarium</i> sp. <i>Piper nigrum</i> — CML 2180 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — CML 2176 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — CML 3263 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — CML 3260 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — CML 3302 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — CML 3291 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — CML 860 <i>Fusarium</i> sp. <i>Glycine max</i> — CML 3262 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — CML 3265 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — CML 2174 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — CML 2178 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — NRRL 22781 <i>F. falciforme</i> 3+4 — CML 3264 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — CML 2184 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — CML 3295 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — CML 2192 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — CML 3308 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — CML 3271 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — NRRL 32542 <i>F. falciforme</i> 3+4 — CML 1833 <i>Fusarium</i> sp. <i>Glycine max</i> — CML 3299 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — CML 3292 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — CML 3300 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> — CML 1830 <i>Fusarium</i> sp. <i>Glycine max</i> — NRRL 43433 <i>F. keratoplasticum</i> 2 — CML 2193 <i>Fusarium</i> sp. <i>Piper nigrum</i> — FRC S-2477 <i>F. keratoplasticum</i> 2 — FRC S-2407 <i>F. keratoplasticum</i> 2 — NRRL 28036 <i>F. keratoplasticum</i> 2 — NRRL 32751 <i>Fusarium</i> sp. 36 — CML 3289 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> 91 — CML 3290 <i>Fusarium</i> sp. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> 	<p>FSSC 3+4*</p> <p>FSSC 2</p>
