

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E PATOGENICIDADE DE
Fusarium acuminatum E *Fusarium verticillioides* A *Cordia americana***

**MORPHOLOGICAL, MOLECULAR AND PATOGENICITY CHARACTERIZATION OF
Fusarium acuminatum and *Fusarium verticillioides* TO *Cordia americana* SEEDS**

Clair Walker¹ Caciara Gonzatto Maciel¹ Paola Mendes Milanesi² Marlove Fátima Brião Muniz³
Ricardo Mezzomo⁴ Camila Schultz Pollet⁵

RESUMO

Cordia americana (L.) Gottschling & J. S. Mill. (guajuvira) é uma espécie florestal amplamente distribuída no território brasileiro e que apresenta importância econômica e ambiental devido à qualidade de sua madeira e utilização em reflorestamentos. Com o objetivo de avaliar a patogenicidade de *Fusarium* sp. associado às sementes, foram caracterizados, morfológica e molecularmente, quatro isolados do fungo que foram inoculados nas sementes de guajuvira. A caracterização morfológica foi realizada com o auxílio de uma chave de identificação para o gênero *Fusarium* e para a identificação molecular foram sequenciadas as regiões genômicas *Internal Transcribed Spacer* (ITS) e Fator de alongação 1 - alpha (TEF1- α). Os resultados do sequenciamento de DNA concordaram com os da caracterização morfológica e permitiram identificar as espécies *Fusarium acuminatum* e *Fusarium verticillioides*. No teste de patogenicidade, verificou-se que ambas as espécies do fungo foram patogênicas a *Cordia americana*, causando tombamento em pré e pós-emergência, além de apodrecimento de raízes e necrose no hipocótilo.

Palavras-chave: tombamento de plântulas; guajuvira; ITS; TEF1- α .

ABSTRACT

Cordia americana (L.) Gottschling & J. S. Mill. (guajuvira) is a forest species widely distributed in Brazil and represents environmental and economic importance due to the quality of its timber and use in reforestation. In order to evaluate the pathogenicity of *Fusarium* sp. associated with seeds, characterizing the isolates morphologically and molecularly in order to identify them on the species level, was obtained four fungal isolates that were inoculated in seeds to demonstrate their pathogenicity. The morphological characterization was performed using an identification key for the genus *Fusarium* and, for the molecular identification, genomic regions *Internal Transcribed Spacer* (ITS) were sequenced with its elongation factor 1 alpha (TEF1- α). The results of the molecular identification agreed with the morphological characterization and allowed to identify the species *Fusarium acuminatum* and *Fusarium verticillioides*,

1 Engenheira Florestal, MSc., Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS), Brasil. clairwalker@gmail.com/ caciaragonzatto@gmail.com

2 Engenheira Agrônoma, Dr^a., Pós-doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS), Brasil. paola.milanesi@gmail.com

4 Engenheira Agrônoma, Dr^a., Professora Adjunta do Departamento de Defesa Fitossanitária, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS), Brasil. marlovedmuniz@yahoo.com.br

5 Engenheiro Florestal, MSc., Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS), Brasil. mezzomoricardo@hotmail.com

6 Acadêmica do Curso de Engenharia Florestal, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS), Brasil. camilaschultz@hotmail.com

both being pathogenic to *Cordia americana*, causing damping-off in pre and post emergence, and rotting of roots and necrosis of hypocotyl.

Keywords: damping-off; Guajuvira; ITS; TEF1- α .

