

SUSAN SATIE TSUJI

**ANÁLISE FILOGENÉTICA E PATOGÊNICA DO AGENTE CAUSAL DA
FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

**RECIFE-PE
FEVEREIRO – 2012**

SUSAN SATIE TSUJI

**ANÁLISE FILOGENÉTICA E PATOGÊNICA DO AGENTE CAUSAL DA
FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO NO BRASIL**

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Cristiano Souza Lima

Co-Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning

Co-Orientador: José Aires Ventura

**RECIFE-PE
FEVEREIRO – 2012**

**ANÁLISE FILOGENÉTICA E PATOGÊNICA DO AGENTE CAUSAL DA
FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO NO BRASIL**

SUSAN SATIE TSUJI

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 29/02/2012

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Cristiano Souza Lima

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff

Prof^ª. Dr^ª. Érika Valente de Medeiros

Dr. Breno Oliveira de Souza

**RECIFE-PE
FEVEREIRO – 2012**

Aos meus pais, Shinichiro e Izabel por não me imporem limites e permitirem que seguisse meu caminho. Às minhas irmãs, Yu e Kaori pela torcida apesar das saudades.

DEDICO

Ao meu avô, Haruo (*in memoriam*) pela filosofia de vida e por me ensinar que não existem fronteiras. À minha avó, Santana (*in memoriam*) pela fé que sempre teve em mim.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todos os sacrifícios que fizeram em razão dos meus sonhos;

À Deus, por me mostrar que escreve certo por linhas tortas;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela oportunidade de realização desta pós-graduação;

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade e suporte na realização dos experimentos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cristiano Souza Lima, pela oportunidade e ensinamentos durante meu mestrado;

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Ludwig Heinrich Pfenning, pela valiosa colaboração, orientação e receptividade;

À Dr^a Sarah da Silva Costa Guimarães, por toda ajuda, orientação, paciência, compreensão e amizade;

Ao meu co-orientador, o pesquisador Dr. José Aires Ventura, por sua colaboração com os testes de patogenicidade;

Ao Prof. Dr. Sami Jorge Michereff, pela ajuda, conselhos e amizade;

Aos meus amigos da UFRPE, especialmente à Camila, Wiler, Chris, Mayumi, Neto, Mateus, Conrado, Mimi e Willie, pela amizade e ajuda;

Aos meus colegas do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos da UFLA, pela receptividade, auxílio durante os experimentos, aprendizado e risadas;

Aos funcionários de ambas as instituições, mas principalmente ao Bob (UFRPE) e ao Edinho (UFLA), pela ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho;

Às minhas queridas Iara, Angel, Mari, Kedma e Lininha, pelo carinho, amizade e apoio;

À todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram nessa jornada. Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
Resumo Geral	vii
General Abstract	viii
Capítulo I – Introdução geral	9
1.1 A cultura do abacaxizeiro	10
1.2 A fusariose do abacaxizeiro	13
1.3 Complexo <i>Gibberella fujikuroi</i> (GFSC)	15
1.4 Conceito de espécie filogenética	16
1.5 Referências bibliográficas	17
Capítulo II – Análise filogenética e patogênica do agente causal da fusariose do abacaxizeiro no Brasil	22
Resumo	23
Abstract	24
Introdução	24
Material e métodos	26
Resultados	29
Discussão	32
Referências bibliográficas	34
Tabelas e figuras	38
Capítulo III – Conclusões gerais	50

RESUMO GERAL

A fusariose do abacaxizeiro (*Ananas comosus*) tem como agente etiológico o fungo *Fusarium guttiforme* (sin. *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas*). Esta doença, considerada a mais importante da cultura, tem como sintoma a exsudação de goma, sendo conhecida também como gomose ou resinose fúngica. A maior parte dos estudos publicados avaliou a resistência de variedades de abacaxizeiro a *F. guttiforme*. A estimativa da diversidade genética em populações de *Fusarium* é fundamental para o entendimento da estrutura populacional, do movimento de material genético do patógeno entre regiões produtoras através da disseminação do mesmo, bem como do entendimento dos processos que levam a resistência a defensivos e superação da resistência genética de cultivares de abacaxi. Esse fungo, que se encontra disseminado por todas as regiões produtoras do país, ainda não possui o teleomorfo conhecido e pertence ao complexo *Gibberella fujikuroi*, um grupo com características heterogêneas. O presente trabalho teve como objetivos: a) obter uma coleção de isolados de *Fusarium* associados à fusariose do abacaxizeiro no país; b) avaliar a filogenia de isolados de *Fusarium* das regiões Nordeste e Sudeste; c) testar a patogenicidade dos isolados obtidos. Foram analisadas sequências parciais de DNA dos genes fator de alongação 1- α (*tef1*) e calmodulina (*cmd*), inferindo-se a história dos alelos através de métodos filogenéticos. Sequências parciais do gene *tef1* foram utilizadas para estimar o número de haplótipos dos isolados coletados em diferentes regiões produtoras. Observou-se que a espécie *F. guttiforme* é o agente causal da gomose do abacaxizeiro no Brasil e que o gene *tef1* possibilitou uma melhor distinção de grupos infraespecíficos que o gene *cmd*.

Palavras-chave: *Fusarium guttiforme*, *Fusarium ananatum*, filogenia, *Ananas comosus* var. *comosus*

GENERAL ABSTRACT

Fusarium guttiforme (sin. *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas*) is the causal agent of fusariosis on pineapple (*Ananas comosus*). This disease, considered the most important to this crop, has the exudation of gum as the most common symptom. Most of the published studies focus on the evaluation of the resistance of pineapple varieties against *F. guttiforme*. The estimative of genetic diversity in *Fusarium* populations is fundamental to understand the population structure, the movement of pathogen genetic material between producing regions, as well as understanding the processes that lead to resistance against pesticides and overcoming genetics resistance of pineapple cultivars. This fungus, which can be found in most regions of the country, does not have a known teleomorph and belongs to the *Gibberella fujikuroi* species complex, a group with heterogeneous characteristics. This study aimed: a) to obtain a collection of *Fusarium* isolates associated with pineapple fusariosis in the country; b) to reconstruct the phylogeny of *Fusarium* isolates that causes fusariosis on pineapple from Northeast and Southeast regions; c) to test the pathogenicity of isolates. DNA sequences of translation elongation factor 1- α (*tef1*) and calmodulin (*cmd*) were analyzed, and the history of the alleles was inferred by phylogenetic methods. *Tef1* gene sequences were used to estimate the number of haplotypes from isolates collected in different regions. It was observed that the *F. guttiforme* is the causal agent of fusariosis on pineapple in Brazil, and the *tef1* gene allowed a better infraspecific group distinction than *cmd* gene.

Keywords: *Fusarium guttiforme*, *Fusarium ananatum*, phylogeny, *Ananas comosus* var. *comosus*

CAPÍTULO I

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A cultura do abacaxizeiro

O abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L.) Merr.] tem origem no hemisfério sul, na América tropical e subtropical, correspondendo às regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste do Brasil e Norte da Argentina e do Paraguai (COLLINS, 1960; CRESTANI et al, 2010). O Brasil é um dos principais centros de diversidade genética, pois além de *A. comosus*, todas as espécies de *Ananas* são encontradas nas formas silvestres ou cultivadas em várias regiões do país (CRESTANI et al., 2010; VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

O abacaxizeiro é uma fruteira muito cultivada em zonas subtropicais e tropicais dos hemisférios norte e sul. É uma planta monocotiledônea, herbácea, perene, com cerca de 1,0 m de altura, pertencente à família das Bromeliáceas. Suas folhas são inseridas no caule pouco desenvolvido, tem forma de calha, são lineares e dispostas em torno de um eixo central. As flores apresentam uma coloração roxo-purpúrea, reunidas em inflorescência terminal de eixo grosso, carnoso e cônico oval (VENTURA et al., 1981). O abacaxi é uma infrutescência, composta por 50 a 150 frutos individuais conhecidos como frutinhos, oriundos de flores completas (CUNHA; CABRAL, 1999). A infrutescência é formada por uma espiral de baixo para cima, assim, os frutinhos das partes superior e mediana possuem idade fisiológica menor que os da parte basal (COPPENS D'EECKENBRUGGE; LEAL, 2003; REINHARDT et al., 2004).

O crescimento ótimo e a melhor qualidade de frutos ocorrem em temperaturas de 21 a 23°C e chuvas de 1200 a 1500 mm bem distribuídas ao longo do ano, sendo recomendado o uso de irrigação em locais com períodos secos muito prolongados. É uma planta exigente em luz, necessitando de 6,8 a 8,2 horas de luz diária, ou seja, de 2500 a 3000 horas de luz por ano (NASCENTE et al 2005).

O ciclo produtivo varia de 14 a 24 meses, sofrendo influência das condições climáticas, além de depender da época de plantio, do tipo das mudas utilizadas e das práticas culturais empregadas. É composto de basicamente duas fases, uma de formação ou vegetativa, e outra de produção, com a condução de apenas um fruto por planta (SOUZA et al., 2010).

As cultivares de abacaxizeiro mais conhecidas no mundo, para consumo ao natural e para a industrialização são Smooth Cayenne, Singapore Spanish, Queen, Española Roja, Pérola e Perolera (CABRAL et al. 1999). Estima-se que cerca de 70% da produção mundial de abacaxi provêm da cultivar Smooth Cayenne (GONÇALVES; CARVALHO, 2000; LEAL, 1990). O predomínio dessa cultivar nos principais países produtores de abacaxi, torna a

cultura bastante vulnerável à ocorrência de fatores bióticos e abióticos adversos (CABRAL et al., 1985).

Pérola é a cultivar mais plantada no Brasil, principalmente nos Estados do Nordeste. As plantas são vigorosas, de porte ereto, com folhas com mais de 110 cm de comprimento, de coloração verde escura, com margens cobertas por espinhos. O pedúnculo é longo, com uma média de 30 cm. Os frutos tem forma ligeiramente cônica, tamanho de pequeno a intermediário (1 a 2 kg), polpa branca, aromática, rica em açúcares (13° a 16° Brix) e acidez moderados, adequados para o consumo interno sob a forma de fruta fresca (GIACOMELLI; PY, 1981; MATOS; REINHARDT, 2009).

A cultivar Smooth Cayenne foi introduzida em São Paulo, na década de 30 e, posteriormente, foi difundida para outros Estados como Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais e Paraíba. É a segunda cultivar mais plantada no Brasil, depois da Pérola. Também conhecida como Abacaxi Havaiano, essa cultivar é vigorosa, com porte semiereto e folhas com poucos espinhos localizados na região apical. Possui pedúnculo curto e forte. Os frutos são maiores (1,5 a 2,5 kg), tem forma cilíndrica, polpa amarela, firme, rica em açúcares (13° a 19° Brix) e acidez elevada (GIACOMELLI; PY, 1981; MATOS; REINHARDT, 2009).

Apesar dos plantios comerciais utilizarem poucas cultivares, no Brasil e em outros países da América Latina ocorrem diversas cultivares de abacaxizeiro de interesse local ou regional (FERREIRA; CABRAL, 1993). No Nordeste Brasileiro há plantios da cultivar Jupi, planta semelhante à Pérola, mas com fruto ligeiramente cilíndrico. Esta cultivar é mais conhecida nos Estados da Paraíba e de Pernambuco e, atualmente, está sendo difundida no Estado do Tocantins, a qual está sendo preferida pelos agricultores e consumidores (CABRAL et al., 1999). Já na Região Amazônica, as cultivares de abacaxizeiro plantadas comercialmente são: Roxo de Tefé, Local de Tefé, Alto Turi, Primavera, Gigante de Tarauacá, Cabeça de Anta, Quinari, entre outras (MATOS; REINHARDT, 2009).

