



ANA KARLA DE FREITAS MIRANDA MACHADO

**ESPÉCIES DE *FUSARIUM*
ASSOCIADAS À MALFORMAÇÃO
DA MANGUEIRA**

LAVRAS – MG

2013

ANA KARLA DE FREITAS MIRANDA MACHADO

**ESPÉCIES DE *FUSARIUM* ASSOCIADAS
À MALFORMAÇÃO DA MANGUEIRA**

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

Orientador

Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning

LAVRAS – MG

2013

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

Machado, Ana Karla de Freitas Miranda.
Espécies de *Fusarium* associadas à malformação da mangueira /
Ana Karla de Freitas Miranda Machado. – Lavras : UFLA, 2013.
52 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.
Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning.
Bibliografia.

1. *Mangifera indica*. 2. Complexo *Gibberella fujikuroi*. 3.
MALDI-TOF. 4. Filogenia molecular. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 632.43

ANA KARLA DE FREITAS MIRANDA MACHADO

**ESPÉCIES DE *FUSARIUM* ASSOCIADAS
À MALFORMAÇÃO DA MANGUEIRA**

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 28 de fevereiro de 2013.

Dr. Flávio Medeiros Vasconcelos UFLA

Dr. Lucas Magalhães de Abreu UFLA

Dr. Ludwig Heinrich Pfenning
Orientador

**LAVRAS – MG
2013**

A todos aqueles que direta, ou indiretamente, contribuíram para mais uma vitória e cumprimento de mais uma etapa de minha formação pessoal e profissional.

Especialmente à minha família e amigos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP) pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Agradeço ao professor Ludwig H. Pfenning, pela orientação, disponibilidade e amizade.

Agradeço também aos professores Dr. Cristiano Lima, Dr. Gerardo Rodriguez-Alvarado, e Dra. Adélica Xavier por todo apoio na realização deste trabalho.

Aos consultores Moacir Brito e Gilberto Nogueira, por todos os ensinamentos transmitidos e todo o auxílio durante as coletas e testes realizados.

Agradeço aos alunos Elismara, Acleide e Marcos Vinícius por toda colaboração durante todo esse tempo.

Agradeço a todos os professores do programa de Pós-Graduação de Fitopatologia que compartilharam seus conhecimentos e não mediram esforços para nos ensinar.

Agradeço aos pós-doutores, Dr. Lucas Magalhães de Abreu e Dra. Sarah Costa Guimarães pelo apoio no desenvolvimento prático e teórico deste trabalho.

À minha família por todo incentivo, amor e carinho ao longo da minha interminável jornada. Sem vocês esta conquista não teria sido alcançada.

Agradeço a todos do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungo, aos amigos queridos, de casa, de turma, de festas, de UFLA, de Lavras, que de uma forma ou de outra contribuíram para alegrar meu dia a dia. Sempre dedicados e companheiros me estimulando a completar a trajetória, agradeço e homenageio a todos.

RESUMO

Quatro espécies são conhecidas como agentes etiológicos da malformação floral e vegetativa da mangueira (MFV), sendo elas *Fusarium mangiferae*, *F. sterilihyphosum*, *F. tuiense* e *F. mexicanum*. Essas espécies pertencem ao complexo *Gibberella fujikuroi* (GFC) e apresentam características morfológicas muito semelhantes. Há evidências de que *F. proliferatum* também cause MFV, mas dados disponíveis ainda aguardam comprovação. No Brasil, os agentes etiológicos da doença são *F. tuiense* e *F. sterilihyphosum*, embora não se tenha certeza se estes são os únicos presentes no país. O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar, por meio de filogenia molecular e espectrometria de massas MALDI-TOF, espécies de *Fusarium* associadas à MFV da mangueira no Brasil e testar a patogenicidade. Dos isolados investigados, utilizando sequências parciais do gene *EEF1A*, vinte e nove foram identificados como *Fusarium tuiense*, três isolados representam a espécie *F. pseudocircinatum*, e um isolado do México e outro de Israel foram identificados como *F. mexicanum* e *F. mangiferae*, respectivamente. Os isolados CML 268 e CML 272 não agruparam com nenhuma das espécies conhecidas, baseado em sequências de *TUBB* e *CALM*. Os isolados CML 396 e CML 272, juntamente com os isolados de *F. pseudocircinatum*, *F. tuiense* e *F. proliferatum*, provenientes de outros hospedeiros, foram selecionados para realização do teste de patogenicidade. Todos os três isolados de *F. proliferatum* testados induziram sintomas de MFV. *F. pseudocircinatum* foi registrado pela primeira vez no Brasil, no entanto, não induziu sintomas de MFV quando inoculado. Os isolados CML 396 e CML 272 também são agentes etiológicos da MFV da mangueira. Os isolados submetidos à análise de proteômica por MALDI-TOF MS agruparam-se, no dendrograma gerado, de forma semelhante à topologia obtida na análise filogenética. A técnica mostrou-se como procedimento eficiente para separar espécies morfológicamente semelhantes e filogeneticamente próximas, e pode ser uma ferramenta auxiliar e uma alternativa a ser empregada em laboratórios de diagnose de doenças de plantas.

Palavras-chave: *Mangifera indica*. Complexo *Gibberella fujikuroi*. MALDI-TOF. Filogenia molecular.

ABSTRACT

Four species are known as pathogens of mango malformation disease (MMD): *Fusarium mangiferae*, *F. sterilihyphosum*, *F. tuiense* and *F. mexicanum*. These species are included in the *Gibberella fujikuroi* complex (GFC) and exhibit very similar morphological characteristics. There is evidence that *F. proliferatum* also causes MMD, but available data are still awaiting confirmation. In Brazil, the causal agents of MMD are *F. tuiense* and *F. sterilihyphosum*, although we are not sure if these are the only ones in the country. The aim of this study was to identify and characterize, through molecular phylogeny and mass spectrometry MALDI-TOF, MMD-associated *Fusarium* species in Brazil and to test the pathogenicity. Among the isolates investigated, using partial *EEF1A* gene sequence, twenty-nine were identified as *Fusarium tuiense*, three isolates represent *F. pseudocircinatum*, and one isolate from Mexico and another from Israel were identified as *F. mexicanum* and *F. mangiferae*, respectively. Isolates CML 268 and CML 272 didn't group with any of the known species based on *TUBB* and *CALM* gene sequences. Isolates CML 272 and CML 396, together with the isolates of *F. pseudocircinatum*, *F. tuiense* and *F. proliferatum* from other hosts, were selected for the pathogenicity test. All three isolates of *F. proliferatum* induced symptoms of MMD. *F. pseudocircinatum* is reported in Brazil for the first time, however, it did not cause MMD symptoms when inoculated. Isolates CML 396 and CML 272 also are MMD pathogens. The dendrogram generated based on proteomic analysis with MALDI-TOF MS grouped isolates in a similar topology as obtained by the phylogenetic analysis. The technique proved to be an efficient procedure to separate closely related species, and it can be an alternative tool to be used in diagnostic method.

Keywords: *Mangifera indica*. *Gibberella fujikuroi* complex. MALDI-TOF. Molecular phylogeny.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 ESTADO DA ARTE	11
2.1 Sintomatologia da malformação floral e vegetativa da mangueira	11
2.2 Caracterização molecular dos agentes etiológicos da malformação floral e vegetativa da mangueira.....	11
2.3 Disseminação e controle da doença	14
2.4 Caracterização de fungos por espectrometria de massa MALDI-TOF ...	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Obtenção de isolados	18
3.2 Culturas monospóricas e preservação	19
3.3 Extração de DNA e amplificação por PCR.....	20
3.4 Sequenciamento e análises filogenéticas	21
3.5 Testes de patogenicidade	25
3.6 Caracterização por espectrometria de massas MALDI-TOF	27
4 RESULTADOS	30
4.1 Coletas e obtenção dos isolados	30
4.2 Análises filogenéticas	31
4.3 Teste de patogenicidade.....	38
4.4 Caracterização por espectrometria de massas MALDI-TOF	40
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO.....	47
7 REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

A demanda por manga, principalmente nos países do Hemisfério Norte vem crescendo significativamente. O Brasil é um dos poucos países que produz manga na chamada entressafra mundial que se estende de outubro a março, período em que a fruta é bastante valorizada em função das festas de final de ano, tornando-se uma alternativa frutícola de excelentes perspectivas. Houve, em função disso, uma rápida expansão da cultura, que levou o país a ser o quarto maior exportador da fruta (FAO, 2009).

Com esta rápida expansão da mangicultura, cresceram também os problemas fitossanitários, como a doença da malformação floral e vegetativa, que se não for bem manejada, pode causar sérias perdas. As inflorescências malformadas não produzem frutos, levando à queda da produtividade (PLOETZ, 2001).

A ocorrência desta doença foi constatada pela primeira vez no distrito de Bihar, Índia, em 1891 (KUMAR; SINGH; BENIWAL, 1993). Posteriormente, foi descrita na maior parte das áreas de produção de manga na Índia, bem como na África (Egito, África do Sul, Sudão, Suazilândia e Uganda), nas Américas (América Central, Brasil, México e EUA) e na Ásia (Israel, Malásia e Paquistão) (ANJOS et al., 1998; FREEMAN; MAIMON; PINKAS, 1999; STEENKAMP et al., 2000; PLOETZ, 2001; BRITZ et al., 2002). No Brasil, a doença foi detectada nos estados da Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro e São Paulo (CUNHA; SANTOS FILHO; NASCIMENTO, 2000).

No início, muitas especulações surgiram sobre as causas da malformação floral e vegetativa da mangueira, e hoje, sabe-se que a doença é causada por quatro espécies de fungo do gênero *Fusarium* pertencentes ao complexo *Gibberella fujikuroi* (GFC), sendo eles *F. mangiferae*, *F.*

sterilihyphosum, *F. mexicanum* e *F. tuiense* (BRITZ et al., 2002, OTERO-COLINA et al., 2010; LIMA et al., 2012). Há evidências que *F. proliferatum* e *F. pseudocircinatum* possam ser agentes etiológicos da doença, mas dados disponíveis ainda aguardam comprovação (OTERO-COLINA et al., 2010; ZHAN et al., 2010).

Estas quatro espécies descritas são filogeneticamente próximas e apresentam características morfológicas muito semelhantes (OTERO-COLINA et al., 2010). Por esse motivo, gera-se demanda para o desenvolvimento de técnicas rápidas e precisas para identificá-las. A análise de proteômica por espectrometria de massas MALDI-TOF já foi utilizada para identificação de algumas espécies de fungos e bactérias com resultados promissores, já que o perfil de proteínas de cada espécie é único e pode servir como um marcador para sua identificação (MARINACH-PATRICE et al., 2009; DE RESPINIS et al., 2010; SANTOS et al., 2010; WICHT et al., 2012).

Neste trabalho, objetivou-se identificar e caracterizar, por meio de filogenia molecular e espectrometria de massas MALDI-TOF, espécies de *Fusarium* associadas à malformação floral e vegetativa (MFV) da mangueira, e testar a patogenicidade. Os objetivos específicos consistiram em i. isolar fungos do gênero *Fusarium* associados ao tecido vegetal com sintomas de malformação floral e vegetativa da mangueira (*Mangifera indica* L.), de diferentes regiões do Brasil; ii. analisar filogeneticamente isolados selecionados por meio de sequência parcial dos genes codificantes do EEF1A (fator de alongação 1 alfa), TUBB (beta tubulina) e CALM (calmodulina); iii. testar a patogenicidade de isolados selecionados em mudas de mangueira; iv. verificar se *F. proliferatum* é mesmo agente etiológico da malformação da mangueira, e v. caracterizar isolados conhecidos como agentes etiológicos da MFV da mangueira através da análise de proteômica por espectrometria de massas MALDI-TOF.