---	--



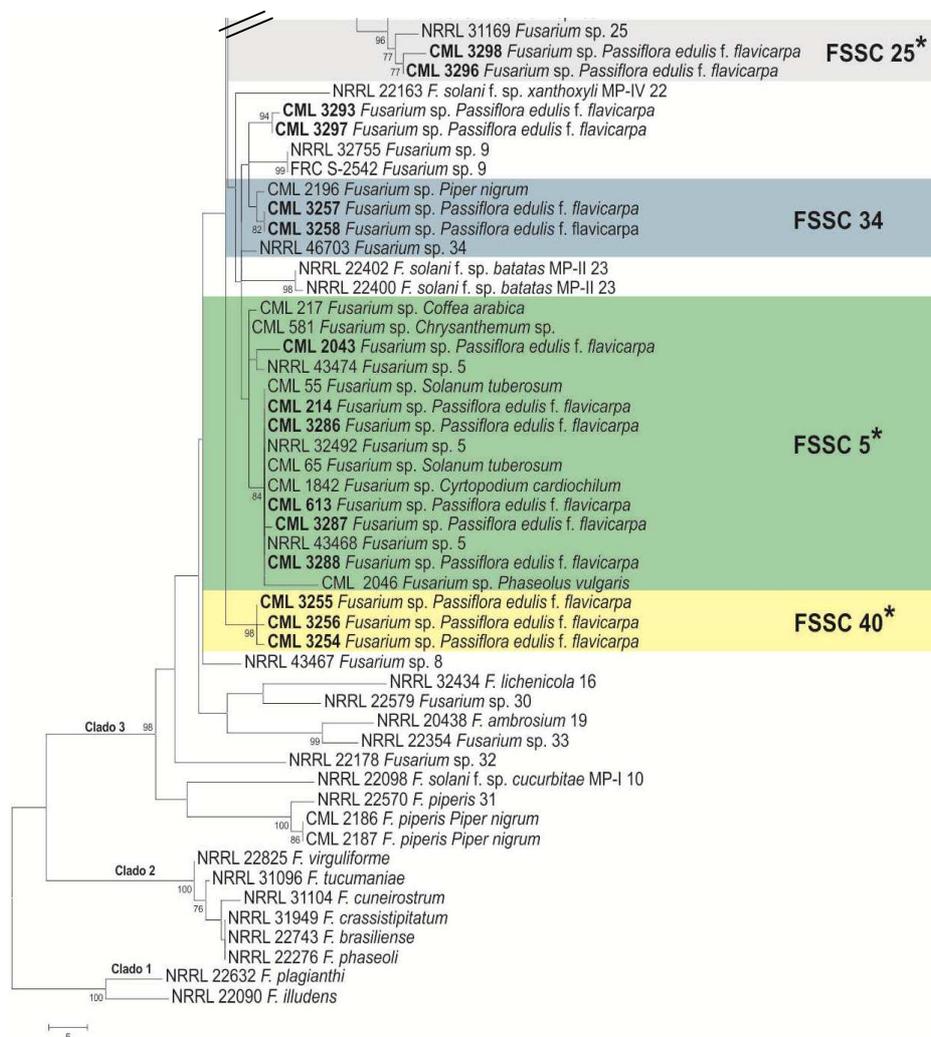
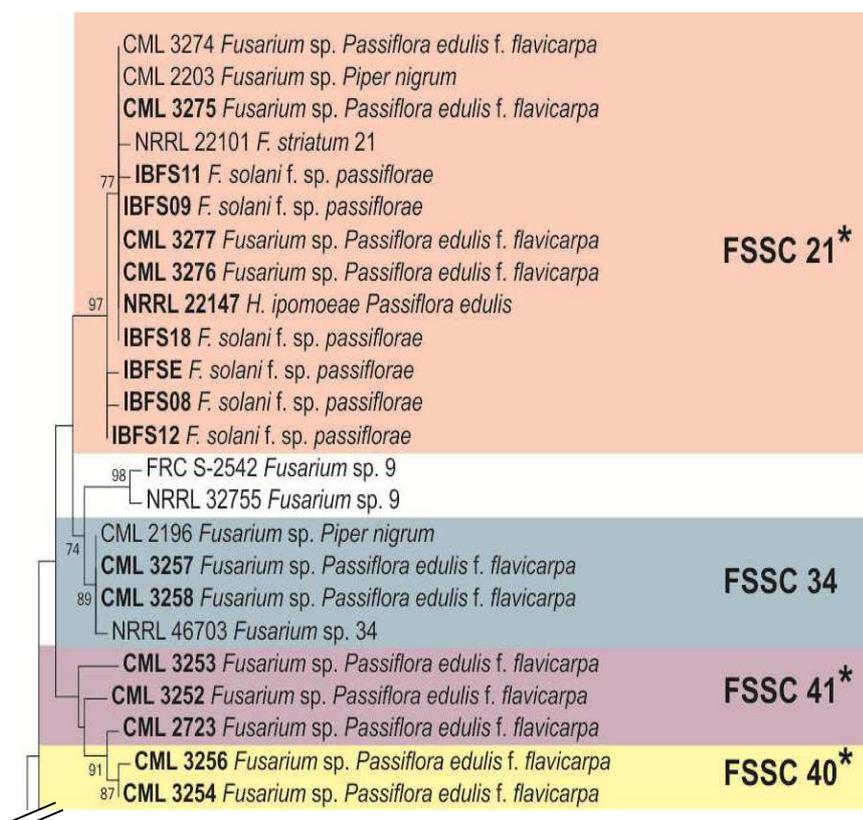
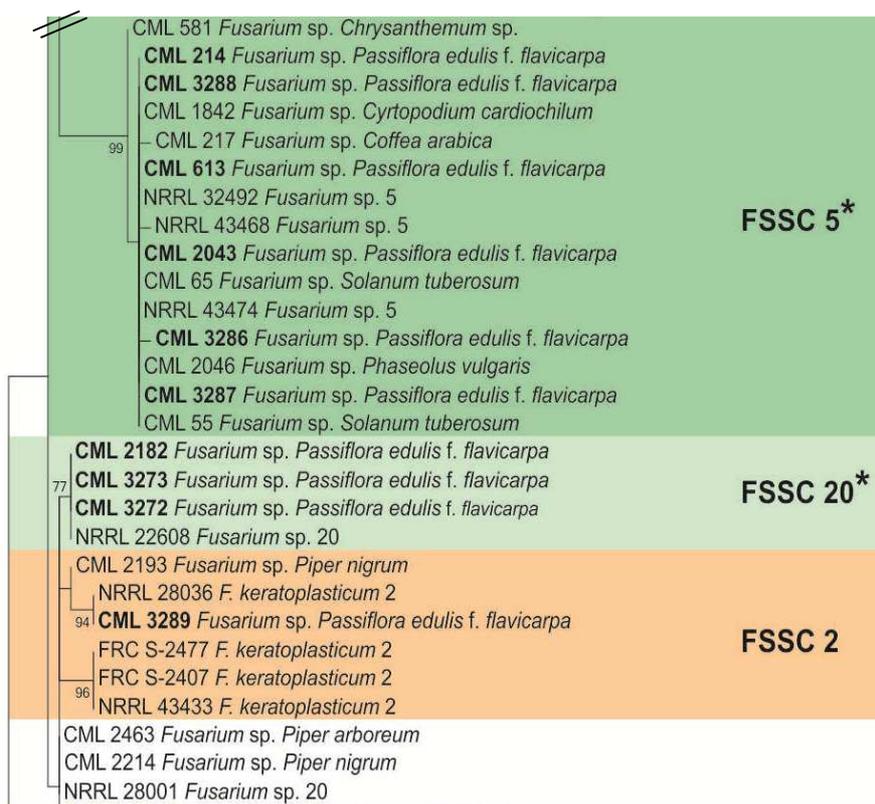
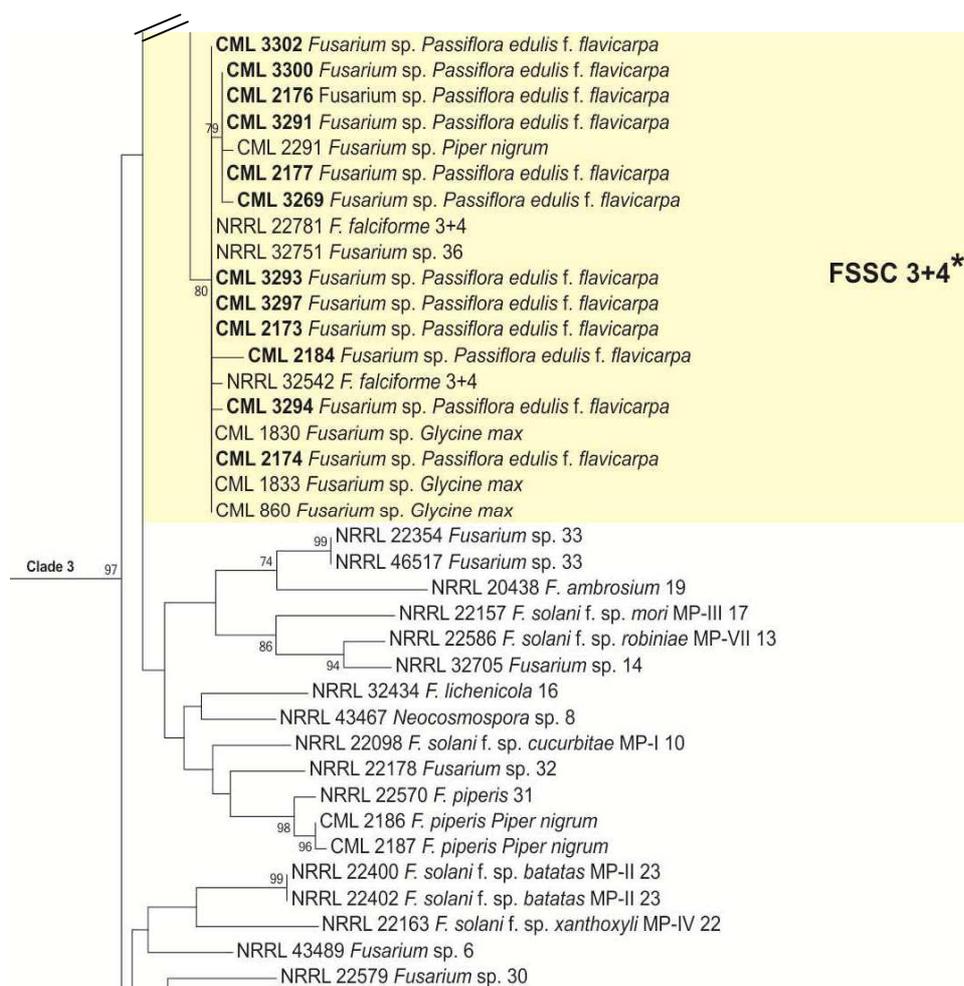


Figura 1 Árvore filogenética de máxima parcimônia das espécies do complexo *Fusarium solani*, usando sequências de *TEF-1a*. *F. plagianthi* e *F. illudens*, utilizados como *outgroup*. Sombreados indicam as linhagens filogenéticas em que os isolados de *Passiflora* se encontram. *Indica as linhagens patogênicas a *Passiflora edulis f. flavicarpa*. Os valores de *bootstrap*, 1.000 repetições, são indicados em porcentagem acima e abaixo dos internódios, máxima parcimônia (MP) Abreviações: MP-I a MP-VII - *mating populations*; IBSF – Coleção Micológica Mário Barreto Figueiredo; CML - Coleção Micológica de Lavras; NRRL - Northern Regional Research Laboratory; MAFF - Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries; FRC – Fusarium Research Center.