A comercialização do abacaxi vem se expandindo nos principais mercados nacionais e internacionais, sendo a segunda fruta tropical a alcançar o mercado internacional, depois da banana (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002). Sua produção pode ser destinada tanto ao mercado interno *in natura* quanto à exportação ou para a industrialização.

Os frutos podem ser consumidos ao natural, ou na forma de sorvetes, doces e sucos. Os frutos quando industrializados, apresentam-se como polpa, xarope, geleia, picles, doce em calda, suco concentrado, licor ou vinho. Em alguns países, o suco do fruto verde é utilizado como vermífugo. Já o caule serve como matéria prima na indústria de alimentos para

produção de álcool etílico e gomas, enquanto o restante do abacaxizeiro pode ser usado na alimentação animal, na forma de material fresco ou ensilado (GRANADA et al., 2004; MEDINA et al., 1987). A bromelina, uma enzima proteolítica obtida do resíduo da industrialização do abacaxi, é muito utilizada na composição de medicamentos por possuir propriedades diuréticas, depurativas e anti-inflamatórias (CRESTANI et al., 2010; MANETTI, 2009).

A maior parte da produção é destinada ao mercado interno, sendo os frutos com coroa e de peso superiores a 1,5 kg, bem conformados, sem fermentos e em estágio de maturação adequado, os que alcançam os melhores preços no mercado *in natura*. Para o mercado externo, a preferência é por frutos com casca e polpa amarelas, cilíndricos, com peso entre 1,0 a 2,0 kg, mínimo de 40% de suco e sabor doce com sólidos solúveis totais acima de 13°Brix (REINHART, 2004).

A cultura tem grande destaque entre os frutos tropicais com produção mundial de 19.418.306 t, sendo o Brasil um dos maiores produtores mundiais de abacaxi (2.120.030 t), respondendo por 10,92% do total anual produzido mundialmente no período de 2010, perdendo apenas para as Filipinas (2.169.230 t) (11,17%), segundo dados da FAO – ‘Food and Agriculture Organization of the United Nations’. Tailândia (1.924.660 t) e Costa Rica (1.976.760 t) aparecem em seguida. O rendimento médio da cultura alcançou a marca de 26.430 mil frutos por hectare e a área colhida, 57.505 hectares. A safra 2011 contou com a produção de 1.519.881 mil frutos em uma área plantada de 78.683 hectares (IBGE, 2011). Paraíba (273.910 mil frutos), Pará (254.347 mil frutos) e Minas Gerais (222.199 mil frutos) são os Estados que se destacam na produção nacional e são responsáveis por 53,10% do total da produção (AGRIANUAL, 2010; FAO, 2010; IBGE, 2010).

As doenças estão entre os principais fatores que impedem a obtenção de altos rendimentos e muitas podem ser limitantes à produção de abacaxi. A importância econômica das doenças varia de acordo com as regiões produtoras. A fusariose é a doença mais severa no Brasil, com perdas que são estimadas em 30 a 40% nos frutos e em até 20% nas mudas. (VENTURA; COSTA, 2006; VENTURA; ZAMBOLIM, 2002). A podridão negra dos frutos e a podridão da base das mudas são causadas por *Ceratocystis paradoxa* (Dade) C. Moreau, um patógeno presente em praticamente todas as regiões produtoras de abacaxi no mundo (GOES, 2005).

Outras doenças que afetam a cultura são a mancha negra dos frutos (*Penicillium funiculosum* Thom e *Fusarium* sp.), podridão do topo ou podridão do olho (*Phytophthora nicotianae* Breda de Haan), podridão de raízes (*Phytophthora cinnamomi* Rands e várias

espécies de *Pythium*), colapso dos frutos causado por *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder, McFadden & Dimock) Brenner et al. e a Pink Disease (*Pantoea citrea*, *Gluconobacter oxydans* e *Acetobacter acetii*) (GOES, 2005).

Fatores abióticos, como a queima solar, também são importantes e de incidência comum em plantios localizados em regiões com temperaturas elevadas durante o desenvolvimento dos frutos (MATOS, 2000a).

1.2 A fusariose do abacaxizeiro

A fusariose, também conhecida como gomose, constitui-se na principal doença do abacaxizeiro. O primeiro relato da fusariose do abacaxizeiro a nível mundial ocorreu na Argentina em 1954 (ROHRBACH, 1994). Foi relatada pela primeira vez no Brasil por Kimati e Tokeshi (1964), no Estado de São Paulo, na variedade Smooth Cayenne, sendo associada à *Fusarium* sp., tendo se disseminado para todas as regiões produtoras através de material propagativo infectado. Posteriormente, o patógeno foi identificado como *Fusarium moniliforme* Sheld. var. *subglutinans* Wr. & Reink. (PISSARRA et al., 1979).

Em 1983, levando-se em consideração características morfológicas e fisiológicas, o agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro foi reclassificado como *Fusarium subglutinans* (Wollenw. & Reinking) P.E. Nelson, Toussoun & Marasas (NELSON et al., 1983; PLOETZ, 2001). Posteriormente, testes de inoculação cruzada de isolados de *F. subglutinans* do abacaxizeiro e de outros hospedeiros, comprovaram que a população que causa a fusariose do abacaxizeiro é específica, o que resultou na proposição de uma nova forma *specialis* *F. subglutinans* f. sp. *ananas* Ventura, Zambolim & Gilbertson (VENTURA et al., 1993).

Nirenberg e O'Donnell (1998) após a observação dos marcadores morfológicos e análises de sequências de DNA de fragmentos dos genes que codificam a subunidade 28S e a menor subunidade mitocondrial (mtSSU) do DNA ribossômico, β -tubulina, calmodulina e fator de alongação-1 α , demonstraram que o agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro pertence a uma espécie única, que foi denominada *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell (NIRENBERG; O'DONNELL, 1998; O'DONNELL et al., 1998, 2000).

Em 2010, na África do Sul, Jacobs et al. relataram a ocorrência de uma espécie distinta causando fusariose, denominada *Fusarium ananatum* Jacobs, Marasas & Van Wyk, cujos sintomas são inicialmente uma descoloração, seguida de depressão em forma de “V” na parte externa do fruto. Essa lesão se estende para os tecidos do interior do fruto como uma podridão (JACOBS et al., 2010)

A fusariose causada por *F. guttiforme* ocorre em todas as partes da planta e em todos os estádios de desenvolvimento, incluindo todos os tipos de mudas. Em estágio de desenvolvimento vegetativo as plantas infectadas apresentam lesões geralmente no terço inferior do caule, e as folhas dessa região apresentam infecção restrita à sua parte basal não clorofilada. Quando os tecidos da região clorofilada atingem a maturidade, tornam-se mais resistentes. Com o desenvolvimento da lesão no caule, ocorre uma redução no fluxo da seiva, resultando em enfezamento, clorose, murcha e morte da planta. Além da lesão do caule, a planta infectada pode expressar também sintomas como curvatura e encurtamento do caule, redução no comprimento das folhas, morte do meristema apical, afunilamento da planta e morte (MATOS, 1999; VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

No material propagativo, os sintomas caracterizam-se por lesão no caule, exsudação de goma e infecção na parte aclorofilada. No fruto observa-se a exsudação da goma na cavidade floral com apodrecimento da polpa na região infectada. Embora estes sintomas possam ser observados com maior intensidade a partir do final da floração, é na fase de maturação que eles tornam-se mais evidentes (MATOS, 1999; VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

O fungo *F. guttiforme* apresenta elevado grau de especificidade ao hospedeiro. A penetração geralmente ocorre por ferimentos naturais existentes na base das mudas ou por ferimentos ocasionados por insetos, ácaros ou tratos culturais. Desses fatores, os danos causados pela broca dos frutos, *Thecla basilides* (Geyer, 1837), são destaque pela contribuição para a penetração do patógeno. A própria arquitetura da planta contribui para que conídios que eventualmente estejam na superfície das folhas sejam arrastados pela chuva para a base das mesmas, onde o patógeno pode iniciar o processo de colonização. Porém, o principal sítio de infecção é constituído pelas inflorescências. A penetração se dá durante a antese, através do canal estilar e pelos ductos nectários (GOES, 2005).

A incidência da fusariose varia de acordo com a época de produção e o estágio de desenvolvimento da planta, estando esse efeito correlacionado a fatores ambientais, tais como precipitação pluvial e temperatura. A associação de elevadas precipitações pluviais com temperaturas amenas, durante o desenvolvimento das inflorescências, favorece a incidência da doença (MATOS, 2000b). Caso o desenvolvimento do fruto se dê em condições favoráveis ao desenvolvimento da doença (precipitações e umidade relativa elevadas e temperaturas entre 15°C e 25°C), a incidência pode ser superior a 80% (REINHARDT et al., 2000).

Em campo, a disseminação se dá principalmente por meio de insetos e pelo vento. (PLOETZ, 2006). A disseminação de *F. guttiforme* de uma região para outra se dá pela movimentação de mudas infectadas (REINHARDT et al., 2000).

O manejo da doença é feito através de uso de material propagativo sadio, controle de insetos e proteção da inflorescência e do fruto em desenvolvimento com fungicidas (PLOETZ, 2006). O uso de defensivos agrícolas é de alto custo e limitado para a cultura. Os únicos produtos registrados são os inseticidas com ingredientes ativos imidacloprido, tiametoxan, beta-ciflutrina, deltametrina e carbaril e os fungicidas para controle da podridão negra (captana), podridão do topo (captana e fosetil Al) e fusariose (tiofanato metílico, tebuconazol e tiabendazol). O único produto biológico é composto por *Bacillus thuringiensis*, e é usado no controle da broca dos frutos (AGROFIT, 2012).

Outras medidas como eliminação de restos culturais de plantios infectados, inspeção periódica e erradicação de plantas com sintomas, realização da indução floral em períodos desfavoráveis à ocorrência da doença e uso de variedades resistentes são alternativas promissoras para o controle da fusariose do abacaxizeiro (REINHARDT et al., 2000). Em 2006, o Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), lançou a cultivar Vitória, que apresenta resistência a fusariose.

1.3 Complexo *Gibberella fujikuroi* (GFSC)

Espécies de *Fusarium*, foram durante muito tempo, classificadas baseando-se apenas em caracteres morfológicos e sua especificidade para com o hospedeiro. Atualmente, com o uso de técnicas moleculares e a aplicação do conceito de espécie biológica, a forma como essas espécies são definidas gera uma informação mais confiável e acurada (KVAS et al., 2009; LESLIE et al., 2001; NIRENBERG; O'DONNELL, 1998).

A aplicação combinada dos conceitos de espécie morfológica, biológica e filogenética tem contribuído para a taxonomia do GFSC, assim como facilitou o reconhecimento e descrição das espécies inseridas nesse complexo. Essa abordagem conjunta se mostrou mais robusta e confiável (KVAS et al., 2009; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

As vantagens no uso conjunto dos conceitos de espécie (morfológica, biológica e filogenética) para identificação de espécies de *Fusarium* são fornecer meios para medir a quantidade de variação associada à morfologia, à fisiologia e às sequências de DNA, permitindo com isso, um melhor entendimento dos limites entre as espécies, especialmente para aquelas que se reproduzem principalmente de forma assexuada (KVAS et al., 2009).

Apesar de ainda não se conhecer a fase teleomórfica de *F. guttiforme*, esse fungo faz parte do complexo *Gibberella fujikuroi*, que é atualmente composto de 12 espécies biológicas com o teleomorfo descrito (HOVE et al., 2011; LEPOINT et al., 2005; LESLIE; SUMMERELL, 2006; SCAUFLAIRE et al., 2011). O complexo *Gibberella fujikuroi* (GFSC)

forma um grupo monofilético de espécies de *Fusarium* que possuem características morfológicas semelhantes, o que dificulta a sua diferenciação. GFSC corresponde aproximadamente à sessão *Liseola*, mas também acomoda certas espécies que originalmente foram classificadas em outras sessões de *Fusarium* (GEISER et al., 2005; KVAS et al., 2009; NIRENBERG; O'DONNELL, 1998; O'DONNELL et al., 1998).