2 ESTADO DA ARTE

2.1 Sintomatologia da malformação floral e vegetativa da mangueira

O termo “malformação” refere-se ao crescimento anormal de inflorescências e ramos vegetativos. A malformação da mangueira (*Mangifera indica*) pode afetar tanto os tecidos florais ou vegetativos da planta (PLOETZ, 2001), sendo que a malformação vegetativa (MV) é mais comum em viveiros, embora possa ocorrer também em plantas adultas. A MV caracteriza-se pela formação de brotos disformes nas gemas apicais e axilares, com internódios mais curtos e folhas anãs, que são mais frágeis e quebradiças. Os brotos não se expandem completamente, comprimidos numa estrutura compacta, com aspecto de “cachos” (PLOETZ; FREEMAN, 2009).

Na malformação floral (MF), as inflorescências adquirem a aparência de um cacho compacto e não formam frutos, diminuindo a produtividade das plantas. Os eixos primários e secundários nas panículas são encurtados e mais espessos, com maior número de ramificações. As panículas de mangueira malformadas produzem até três vezes o número normal de flores e têm um aumento na proporção de flores masculinas, além de produzirem flores menores e distorcidas (PLOETZ; FREEMAN, 2009).

2.2 Caracterização molecular dos agentes etiológicos da malformação floral e vegetativa da mangueira

Atualmente, são descritas quatro espécies de fungo do gênero *Fusarium* como agentes etiológicos da malformação floral e vegetativa (MFV) da mangueira, que incluem *F. mangiferae*, *F. sterilihyphosum*, *F. mexicanum* e

F. tupiense (BRITZ et al., 2002, OTERO-COLINA et al., 2010; LIMA et al., 2012).

A primeira ocorrência da doença foi constatada na Índia há mais de um século, e vários fatores foram citados como sua causa: ácaros, problemas nutricionais, desbalanços hormonais, vírus, fitoplasmas, fungos e fatores desconhecidos (KUMAR; SINGH; BENIWAL, 1993). A associação da MFV da mangueira a uma espécie de fungo do gênero *Fusarium* só foi descrita em 1966, e foi reconhecido como *F. moniliforme* (SUMMANWAR; RAYCHAUDHURI; PHATAK, 1966). Essa espécie era considerada, até então, a única espécie da seção *Liseola*, a qual os fungos nela classificados se caracterizam por produzir microconídios em cadeias e/ou falsas cabeças e macroconídios, mas que não produzem clamidósporos (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Mais tarde, Booth et al. (1971) utilizaram a morfologia das células conidiogênicas para separar *F. moniliforme*, que apresentavam somente monofiálides, da sua variedade *F. moniliforme* var. *subglutinans*, com presença de polifiálides, e mais tarde, Varma et al. (1974) demonstraram que a variedade estava associada à doença (VARMA et al., 1974).

Baseado em critérios morfológicos, um novo sistema de classificação para o gênero *Fusarium* foi proposto e, devido à presença de polifiálides e microconídios somente em falsas cabeças, *F. subglutinans* foi reconhecida como uma espécie e como o agente etiológico da malformação da mangueira (NELSON; TOUSSOUN; MARASAS, 1983).

F. subglutinans é uma espécie do complexo *Gibberella fujikuroi* (GFC), complexo que inclui as espécies de *Fusarium* da seção *Liseola*. Através de comparações nas sequências de DNA e análises filogenéticas, percebeu-se que, na verdade, *F. subglutinans* representa várias populações com características morfológicas muito semelhantes (*F. subglutinans* sensu lato), associadas a diversas plantas hospedeiras, cada uma das quais representando

uma linhagem distinta no complexo *G. fujikuroi* (O'DONNELL; CIGELNIK; NIRENBERG, 1998; O'DONNELL et al., 2000).

A partir destes estudos, foram desenvolvidos trabalhos envolvendo isolados de *F. subglutinans* sensu lato, agentes causais da malformação da mangueira, baseados em sequências parciais de genes, a fim de acomodar filogeneticamente linhagens distintas (FREEMAN; MAIMON; PINKAS, 1999; STEENKAMP et al. 2000). Britz et al. (2002) descreveram as espécies *F. mangiferae* e *F. sterilihyphosum* como agentes etiológicos da doença, com base em análises de sequências parciais dos genes beta tubulina e histona H3. Além disso, *F. sterilihyphosum* se diferencia morfologicamente de *F. mangiferae* por ter como principal marcador a presença de uma hifa estéril espiralada no micélio. *F. mangiferae* ocorre nos países produtores de manga da África e Ásia, porém, na América, a espécie foi registrada somente no sul da Flórida, e *F. sterilihyphosum* foi encontrado somente na África do Sul e Brasil (BRITZ et al., 2002; LIMA et al., 2009b).

No Brasil, além de análises filogenéticas com sequências parciais dos genes *EEF1A* (fator de alongação 1 alfa) e *TUBB* (beta tubulina), outras ferramentas, como marcadores AFLP e grupos de compatibilidade vegetativa (VCG), foram utilizadas para comparar isolados associados à MFV da mangueira. Testes de patogenicidade foram realizados e permitiram concluir que estes isolados representavam uma nova linhagem, também patogênica à mangueira (LIMA et al., 2009 a; b). Na sequência, *F. tuiense* foi formalmente descrito como principal agente etiológico da MFV da mangueira no Brasil, representando uma espécie filogenética e biológica no GFC (LIMA et al., 2012). Um pouco depois, esta espécie teve seu primeiro registro no Senegal (SENGHOR et al., 2012).

Otero-Colina et al. (2010) também descreveram uma nova espécie de *Fusarium* associada à doença no México, conhecida como *F. mexicanum*. Foram

realizadas análises filogenéticas de cinco regiões gênicas, que evidenciaram a formação de um clado distinto, além de análises morfológicas e testes de patogenicidade, provando realmente ser uma espécie nova. Neste mesmo trabalho, outras três linhagens distintas foram identificadas, dando evidência que podem haver ainda outras espécies além das conhecidas, associadas à MFV. Até o momento *F. mexicanum* está restrito ao México.

Alguns trabalhos indicam ainda que *F. proliferatum* é outro agente etiológico da MFV da mangueira (MARASAS et al., 2006; ZHAN et al., 2010). *F. proliferatum* é considerada a principal espécie associada à MFV da mangueira encontrada na Malásia (John Leslie, comunicação pessoal). Contudo, os estudos ainda não foram conclusivos, carecendo de análises filogenéticas para confirmar a identidade do isolado (ZHAN et al., 2010), ou em que os postulados de Koch ainda não foram realizados (MARASAS et al., 2006).

F. pseudocircinatum também foi encontrado em tecidos de mangueira com sintomas malformação no México (OTERO-COLINA et al., 2010), mas testes de patogenicidade também não foram realizados. De acordo com trabalhos realizados com isolados coletados no Brasil, não foram recuperados isolados de *F. pseudocircinatum* em associação a tecidos com malformação (LIMA et al., 2009; LIMA et al., 2012).

2.3 Disseminação e controle da doença

Algumas das formas do patógeno da malformação da mangueira se dispersar para novas áreas são através de enxertos ou mudas de mangueiras infectadas (KUMAR; SINGH; BENIWAL, 1993).

Segundo Youssef et al. (2007), as espécies de *Fusarium*, que causam a MFV da mangueira não são habitantes típicas do solo, e por isso, essa não é a principal via de dispersão da doença.

Os mesmos autores comprovaram também que este não é um fungo sistêmico, testando sua translocação das raízes para os meristemas e sementes. Em pomares com plantas infectadas, a superfície de todos os frutos foi contaminada, porém a presença do fungo não foi detectada no seu interior. Isto indica que o inóculo é transportado pelo ar ou por vetor, e que frutos infectados devem ser descontaminados antes do armazenamento ou do transporte, bem como os equipamentos utilizados para processar e armazenar produtos, especialmente se forem reutilizados em pomares livres de patógeno (YOUSSEF et al., 2007).

Até o momento, não há produtos químicos eficazes disponíveis para o controle da MFV da mangueira e que tenham efeito curativo. A medida padrão inclui sanitização, em que panículas infectadas e ramos (três nós abaixo das panículas infectadas) são removidos e destruídos para reduzir a propagação e acúmulo de inóculo do patógeno. Além disso, outra medida eficaz para evitar a propagação do patógeno é manter um ambiente livre do mesmo utilizando mudas saudáveis (PLOETZ et al., 2002).

2.4 Caracterização de fungos por espectrometria de massa MALDI-TOF

Atualmente, o paradigma taxonômico aceito para a identificação de fungos é a reconstrução filogenética com base no sequenciamento de vários genes (TAYLOR et al., 2000). Isso ocorre porque a evolução progride a um ritmo muito mais rápido a nível molecular que a nível morfológico, o que torna cada vez mais difícil reconhecer táxons morfológicamente definidos. Em *Fusarium*, o número de caracteres fenotípicos é pequeno em relação ao número de espécies indicadas por filogenia molecular (DE RESPINIS et al., 2010; LIMA et al., 2009b)

Desta forma, novas aplicações surgem para a identificação de fungos, dentre elas, a *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) (DE RESPINIS et al. 2009; MARKLEIN et al., 2009). Inicialmente, os estudos foram realizados para identificação de fungos relevantes na área médica, todavia, a técnica pode também ser aplicada com sucesso para a identificação de organismos fitopatogênicos. A utilização de espectrometria de massas com MALDI-TOF é confiável, rápida e barata em termos de trabalho e de consumo (WICHT et al., 2012).

Os resultados alcançados por espectrometria de massas MALDI-TOF podem fornecer duas ferramentas taxonômicas importantes. Por um lado, a técnica permite a análise de macromoléculas, que refletem a estrutura do genoma, tornando este método útil para auxiliar a determinação do limite de espécies. Por outro lado, e mais importante, o MALDI-TOF MS representa uma alternativa válida para diagnóstico de espécies de fungos, podendo ser utilizada como um método suplementar para a identificação de agentes fitopatogênicos (DE RESPINIS et al., 2010; WICHT et al., 2012).

Basicamente, o MALDI, em português, “Ionização e dessorção a laser assistida por matriz” é uma técnica de ionização branda utilizada em espectrometria de massa, permitindo a análise de grandes moléculas orgânicas, e neste caso, proteínas de fungos filamentosos. A amostra é co-cristalizada com uma matriz sólida que pode absorver o comprimento de onda da luz emitida por um laser.

Normalmente, a matriz e amostra são misturadas em uma sonda, que é inserida em um sistema de vácuo, e após a irradiação com laser de UV, formam-se íons em fase gasosa que são dirigidos para o analisador de massa (LAIKO; BALDWIN; BURLINGAME, 2000; GLISH; RICHARD, 2003).

Após a formação destes íons pelo MALDI, eles adentram ao TOF, em português “tempo de voo”, e recebem um pulso de energia igual, mas são acelerados de maneiras diferentes, devido à diferença da relação massa/carga (m/z), e chegam ao detector em tempos diferentes. Os íons com menor m/z terão maior velocidade e chegarão primeiro ao detector, e assim por diante. Desta forma, pela medida do tempo de voo dos íons no tubo, pode-se deduzir sua m/z , analisando assim compostos de massa baixa até macromoléculas (GLISH; RICHARD, 2003).

Os picos formados no espectro gerado pelo MALDI são relacionados às massas das proteínas expressas pelo genoma, e por isso, essa técnica pode servir como um marcador para identificação de espécies de *Fusarium* (DE RESPINIS et al., 2010; MARINACH-PATRICE et al., 2009).

Como já foi dito, existem quatro espécies de *Fusarium* como patógenos da malformação da mangueira. As características morfológicas dessas espécies são bem semelhantes, principalmente entre *F. mexicanum*, *F. tuiense* e *F. sterilihyphosum*. O método mais utilizado para distingui-las é através de análises de sequências parciais de alguns genes, dentre eles *EEF1A*, que apresenta melhor resolução na análise filogenética (BRITZ et al., 2002, OTERO-COLINA et al., 2010; LIMA et al., 2012). Porém, os métodos moleculares demandam certo tempo para preparação das amostras e custo elevado. Por isso, a utilização da análise proteômica por espectrometria de massas MALDI-TOF para identificação destas espécies pode ser uma ferramenta auxiliar e uma alternativa a ser empregada em laboratórios de diagnose de doenças de plantas (SANTOS et al., 2010; WICHT et al., 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de isolados

Para obtenção de isolados de *Fusarium* associados à MFV da mangueira, duas coletas foram realizadas em dois estados do Brasil que se destacam na produção de manga. A primeira coleta foi realizada em outubro de 2010 no norte de Minas Gerais, em fazendas produtoras de manga localizadas em Janaúba e Jaíba. Cinco fazendas foram visitadas e em todas foi constatada baixa incidência de plantas com sintomas de malformação, pois seu manejo era bem realizado. As principais cultivares produzidas eram Tommy Atkins e Palmer, além de algumas plantas da cultivar Haden. A outra coleta ocorreu em abril de 2011 na cidade de Petrolina, no estado de Pernambuco, onde duas fazendas foram visitadas.