INTRODUÇÃO

O gênero *Fusarium*, de acordo com a classificação taxonômica, constitui um estado anamorfo da ordem Hypocreales, filo Ascomycota. Dentro desse gênero, as espécies *Fusarium verticillioides* ((Saccardo) Nirenberg), *Fusarium proliferatum* ((Matsushima) Nirenberg) e *Fusarium subglutinans* ((Wollenweber) e Reinking) participam de um grupo de aproximadamente 20 espécies que compõem o complexo *Gibberella fujikuroi*, e estão associadas a doenças de diversas culturas de importância econômica, dentre elas: milho, trigo e cana-de-açúcar. Em frutíferas como a manga (*Mangifera indica*) ocorre a doença conhecida como a malformação da mangueira, localizadas em áreas tropicais e subtropicais do mundo, que tem sido atribuída a várias espécies de *Fusarium*, incluindo *Fusarium mangiferae*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium sacchari*, *Fusarium sterilihyphosum* e *Fusarium subglutinans* (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Espécies de *Fusarium* formam um grupo de fungos cosmopolita e é comum sua ocorrência no solo, sendo comum a necrose de raízes de plantas em solos agrícolas colonizados por espécies desse gênero (NELSON et al., 1983). Em regiões temperadas e tropicais, espécies de *Fusarium* apresentam diferenças em termos de número de espécies, distribuição, gama de hospedeiros e virulência (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Espécies desse gênero são amplamente distribuídas em todo o mundo, e são bem conhecidas como agentes patogênicos de viveiros, ocasionando sintomas de pré e pós-emergência, *damping-off*, bem como redução da germinação de sementes em viveiros de coníferas (MÁRTIN-PINTO; PAJARES; DÍEZ, 2008). No Brasil uma das principais doenças da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.), em viveiro e, principalmente, a campo, é a podridão-de-raízes, causada por *Fusarium* spp. (POLETTI et al., 2012). Em plântulas de *Pinus elliottii* Engelm, sintomas de murcha, tombamento, apodrecimento de cotilédones e lesão seguida de ruptura do hipocótilo, foram observados devido à infecção das sementes por *Fusarium sambucinum* Fuckel

(MACIEL et al., 2013).

A correta identificação de espécies de *Fusarium* spp. associadas às sementes de *Cordia americana*, espécie florestal nativa de importância econômica e ambiental, é importante para a condução de estratégias de controle do patógeno. Nesse sentido, a identificação de espécies de *Fusarium*, que era mais subjetiva quando baseada apenas em aspectos morfológicos, agora abrange, além dos critérios biológicos, critérios filogenéticos baseados em informações moleculares (SUMMERELL; SALLEH; LESLIE, 2003), de diferentes regiões genômicas (WATANABE et al., 2011).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a patogenicidade de *Fusarium* spp. associada às sementes de *Cordia americana*, caracterizando os isolados de forma morfológica e molecular com vistas a identificá-los em nível de espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização da área de estudo

As sementes de guajuvira (*Cordia americana*) foram coletadas de três árvores-matrizes em uma área situada na Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), coordenadas geográficas de 29°39'45" de latitude Sul e 53°55'12" de longitude Oeste, localizada no município de Santa Maria, região fisiográfica da Depressão Central do Rio Grande do Sul. O clima da região caracteriza-se como subtropical úmido, do tipo "Cfa", segundo a classificação de Köppen, com temperatura média do mês mais frio entre -3 e 18°C e do mês mais quente superior a 22°C e precipitação média anual de 1.769 mm (MORENO, 1961).

O teste de patogenicidade foi desenvolvido no Viveiro Florestal Juarez Martins Hoppe, pertencente ao Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria. A caracterização morfológica dos isolados foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Fitopatologia, pertencente ao Departamento de Defesa Fitossanitária e o sequenciamento de DNA foi feito no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo.

Coleta e beneficiamento dos frutos

A coleta dos frutos foi realizada aos 52 dias após antese, através de dois métodos de coleta: coleta diretamente na copa das árvores e coleta no solo. Primeiramente, os frutos foram coletados no solo e após estendeu-se uma lona sob a copa das árvores e efetuou-se a coleta dos frutos extraídos da planta, procurando-se coletar na porção superior e inferior da copa, em quatro direções, com o auxílio de podão e escadas. Dessa maneira, os frutos da planta que caíram sob a lona foram coletados, evitando-se o contato com o solo. As amostras dos frutos foram devidamente identificadas de acordo com o método de coleta, acondicionadas em embalagens plásticas e encaminhadas ao laboratório. O beneficiamento foi realizado imediatamente após a coleta, através da retirada manual do cálice do fruto, sendo que, após esse procedimento, as sementes foram armazenadas em geladeira à temperatura de $6 \pm 2^\circ\text{C}$ até o momento da realização do teste de patogenicidade.