1.4 Conceito de espécie filogenética

Para aplicar o conceito de espécie filogenética, análises filogenéticas com base em informações combinadas de várias regiões dos genes que codificam a subunidade 28S e a menor subunidade mitocondrial (mtSSU) do DNA ribossômico, β -tubulina, histona H3, calmodulina e fator de alongação-1 α tem sido utilizadas (AOKI et al., 2001; GEISER et al., 2005; KVAS et al. 2009; O'DONNELL et al., 1998; STEENKAMP et al., 2000).

O gene que codifica o fator de alongação-1 α tornou-se uma boa escolha como marcador, pois é um gene de cópia única e é altamente informativo entre espécies estreitamente relacionadas (GEISER et al, 2004; KVAS et al, 2009). Os dados moleculares são frequentemente analisados utilizando máxima parcimônia na análise cladística (SAMUELS; SEIFERT, 1995).

De acordo com Jacobs et al. (2010), em estudo com isolados do Brasil e da África do Sul, *F. ananatum* e *F. guttiforme* podem ser facilmente separados com base em comparações de sequências de DNA, utilizando os genes fator de alongação 1- α , β -tubulina e histona H3, levando à formação de clados distintos.

Soares (2011), analisando sequências de DNA dos genes β -tubulina e fator de alongação 1- α , de isolados de abacaxi de diversas regiões produtoras do Brasil, observou que o gene *tub2* obteve maior capacidade de distinção de grupos filogenéticos que o gene *tef1*.

Apesar da importância da fusariose para a cultura do abacaxi, pouco se conhece sobre a diversidade genética da população do agente etiológico no Brasil. Assim, o objetivo deste trabalho foi compor uma coleção representativa de *Fusarium* associado à fusariose do abacaxizeiro no país, para avaliar marcadores morfológicos e estudar sua filogenia, gerando informações que possibilitem o entendimento da estrutura populacional, da patogenicidade de *Fusarium guttiforme* e, por conseguinte, o desenvolvimento futuro de estratégias de manejo eficientes.

1.5 Referências bibliográficas

- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 20 de fev. 2012.
- ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. **Abacaxi**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2010.
- AOKI, T.; O'DONNELL, K.; ICHIKAWA, K. *Fusarium fractiflexum* sp. nov. and two other species within the *Gibberella fujikuroi* species complex recently discovered in Japan that form aerial conidia in false heads. **Mycoscience**, Tokio, v. 42, n. 5, p. 461-478, 2001.
- CABRAL, J. R. S.; MATOS, A. P.; SOUTO, G. F. Reação de germoplasma de abacaxi à inoculação com *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 7, p.787-791, 1985.
- CABRAL, J. R. S.; SOUZA, J. S.; FERREIRA, F. R. Variabilidade genética e melhoramento do abacaxi. In: QUEIRÓS, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R (Eds.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina. EMBRAPA/CPATSA, 1999. Disponível em: <<http://www.cpatosa.embrapa.br/catalogo/livrorg/abacaxi.pdf>>. Acesso em: 11 out. 2010.
- COLLINS, J. L. **The pineapple, botany, cultivation and utilization**. New York: Interscience Publishers, 1960. 244 p.
- COPPENS D'EECKENBRUGGE, G; LEAL, F. Morphology, anatomy and taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D. P.; PAULL, R. E.; ROHRBACH, K. G. **The pineapple: botany, production and uses**. New York: CAB International, 2003. p. 13-32.
- CRESTANI, M; BARBIERI, R. L.; HAWERROTH, F. J.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C. Das Américas para o mundo: origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 6, p. 1473-1483, 2010.
- CUNHA, G. A. P.; CABRAL, J. R. S. Taxonomia, espécies, cultivares e morfologia. In CUNHA, G. A. P.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. S. **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. p. 17-51.
- FERREIRA, F. R.; CABRAL, J. R. S. Pineapple germplasm in Brazil. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.334, p.23-26, 1993.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT**: agricultural statistic database. Rome: World Agricultural Information Centre, 2010. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em 10 de jan. 2012.
- GEISER, D. M. et al. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 5/6, p. 473-479, 2004.

- GEISER, D. M.; IVEY, M. L. L.; HAKIZA, G.; JUBA, J. H.; MILLER, S. A. *Gibberella xylarioides* (anamorph: *Fusarium xylarioides*), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is a previously unrecognized member of the *G. fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 1, p. 191-201, 2005.
- GIAGOMELLI, E. J.; PY, C. **O abacaxi no Brasil**. Campinas: Fundação Cargil, 1981. 101p.
- GOES, A. Doenças do abacaxi. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 9-14.
- GONÇALVES, N. B.; CARVALHO, V. D. In: GONÇALVES, N. B. (Ed.). **Abacaxi Pós-Colheita**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. 45p. (Frutas do Brasil, 5).
- GRANADA, G. G.; ZAMBAZI, R. C.; MENDONÇA, C. R. B. Abacaxi: produção, mercado e subprodutos. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 22, n.2, p. 405-422, 2004.
- HOVE, F. V.; WAALWIJK, C.; LOGRIECO, A.; MUNAUT, F.; MORETTI, A. *Gibberella musae* (*Fusarium musae*) sp. nov., a recently discovered species from banana is sister to *F. verticillioides*. **Mycologia**, New York, v. 103, n. 3, p. 570-585, 2011.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA **Dados de safra de abacaxi no Brasil**. On-line. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp>. Acesso em 10 de jan. 2012.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA **Estados@**: banco de dados. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2008. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/>. Acesso em 10 de jan. 2012.
- JACOBS, A. et al. *Fusarium ananatum* sp. nov. in the *Gibberella fujikuroi* species complex from pineapples with fruit rot in South Africa. **Fungal Biology**, Oxford, v. 114, n.7, p. 515-527, 2010.
- KIMATI, H.; TOKESHI, H. Nota sobre a ocorrência de *Fusarium* sp. causando resinose em abacaxi. **Revista de Agricultura**, v.39, p. 131-33, 1964.
- KVAS, M; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, B. D. ; WIGFIELD, M. J.; STEENKAMP, E. T. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 34, p.1-21, 2009.
- LEAL, F. Complementos a la clave para identificación de las variedades comerciales de piña *Ananas comosus* (L.) Merril. **Revista de la Facultad de Agronomía**, Maracay, v.16, n.1, p.1-12, 1990.
- LEPOINT, P. C. E.; MUNAUT, F. T.; MARAITE, H. M. M. *Gibberella xylarioides* Sensu Lato from *Coffea canephora*: a new mating population in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 12, p. 8466-8471, 2005

- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Ames: Blackwell Publishing, 2006. 388p.
- LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; SUMMERELL, B. A. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, n. 3, p. 107-117, 2001.
- MANETTI, L. M. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. **Química Nova**, São Paulo, v. 15, n. 00, p. 1-13, 2009.
- MATOS, A. P. Doenças e seu controle. In.: REINHARDT, D. H.; SOUZA, L. F. S.; CABRAL, J. R. S. (Eds.). **Abacaxi produção: aspectos técnicos**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura – Brasília: Embrapa. Comunicação para transferência de tecnologia, 2000a, 77p. (Frutas do Brasil, 7).
- MATOS, A. P. **Abacaxi Fitossanidade**. Brasília: Embrapa comunicação para transferência de tecnologia, 2000b, 77p. (Frutas do Brasil, 9).
- MATOS, A. P.; CUNHA, G. A. P.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. S.; Doenças e seu controle. **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**, Cruz das Almas: EMBRAPA, p. 269-305, 1999.
- MATOS, A. P.; REINHARDT, D. H. Pineapple in Brazil: characteristics, research and perspectives. **Acta Horticulturae**, n. 822, p. 25-36, 2009.
- MEDINA, J. C. et al. **Abacaxi: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1987, 285p.
- NASCENTE, A. S.; COSTA, R. S. C.; COSTA, J. N. M. **Cultivo do abacaxi em Rondônia**. Porto Velho, 2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Abacaxi/CultivodoAbacaxiRO/autres.htm>. Acesso em 27 de fev. 2012.
- NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium* species: an illustrated manual for identification**. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press. 1983.
- NIRENBERG, H. I.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York, v. 90, n. 3, p. 434-458, 1998.
- O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York, 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**, New York, v. 41, p. 61-78, 2000.
- PISSARRA, T. B.; CHAVES, G. M.; VENTURA, J. A. Sintomatologia da fusariose (*Fusarium moniliforme* Sheld. var. *subglutinans* Wr. & Reink) do abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4. p. 255-263, 1979.

PLOETZ, R. C. Significant diseases in the tropics that are caused by species of *Fusarium*. In: Summerell BA, Leslie JF, Backhouse D, Bryden WL, Burgess LW (eds), ***Fusarium***: Paul Nelson Memorial Symposium. The American Phytopathological Society Press, St Paul, pp. 295-309, 2001.

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

REINHARDT, D. H. **Abacaxi: produção, pós-colheita e mercado**. Fortaleza: Instituto Frutal, 2004, 139p.

REINHARDT, D. H.; MEDINA, V. M.; CALDAS, R. C.; CUNHA, G. A. P.; ESTEVAM, R. F. H. Gradientes de qualidade em abacaxi 'Pérola' em função do tamanho e estágio de maturação do fruto. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 544-546, 2004.

REINHARDT, D. H.; SOUZA, L. F. S.; CABRAL, J. R. S. **Abacaxi produção e aspectos técnicos**. Brasília: Ministério da Agricultura e Abastecimento, Frutas do Brasil/ EMBRAPA, 2000, 77p.

ROHRBACH, K. G. Fusariosis. In: PLOETZ RC, ZENTMEYER GA, NISHIJIMA WT, ROHRBACH KG, OHR HD (eds), **Compendium of Tropical Diseases**. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, 1994, p. 45-56.

SAMUELS, G. J.; SEIFERT, K. A. The impact of molecular characters on systematics of filamentous ascomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 37-67, 1995.

SCAUFLAIRE, J.; GOURGUE, M.; MUNAUT, F. *Fusarium temperatum* sp. nov. from maize, an emergent species closely related to *Fusarium subglutinans*. **Mycologia**, New York, v. 103, n. 3, p. 586-597, 2011.

SOARES, J. M. **Caracterização morfológica, molecular e patogênica do agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro no Brasil**. 2011. 59f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SOUZA, O. P.; COUTINHO, A. C.; TORRES, J. L. R. Avaliação econômica da produção do abacaxi irrigado cv Smooth Cayenne no Cerrado, em Uberaba-MG. **Revista Universidade Rural Série Ciências da Vida, Seropédica**, v. 30, n. 1, p. 1-14, 2010.

STEENKAMP, E. T.; WINGFIELD, B. D.; COUTINHO, T. A.; ZELLER, K. A.; WINGFIELD, M. J.; MARASAS, W. O.; LESLIE, J. F. PCR-based identification of *MAT-1* and *MAT-2* in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4378-4382, 2000.

VENTURA, J. A.; COSTA, H. Controle Cultural. In: OLIVEIRA, S. M. A.; TERADO, D.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. H. (Org.). **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2006. p. 145-169.

VENTURA, J. A.; MAFIA, L. A.; CHAVES, G. M.; Field induction of fusariosis in pineapple fruits with *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* Wr & Reg. **Fruits**, Paris, v. 36, n. 11, p. 707-710, 1981.