Foram coletadas inflorescências de mangueira (*Mangifera indica* L.) com sintomas de malformação floral e gemas com malformação vegetativa. As inflorescências, brotos e folhas foram retirados, e somente o eixo principal foi utilizado para isolamento. Somente uma inflorescência ou um broto com sintomas de malformação foi coletado por planta, obtendo-se somente um isolado por planta.

Cada eixo foi fragmentado (discos de 3 mm) e desinfestado, seguindo o procedimento descrito a seguir: imersão em álcool etílico (70%) por 30 segundos, hipoclorito de sódio (2%) pôr 1 minuto e três lavagens em água destilada esterilizada, nesta sequência. Antes de proceder com o plaqueamento, os fragmentos desinfestados foram colocados em papel de filtro esterilizado para a retirada do excesso de água. Foram colocados 4 fragmentos em cada placa de poliestireno de 60mm contendo meio de cultura malte 2% (MA2%) e os antibióticos estreptomicina e cloranfenicol, que foram deixadas em temperatura ambiente até o surgimento de colônias fúngicas com características do gênero *Fusarium*. O micélio fúngico foi transferido para outra placa estéril contendo

meio de cultura SNA visando a obtenção de culturas puras. Além dos isolados obtidos na coleta, foram utilizados neste estudo, isolados de *Fusarium* associados à MFV da mangueira, depositados na Coleção Micológica de Lavras, que já tinham sido coletados de diferentes regiões do Brasil e que não haviam sido incluídos em trabalhos anteriores.

3.2 Culturas monospóricas e preservação

Culturas monospóricas foram obtidas a partir dos isolados por micromanipulação executada em microscópio devidamente adaptado. Uma agulha de vidro, com ponta extremamente fina, foi acoplada ao condensador do microscópio. Com auxílio de uma alça, os esporos foram transferidos para um fragmento de ágar, e colocado na extremidade de uma lâmina de vidro com bordas laterais adaptadas, que foi levada ao microscópio de cabeça para baixo. Na outra extremidade da lâmina foram colocados fragmentos de ágar estéril. Com movimento da agulha para baixo e para cima, foi retirado um único microconídio, o qual foi transportado para um dos fragmentos de ágar estéril. Cada fragmento foi transferido para uma placa de poliestireno com meio sólido, até o desenvolvimento de uma colônia monospórica.

Para preservação das culturas, blocos de meio de cultura SNA, com cultura esporulada do fungo, foram transferidos para tubos do tipo Eppendorf®. As culturas foram preservadas ainda por método de criopreservação em freezer -80°C. Os isolados foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio completo (MC) e uma suspensão de esporos foi preparada em 15% glicerol e transferida para criotubos. Os criotubos foram armazenados em freezer -80°C, mantendo assim a estabilidade fisiológica e genética por vários anos. As culturas obtidas foram depositadas na Coleção Micológica de Lavras (CML).

3.3 Extração de DNA e amplificação por PCR

Culturas monospóricas cultivadas em meio líquido MA 2% por três dias foram filtradas e submetidas à extração do DNA genômico usando o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit® (Promega, Madison, EUA). As concentrações de DNA foram medidas usando NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA).

Como foi obtido um grande número de isolados nas duas últimas coletas, uma seleção foi realizada, sequenciando-se um número menor de isolados por fazenda, e de cultivares distintas. Além dos isolados provenientes dessas coletas, foram utilizados outros que já estavam depositados na Coleção Micológica de Lavras pelo Dr. Cristiano Souza Lima e que ainda não tinham sido estudados (Tabela 1 – página 23).

As reações de PCR foram realizadas utilizando o kit Master Mix GoTaq® Incolor (Promega) no termociclador My Cycler™ (Bio-Rad, Hercules, EUA). Fragmentos de aproximadamente 600-630 pb do gene *EEF1A* de 39 isolados de *Fusarium*, obtidos de mangueira com sintomas de malformação (Tabela 1 – página 23), foram amplificados utilizando os *primers* específicos Ef-1 (forward; 5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') e Ef-2 (reverse; 5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') e condições de ciclo de acordo com Geiser et al. (2004). Após uma análise filogenética com o gene *EEF1A* dos isolados, foi realizada uma seleção daqueles isolados que poderiam ser linhagens diferentes das espécies já descritas no Brasil até o momento, e os genes *TUBB* e *CALM* foram sequenciados pra estes isolados selecionados (Tabela 1 – página 23). Para a amplificação do fragmento do gene *TUBB* de aproximadamente 540 pb, foram utilizados os *primers* T1 (forward; 5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3') e T2 (reverse; 5'-

TAGTGACCCTTGGCCCAGTTG-3') e condições de ciclo de acordo com O'Donnell e Cigelnik (1997), e para a amplificação do fragmento do gene CALM de aproximadamente 680 pb, foram utilizados os *primers* CL1 (forward; 5'-GA(GA)T(AT)CAAGGAGGCCTTCTC-3') e CL2 (reverse; 5'-TTTTTGCATCATGAGTTGGAC-3') e condições de ciclo de acordo com O'Donnell et al. (2000).

Os fragmentos amplificados foram purificados com o kit Invisorb[®] Fragment Clean Up (Stratec Molecular, Berlim, Alemanha). O sequenciamento dos fragmentos gênicos foi realizado em sequenciador automático MegaBACE 500 (Amersham Biosciences, São Paulo, Brasil) no Laboratório de Genômica da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.

3.4 Sequenciamento e análises filogenéticas

Fragmentos dos genes amplificados por PCR foram sequenciados nas direções sense e anti-sense, utilizando os *primers* descritos anteriormente. Os eletroferogramas foram analisadas visualmente e as sequências consenso foram montadas utilizando SeqAssem[®] ver. 07/2008 (SequentiX - Digital DNA Processing, Klein Raden, Germany). Os alinhamentos múltiplos das sequências dos isolados de *F. subglutinans* sensu lato associados a tecidos da mangueira e as análises filogenéticas foram realizadas com o programa MEGA 5[®] (TAMURA et al., 2011). As sequências foram alinhadas usando MUSCLE implementado no MEGA 5. As árvores filogenéticas geradas a partir da análise para cada gene e da análise combinada dos três genes foram construídas com o critério de máxima verossimilhança, utilizando o modelo de distância Kimura 2-parâmetros (K2P). As análises de *bootstrap* foram baseadas em 1000 repetições. Todas as posições contendo “gaps” foram eliminadas das análises

(PHOULIVONG et al., 2010). A espécie *Fusarium oxysporum* foi utilizada como *outgroup* na árvore gerada com sequências do gene *EEF1A* e *Fusarium mangiferae* como *outgroup* das árvores geradas com sequências do gene *TUBB* e *CALM* e a combinada com sequências dos três genes (*EEF1A*, *CALM* e *TUBB*).

Tabela 1 Isolados analisados no presente estudo

Espécie	Código do isolado ^a	Cultivar ^b	Origem	EEF1A ^c	TUBB ^d	CALM ^e
<i>Fusarium</i> sp.	CML 268	MF/ <i>M. Indica</i>	BRASIL, SP, Jaguariúna	x	x	x
<i>Fusarium</i> sp.	CML 271	MV/ <i>M. Indica</i>	BRASIL, CE, Pentecoste	x		
<i>Fusarium</i> sp.	CML 272	MF/ <i>M. Indica</i>	BRASIL, ES, Brejetuba	x	x	x
<i>F. pseudocircinatum</i>	CML 273	MF/ <i>M. Indica</i>	BRASIL, MG, Janaúba	x		
<i>F. sterilihyphosum</i>	CML 283	MF/ <i>M. Indica</i>	BRASIL, SP, Piracicaba	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 349	MF/ <i>M. Indica</i>	BRASIL, BA, Livramento	x		
<i>Fusarium</i> sp.	CML 0379	MF/ <i>M. Indica</i>	BRASIL, CE, Tururu	x		
<i>F. pseudocircinatum</i>	CML 0380	MF/ <i>M. Indica</i>	BRASIL, CE, Pentecoste	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 0391	MF/ <i>M. Indica</i>	BRASIL, CE, Cruz	x		
<i>Fusarium</i> sp.	CML 0396	MF/ <i>M. Indica</i>	BRASIL, MG, Nova Porteirinha	x		
<i>F. pseudocircinatum</i>	CML 0399	MV/ <i>M. Indica</i>	BRASIL, MG, Guidoval	x		
<i>F. mangiferae</i>	CML 408=BBA 70829	ND/ <i>M. Indica</i>	ISRAEL	x		
<i>F. mexicanum</i>	CML 411=BBA 71282	ND/ <i>M. Indica</i>	MEXICO	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 531	MV/Atkins	BRASIL, PE, Petrolina	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 532	MF/Atkins	BRASIL, PE, Petrolina	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 533	MF/Atkins	BRASIL, PE, Petrolina	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 534	MF/Atkins	BRASIL, PE, Petrolina	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 535	MF/Kent	BRASIL, PE, Petrolina	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 537	SS/Kent	BRASIL, PE, Petrolina	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 540	ND/ <i>M. Indica</i>	MEXICO	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 747	ND/ <i>M. Indica</i>	ND	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 748	ND/ <i>M. Indica</i>	ND	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 2469	MF/Palmer	BRASIL, MG, Janaúba	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 2470	MV/Palmer	BRASIL, MG, Janaúba	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 2471	MF/Palmer	BRASIL, MG, Janaúba	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 2472	MF/Palmer	BRASIL, MG, Jaíba	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 2473	MF/Palmer	BRASIL, MG, Jaíba	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 2474	MF/Haden	BRASIL, MG, Jaíba	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 2475	MF/Haden	BRASIL, MG, Jaíba	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 2476	MF/Palmer	BRASIL, MG, Janaúba	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 2477	MV/Palmer	BRASIL, MG, Janaúba	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 2478	MF/Palmer	BRASIL, MG, Janaúba	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 2479	MF/Haden	BRASIL, MG, Janaúba	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 2480	MF/Palmer	BRASIL, MG, Jaíba	x		

“Tabela 1, continuação”

Espécie	Código do isolado ^a	Cultivar ^b	Origem	EEF1A ^c	TUBB ^d	CALM ^e
<i>F. tuiense</i>	CML 2481	MF/Ubá	BRASIL, MG, Jaíba	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 2482	MF/Atkins	BRASIL, PE, Petrolina	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 2483	MV e MF/Atkins	BRASIL, PE, Petrolina	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 2484	MF/Atkins	BRASIL, PE, Petrolina	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 2485	MF/Atkins	BRASIL, PE, Petrolina	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 2486	MF/Atkins	BRASIL, PE, Petrolina	x		
<i>F. tuiense</i>	CML 2487	MV/Keitt	BRASIL, PE, Petrolina	x		

^a Abreviações das coleções de culturas: CML: Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; BBA: Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlim, Alemanha.

^b MF - malformação floral, ND: não definido, MV: malformação vegetativa, SS: sem sintoma.

^c EEF1A: fator de alongação 1alfa

^d TUBB: beta tubulina

^e CALM: calmodulina

3.5 Testes de patogenicidade

Os testes de patogenicidade foram realizados na Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes) – Campus Janaúba, em colaboração com a professora Dra. Adelica Xavier e o consultor técnico Moacir Brito.

Mudas de mangueira da cultivar Palmer com 6 meses de enxertia foram transferidas para potes de 10L e colocadas em casa de vegetação com UR de 50 a 60% e temperatura de 22°C (noturna) a 30°C (diurna). Antes de iniciar o teste, foi necessário fazer um processo de indução floral das mangueiras. O objetivo desta etapa é deixar todas as mudas em um mesmo estágio fisiológico (início do processo de floração) antes da inoculação.