Isolamento dos fungos

No teste de transmissão de *Fusarium* spp. das sementes para as plântulas, foi realizada a semeadura em areia autoclavada. Quando se observaram sintomas de murcha e tombamento em pré e pós-emergência, as plântulas sintomáticas foram analisadas quanto à presença de micélio de *Fusarium* spp. Em seguida, procedeu-se o isolamento do fungo para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA; 200 g batata, 20 g dextrose, 20 g ágar e 1000 mL de água destilada), suplementado com 0,05 g de sulfato de estreptomicina/100 mL de meio. Foram obtidos, de plântulas com sintomas, quatro isolados de *Fusarium* spp., que foram utilizados no teste de patogenicidade, sendo denominados F1CW, F2CW, F3CW e F4CW.

Para a purificação dos isolados, foi utilizada a técnica da cultura monospórica (FERNANDEZ, 1993), em que fragmentos do micélio dos fungos foram colocados em 5 mL de água destilada e esterilizada, agitados e plaqueados em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água (AA, 20 g de ágar e 1000 mL água destilada). Após 24 h de incubação em temperatura ambiente, foi realizada a observação dos conídios germinados em meio AA, através de microscópio ótico. Os conídios que germinaram isoladamente foram repicados para

tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA (para observação da cor e medição da colônia), e para placas de Petri contendo meio de cultura folha de cravo-ágar (CLA, 20 g de ágar, 1000 mL de água destilada e 3 pedaços de folhas de cravo, *Dianthus caryophyllus* L., esterilizadas a $60^\circ\text{C}/72$ h), que permitiu a melhor caracterização de macroconídios, microconídios e clamidósporos. As culturas monospóricas de cada isolado foram utilizadas para a realização do teste de patogenicidade e caracterização molecular.

Teste de patogenicidade

Para a realização do teste de patogenicidade, foi utilizado o método de contato com a cultura fúngica, através da inoculação dos isolados de *Fusarium* spp. em sementes de *Cordia americana*. Inicialmente, as sementes foram desinfestadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) (por 30 segundos), seguida por álcool 70% (v/v) (durante 30 segundos) e, após, três lavagens sucessivas em água destilada e esterilizada (30 s cada). Após esse procedimento, as sementes foram colocadas sobre papel-filtro esterilizado para retirar o excesso de umidade. Posteriormente, as sementes foram dispostas em contato com a cultura fúngica, com exceção da testemunha que foi colocada apenas em meio de cultura BDA. As sementes permaneceram em contato com o patógeno por um período de 48 horas (temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas).

Após o período de incubação, as sementes foram semeadas em bandejas de isopor de 200 células, contendo substrato comercial, previamente autoclavado por duas vezes (1 atm, 120°C por 60 min, com intervalo de 24 h entre autoclavagens). As bandejas permaneceram em casa de vegetação (durante 57 dias), com irrigação feita com o auxílio de uma barra móvel de microaspersores.

Durante o período de emergência e avaliação final, as plântulas com sintomas de tombamento de pré e pós-emergência foram contabilizadas e, posteriormente, retiradas e colocadas em câmara úmida (método de *blotter test*) e mantidas, durante sete dias, em temperatura controlada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, para o reisolamento do patógeno.

Caracterização morfológica dos isolados

Crescimento micelial

Para a determinação do crescimento micelial dos quatro isolados de *Fusarium* sp., foram utilizadas as culturas monospóricas descritas anteriormente, em que discos de micélio (8 mm de diâmetro) foram transferidos para o centro das placas de Petri, contendo meio de cultura BDA. Posteriormente, as mesmas foram incubadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e em regime de luz alternado com fotoperíodo de 12 h. A avaliação do crescimento micelial consistiu na medição, a cada 24 h, do diâmetro da colônia em sentidos diametralmente opostos, com o auxílio de um paquímetro digital. As leituras foram concluídas quando o crescimento da colônia cobriu completamente o diâmetro da placa e, assim, pode-se determinar o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) para cada isolado, utilizando-se a fórmula proposta por Maguire (1962), adaptada por Oliveira (1991).