VENTURA, J. A.; ZAMBOLIM, L.; GILBERTSON, R. L. Proposição de nova forma specialis em *Fusarium subglutinans* em abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 208, 1993.

VENTURA, J. A.; ZAMBOLIM, L. Controle das doenças do abacaxizeiro. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. do; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: fruteiras**. Viçosa, MG: UFV, 2002. v. 1, p. 445-510.

CAPÍTULO II

Análise filogenética e patogênica do agente causal da fusariose do abacaxizeiro no Brasil

1 **Análise filogenética do agente causal da fusariose do abacaxizeiro no Brasil**

2

3 **Susan Satie Tsuji¹, Cristiano S. Lima², Ludwig H. Pfenning³, Sarah S. C. Guimarães³,**

4 **Juliana M. Soares³ & José A. Ventura⁴**

5

6 ¹Área de Fitossanidade, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de

7 Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brasil; ²Unidade Acadêmica de Garanhuns, UFRPE,

8 55292-270, Garanhuns, PE, Brasil; ³Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de

9 Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brasil; ⁴Instituto Capixaba de Pesquisa e Extensão Rural -

10 INCAPER, Rua Afonso Sarlo 160, Bento Ferreira, 29052-010, Vitória, ES, Brasil.

11

12 Autor para correspondência: Cristiano S. Lima, email: cristiano@uag.ufrpe.br

13

14 **RESUMO**

15 A fusariose é a doença mais importante do abacaxizeiro, provocando grandes perdas

16 econômicas. Uma estimativa da diversidade genética de *Fusarium* é fundamental para o

17 entendimento da estrutura populacional. Os isolados utilizados foram coletados em campos de

18 produção do Estado de Pernambuco e obtidos de coleção de culturas. Os isolados foram

19 caracterizados pela morfologia, patogenicidade e por meio de análises filogenéticas dos genes

20 fator de alongação-1 α (*tef1*) e calmodulina (*cmd*). Características morfológicas não foram

21 marcadores informativos para *Fusarium guttiforme*. A análise filogenética não separou os

22 isolados de acordo com as regiões das coletas. As árvores filogenéticas do gene *tef1*

23 apresentaram melhor topologia e suporte estatístico. As árvores filogenéticas dos dois genes

24 geradas pelo método de máxima parcimônia concordaram em parte quanto ao agrupamento

25 dos isolados do estudo, separando *Fusarium guttiforme* e *Fusarium ananatum* em dois grupos

26 distintos.

27

28 **Palavras-chave:** *Fusarium guttiforme*, *Fusarium ananatum*, filogenia, *Ananas comosus* var.

29 *comosus*

30

31 **ABSTRACT**

32 The fusariosis on pineapple is the most important disease of this crop, causing huge
33 losses to pineapple production in Brazil. A *Fusarium* genetic variability estimate is
34 fundamental to understanding the population structure. The isolates used in this study were
35 collected in production fields in Pernambuco State or obtained from culture collection. The
36 isolates were characterized by morphology, pathogenicity and through phylogenetic analyzes
37 of translation elongation factor-1 α (*tef1*) and calmodulin (*cmd*) genes. Morphological
38 characteristics were not informative markers for *Fusarium guttiforme*. Phylogenetic analysis
39 did not separate the isolates according to the collections regions. *Tef1* gene phylogenetic tree
40 showed the best topology and statistical support. The phylogenetic tree generated by the
41 combination of alignments of the two genes generated by maximum parsimony method
42 agreed partially, separating as well *Fusarium guttiforme* and *Fusarium ananatum* in two
43 distinct groups.

44

45 **Key words:** *Fusarium guttiforme*, *Fusarium ananatum*, phylogeny, *Ananas comosus* var.

46 *comosus*

47

48 **INTRODUÇÃO**

49 A fusariose do abacaxizeiro, conhecida também como gomose ou resinose fúngica, é a
50 principal doença da cultura e afeta todas as partes da planta. Os sintomas iniciais são
51 imperceptíveis, o que facilita a disseminação do patógeno por meio de transporte de mudas
52 infectadas. Os primeiros países em que a doença foi observada foram Argentina e Brasil. O

53 Espírito Santo e a Bahia são os Estados brasileiros com maior incidência do patógeno
54 (Ventura & Zambolim, 2002; Ploetz, 2006).

55 O agente etiológico era conhecido, até 1998, como *Fusarium subglutinans* (Wollenw.
56 & Reinking) P.E. Nelson, Toussoun & Marasas, com base em características morfológicas e
57 fisiológicas. O posterior estabelecimento da *forma specialis F. subglutinans* f. sp. *ananas*
58 Ventura, Zambolim & Gilbertson, com base em testes de inoculação cruzada de isolados de *F.*
59 *subglutinans* do abacaxi e outros hospedeiros, forneceu evidências da especificidade do
60 patógeno (Ventura et al., 1993).

61 A espécie *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell foi proposta como agente
62 etiológico da fusariose do abacaxizeiro através de estudos com base tanto na morfologia como
63 na filogenia de sequências do DNA, utilizando fragmentos dos genes que codificam a
64 subunidade 28S e a menor subunidade mitocondrial (mtSSU) do DNA ribossômico, a beta
65 tubulina (*tub2*), fator de alongação-1 α (*tef1*) e calmodulina (*cmd*) de nove isolados
66 provenientes do Brasil (Nirenberg & O'Donnell, 1998; O'Donnell et al., 1998; 2000).

67 Em 2010, na África do Sul, Jacobs et al. relataram a ocorrência de uma espécie distinta
68 causando fusariose, denominada *Fusarium ananatum* Jacobs, Marasas & Van Wyk, cujos
69 sintomas diferem da fusariose causada por *F. guttiforme*. Os sintomas foram observados em
70 frutos, onde inicialmente há uma descoloração seguida de depressão em forma de “V” na parte
71 externa, que se estende para os tecidos do interior do fruto como uma podridão.

72 Estudos sobre a determinação do agente causal da fusariose do abacaxizeiro no Brasil,
73 e a variabilidade genética de isolados desse fitopatógeno fornecerão informações importantes,
74 auxiliando no entendimento da interação planta-patógeno e no melhoramento genético.
75 Medidas fitossanitárias necessárias podem ser adotadas somente com a correta identificação
76 do patógeno e aliadas a conhecimentos sobre a variabilidade populacional do patógeno e sua
77 distribuição geográfica para determinar o manejo da doença. Considerando a importância

78 econômica da cultura no Brasil, esse conhecimento é imperativo para programas de
79 melhoramento e controle da doença.

80 Este trabalho teve como objetivos: compor uma coleção representativa de *Fusarium*
81 associado à fusariose do abacaxizeiro, analisar marcadores morfológicos, inferir filogenia
82 destes isolados com base nas sequências dos genes fator de alongação-1 α (*tef1*) e calmodulina
83 (*cmd*) e determinar qual espécie de *Fusarium* causa a fusariose do abacaxizeiro no Brasil.

84

85 **MATERIAL E MÉTODOS**

86

87 **Obtenção dos isolados e caracterização morfológica**

88 Frutos de abacaxi com sintomas de fusariose foram coletados na região produtora de
89 Pombos – PE, em pequenas propriedades caracterizadas por agricultura familiar. O
90 isolamento foi realizado após a flambagem de pedaços dos frutos de onde foram retirados
91 fragmentos de tecidos que foram plaqueados em meio BDA (batata, dextrose, ágar). Os
92 isolados foram purificados através de culturas monospóricas em meio SNA (ágar pobre em
93 nutrientes sintéticos). Os isolados foram depositados na Coleção de Culturas de Fungos
94 Fitopatogênicos “Prof^a Maria Menezes” (CMM), da Universidade Federal Rural de
95 Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brasil). O restante do isolados foram recuperados da
96 Coleção Micológica de Lavras (CML), da Universidade Federal de Lavras (Lavras, Minas
97 Gerais, Brasil) (Tabela 1).

98 As características morfológicas foram analisadas após 10-14 dias em culturas fúngicas
99 crescidas a 20°C com fotoperíodo de 12 horas de luz branca fluorescente, em meio SNA com
100 pedaços de papel de filtro autoclavados. Culturas fúngicas crescidas em meio BDA a 25°C no
101 escuro após três dias de incubação, tiveram o diâmetro das colônias medido utilizando
102 paquímetro, e as colorações das colônias foram observadas após 10-14 dias de incubação a
103 20°C com fotoperíodo de 12 horas de luz branca fluorescente, em meio BDA.

104

105 **Extração de DNA**

106 Os isolados monospóricos foram cultivados em meio líquido extrato de malte a 2%
107 por três dias sob agitação constante de 100 rpm e temperatura ambiente (25-28°C). A
108 biomassa foi filtrada em gaze esterilizada e macerada após congelamento com nitrogênio
109 líquido, sendo utilizado polivinilpirrolidone como antioxidante. A pulverização da biomassa
110 fúngica foi realizada em cadinho utilizando pistilo. O micélio triturado foi transferido para
111 tubo de 1,5 mL de microcentrífuga e a extração de DNA foi realizada pelo protocolo
112 utilizando tampão CTAB (Leslie & Summerell, 2006). O DNA extraído foi analisado em gel
113 de agarose a 1% utilizando o corante GelRed (Biotium®). O DNA foi quantificado utilizando-
114 se o aparelho espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). A concentração de
115 DNA foi ajustada para 5 ng para as reações de PCR.

116

117 **Amplificação por PCR e sequenciamento de DNA**

118 Foram selecionados 96 isolados de *Fusarium* associados ao abacaxizeiro para o
119 sequenciamento do gene fator de alongação 1- α (*tef1*) (O'Donnell et al., 1998). Os 17 isolados
120 que tiveram um fragmento do gene calmodulina (*cmd*) (O'Donnell et al., 2000) sequenciado
121 foram selecionados com base nos haplótipos gerados na análise do gene *tef1*. Os primers EF-1
122 (5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') e EF-2 (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3')
123 foram utilizados na amplificação do gene *tef1*. Para reação de amplificação do gene *cmd*
124 foram utilizados os primers CL1 (5'-GARTWCAAGGAGGCCTTCTC-3') e CL2A (5'-
125 TTTTTCATCATGAGTTGGAC-3').

126 As reações de PCR foram realizadas como descritas por O'Donnell et al. (1998), para
127 *tef1* e por O'Donnell et al. (2000) para *cmd*. As condições das reações de PCR, para
128 amplificação do gene *tef1*, foram de 1 min a 94°C seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a
129 62°C, 1 min a 72°C, uma extensão final de 5 min a 72°C, seguida por 4°C. As condições das

130 reações de PCR, para amplificação do gene *cmd*, foram de 5 min a 94°C seguido de 31 ciclos
131 de 30 s a 94°C, 1 min a 55°C, 2 min a 72°C, uma extensão final de 5 min a 72°C, seguida por
132 4°C. Os produtos das PCR foram analisados por eletroforese em géis de agarose a 1%
133 corados com GelRed (Biotium®) e as bandas estimadas quanto ao seu peso molecular e
134 concentração por comparação com o marcador 1 Kb ladder (Invitrogen). Os produtos de PCR
135 purificados com o kit GenElute™ PCR Clean-Up da SIGMA, foram enviados para Seoul –
136 Coréia do Sul, para sequenciamento no aparelho 3730XL DNA sequencer da empresa
137 Macrogen Korea.

138

139 **Análises filogenéticas**

140 Os eletroferogramas gerados foram analisados utilizando o programa SeqAssem®
141 (HEPPERLE, 2004) e as sequências comparadas com as bases de dados do *National Center*
142 *for Biotechnology Information* (NCBI) através do programa BLAST
143 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Foram utilizadas também sequências de referência de *F.*
144 *guttiforme* e *F. anatum*, bem como de outras espécies pertencentes ao GFSC que foram
145 adquiridas a partir do GenBank (Tabela 2).