O processo de indução floral consistiu na aplicação de paclobutrazol (PBZ) nas mudas, que inibe a síntese da giberelina e cessa o crescimento vegetativo, com dose de 0,25g ia/m de diâmetro de copa; e 30 dias após aplicação do PBZ, seguiram-se três pulverizações com sulfato de potássio com intervalos de 12 dias, seguida da redução da lâmina de água, e aos 70 dias da aplicação do PBZ, foram realizadas quatro pulverizações com nitrato de cálcio (2%) (Adaptado de ROZANE et al., 2004). O nitrato de cálcio promove a quebra da dormência das gemas, para que se diferenciem e o processo de florescimento se inicie. A inoculação foi realizada antes da primeira aplicação com nitrato de cálcio, nas gemas ainda dormentes.

Com o objetivo de verificar a patogenicidade e completar os Postulados de Koch, nove isolados selecionados de *Fusarium* foram inoculados (Tabela 2 – página 28). A escolha dos isolados para realização do teste baseou-se nos dados da análise filogenética. Também foram utilizados três isolados de *F. proliferatum* da Coleção Micológica de Lavras (CML), provenientes dos hospedeiros abacaxi, milho e soja (Tabela 2 – página 28) para serem incluídos no teste, uma vez que existem relatos que podem ser patogênicos à mangueira

(MARASAS et al., 2006, ZHAN et al., 2010). Foi selecionado também um isolado de *F. tuiense* (CML 345), já testado previamente, como patogênico para validação do teste (LIMA et al., 2009).

A preparação do inóculo foi realizada pelo cultivo dos isolados em tubos de ensaio contendo meio OA e incubados a 23 °C por sete dias com regime de luz de 12 horas. Após este período, foi adicionada água destilada esterilizada em cada tubo. Em seguida, a suspensão de esporos foi ajustada para uma concentração de 5×10^7 conídios.mL⁻¹ (FREEMAN; MAIMON; PINKAS, 1999).

Antes da inoculação, tecidos próximos da região meristemática de todas as mudas foram desinfestados com hipocloritos de sódio (3 %) e plaqueados em meio MA2%, com o objetivo de verificar a presença de *Fusarium* colonizando os tecidos das mudas de mangueira. Só foram inoculadas as mudas das quais não foi isolada nenhuma espécie de *Fusarium*. A inoculação foi realizada pela aplicação, com o auxílio de uma pipeta, de uma suspensão de 20µL de conídios em 4 a 5 gemas laterais ou apicais dormentes de cada planta. A gota da suspensão foi colocada nas gemas após pequenos ferimentos de aproximadamente 1mm de profundidade serem feitos com uma agulha. Ao redor da gema inoculada, por um período de 24 horas, foi mantido um pedaço de algodão embebido com água estéril, e as mudas foram colocadas em câmara úmida por um dia (FREEMAN; MAIMON; PINKAS, 1999; LIMA et al., 2009b; OTERO-COLINA et al., 2010). Cada isolado foi inoculado em 6 mudas. Nas mudas testemunhas, foi inoculado apenas água destilada esterilizada. O isolado CML 398, *Fusarium semitectum*, que é considerado um fungo não patogênico, foi também inoculado para servir como controle negativo para a malformação juntamente com as mudas inoculadas somente com água estéril.

Após a inoculação, as mudas foram avaliadas semanalmente quanto ao surgimento de sintomas, sendo consideradas doentes aquelas que apresentaram

superbrotamento e das quais foi possível recuperar o isolado inoculado. Para tal, os tecidos doentes das mudas com sintoma foram desinfestados e plaqueados em MA2%. Os isolados que causaram malformação em pelo menos uma muda foram considerados potencialmente patogênicos.

3.6 Caracterização por espectrometria de massas MALDI-TOF

Os isolados de *Fusarium*, que causam da malformação floral e vegetativa da mangueira foram reativados da Coleção Micológica de Lavras (CML) (Tabela 3 – página 29), crescidos em meio de cultura extrato de malte 2% (MA2%) a 25°C por 72 h. Estas espécies foram selecionadas para representar a diversidade das espécies associadas à MFV da mangueira, e que são filogeneticamente próximas e com características morfológicas muito semelhantes.

Os isolados ativados em meio de cultura MA2% foram transferidos, em duplicata, para meio de cultura de aveia (OA), em placas de poliestireno de

60 mm, e incubados a 23 °C, sob fotoperíodo de 12 h de luz branca, durante sete

dias.

A obtenção de perfis de proteínas dos isolados de *Fusarium* por espectrometria de massas MALDI-TOF foi realizada no Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), em parceria com o professor Edson Rodrigues Filho.

Aproximadamente 1 mL de água destilada foi adicionada a placa com o micélio, o qual foi raspado delicadamente com ajuda de uma alça de drigalsky. A suspensão foi transferida pra microtubos tipo eppendorf, centrifugados por 30 s a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foram adicionados 20 μ L de TFA 1% e 20 μ L de acetonitrila. Aproximadamente 2 μ L desse ressuspendido foram depositados em poços de uma placa de amostras de aço polido (MPT384 target plate, Bruker Daltonics, Bremen, DE). Então, 2 μ L de uma solução de matriz contendo 20 mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico (HCCA) em água:acetonitrila (1:1) contendo 0,1% de ácido trifluoroacético foi imediatamente adicionada à amostra. Após a aplicação da matriz, as amostras ficaram em temperatura ambiente para cristalização do HCCA.

Os espectros de massa foram obtidos em um sistema Autoflex Speed TOF/TOF composto por uma fonte de ionização MALDI e um analisador de massas por tempo de voo (TOF), controlado pelo software Flex Control 3.3 (Bruker Daltonics, Bremen, DE). Foram adquiridos e acumulados até 500 espectros por cada amostra depositada na placa, no intervalo de massa de 2500 a 20000 DA, dando origem a um espectro composto.

Cada repetição biológica foi aplicada em três poços da placa e cada poço foi avaliado três vezes. Um total de 18 espectros compostos (2 placas x 3 poços/placa x 3 avaliações/poço) foi adquirido para cada isolado. Os espectros obtidos de cada isolado foram carregados no programa MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics), processados utilizando algoritmos padrão contidos no software e usados para montagem de um espectro principal (em inglês Main SPectrum ou MSP), onde picos presentes em pelo menos 25% dos 18 espectros compostos de cada isolado foram incorporados ao respectivo MSP. Os MSPs foram identificados com os códigos dos respectivos isolados e submetidos à análise multivariada de classificação para a obtenção de um dendrograma.

Tabela 2 Lista de isolados utilizados no teste de patogenicidade

Tratamentos	Espécie	Coleção ^a	Hospedeiro
Tratamento 1 (T1)	<i>F. tuiense</i>	CML 345	<i>M. indica</i>
Tratamento 2 (T2)	<i>F. pseudocircinatum</i>	CML 380	<i>M. indica</i>
Tratamento 3 (T3)	<i>F. pseudocircinatum</i>	CML 273	<i>M. indica</i>
Tratamento 4 (T4)	<i>F. proliferatum</i>	CML 212	<i>Ananas comosus</i>
Tratamento 5 (T5)	<i>F. proliferatum</i>	CML 897	<i>Zea mays</i>
Tratamento 6 (T6)	<i>F. proliferatum</i>	CML 427	<i>Glycine max</i>
“Tabela 2, continuação”			
Tratamentos	Espécie	Coleção ^a	Hospedeiro
Tratamento 7 (T7)	<i>Fusarium</i> sp.	CML 272	<i>M. indica</i>
Tratamento 8 (T8)	<i>Fusarium</i> sp.	CML 396	<i>M. indica</i>
Tratamento 9 (T9)	<i>F. semitectum</i>	CML 398	<i>M. indica</i>
Tratamento 10 (T10)	Testemunha		

^a CML: Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Tabela 3 Lista de isolados utilizados para análise de MALDI-TOF

Espécie	Coleção ^a	Cultivar ^b	Origem
<i>F. tuiense</i>	CML 262 (NRRL 53984)	MF/ <i>M. indica</i>	BRASIL, MG, Lavras
<i>F. tuiense</i>	CML 265 (NRRL 53985)	MF/Keitt	BRASIL, MG, Uberlândia
<i>F. tuiense</i>	CML 266 (NRRL 53986)	MF/Vandik	BRASIL, MG, Uberlândia
<i>F. tuiense</i>	CML 267 (NRRL 53987)	MF/ <i>M. indica</i>	BRASIL, SP, Jaguariúna
<i>F. tuiense</i>	CML 279 (NRRL53988)	MF/ <i>M. indica</i>	BRASIL, MG, S. João Del Rei
<i>F. tuiense</i>	CML 281 (NRRL 53990)	MF/ <i>M. indica</i>	BRASIL, MG, Caxambu
<i>F. tuiense</i>	CML 350 (NRRL 53992)	MF/ <i>M. indica</i>	BRASIL, MT, Várzea Grande
<i>F. tuiense</i>	CML 385 (NRRL 53994)	MF/ Vandik	BRASIL, MG, Nova Porteirinha
<i>F. tuiense</i>	CML 386 (NRRL 53995)	MF/ Atkins	BRASIL, CE, Almofala
<i>F. tuiense</i>	CML 389 (NRRL 53996)	MF/ Atkins	BRASIL, BA, Juazeiro
<i>F. tuiense</i>	CML 412	ND/ <i>M. indica</i>	ND
<i>F. tuiense</i>	CML 2473	MF/Palmer	BRASIL, MG, Jaíba
<i>F. tuiense</i>	CML 2474	MF/Haden	BRASIL, MG, Jaíba
<i>F. tuiense</i>	C ML2475	MF/Haden	BRASIL, MG, Jaíba
<i>F. tuiense</i>	CML 2477	MV/Palmer	BRASIL, MG, Janaúba
<i>F. sterilihyphosum</i>	CML 282	MF/ <i>M. indica</i>	BRASIL, MG, Itumirim
<i>F. sterilihyphosum</i>	CML 283	MF/ <i>M. indica</i>	BRASIL, SP, Piracicaba
<i>F. sterilihyphosum</i>	CML 401	MF/ <i>M. indica</i>	BRASIL, MG, Lavras
<i>F. sterilihyphosum</i>	CML 414=MRC 2802	ND/ <i>M. indica</i>	ÁFRICA DO SUL
<i>F. sterilihyphosum</i>	CML 415= KSU 11782= MRC 8101	ND/ <i>M. indica</i>	ÁFRICA DO SUL
<i>F. mangiferae</i>	CML 406=BBA 69662	ND/ <i>M. indica</i>	INDIA
<i>F. mangiferae</i>	CML 408=BBA 70829	ND/ <i>M. indica</i>	ISRAEL
<i>F. mangiferae</i>	CML 409=BBA 70896	ND/ <i>M. indica</i>	EGITO
<i>F. mexicanum</i>	CML 411=BBA 71282	ND/ <i>M. indica</i>	MEXICO
<i>F. mexicanum</i>	NRRL 53135	MV/Haden	MEXICO, Michoacan
<i>F. mexicanum</i>	NRRL 53143	MF/Haden	MEXICO, Michoacan
<i>F. mexicanum</i>	NRRL 53147	MV/Haden	MEXICO, Michoacan

^a CML: Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; NRRL: National Center for Agricultural Utilization

Research, Peoria, Illinois, USA; BBA: Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlim, Alemanha; KSU: Kansas State University, Manhattan, Kansas, EUA; MRC: Medical Research Council, Tygerberg, África do Sul;

^b MF: malformação floral, ND: não definido, MV: malformação vegetativa.

4 RESULTADOS

4.1 Coletas e obtenção dos isolados

Os resultados das coletas, realizadas nas duas regiões do Brasil, são mostrados na tabela 4.