APÊNDICE D







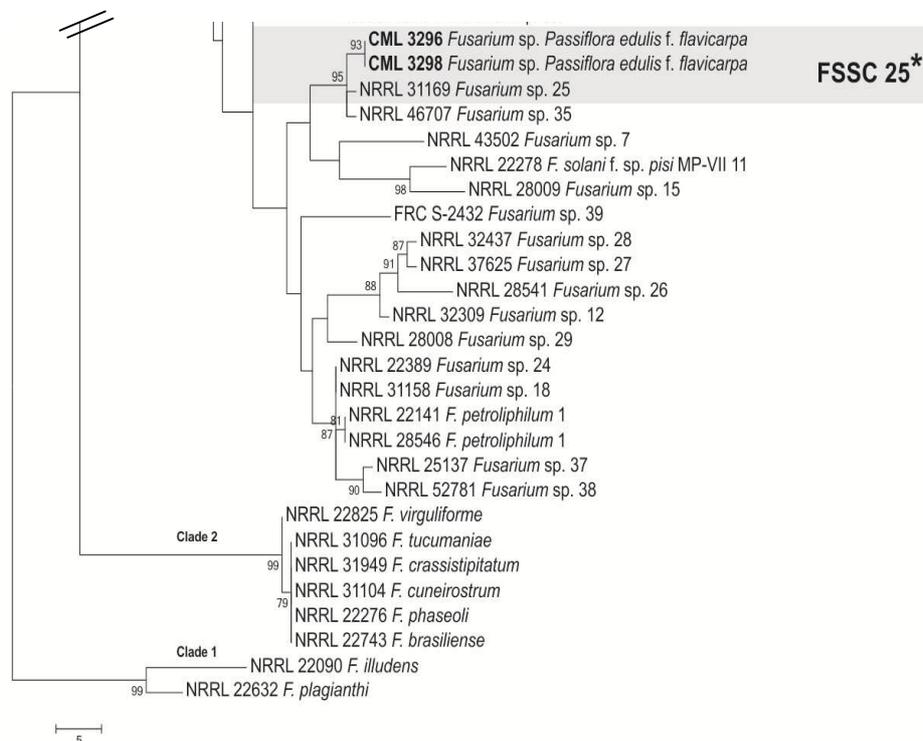


Figura 2 Árvore filogenética de máxima parcimônia das espécies do complexo *Fusarium solani*, usando sequências de *RPB2*. *F. plagianthi* e *F. illudens*, utilizados como *outgroup*. Sombreados indicam as linhagens filogenéticas em que os isolados de *Passiflora* se encontram. * Indica linhagens patogênicas a *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Os valores de *bootstrap*, 1.000 repetições, são indicados em porcentagem acima e abaixo dos internódios, máxima parcimônia (MP) Abreviações: MP-I a MP-VII - *mating populations*; IBSF – Coleção Micológica Mário Barreto Figueiredo; CML - Coleção Micológica de Lavras; NRRL - Northern Regional Research Laboratory; FRC – Fusarium Research Center.