146 As sequências foram alinhadas utilizando Clustal W (Thompson et al., 1994). Os
147 alinhamentos foram corrigidos manualmente, sendo as análises filogenéticas realizadas no
148 programa Mega 5® (Tamura et al., 2011). As análises filogenéticas para cada conjunto de
149 dados foram construídas pelo método de máxima parcimônia com análise de ‘bootstrap’ com
150 1000 repetições. *Fusarium oxysporum* Schltdl. emend. Snyder & Hansen foi selecionado
151 como outgroup por apresentar maior distância genética entre as sequências estudadas.

152

153 **Análise dos haplótipos**

154 As sequências do gene *tef1* foram utilizadas para a análise dos haplótipos dos isolados
155 de *F. guttiforme*. Os isolados foram agrupados dentro de subpopulações de acordo com a sua

156 região de origem (Tabelas 1 e 3). O número de haplótipos entre as populações foram
157 conduzidos no programa DnaSP 4.0 (Rozas et al., 2003) e a análise dos mesmos foi feita no
158 programa MEGA 5 através de ‘Neighbor-Joining’ com o modelo de substituição Kimura-2-
159 parameter.

160

161 **Testes de patogenicidade**

162 Os testes de patogenicidade dos isolados de *Fusarium* foram conduzidos no Instituto
163 Capixaba de Pesquisa e Extensão Rural, Incaper, em Vitória – ES, do período de outubro de
164 2011 a janeiro de 2012. Os ensaios foram realizados de acordo com Ventura (1994), em
165 mudas de abacaxizeiro da cultivar Pérola, devido ao alto grau de suscetibilidade. As mudas do
166 tipo filhote, sem a aplicação de fungicidas, foram obtidas da Fazenda Experimental do Incaper
167 em Sooretama – ES.

168 O teste foi realizado com os isolados da Tabela 4. Os isolados E-480 e E-203 de *F.*
169 *guttiforme* foram utilizados como referência para sintomas causados pelo patógeno. Mudas
170 inoculadas com água destilada esterilizada foram utilizadas como controle negativo dos
171 sintomas. A avaliação foi feita observando-se o aparecimento da lesão e medindo o seu
172 diâmetro a partir da base das mudas no ponto de inoculação.

173

174 **RESULTADOS**

175

176 **Caracterização morfológica**

177 A caracterização morfológica dos isolados de Pernambuco foi realizada utilizando o
178 isolado CML1063 = NRRL 25295 = JAV E 248 = BBA 69661 = CBS 409.97 = IMI 376113
179 (*ex-holotype*), como referência. Os isolados apresentaram marcadores morfológicos
180 condizentes com *F. guttiforme*, como microconídios obovóides em falsas cabeças produzidos

181 no micélio aéreo, ausência de clamidósporo, esporodóquios de coloração alaranjada e mono e
182 polifiálides.

183 O diâmetro das colônias variou de 1,86 a 3,1 cm. O isolado de referência apresentou
184 diâmetro de 2,67 cm. Os isolados apresentaram coloração branca tanto na superfície superior
185 da colônia quanto no micélio aéreo. A coloração inferior das colônias variou de branca a
186 violeta. A produção de esporodóquios foi pouca, não estando presentes em todos os isolados e
187 quando presentes apresentaram coloração alaranjada. O tamanho dos microconídios
188 mensurados variou de 9 a 20 µm de comprimento por 3 a 5 µm de largura, se apresentando
189 asseptados ou com 1 ou 2 septos. Os macroconídios se apresentaram de retos a ligeiramente
190 curvados, com tamanha variando de 40 a 72 µm de comprimento por 3 a 5 µm de largura,
191 sendo observados de 3 a 8 septos.

192

193 **Análise dos haplótipos**

194 Foram analisadas 114 sequências do gene *tef1* de isolados coletados em sete Estados
195 do Brasil sendo divididos em populações do Nordeste e Sudeste. Para todos os parâmetros
196 avaliados, a população dos Sudeste apresentou os maiores valores, demonstrando uma maior
197 diversidade. Dos cinco haplótipos definidos neste estudo, o Estado do Espírito Santo possui
198 representantes de quatro deles (Tabela 3), não sendo encontrado apenas o haplótipo 3 (H3)
199 cujo único representante pertence ao Estado de São Paulo (Tabela1, figuras 4 e 5).

200

201 **Análise filogenética**

202 A amplificação dos fragmentos gênicos por PCR gerou produtos de aproximadamente
203 600 pb para *tef1* e aproximadamente 680 pb para *cmd*. Para a análise filogenética de máxima
204 parcimônia de *tef1*, 17 isolados foram selecionados representando os haplótipos identificados
205 e 23 sequências do GenBank foram usadas como referência. Na análise filogenética de
206 máxima parcimônia realizada com *cmd*, 17 isolados sequenciados foram analisados

207 juntamente com 21 isolados de referência. Um isolado de referência de *F. oxysporum* foi
208 utilizado como outgroup em todas as análises.

209 As árvores geradas pelo método de MP das sequências de *tef1* separaram os isolados
210 de *F. guttiforme* de outras espécies, formando um grupo monofilético (Figura 1). Dentro desse
211 grupo houve a formação de subgrupos, sendo o subgrupo A, composto por sete isolados de
212 cinco Estados (BA, CE, ES, PB e PE) e os isolados de referência de *F. guttiforme* (CML1063
213 e MRC6782), o subgrupo B, composto por dois isolados, um de SP e o outro o isolado de
214 referência MRC6783, o subgrupo C composto por dois isolados do ES e o subgrupo D
215 composto por cinco isolados de três Estados (ES, MG e PE) . Os subgrupos foram bem
216 definidos, todos apresentando suporte estatístico (valor de ‘bootstrap’ maiores que 50%).
217 Todos os isolados do estudo permaneceram dentro do grupo *F. guttiforme*, não sendo
218 observadas divisões quanto à região geográfica das coletas. Os agrupamentos concordam com
219 os haplótipos, sendo o subgrupo A formado por isolados com haplótipo 2, o subgrupo B
220 formado por isolados com haplótipo 3, o subgrupo C formado por isolados com haplótipo 4, o
221 subgrupo D formado por isolados do haplótipo 1 e o isolado CML1026 representa o haplótipo
222 5. Nenhum dos isolados do estudo agrupou com *F. ananatum*, cujo isolado de referência
223 formou um grupo irmão distinto de *F. guttiforme*. Os isolados de referência se agruparam em
224 clados Asiático, Americano e Africano de acordo com O’Donnell et al. (2000).

225 As árvores geradas pelo método de MP das sequências de *cmd* separaram os isolados
226 de *F. guttiforme* formando um grupo monofilético (Figura 2). Dentro desse grupo houve a
227 formação de subgrupos que apresentaram suporte estatístico (valor de ‘bootstrap’ maior que
228 50%). Nenhum dos subgrupos foi formado pelos mesmos agrupamentos obtidos em *tef1*.
229 Nenhum dos isolados do estudo agrupou com *F. ananatum*, cujo isolado de referência formou
230 um grupo irmão distinto de *F. guttiforme*. Os isolados de referência se agruparam em clados
231 Asiático, Americano e Africano de acordo com O’Donnell et al. (2000).

232 Considerando o princípio da concordância genealógica de genes para reconhecimento
233 de espécies filogenéticas (Genealogical concordance phylogenetic species recognition), ou
234 GCPSR (Taylor et al., 2000), os alinhamentos dos dois genes (*tef1* e *cmd*) foram combinados,
235 gerando árvores pelos métodos de MP (Figura 3). Assim como nas árvores individuais,
236 observou-se que com a análise combinada toda a população foi reconhecida como *F.*
237 *guttiforme*. Na análise combinada dos genes, nenhum dos isolados do estudo agrupou com o
238 isolado de referência de *F. ananatum*, que formou um grupo irmão distinto. O subgrupo
239 formado pelos isolados CMM3669, CMM3672 e CMM3702, todos do Estado de
240 Pernambuco, apresentou bom suporte estatístico e se agrupou tanto nas árvores individuais
241 quanto na combinada. O subgrupo formado pelos isolados CMM2100 e CMM2119, ambos do
242 Estado do Espírito Santo, apresentou bom suporte estatístico e se agrupou na árvore de *tef1* e
243 na combinada.

244

245 **Teste de patogenicidade**

246 Foram avaliados 27 isolados do Estado de Pernambuco. Os dados obtidos foram
247 comparados com os resultados do teste de patogenicidade de 10 isolados da região Sudeste de
248 estudo anterior (Soares, 2011).

249

250 **DISCUSSÃO**

251 Nesse estudo, foi avaliado um grande número de isolados de *Fusarium* com
252 características de *F. guttiforme* associados à fusariose do abacaxizeiro de sete Estados
253 produtores do Brasil.

254 Espécies que foram delimitadas pelo conceito de espécie morfológica como *Fusarium*,
255 geralmente são compostas por mais de uma espécie ou linhagem filogenética (O'Donnell, et
256 al., 1998; Jacobs et al., 2010). A identificação apenas com base em características
257 morfológicas e patogênicas, não possibilita a determinação das relações filogenéticas entre

258 espécies do GFSC. Técnicas moleculares como sequenciamento de DNA, PCR e AFLP são
259 utilizadas na identificação e estudos de diversidade genética em populações, assim como
260 ajudam a elucidar os complexos de espécies do gênero *Fusarium*, servindo como marcadores
261 para populações de mesmo fenótipo, mas genotipicamente diferentes (Bogale et al., 2006;
262 Leslie & Summerell, 2006).

263 Através das análises filogenéticas, concluiu-se que a espécie responsável pela
264 fusariose do abacaxizeiro no Brasil trata-se de *F. guttiforme*, e que a espécie *F. ananatum*
265 aparentemente não está presente no país. Não houve variabilidade morfológica que pudesse
266 gerar agrupamentos entre os isolados deste estudo, desta forma a diversidade na espécie *F.*
267 *guttiforme* foi mostrada pelas análises filogenéticas dos genes *tefl* e *cmd*. Neste estudo, a
268 análise do gene *tefl* dividiu o conjunto de dados em subgrupos bem definidos e com bom
269 suporte estatístico, porém, o gene *cmd* não apresentou essa mesma capacidade distinção. As
270 topologias das árvores de *tefl* e *cmd* foram diferentes, evidenciando que o gene *tefl* possui
271 um sinal filogenético melhor, ficando as árvores com uma melhor resolução.

272 Os isolados de *F. guttiforme* obtidos nos Estados da Bahia, Ceará, Espírito Santo,
273 Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco e São Paulo, apresentaram diversidade genética, com
274 base no polimorfismo das sequências do gene *tefl*. Os 114 isolados formaram cinco
275 haplótipos. Os isolados do Espírito Santo foram divididos em quatro haplótipos, dando
276 indícios que o Estado pode ser fonte de disseminação do patógeno. O fluxo de germoplasma
277 pode ter contribuído na disseminação do patógeno para as demais regiões produtoras, uma vez
278 que a variação genotípica dentro das subpopulações foi baixa. Os resultados obtidos
279 mostraram diferentes haplótipos associados à patogênese do abacaxizeiro no Brasil, indicando
280 diversidade genética na espécie.

281 Uma ferramenta para avaliação de riscos de potenciais agentes fitopatogênicos é a
282 compreensão dos processos evolutivos que levam ao surgimento de novos patógenos
283 (Stukenbrock & McDonald, 2008). Um haplótipo é uma unidade fundamental com uma

284 combinação única de nucleotídeos em uma sequência (loco). Indivíduos que compartilham
285 um haplótipo tem os mesmos nucleotídeos em posições variáveis ou não (Templeton, 1994;
286 Carbone & Kohn, 2001).