Tabela 4 Número de isolados obtidos nas coletas realizadas em MG e PE

Cidade	Fazenda	Variedade	Número de isolados
Janaúba MG	Faz. Baixa da Colônia	Palmer	11
Janaúba MG	Faz. Baixa da Colônia	Haden	2
Janaúba MG	Faz. Baixa da Colônia	Tommy	1
Janaúba MG	Faz. Agrogerais	Palmer	9
Janaúba MG	Faz. FIM	Palmer	10
Jaíba MG	Faz. Frutil	Palmer	5
Jaíba MG	Faz. PJ	Haden	8
Petrolina PE	Faz. Frutavi	Tommy	60
Petrolina PE	ND	Keit	27
TOTAL:			133

Durante a realização deste trabalho, foram recuperados 133 isolados de *Fusarium* com características de *F. subglutinans* sensu lato associados à malformação floral e vegetativa da mangueira. Além disso, foram utilizados 22 isolados, consistindo aqueles entre CML 268 a CML 748 (Tabela 1 – página 23) coletados de plantas com sintomas de MFV da mangueira, de várias regiões do Brasil e de outros países, provenientes de coletas realizadas entre 2003 e 2004 e que ainda não haviam sido caracterizados e identificados.

4.2 Análises filogenéticas

As sequências de DNA de *EEF1A*, *TUBB* e *CALM* de *Fusarium* spp. associados à MFV da mangueira foram comparadas com as sequências de isolados de outras espécies do complexo *Gibberella fujikuroi* disponíveis no Gen Bank (Tabela 6 – página 42), sendo que a maioria destes de isolados de referência foram também recuperados de plantas de mangueira.

Os isolados de referência nomeados como *Fusarium* sp2, *Fusarium* sp3 e *Fusarium* sp4 representam linhagens distintas identificadas por Otero-Colina et al. (2010) associadas a tecidos de mangueira com sintomas de MFV, com exceção de dois isolados da linhagem *Fusarium* sp2, que foram recuperados também de plantas do gênero *Cinchona*. Estas linhagens ainda não foram descritas formalmente como novas espécies.

Foram analisados 39 isolados, sendo 19 provenientes das coletas recentes realizadas em PE e MG, e 20 que já estavam depositados na CML, antes do início da realização deste trabalho. De acordo com a análise filogenética das sequências *EEF1A* (Figura 1), dos isolados de *Fusarium* analisados, 29 se agruparam em um mesmo clado com isolados de *F. tuiense*, formando um grupo monofilético com 85% de suporte de bootstrap. Todos os 19 isolados provenientes das últimas coletas (PE e MG) foram identificados como *F. tuiense*.

Pela comparação entre sequências desse gene, isolados de *F. sterilihyphosum*, *Fusarium* sp3, *Fusarium* sp4 e *Fusarium* sp (CML 272) não puderam ser diferenciados como uma espécie filogenética ou linhagens distintas, formando um grupo parafilético com *F. tuiense*, *Fusarium* sp2 e uma outra linhagem *Fusarium* sp., formada por 2 isolados (CML 268 e CML 396).

Um isolado de Israel (CML 408), e outro do México (CML 411) foram identificados como *F. mangiferae* e como *F. mexicanum*, com 100% e 99% de suporte de bootstrap, respectivamente.

Três isolados do Brasil (CML 273, 380, 399) foram identificados como *F. pseudocircinatum*, formando um grupo monofilético, com o isolado ex-holotipo NRRL 22946 (NIRENBERG; O'DONNELL, 1998) e 99% de suporte de bootstrap, comprovando o primeiro registro dessa espécie no Brasil, associada a tecidos de mangueira com sintomas de MFV. Pela árvore filogenética das sequências de *EEF1A*, os isolados CML 271 e 379 constituem linhagens distintas e não podem ser identificados como *F. pseudocircinatum*.

Os três isolados de *Fusarium* CML 268, 272 e 396 foram selecionados para sequenciamento de DNA dos genes *TUBB* e *CALM* para construção da árvore combinada dos três genes (*EEF1A*, *TUBB* e *CALM*). Entretanto, apenas para os isolados CML 268 e CML 272 foram obtidas sequências de qualidade.

Além da árvore combinada, árvores para cada gene *TUBB* e *CALM* foram construídas (Figura 2). De acordo com a comparação das sequências do gene *TUBB*, não há caracteres informativos (sinapomorfias) que agrupem os isolados de *Fusarium* sp. CML 272 e CML 268 em uma linhagem distinta ou juntamente com as espécies *F. mexicanum*, *F. sterilihyphosum* e *F. tuiense*. Na análise filogenética das sequências de *CALM*, o *Fusarium* sp. CML 272 formou um grupo monofilético com os isolados de *F. sterilihyphosum*, mas com um suporte de bootstrap baixo (59%).

Na árvore combinada dos três genes (*EEF1A*, *TUBB* e *CALM*) (Figura 3), *Fusarium* sp. CML 268 também não apresenta sinapomorfias que o agrupe em um clado que represente uma espécie ou uma linhagem. *Fusarium* sp. CML 272 formou um clado com a linhagem *F. sp2*, com suporte bootstrap baixo de 53%.

Desta forma, os isolados *Fusarium* sp. CML 268 e CML 272 não são *F. tuiense*, mas não há suporte suficiente para dizer que seja *F. sterilihyphosum* ou da linhagem *Fusarium* sp2, encontrada por OTERO-COLINA et al. (2010), ou outra linhagem distinta, sendo necessária a amplificação de um maior número de genes e a obtenção de um maior número de isolados filogeneticamente semelhantes.

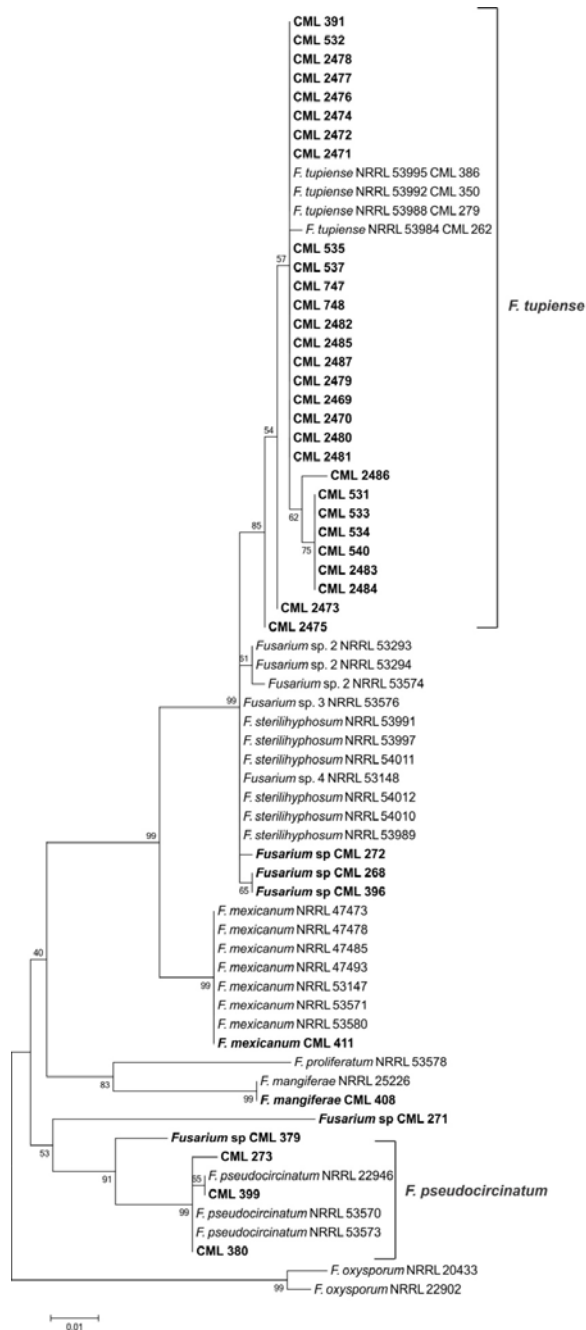
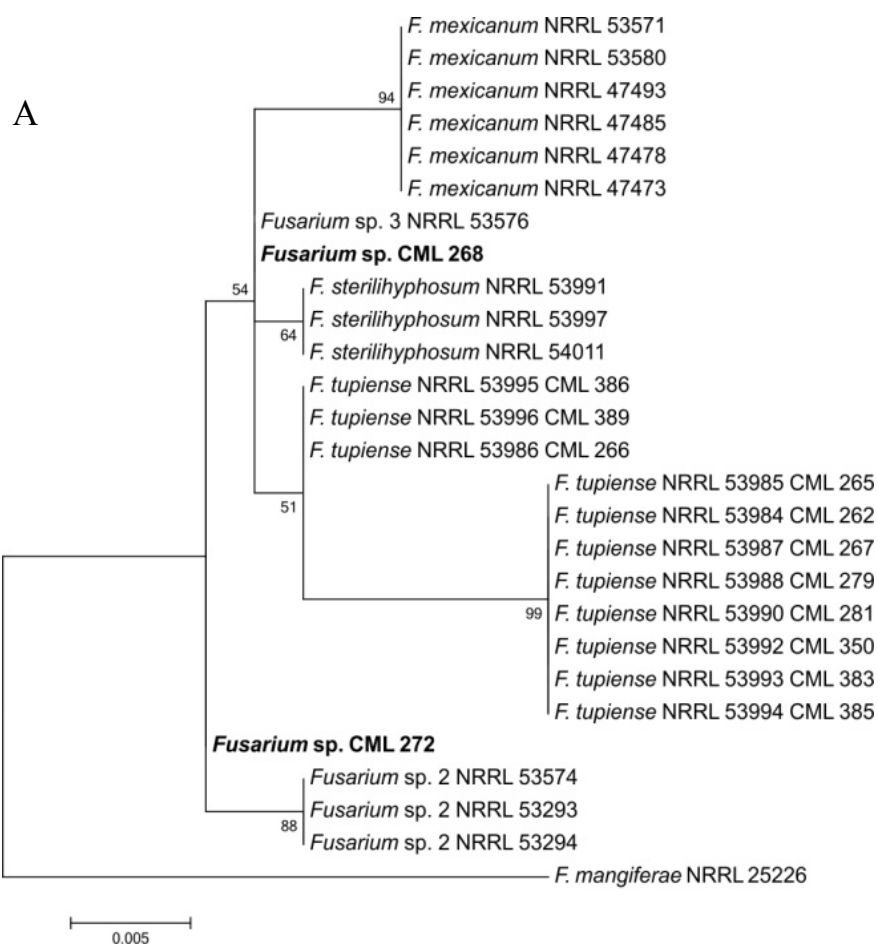


Figura 1 Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida do alinhamento das sequências do gene *EEF1A* mostrando as relações entre espécies de *Fusarium* associadas à MFV da mangueira. O modelo Kimura 2-parâmetros foi utilizado para a substituição de nucleotídeos. Os valores de *bootstrap* maiores que 50% (1000 repetições) estão representados nos nós. *Fusarium oxysporum* (NRRL22902 e NRRL 20433) foram utilizados como *outgroup*.