Coloração da colônia fúngica

A coloração da colônia, produzida pelo fungo, em tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA foi determinada com o auxílio de literatura (NELSON et al., 1983). Inicialmente, para a preparação do material, transferiu-se uma alíquota de micélio do fungo, advindo de cultivo monospórico, para tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA e incubou-se por 10-14 dias, em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e em regime de luz alternado com fotoperíodo de 12 horas.

Análise das estruturas reprodutivas em meio de cultura folha de cravo (CLA)

Os isolados cultivados, entre 10-14 dias, em meio de cultura folha de cravo-ágar (CLA) (NELSON et al., 1983), foram avaliados quanto às seguintes características morfológicas: formação de esporodóquio; presença de macroconídios; comprimento e largura, número de septos e forma da célula basal e apical dos macroconídios; ausência/presença de clamidósporo; tipo de célula conidiogênica (monofálide; polifálide); disposição de microconídios sobre a célula conidiogênica (em cadeias; “falsas cabeças”). As dimensões de 15 macroconídios, selecionados de forma arbitrária, foram obtidas em microscópio de contraste

Olympus BX41[®] na objetiva de 40x, com o auxílio de uma ocular OSM acoplada ao microscópio. A identificação das espécies do fungo foi realizada de acordo com as chaves de classificação de Nelson et al. (1983), Leslie e Summerell (2006) e Gerlach e Nirenberg (1982).

Identificação Molecular dos Isolados

Para a extração de DNA, os isolados fúngicos foram cultivados em tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA e incubados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e em regime de luz alternado com fotoperíodo de 12 horas. O material foi enviado para o Laboratório de Bioquímica Fitopatológica (Instituto Biológico, São Paulo) para o sequenciamento.

A extração do DNA foi efetuada pelo método CTAB (cetiltrimetil brometo de amônio) (DOYLE; DOYLE, 1990). As amostras de DNA genômico extraídas foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a amplificação das regiões: ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990), e fator de alongação 1-alfa (TEF1- α), com o par de oligonucleotídeos iniciadores EF1-T (ATGGGTAAGGARGACAAGAC) e EF1-1567R (ACHGTRCCRATACCACCRATCTT) (REHNER; BUCKLEY, 2005).

As reações continham, aproximadamente, 30 ng de DNA, tampão 10X, 2,5 μM de cada dNTP, 20 nM de MgCl_2 , 25 μM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 5 U da enzima *Taq* DNA polimerase e água ultrapura para completar o volume da reação. As reações foram realizadas em termociclador MJ Research (INC. PTC – 100MT), sob as seguintes condições térmicas: 94°C por 2 min, 30 ciclos de 94°C por 45 s, 55°C por 30 s, 72°C por 35 s e 72°C por 10 min. Ao final da reação, os produtos da PCR foram mantidos a 4°C . Um controle negativo sem DNA foi incluído nas amplificações do PCR. Os fragmentos amplificados e o controle foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, em tampão TBE 1X (10,8 g de tris base, 5,5 g de ácido bórico, 4 mL de EDTA a 0,5 M e 4 ml de água destilada), contendo brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta. Os produtos da PCR foram purificados com PEG 8000 a 13% e, nas reações de sequenciamento para os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4, as sequências geradas continham de 400 a 900 pb, tamanho referente ao segmento que corresponde à região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA. Para a região TEF1- α foram utilizados fragmentos de 1100 pb.

O sequenciamento foi efetivado em sequenciador Mega BACE 500 (Amersham).

Análise dos dados

Para as variáveis diâmetro de colônia e índice de velocidade de crescimento micelial, o delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado e os dados foram submetidos à análise de variância e de regressão polinomial, em função do tempo (h). Foram testados os modelos linear, quadrático e cúbico, sendo selecionado o modelo significativo de maior ordem para explicar os resultados. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2009).