287 O surgimento de novos haplótipos pode se dar por mutações ou por recombinação.
288 Quanto maior é a diversidade genética de uma população, maior é o seu potencial evolutivo,
289 aumentando a probabilidade dela se adaptar a novas condições ambientais (McDonald, 1997).
290 Diante disso, a probabilidade de o Estado do Espírito Santo ser a fonte de disseminação do
291 patógeno, explicaria a existência de somente dois haplótipos da região Nordeste onde as
292 condições ambientais são mais severas, exigindo indivíduos mais adaptados a essas condições
293 restritivas.

294 Muitos fungos têm reprodução predominante, ou em muitos casos exclusivamente,
295 assexuada, por isso a dificuldade de interpretação de evidências de trocas genéticas e
296 recombinação muitas vezes aparente nesses microrganismos (Carbone & Kohn, 2001).

297 A fusariose do abacaxizeiro é uma doença de difícil manejo, onde o uso de defensivos
298 agrícolas é limitado e de alto custo. Estes resultados contribuem para o conhecimento da
299 população do patógeno, sendo um subsídio para trabalhos futuros de melhoramento, uma vez
300 que, a dificuldade no desenvolvimento de cultivares resistentes é maior quando ocorre uma
301 alta diversidade genética do patógeno.

302

303 **AGRADECIMENTOS**

304 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e à
305 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES pela concessão das
306 bolsas dos autores. Ao Laboratório de Patologia de Sementes da Universidade Federal de
307 Lavras pelo uso de seus aparelhos.

308

309 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

310

311 Bogale M, Wingfield BD, Wingfield MJ, Steenkamp ET (2006) Characterization of *Fusarium*
312 *oxysporum* isolates from Ethiopia using AFLP, SSR and DNA sequence analyses. Fungal
313 Diversity 23:51-66.

314

315 Carbone I, Kohn LM (2001) A microbial population-species interface: nested cladistic and
316 coalescent inference with multilocus data. Molecular Ecology 10:947-964.

317

318 Hepperle D (2004) SeqAssem©: a sequence analysis tool contig assembler and trace data
319 visualization tool for molecular sequences. Win32-Version. Klein Raden, 2004. Disponível
320 em: <<http://www.sequentix.de>>.

321

322 Jacobs A. et al. (2010) *Fusarium ananatum* sp. nov. in the *Gibberella fujikuroi* species
323 complex from pineapples with fruit rot in South Africa. Fungal Biology 114:515-527.

324

325 Leslie JF, Summerell BA (2006) The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing.

326

327 McDonald BA (1997) The population genetics of fungi: tools and techniques. Phytopathology
328 87:448-453.

329

330 Nirenberg HI, O'Donnell K (1998) New *Fusarium* species and combinations within the
331 *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90:434-458.

332

333 O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg HI (1998) Molecular systematics and phylogeography of
334 the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycolgia 90:465-493.

335

336 O'Donnell K, Nirenberg HI, Aoki T, Cigelnik E (2000) A multigene phylogeny of the
337 *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct
338 species. *Mycoscience* 41:61-78.
339

340 Ploetz RC (2006) *Fusarium*-Induced diseases of tropical, perennial crops. *Phytopathology*
341 96:648-652.
342

343 Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism
344 analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496-2497.
345

346 Soares JM (2011) Caracterização morfológica, molecular e patogênica do agente etiológico da
347 fusariose do abacaxizeiro no Brasil. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Universidade
348 Federal de Lavras. Lavras MG, Brasil.
349

350 Stukenbrock EH, McDonald BA (2008) The origins of plant pathogens in agro-ecosystems.
351 *Annual Review of Phytopathology* 46:75-100.
352

353 Tamura K et al (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum
354 likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and*
355 *Evolution* 28:2731-2739.
356

357 Taylor J W et al. (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi.
358 *Fungal Genetics and Biology* 31:21-32.
359

360 Templeton AR (1994) The role of molecular genetics in speciation studies. In: *Molecular*
361 *ecology and evolution: approaches and applications*. Switzerland. Schierwater B. pp. 455-477.

362

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

366

367 Ventura JA, Zambolim L (2002) Controle das doenças do abacaxizeiro. In: Zambolim L, Vale
368 FXR do, Monteiro AJA, Costa H. Controle de doenças de plantas: fruteiras. Viçosa, MG:
369 UFV. pp. 445-510.

370

371 Ventura JA, Zambolim L, Gilbertson RL (1993) Proposição de nova forma *specialis* em
372 *Fusarium subglutinans* em abacaxizeiro. *Fitopatologia Brasileira* 18:208.

373

374 Ventura JA (1994) Fusariose do abacaxizeiro: caracterização do patógeno, epidemiologia da
375 doença, resistência e micro-propagação do hospedeiro *in vitro*. Tese (Doutorado em
376 Agronomia) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

Tabela 1. Isolados utilizados no estudo

Acesso CML	Host - Subst	Origem	Coordenadas	<i>tef1</i>	<i>cmd</i>	Haplótipo
CML 903	AC (P-Fo)	Presidente Kennedy, ES		X	X	H2
CML 905	AC (P-Fi)	Presidente Kennedy, ES		X	X	H2
CML 906	AC (P-Fo)	Presidente Kennedy, ES		X	X	H2
CML 911	AC (P-Fo)	Fazenda Jaqueira, ES		X		H2
CML 912	AC (P-Fo)	Marataízes, ES		X		H2
CML 914	AC (P-Fo)	Marataízes, ES		X		H2
CML 916	AC (P-Fo)	Marataízes, ES		X	X	H2
CML 918	AC (P-Ca)	Marataízes, ES		X		H2
CML 919	AC (P-Fo)	Marataízes, ES		X	X	H2
CML 921	AC (P-Fi)	Marataízes, ES		X		H2
CML 923	AC (P-Fr)	Jegoriuma, ES		X		H1
CML 924	AC (P-Fo)	Jegoriuma, ES		X	X	H2
CML 930	AC (P-Fo)	Santa Rita, PB		X	X	H2
CML 996	AC (P-Fi)	Itaberaba, BA		X		H2
CML 997	AC (P-Fi)	Itaberaba, BA		X	X	H2
CML 999	AC (P-Fi)	Itaberaba, BA		X	X	H2
CML 1026	AC (P-Fi)	Canaã, ES		X	X	H5
CML 1027	AC (P-Fr)	Canaã, ES		X		H2
CML 1030	AC (P-Ca)	Itaberaba, BA		X		H2
CML 1034	AC (SC)	São Paulo		X	X	H3
CML 1037	AC	MG		X	X	H1
CML 1041	AC	Itaberaba, BA		X		H2
CML 1043	AC	Santa Rita, PB		X	X	H2
CML 1044	AC	Santa Rita, PB		X	X	H2
CML 1045	AC	Santa Rita, PB		X	X	H2
CML 1051	AC (SC)	Espírito Santo		X		H2
CML 1053	AC (P)	Bahia		X		H2
CML 1057	AC (P-Fo)	Frutal, MG		X		H2
CML 1065	AC	Brasil, ES		X		H2
CML 1067	AC (SC -Fo)	Brasil, MG		X		H2
CML 1637	AC	Santa Rita, PB		X		H2
CML 1638	AC	Santa Rita, PB		X		H2
CML 2079	AC (Fo)	Monte Alegre, MG		X	X	H2
CML 2083	AC (Fo)	Monte Alegre, MG		X	X	H2
CML 2099	AC (Fo)	Marataízes (Com. Siri), ES		X	X	H2
CML 2100	AC (Fo)	Cach Itap, ES		X	X	H4

CML 2103	AC (Fo)	Cach Itap, ES		X	X	H1
CML 2106	AC (Fo)	Sooretama, ES		X	X	H2
CML 2114		Sooretama, ES		X	X	H2
CML 2119	AC (JUPI)	Jaguaré, ES		X	X	H4
CML 2127		Jaguaré, ES		X	X	H1
CML 2130		Ceará		X		H2
CML 2149		Ceará		X		H1
CML 2153		Ceará		X		H1
CMM 3658	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra I), PE	S 08°08'50.7"	X	X	H2
CMM 3659	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra I), PE	W 035°24'41.8"	X		H2
CMM 3660	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra I), PE	Alt. 240	X		H2
CMM 3661	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra I), PE		X		H2
CMM 3662	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra I), PE		X		H2
CMM 3663	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra I), PE		X	X	H2
CMM 3664	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra I), PE		X		H2
CMM 3665	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra I), PE		X		H2
CMM 3666	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra I), PE		X		H2
CMM 3667	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra I), PE		X		H2
CMM 3668	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra I), PE		X	X	H2
CMM 3669	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE	S 08°08'59.7"	X		H1
CMM 3670	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE	W 035°25'27.0"	X		H2
CMM 3671	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE	Alt. 251	X		H2
CMM 3672	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE		X	X	H1
CMM 3673	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE		X		H1
CMM 3674	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE		X		H2
CMM 3675	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE		X		H1
CMM 3676	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE		X		H1
CMM 3677	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE		X		H1
CMM 3678	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE		X		H1
CMM 3679	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE		X		H1
CMM 3680	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE		X		H1
CMM 3681	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE		X		H1
CMM 3682	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE		X		H2
CMM 3683	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE		X		H2
CMM 3684	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE		X		H1
CMM 3685	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE		X		H2
CMM 3686	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE		X	X	H1
CMM 3687	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE		X		H1
CMM 3688	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE		X		H1

CMM 3689	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE		X		H2
CMM 3690	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE		X		H1
CMM 3691	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE		X		H2
CMM 3692	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE		X		H1
CMM 3693	AC (Fr)	Pombos (Pé de Serra II), PE		X		H1
CMM 3694	AC (Fr)	Pombos (Serra das Russas), PE	S 08°09'33.9" W 035°26'01.6" Alt. 277	X		H2
CMM 3695	AC (Fr)	Pombos (Serra das Russas), PE		X	X	H2
CMM 3696	AC (Fr)	Pombos (Serra das Russas), PE		X		H2
CMM 3697	AC (Fr)	Pombos (Serra das Russas), PE		X		H1
CMM 3698	AC (Fr)	Pombos (Serra das Russas), PE		X		H2
CMM 3699	AC (Fr)	Pombos (Serra das Russas), PE		X	X	H1
CMM 3700	AC (Fr)	Pombos (Serra das Russas), PE		X		H1
CMM 3701	AC (Fr)	Pombos (Serra das Russas), PE		X		H2
CMM 3702	AC (Fr)	Pombos (Serra das Russas), PE		X	X	H1
CMM 3703	AC (Fr)	Pombos (Maracujá), PE		S08°08'38.0" W035°25'07.7" Alt. 257	X	
CMM 3704	AC (Fr)	Pombos (Maracujá), PE	X			H2
CMM 3705	AC (Fr)	Pombos (Maracujá), PE	X			H1
CMM 3706	AC (Fr)	Pombos (Maracujá), PE	X			H2
CMM 3707	AC (Fr)	Pombos (Maracujá), PE	X			H1
CMM 3708	AC (Fr)	Pombos (Maracujá), PE	X		X	H2
CMM 3709	AC (Fr)	Pombos (Maracujá), PE	X			H2
CMM 3710	AC (Fr)	Pombos (Maracujá), PE	X			H2
CMM 3711	AC (Fr)	Pombos (Maracujá), PE	X			H1
CMM 3712	AC (Fr)	Pombos (Maracujá), PE	X			H1
CMM 3713	AC (Fr)	Pombos (Maracujá), PE	X		X	H2
CMM 3714	AC (Fr)	Pombos (Maracujá), PE	X			H2
CMM 3715	AC (Fr)	Pombos (Maracujá), PE	X			H2
CMM 3716	AC (Fr)	Pombos (Maracujá), PE	X			H2
CMM 3717	AC (Fr)	Pombos (Maracujá), PE	X			H1
CMM 3718	AC (Fr)	Pombos (Maracujá), PE	X			H2
CMM 3719	AC (Fr)	Pombos (Maracujá), PE	X		H1	
DB1	AC	ES		X	X	H2
DB4	AC	ES		X	X	H2
DB7	AC	ES		X	X	H2
E391	AC	CE		X		H1
E392	AC	CE		X		H2
E395	AC	CE		X	X	H2