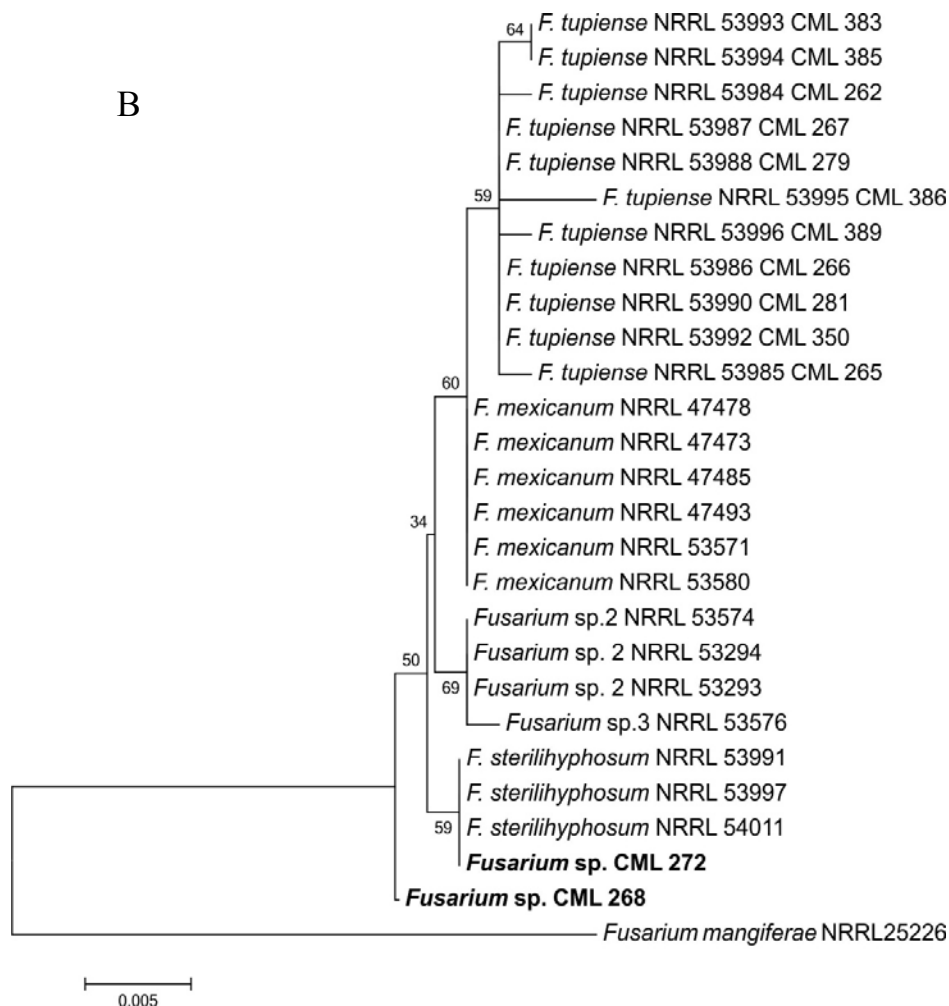


Figura 2 Árvores filogenéticas de máxima verossimilhança inferida do alinhamento das sequências dos genes TUBB (A) e CALM (B) mostrando as relações entre espécies de *Fusarium* associadas à MFV da mangueira. O modelo Kimura 2-parâmetros foi utilizado para a substituição de nucleotídeos. Os valores de *bootstrap* maiores que 50% (1000 repetições) estão representados nos nós. *Fusarium mangifera* (NRRL 25226) foi utilizado como *outgroup*.

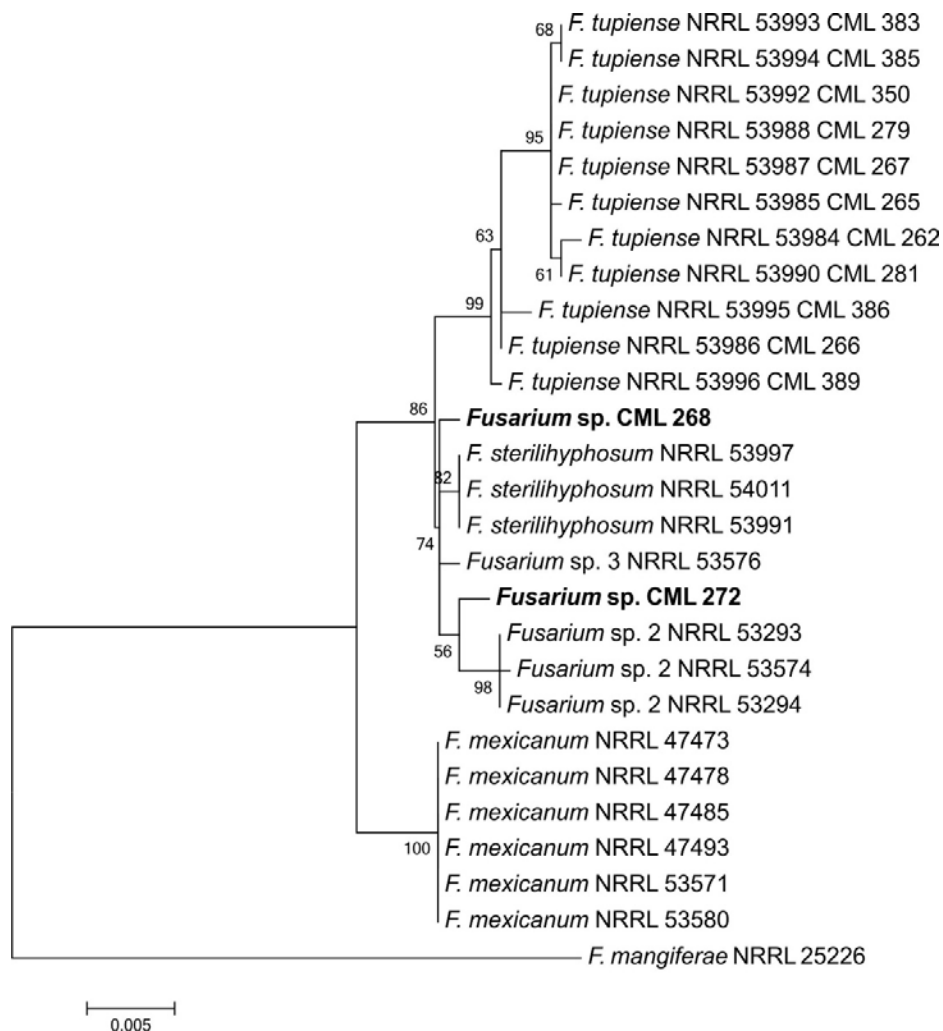


Figura 3 Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida na combinação do alinhamento das sequências dos genes *EEF1A*, *TUBB* e *CALM* mostrando as relações entre espécies de *Fusarium* associadas à MFV da mangueira. O modelo Kimura 2-parâmetros foi utilizado para a substituição de nucleotídeos. Os valores de *bootstrap* maiores que 50% (1000 repetições) estão representados nos nós. *Fusarium mangifera* (NRRL 25226) foi utilizado como *outgroup*.

4.3 Teste de patogenicidade

As mudas de mangueiras inoculadas com espécies de *Fusarium* foram avaliadas por até cinco meses. Foi observado se as mudas apresentavam os sintomas típicos da malformação floral e vegetativa, que se iniciaram aproximadamente quatro semanas após a inoculação (Figura 4).

Durante o período, foram realizados isolamentos dos tecidos próximos dos meristemas com o objetivo de reisolar os fungos inoculados, e assim, completar os postulados de Koch. Foram encontrados sintomas de malformação nos tratamentos listados na tabela 5.

Tabela 5 Tratamentos que desenvolveram sintomas de MFV

Tratamentos	Espécie inoculada	N. de plantas com sintomas	Incidência de plantas doentes (%)	Sintomas ^a
Tratamento 1	<i>F. tuiense</i>	3	50%	MF e MV
Tratamento 4	<i>F. proliferatum</i>	1	16,7%	MF
Tratamento 5	<i>F. proliferatum</i>	2	33,4%	MF
Tratamento 6	<i>F. proliferatum</i>	2	33,4%	MF
Tratamento 7	<i>Fusarium</i> sp. CML 272	1	16,7%	MF
Tratamento 8	<i>Fusarium</i> sp. CML 396	2	33,4%	MF e MV

^a MF: malformação floral; MV: malformação vegetativa.

Em trabalhos anteriores, *F. tuiense* já foi confirmado ser patogênico (LIMA et al., 2009). Foram recuperadas culturas típicas de todos os tratamentos.

Com este resultado, *F. proliferatum* pode causar sintomas de malformação floral e vegetativa da mangueira, porém ainda não se sabe se ele está associado à doença no Brasil. Apesar de *F. pseudocircinatum* ter sido encontrado associado a plantas de mangueira com sintomas de malformação, os isolados inoculados não causaram sintomas de MFV, portanto, ainda não há evidências que seja uma espécie patogênica. O isolado CML 398 (*F. semitectum*) não provocou sintomas da doença nas mudas inoculadas. Não foi isolada nenhuma cultura de *Fusarium* de nenhuma das mudas utilizadas como

controle negativo, ou seja, aquelas inoculadas somente com água estéril, foram assintomáticas.

Algumas mudas morreram após inoculação, apresentando sintomas de morte descendente devido ao ataque por *Lasiodiplodia* sp., sendo estas: duas mudas do tratamento 1 (*F. tuiense*), tratamento 7 (*Fusarium* sp.- CML 272) e tratamento 10 (*F. semitectum*), e uma muda do tratamento 2 (*F. pseudocirciantum*), tratamento 3 (*F. pseudocirciantum*), tratamento 5 (*F. proliferatum*), tratamento 6 (*F. proliferatum*), tratamento 8 (*Fusarium* sp.- CML 396) e tratamento 11 (testemunha).

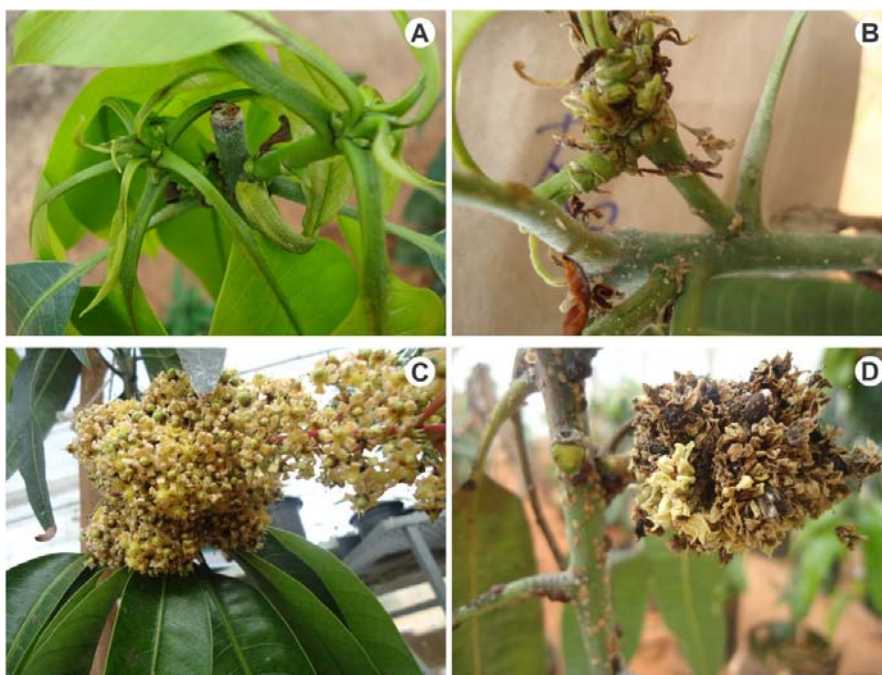


Figura 4 Plantas de mangueira com sintomas de malformação vegetativa (A e B) e malformação floral (C e D). Estes sintomas foram produzidos pelos isolados de *F. proliferatum* (CML 212) (A, B e D) e *Fusarium* sp. (CML 396) (C).

4.4 Caracterização por espectrometria de massas MALDI-TOF

Vinte e oito isolados morfológicamente e geneticamente bem caracterizados foram analisados por espectrometria de massas MALDI-TOF (Tabela 3 – página 29). Os espectros de cada isolado foram combinados em um espectro principal (MSP), que contém dados de massa de macromoléculas característicos, partilhados pela maioria dos isolados e que, futuramente, servirão de referência para a identificação de espécies de *Fusarium* associados à MFV da mangueira.

O dendrograma construído a partir dos dados gerados na espectrometria de massas MALDI-TOF (Figura 5) compartilhou grupos semelhantes às árvores filogenéticas obtidas por sequenciamento de genes. Os isolados de *F. mexicanum* separaram em dois grupos, sendo que um grupo, composto por dois isolados (NRRL 53135 e NRRL 53143) foi mais próximo de *F. sterilihyphosum* e o outro, composto também por dois isolados (NRRL 53147 e CML 411) mais próximos de *F. mangiferae*. Como a técnica é utilizada para fins de identificação, essa separação não afetará esse objetivo.

Além disso, a espectrometria de massas MALDI-TOF se mostrou eficiente para caracterização e separação das espécies de *Fusarium*, que são agentes etiológicos da MFV da mangueira do Brasil, pois *F. tuiense*, principal patógeno da doença no Brasil, formou um grupo bem distinto das outras espécies de *Fusarium*; e *F. sterilihyphosum*, apesar de ter ficado próximo de *F. mexicanum*, que não foi encontrado no Brasil até o momento, formou um grupo consistente e divergente de *F. tuiense*.

A utilização de espectrometria de massas MALDI-TOF comprovou se tratar de uma técnica rápida e confiável para identificação de espécies filogeneticamente muito próximas e com características morfológicas muito

semelhantes, como o caso das espécies de *Fusarium* que causam malformação floral e vegetativa da mangueira.

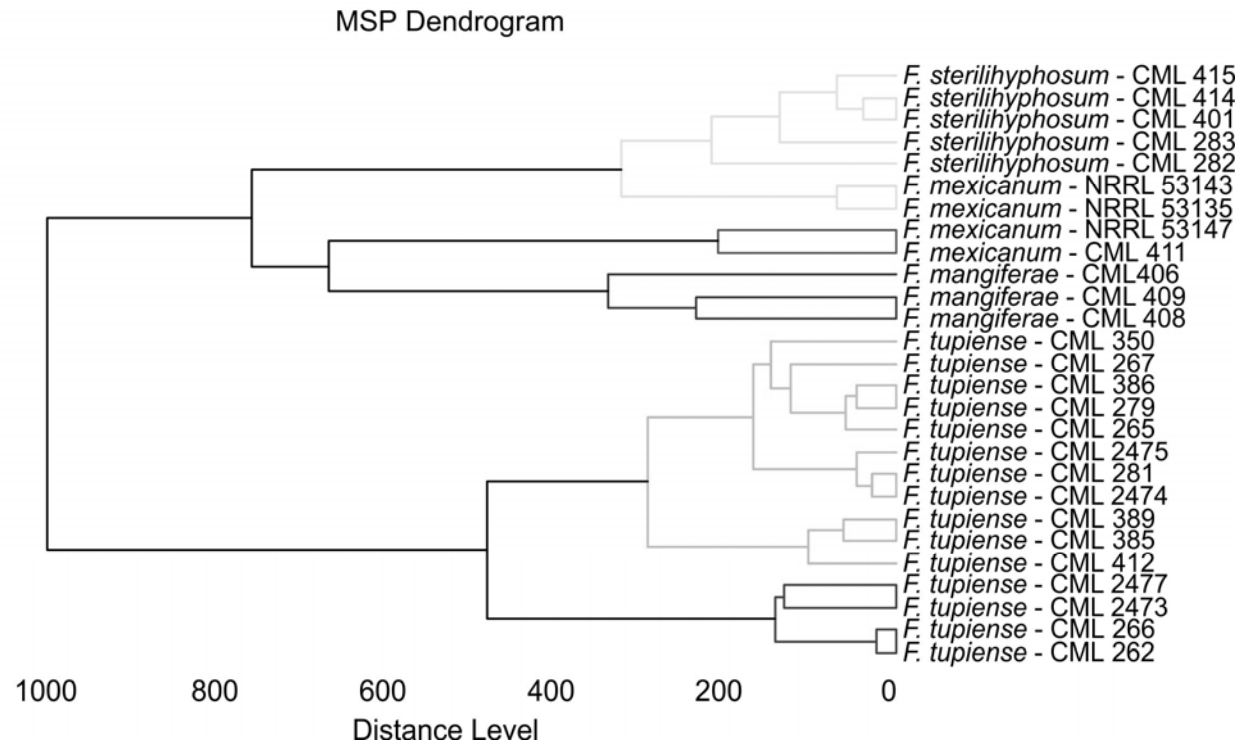


Figura 5 Dendrograma baseado em análises de espectrometria de massas MALDI-TOF mostrando o agrupamento dos isolados estudados.

Tabela 6 Código de acesso do GenBank de isolados de referência de *Fusarium* utilizados para gerar os filogramas

Espécie	Coleção ^a	Hospedeiro/ substrato	Origem	Código de acesso no Gen Bank ^b		
				EEF1A	TUBB	CALM
<i>F. mexicanum</i>	NRRL 47473	MV/Haden	Michoacán, MX	GU737416.1	GU737308.1	GU737389.1
<i>F. mexicanum</i>	NRRL 47478	MF/Haden	Michoacán, MX	GU737417.1	GU737309.1	GU737390.1
<i>F. mexicanum</i>	NRRL 47485	MV/Atkins	Michoacán, MX	GU737418.1	GU737310.1	GU737391.1
<i>F. mexicanum</i>	NRRL 47493	MF/Atkins	Michoacán, MX	GU737419.1	GU737311.1	GU737392.1
<i>F. mexicanum</i>	NRRL 53147 (GR20)	MV/Haden	Michoacán, MX	GU737282.1		
<i>F. mexicanum</i>	NRRL 53571	MV/Criollo	Guerrero, MX	GU737420.1	GU737312.1	GU737393.1
<i>F. mexicanum</i>	NRRL 53580	MF/Haden	Michoacán, MX	GU737421.1	GU737313.1	GU737394.1
<i>Fusarium</i> sp. #2	NRRL 53574	MF/Ataulfo	Campeche, MX	GU737395.1	GU737287.1	GU737368.1
<i>Fusarium</i> sp. #2	NRRL 53293	<i>Cinchona</i>	Dem. Rep. Congo	GU737396.1	GU737288.1	GU737369.1
<i>Fusarium</i> sp. #2	NRRL 53294	<i>Cinchona</i>	Dem. Rep. Congo	GU737397.1	GU737289.1	GU737370.1
<i>Fusarium</i> sp. #3	NRRL 53576	MF/Atkins	Veracruz, MX	GU737401.1	GU737293.1	GU737374.1
<i>Fusarium</i> sp. #4	NRRL 53148	MF/Ataulfo	Colima, MX	GU737283.1		
<i>F. mangiferae</i>	NRRL 25226 (CML 406)	<i>M. Indica</i>	Índia	AF160281.1	U61561.1	AF158334.1
<i>F. tuiense</i>	CML 262 (NRRL 53984)	MF/ND	Minas Gerais, BR	GU737404.1	GU737296.1	GU737377.1
				DQ452859.1	DQ445781.1	
<i>F. tuiense</i>	CML 265 (NRRL 53985)	MF/Keitt	Minas Gerais, BR	GU737407.1	GU737299.1	GU737380.1
				DQ452863.1		
<i>F. tuiense</i>	CML 266 (NRRL 53986)	MF/Vandik	Minas Gerais, BR	GU737410.1	GU737302.1	GU737383.1
<i>F. tuiense</i>	CML 267 (NRRL 53987)	MF/ND	São Paulo, BR	GU737405.1	GU737297.1	GU737378.1
<i>F. tuiense</i>	CML 279 (NRRL 53988)	MF/ND	Minas Gerais, BR	GU737406.1	GU737298.1	GU737379.1
<i>F. tuiense</i>	CML 281 (NRRL 53990)	MF/ND	Minas Gerais, BR	GU737402.1	GU737294.1	GU737375.1
<i>F. tuiense</i>	CML 350 (NRRL 53992)	MF/ND	Mato Grosso, BR	GU737403.1	GU737295.1	GU737376.1

“Tabela 6, continuação”

Espécie	Coleção ^a	Hospedeiro/ substrato	Origem	Código de acesso no Gen Bank ^b		
				EEF1A	TUBB	CALM
<i>F. tupiense</i>	CML 383 (NRRL 53993)	MF/ Atkins	Minas Gerais, BR	GU737408.1 EU574680.1	GU737300.1	GU737381.1
<i>F. tupiense</i>	CML 385 (NRRL 53994)	MF/ Vandik	Minas Gerais, BR	GU737409.1	GU737301.1	GU737382.1
<i>F. tupiense</i>	CML 386 (NRRL 53995)	MF/ Atkins	Ceará, BR	GU737411.1	GU737303.1	GU737384.1
<i>F. tupiense</i>	CML 389 (NRRL 53996)	MF/ Atkins	Bahia, BR	GU737411.1 DQ452860.1	GU737303.1 DQ445782.1	GU737384.1
<i>F. proliferatum</i>	NRRL 53578	<i>M. Indica</i>	Malasya	GU737400.1	GU737292.1	GU737373.1
<i>F. sterilihyphosum</i>	CML 280 (NRRL 53989)	MV/ND	Minas Gerais, BR	GU737267.1		
<i>F. sterilihyphosum</i>	CML 282 (NRRL 53991)	MF/ND	Minas Gerais, BR	GU737413.1	GU737305.1 DQ445785.1	GU737386.1
<i>F. sterilihyphosum</i>	CML 401 (NRRL 53997)	MF/ND	Minas Gerais, BR	GU737414.1	GU737306.1	GU737387.1
<i>F. sterilihyphosum</i>	CML 414 (NRRL 25623)	<i>M. Indica</i>	África do Sul	AF160300.1		
<i>F. sterilihyphosum</i>	NRRL 54010	<i>M. Indica</i>	África do Sul	GU737268.1		
<i>F. sterilihyphosum</i>	NRRL 54011	<i>M. Indica</i>	África do Sul	GU737415.1	GU737307.1	GU737388.1
<i>F. sterilihyphosum</i>	NRRL 54012	<i>M. Indica</i>	África do Sul	GU737269.1		
<i>F. pseudocircinatum</i>	NRRL 22946	<i>Solanum sp.</i>	Ghana	AF160271		
<i>F. pseudocircinatum</i>	NRRL 53570	MV/Haden	Guerrero, MX	GU737398.1		
<i>F. pseudocircinatum</i>	NRRL 53573	MF/Atkins	Campeche, MX	GU737399.1		
<i>F. oxysporum</i>	NRRL22902	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Estados Unidos	AF160312		
<i>F. oxysporum</i>	NRRL 20433	<i>Vicia faba</i>	Alemanha	AF008479.1		

^a CML: Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil, NRRL: National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois, USA.

^b Estudos onde as sequências de DNA foram geradas: O'Donnell et al. (2000); Lima et al. (2009), Otero-Colina et al. (2010).

5 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho evidenciam que *Fusarium tuiense* é a espécie predominante no Brasil como agente etiológica do MFV da mangueira. Esta evidência pode ser confirmada pelo grande número de isolados que já foram coletados e que possibilitou a sua descrição como o principal agente etiológico da doença no país (LIMA et al., 2009b, LIMA et al., 2012). Além disso, todos os isolados sequenciados provenientes da última coleta são *F. tuiense*.

De acordo com a análise filogenética da combinação dos três genes (TUBB, CALM e EEF1A), *Fusarium* sp. CML 268 e *Fusarium* sp3 formaram um grupo parafilético com *F. tuiense*, *F. sterilihyphosum* e *Fusarium* sp2. Apesar de não conterem sinapomorfias que os diferenciem dos demais, em outro estudo, *Fusarium* sp3 foi considerado com uma possível espécie nova, mesmo sendo representado por um único isolado e formando um grupo também parafilético em uma árvore filogenética combinada de cinco genes (EEF1A, TUBB, CALM, IGS r DNA e histona H3) (OTERO-COLINA et al., 2010).

O pequeno número de isolados amostrados para estas linhagens é um fator limitante para estudos mais aprofundados, por não ser possível uma avaliação completa que estabeleça o limite dessas supostas espécies (OTERO-COLINA et al., 2010).

Não se pode afirmar que *Fusarium* sp. CML 272 realmente seja *Fusarium* sp2 pelo baixo suporte bootstrap, e o fato de ter somente um isolado, impossibilita essa comprovação. Apesar de não ter sido possível, o sequenciamento dos genes TUBB e CALM para o isolado *Fusarium* sp. CML 396, na árvore filogenética do gene EEF1A, ele também se divergiu das espécies já conhecidas.

O maior interesse nestes isolados é pelo fato de dois deles (CML 272 e CML 396), selecionados para realização do teste de patogenicidade, serem capazes de reproduzir sintomas de malformação nas inflorescências da mangueira.