E405	AC	CE		X		H2
E406	AC	CE		X		H2

Abreviações: AC (*Ananas comosus*), P (cultivar Pérola), SC (cultivar Smooth Cayenne), Fo (folha), Ca (caule), Fi (muda do tipo filhote) e Fr (fruto)

Tabela 2. Sequências de referência utilizadas na análise filogenética

Espécie	Código do isolado	Código de acesso GenBank	
		<i>tef1</i> ^b	<i>cmd</i> ^c
<i>F. oxysporum</i>	NRRL22902	AF160312	AF158365
<i>F. acutatum</i>	NRRL13308	AF160276	AF158329
<i>F. ananatum</i>	NRRL22945*	AF160297	AF158350
<i>F. anthophilum</i>	NRRL13602	AF160292	AF158345
<i>F. brevicatenulatum</i>	NRRL25446	AF160265	AF158318
<i>F. bulbicola</i>	NRRL13618	AF160294	AF158347
<i>F. dlaminii</i>	NRRL13164	AF160277	AF158330
<i>F. globosum</i>	NRRL26131	AF160285	AF158338
<i>F. guttiforme</i>	NRRL25295 (CML1063)	Sequenciado no estudo	Sequenciado no estudo
	MRC6782	DQ282170	-
	MRC6783	DQ282166	-
<i>F. lactis</i>	NRRL25200	AF160272	AF158325
<i>F. napiforme</i>	NRRL13604	AF160266	AF158319
<i>F. phyllophilum</i>	NRRL13617	AF160274	AF158327
<i>F. proliferatum</i>	NRRL22944	AF160280	AF158333
<i>F. pseudoanthophilum</i>	NRRL25206	AF160264	AF158317
<i>F. pseudocircinatum</i>	NRRL22946	AF160271	AF158324
<i>F. pseudonygamai</i>	NRRL13592	AF160263	AF158316
<i>F. ramigenum</i>	NRRL25208	AF160267	AF158320
<i>F. sacchari</i>	NRRL13999	AF160278	AF158331
<i>F. succisae</i>	NRRL13613	AF160291	AF158344
<i>F. udum</i>	NRRL22949	AF160275	AF158328
<i>G. fujikuroi</i>	NRRL13566	AF160279	AF158332
<i>G. moniliformis</i>	NRRL22172	AF160262	AF158315

^aAbreviações das coleções de culturas: MRC: Medical Research Council, Tygerberg, Cidade de Cape, África do Sul. NRRL: *National Centre for Agricultural Utilization Research*, Peoria, IL, USA. ^bSequências do gene *tef1* obtidas do GenBank, NCBI; ^cSequências do gene *cmd* obtidas do GenBank, NCBI. *Isolado reclassificado em *F. ananatum* de acordo com Jacobs, et al. (2010).

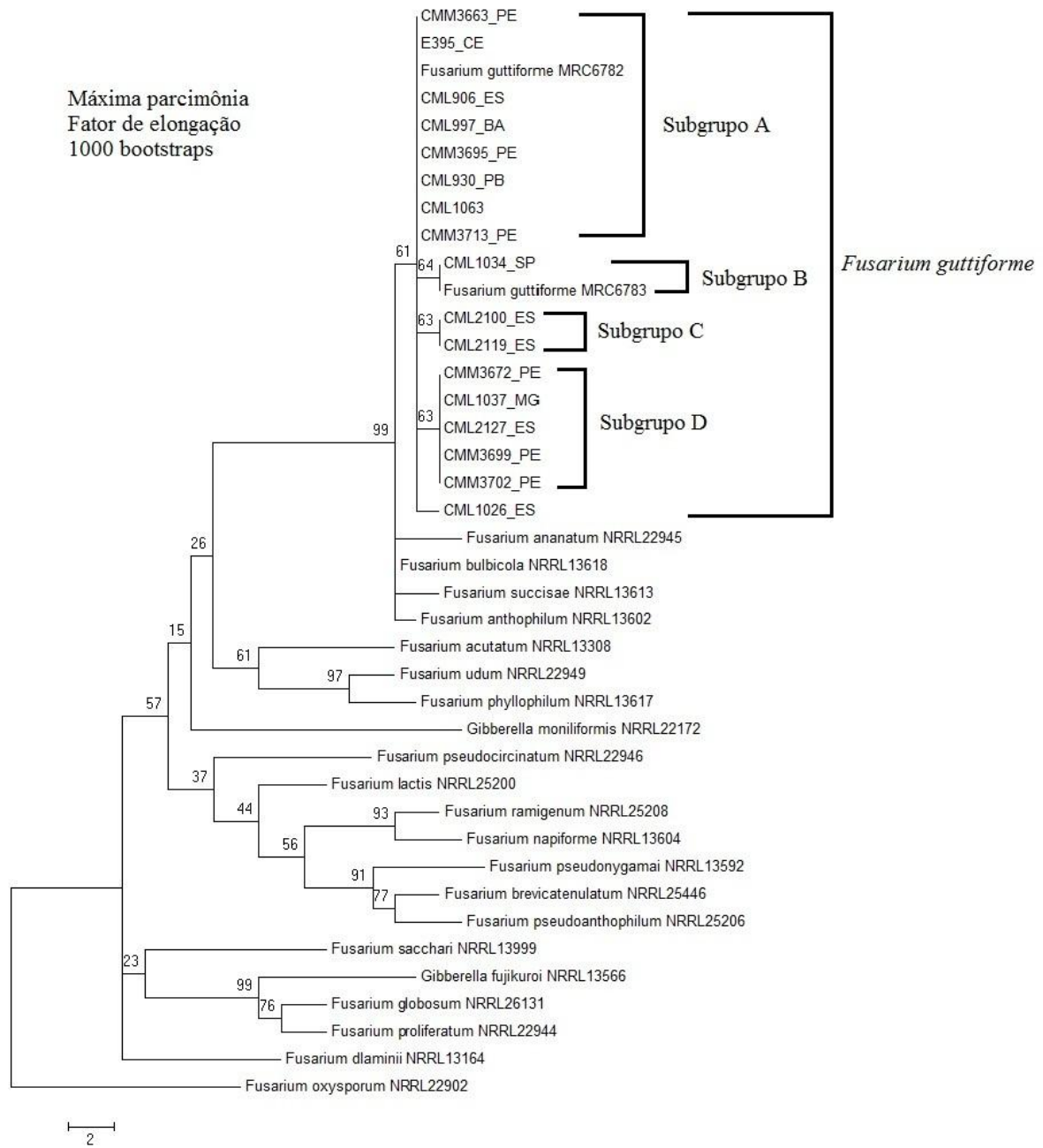


Figura 1. Árvore gerada por máxima parcimônia a partir do alinhamento de seqüências de fator de alongação.

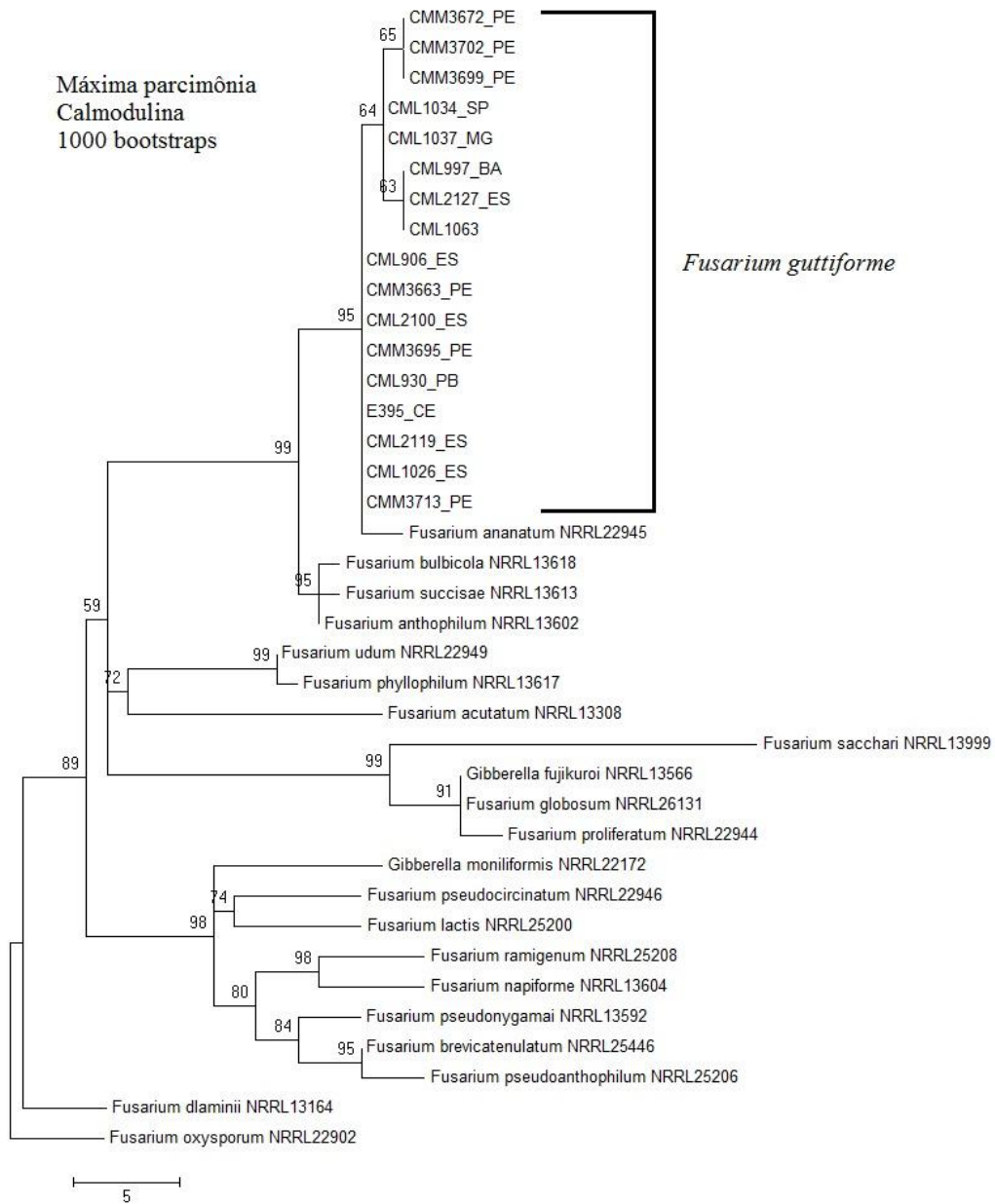


Figura 2. Árvore gerada por máxima parcimônia a partir do alinhamento de seqüências de calmodulina.