Utilizar o processo de indução floral da mangueira, antes da inoculação, para realização do teste de patogenicidade também foi essencial para alcançar resultados mais rápidos (um mês após inoculação). Em trabalhos anteriores, o surgimento dos primeiros sintomas eram típicos de malformação vegetativa e levaram 2 a 3 meses (LIMA et al., 2009b, OTERO-COLINA et al., 2010). De acordo com a tabela 5 (Página 37), neste experimento, maioria das plantas desenvolveram sintomas de MF, e o tratamento 1 e 8 apresentaram também MV.

A espécie *F. proliferatum* também reproduziu sintomas de malformação nas mudas de mangueira. Os três isolados utilizados provêm de hospedeiros distintos, fato esse que evidencia que um grupo de isolados de *F. proliferatum* não tem especificidade a um determinado hospedeiro. Apesar de não ter sido recuperado de plantas de mangueira no Brasil, a espécie está presente no país, causando doenças em várias culturas importantes e pode ser um patógeno em potencial da mangueira, ou que já se estabeleceu em outras regiões onde coletas ainda não foram realizadas. Esta espécie já foi encontrada em outros países, como China e Malásia, associada à MFV (MARASAS et al., 2006; ZHAN et al., 2010).

F. pseudocircinatum foi outra espécie recuperada de tecidos de mangueira com malformação, de acordo com o teste de patogenicidade, não há evidências de que seja uma espécie patogênica. Não há relatos dessa espécie no Brasil associada à mangueira ou a outras plantas. *F. pseudocircinatum* foi descrito por Nirenberg e O'Donnell (1998) e está associada a uma variedade de plantas tropicais, mas pouco se sabe sobre sua biologia e ecologia, e

aparentemente, ela não está relacionada a doenças. Recentemente, *F. pseudocircinatum* foi registrado no México associado também a plantas de mangueira com sintomas de MFV, mas sua patogenicidade não foi testada (OTERO-COLINA et al., 2010). Com os resultados obtidos neste trabalho, tem-se o primeiro registro de *F. pseudocircinatum* no Brasil, identificado com base na análise filogenética do gene *EEF1A*. Esta espécie não é conhecida como agente etiológico da MFV da mangueira, e ao que tudo indica, está associada à mangueira e a outras espécies tropicais se comportando como endófito (NIRENBERG; O'DONNELL, 1998).

Os resultados alcançados pela análise por espectrometria de massas MALDI-TOF podem levar a aplicação de uma nova técnica na rotina dos laboratórios que trabalham com identificação de microrganismos, a qual demonstra ser eficaz na identificação de espécies fúngicas (DE RESPINIS et al., 2010). Os MSPs gerados neste estudo demonstraram que os isolados possuem variações no número de macromoléculas com informações suficientes para distinção das espécies *F. mangiferae*, *F. sterilihyphosum*, *F. tuiense* e *F. mexicanum*. A separação de *F. mexicanum* em grupos distintos no MSP não inviabiliza a utilização da análise proteômica.

A separação dos grupos apresentadas no dendrograma (Fig. 4) foi semelhante àquela obtida pela análise filogenética do gene *EEF1A*. Trabalhos semelhantes foram desenvolvidos para identificação de espécies de *Trichoderma*, *Fusarium* de importância médica, *Aspergillus* e outros fungos de difícil identificação por critérios morfológicos (MARINACH-PATRICE et al., 2009; DE RESPINIS et al., 2010; SANTOS et al., 2010).

Inicialmente, as análises foram realizadas para verificar a eficácia em separar as espécies filogenéticas e compor um banco de dados. Os MSPs destes isolados podem ser incluídos nesse banco de dados, que ficará disponível e possibilitará a identificação de outros isolados. Deve ser estabelecido também

um protocolo que padronize as condições da cultura, pois a escolha do meio de cultura e idade da colônia podem interferir na obtenção dos perfis (MARINACH-PATRICE et al., 2009). Além disso, a cultura deve estar esporulada e não degenerada. Estes fatores podem alterar os espectros significativamente (MARINACH-PATRICE et al., 2009). Durante a realização do trabalho, foram realizados teste com isolados crescidos em diferentes meios de cultura e em diferentes dias, até ser obtido o melhor protocolo para obtenção de bons perfis.

6 CONCLUSÃO

- A espécie *F. proliferatum* é um agente etiológico da malformação floral e vegetativa da mangueira.

- Tem-se o primeiro registro de *F. pseudocircinatum* no Brasil, associado a plantas de mangueira com sintomas de malformação, porém a espécie não induziu sintomas da doença.

- Os isolados de *Fusarium* CML 272 e CML 396, ainda não identificados, podem causar sintomas de malformação na mangueira.

- *Fusarium tuiense* é o principal agente etiológico da malformação da mangueira no Brasil.

- A espectrometria de massas MALDI-TOF é uma técnica rápida e eficaz que permite a identificação de espécies filogeneticamente próximas e morfológicamente semelhantes, como no caso dos agentes etiológicos da MFV da mangueira.

7 REFERÊNCIAS

ANJOS, J. N.; CHARCHAR, M. J. A.; PINTO, A. C. Q.; RAMOS, V. H. V. Associação de *Fusarium sacchari* com a malformação vegetativa da mangueira. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 75-77, 1998.

BOOTH, C. **The genus *Fusarium***, Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 237 p.

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

CUNHA, M. M.; SANTOS FILHO, H. P.; NASCIMENTO, A. S. Manga: fitossanidade. **Brasília: EMBRAPA Comunicação para Transferência de Tecnologia**, p. 25-47, 2000.

DE RESPINIS, S.; VOGEL, G.; BENAGLI, C.; TONOLLA, M.; PETRINI, O.; SAMUELS, G. J. MALDI-TOF MS of *Trichoderma*: a model system for the identification of microfungi. **Mycological progress**, Tübingen, v. 9, n. 1, p. 79-100, 2010.

FAOSTAT. Estatísticas da *Food and Agriculture Organization* das Nações Unidas. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acessos em janeiro 2012.

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

GEISER, D. M.; JIMENEZ-GASCO, M. M.; KANG, S.; MAKALOWSKA, I.; VEERARAGHAVAN, N.; WARD, T. J.; ZHANG, N.; KULDAU, G. A.; O'DONNELL, K. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 110, n. 5-6, p. 473-479, 2004.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 2, n. 2, p. 140-150, 2003.

KUMAR, J.; SINGH, U. S.; BENIWAL, S. P. S. Mango malformation: one hundred years of research. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, n. 1, p. 217-232, 1993.

LAIKO, V. V.; BALDWIN, M. A.; BURLINGAME, A. L. Atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption /ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Urbana, v. 72, n. 4, p. 652-657, 2000.

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

LIMA, C. S.; MONTEIRO, J. H. A.; CRESPO, N. C.; COSTA, S. S.; LESLIE, J. F.; PFENNING, L. H. VCG and AFLP analyses identify the same groups in the causal agents of mango malformation in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 123, n. 1, p. 17-26, 2009a.

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

LIMA, C. S.; PFENNING, L. H.; COSTA, S. S.; ABREU, L. M.; LESLIE, J. F. *Fusarium tupiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. **Mycologia**, Lawrence, v. 104, n. 6, p. 1408-1419, 2012.

MARASAS, W. F. O.; PLOETZ, R. C.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. D.; STEENKAMP, E. T. Mango malformation disease and the associated *Fusarium* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 6, p. 667-672, 2006.

MARINACH-PATRICE, C.; LETHUILLIER, A.; MARLY, A.; BROSSAS, J. Y.; GENÉ, J.; SYMOENS, F.; DATRY, A.; GUARRO, J.; HENNEQUIN, C. Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, Basel, v. 15, n. 7, p. 634-642, 2009.

MARKLEIN, G.; JOSTEN, M.; KLANKE, U.; MÜLLER, E.; HORRÉ, R.; MAIER, T.; WENZEL, T.; KOSTRZEWA, M.; BIERBAUM, G.; HOERA, U. F. A.; SAHL, H. G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, n. 9, p. 2912-2917, 2009.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. **The Pennsylvania State University Press, University Park**, 1983. 193 p.

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

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

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular phylogenetics and evolution**, Detroit, v. 7, n. 1, p. 103-116, 1997.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, Lawrence, v. 90, p. 465-493, 1998.

O'DONNELL, K.; NIRENBERG, H. I.; AOKI, T.; CIGELNIK, E. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**, Mito, v. 41, n. 1, p. 61-78, 2000.

OTERO-COLINA, G.; RODRÍGUEZ-ALVARADO, G.; FERNÁNDEZ-PAVÍA, S. P.; MAYMON, M.; PLOETZ, R.C.; AOKI, T.; O'DONNELL, K.; FREEMAN, S. Identification and characterization of a novel etiological agent of mango malformation disease in Mexico, *Fusarium mexicanum* sp.nov. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, n. 11, p. 1176-1184, 2010.

PERES, N. A.; HARAKAVA, R.; CARROLL, G. C.; ADASKAVEG, J. E.; TIMMER, L.W. Comparison of molecular procedures for detection and identification of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae*. **Plant disease**, Quebec, v. 91, n. 5, p. 525-531, 2007.

PHOULIVONG, S.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E. H. C.; ABDELSALAM, K.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 44, n. 1, p. 33-43, 2010.

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

PLOETZ, R. C.; FREEMAN, S. 8 Foliar, Floral and Soilborne Diseases. **The Mango: Botany, Production and Uses**, London, p. 231-302, 2009.

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

ROZANE, D. E.; DAREZZO, R. J.; AGUIAR, R. L.; AGUILERA, G. H. A.; ZAMBOLIM, L. **Manga: produção integrada, industrialização e comercialização**. Viçosa: UFV, p 321-335, 2004.

SANTOS, C.; PATERSON, R. R.; VENANCIO, A.; LIMA, N. Filamentous

fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization

time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford,

v. 108, n. 2, p. 375-385, 2010.

SENGHOR, A. L.; SHARMA, K.; KUMAR, P. L.; BANDYOPADHYAY, R. First Report of Mango Malformation Disease Caused by *Fusarium tuptense* in Senegal. **Plant Disease**, Quebec, v. 96, n. 10, p. 1582-1582, 2012.

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

SUMMANWAR, A. S.; RAYCHAUDHURI, S. P.; PHATAK, S. C. Association of the fungus *Fusarium moniliforme* Sheld. with the malformation in mango

(*Mangifera indica* L.). **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 19, p. 227-228, 1966.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TAVARES, S. C. C. H.; LIMA, J. A. S. Isolamento do agente causal da malformação vegetativa em mangueira no Submédio São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22 (Supl.), p. 322, 1997.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GEISER, D. M.; HIBBETT, D. S.; FISHER, M. C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal genetics and biology**, Arkansas, v. 31, n. 1, p. 21-32, 2000.

VARMA, A.; LELE, V. C.; RAYCHAUDURI, S. P.; RAM, A.; SANG, A. Mango malformation: A fungal disease. **Journal of Phytopathology**, Malden, v. 79, n. 3, p. 254-257, March, 1974.

WICHT, B.; PETRINI, O.; JERMINI, M.; GESSLER, C.; BROGGINI, G. A. L. Molecular, proteomic and morphological characterization of the ascomycete *Guignardia bidwellii*, agent of grape black rot: a polyphasic approach to fungal identification. **Mycologia**, Lawrence, v. 104, n. 5, p. 1036-1045, 2012.

YOUSSEF, S. A.; MAYMON, M.; ZVEIBIL, A.; KLEIN-GUETA, D.; SZTEJNBERG, A.; SHALABY, A. A.; FREEMAN, S. Epidemiological aspects of mango malformation disease caused by *Fusarium mangiferae* and source of infection in seedlings cultivated in orchards in Egypt. **Plant pathology**, Oxford, v. 56, n. 2, p. 257-263, 2006.

ZHAN, R. L.; YANG, S. J.; HO, H. H.; LIU, F.; ZHAO, Y. L.; CHANG, J. M.; HE, Y. B. Mango Malformation Disease in South China Caused by *Fusarium*

proliferatum. **Journal of Phytopathology**, Malden, v. 158, n. 11-12, p. 721-725,

2010.