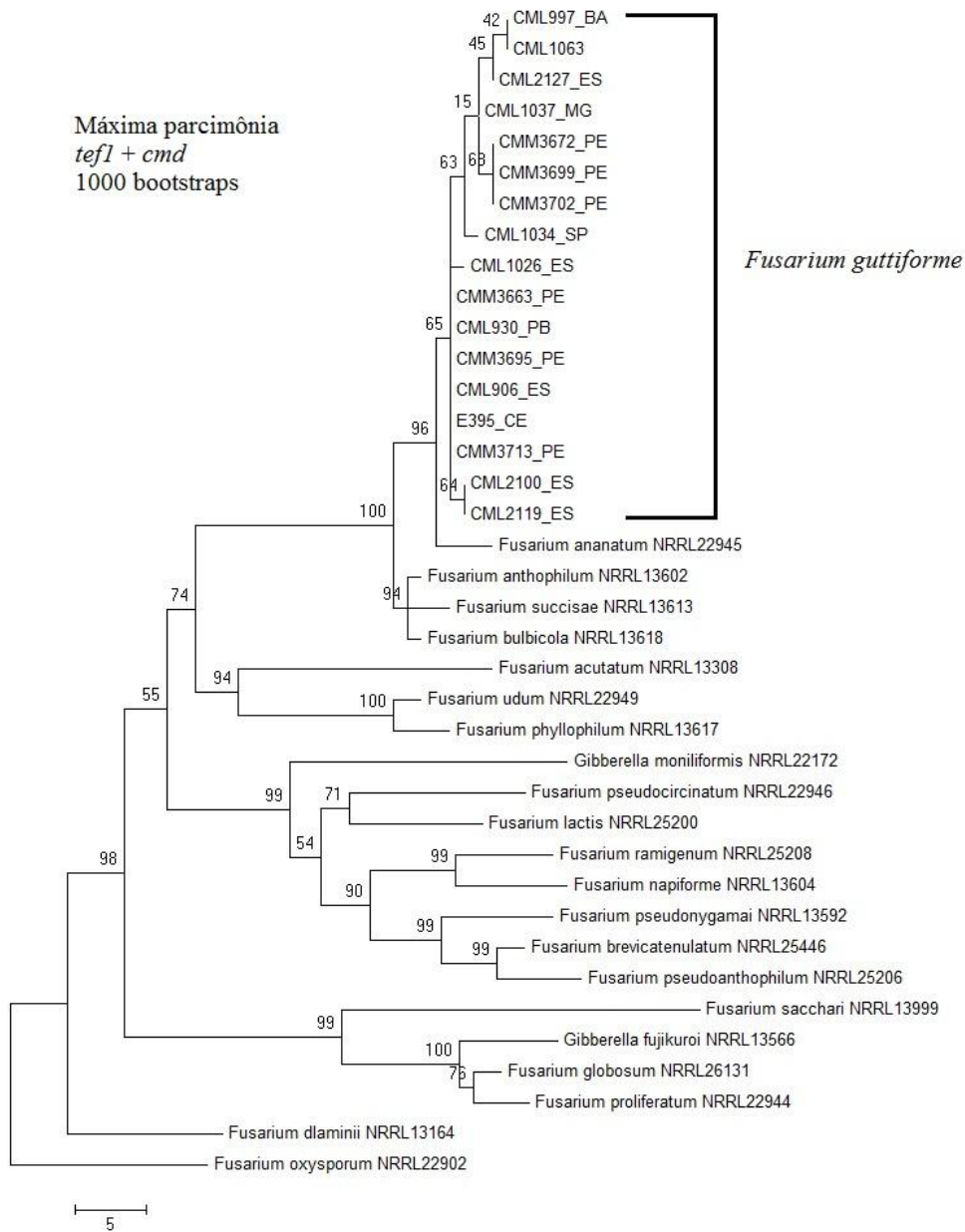


Figura 3. Árvore gerada por máxima parcimônia a partir do alinhamento de seqüências de fator de alongação e calmodulina.

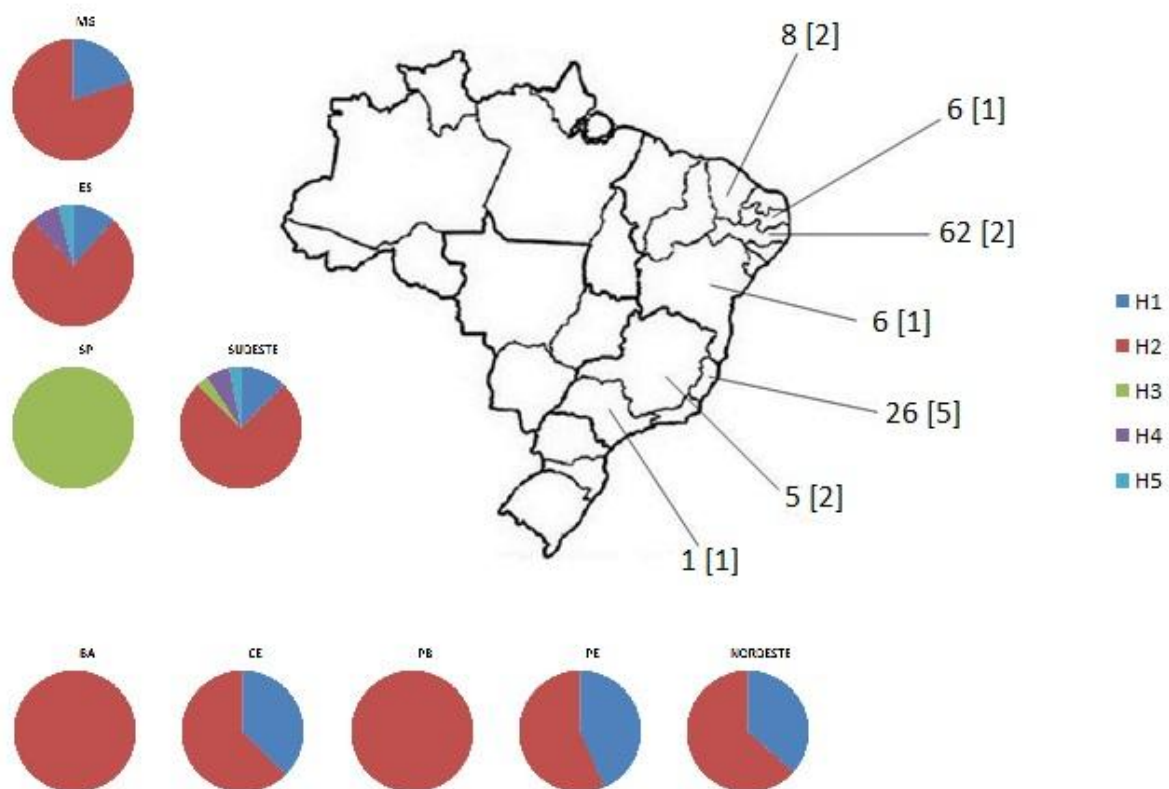


Figura 4. Distribuição geográfica das populações *Fusarium guttiforme* utilizadas neste estudo, constando o número de isolados e [número de haplótipos] por Estado.

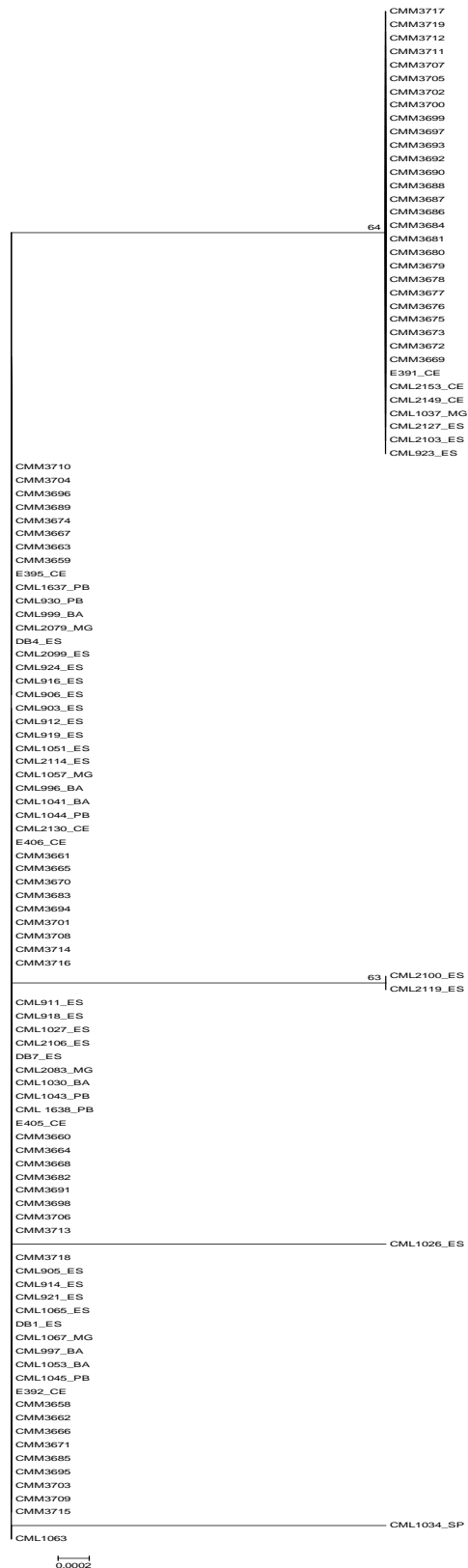


Figura 5 Árvore filogenética gerada por ‘Neighbor-Joining’, com base no polimorfismo das sequências parciais do gene *tef1* de populações de *Fusarium guttiforme* no Brasil. Abreviações: CML= Coleção Micológica de Lavras; ES = Espírito Santo, MG=Minas Gerais SP=São Paulo, BA=Bahia, PB=Paraíba, CE= Ceará e PE=Pernambuco.

Tabela 3. Distribuição dos haplótipos e [número de isolados] de acordo com as regiões de coleta.

Haplótipos	Nordeste	Sudeste	ES	MG	SP	BA	PB	CE	PE
Nordeste	2 [82]	2	2	0	0	1	1	2	2
Sudeste	2	5 [32]	4	2	1	1	1	2	2
ES	2	4	4 [26]	2	0	1	1	2	2
MG	0	2	2	2 [5]	0	0	0	0	0
SP	0	1	0	0	1 [1]	0	0	0	0
BA	1	1	1	0	0	1 [6]	0	0	0
PB	1	1	1	0	0	0	1 [6]	0	0
CE	2	2	2	0	0	0	0	2 [8]	2
PE	2	2	2	0	0	0	0	2	2 [62]

Tabela 4. Teste de patogenicidade dos isolados associados ao abacaxizeiro

Isolado	Origem	Média das lesões (mm)
Testemunha (H ₂ O)		0,0
Controle + (E-480)		34,3
Controle + (E-203)		26,3
CMM3659	PE	28,3
CMM3661	PE	38
CMM3663	PE	28,3
CMM3665	PE	20,7
CMM3666	PE	19,3
CMM3671	PE	35,0
CMM3672	PE	39,3
CMM3674	PE	36,0
CMM3678	PE	39,3
CMM3680	PE	38,7
CMM3686	PE	39,3
CMM3687	PE	33,3
CMM3689	PE	38,7
CMM3694	PE	38,7
CMM3695	PE	22,7
CMM3697	PE	32
CMM3698	PE	36
CMM3699	PE	39,3
CMM3701	PE	21,7
CMM3702	PE	35,0
CMM3703	PE	15,0
CMM3704	PE	31,7
CMM3708	PE	15,0
CMM3710	PE	31,7
CMM3712	PE	7,7
CMM3713	PE	7,0
CMM3716	PE	35,0
CML906*	ES	8,3
CML912*	ES	10,7
CML914*	ES	27,0
CML923*	ES	1,3
CML1051*	ES	1,3
CML2099*	ES	19,7
CML2119*	ES	20,0
CML1034*	SP	5,7
CML1037*	MG	14,7
CML1041*	BA	2,3

*Isolados utilizados em estudo anterior (Soares, 2011).

CAPÍTULO III

Conclusões gerais

Conclusões gerais:

- *Fusarium guttiforme* é a espécie causadora da fusariose do abacaxizeiro no Brasil.
- O gene *tef1* possibilitou melhor distinção de subgrupos infraespecíficos que o gene *cmd*.
- Há diferentes haplótipos associados à patogênese de *F. guttiforme* ao abacaxizeiro.