Os fragmentos sequenciados foram analisados e comparados com sequências já existentes através da ferramenta BLAST, na base de dados do *GenBank*, sediado no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (ALTSCHUL et al., 1997). As sequências do *GenBank* que apresentaram os maiores escores foram selecionadas e alinhadas, juntamente com as sequências obtidas no sequenciamento pelo algoritmo ClustalW, utilizando-se o programa BioEdit (HALL, 1999). A análise filogenética foi conduzida adotando-se o método *Neighbor-joining* com 1000 replicatas, pelo programa MEGA versão 4 (TAMURA et al., 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp.

Os resultados da avaliação da emergência de plântulas, após a inoculação de isolados de *Fusarium* spp. demonstraram que o fungo foi patogênico causando tombamento de pré e pós-emergência em plântulas de *Cordia americana*, sendo observado apodrecimento das raízes, necrose do hipocótilo seguida de ruptura. Outros trabalhos já foram publicados relatando tombamento de plântulas de espécies florestais, causados por diversas espécies de *Fusarium* sp. No noroeste da Espanha, Martín-Pinto, Pajares e Díez. (2008) observaram tombamento de pós-emergência em mudas de *Pinus nigra* causados por *Fusarium verticillioides* e *Fusarium oxysporum*, sendo verificada uma mortalidade de 65,6 e 61,3%, respectivamente. Lazarotto, Muniz e Santos (2010) verificaram que *Fusarium* sp. foi

patogênico causando os sintomas de tombamento de plântulas de paineira (*Ceiba speciosa*), além da podridão-de-raízes.

Caracterização morfológica dos isolados

De acordo com os resultados de crescimento micelial, verificou-se que *Fusarium acuminatum* (F1CW) e *Fusarium verticillioides* (F2CW, F3CW e F4CW) apresentaram tendência quadrática entre o diâmetro da colônia (DC) e o tempo durante a avaliação (144 e 192 h, respectivamente), nas quais ambos atingiram 9 cm no final desse período (Figura 1). Observou-se que, para *Fusarium acuminatum*, o crescimento da colônia foi cerca de 1,60 cm a cada 24 h, diminuindo a velocidade a partir das 96 h. O crescimento para *Fusarium verticillioides* foi mais lento em relação a essa espécie (aproximadamente 1,12 cm a cada 24 h).

Em relação ao índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), observou-se que os dados ajustaram-se a um modelo quadrático. Para *Fusarium acuminatum* e *Fusarium verticillioides*, o crescimento micelial máximo foi de 0,84 e 0,77 cm, respectivamente, sendo este atingido às 48 h após a incubação.

A chave de classificação de Nelson et al. (1983) divide as espécies de *Fusarium* em seções, conforme as similaridades morfológicas das espécies. Dessa maneira, os isolados de *Fusarium* spp. foram inseridos dentro dos grupos, para posterior identificação em nível de espécie. Neste trabalho, de acordo com a chave de classificação de Nelson et al. (1983), o isolado F1CW foi alocado na seção Gibbosum, sendo identificado como *Fusarium acuminatum*. Nessa seção, também estão classificadas as seguintes espécies: *Fusarium equiseti*, *Fusarium scirpi* e *Fusarium longipes*. Os isolados F2CW, F3CW e F4CW foram identificados como *Fusarium verticillioides*, sendo alocados na seção Liseola. Existia controvérsia em relação ao nome com que alguns taxonomistas denominavam *Fusarium moniliforme*, mas atualmente *Fusarium verticillioides* é aceito como a denominação que deve ser utilizada para essa espécie. Além disso, *Fusarium verticillioides* deve ser utilizado apenas para cepas que têm *Giberella moniliformis* como seu teleomorfo e não apenas como uma substituição ao nome *Fusarium moniliforme* (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Fusarium acuminatum, em meio de cultura BDA, apresentou a formação de micélio

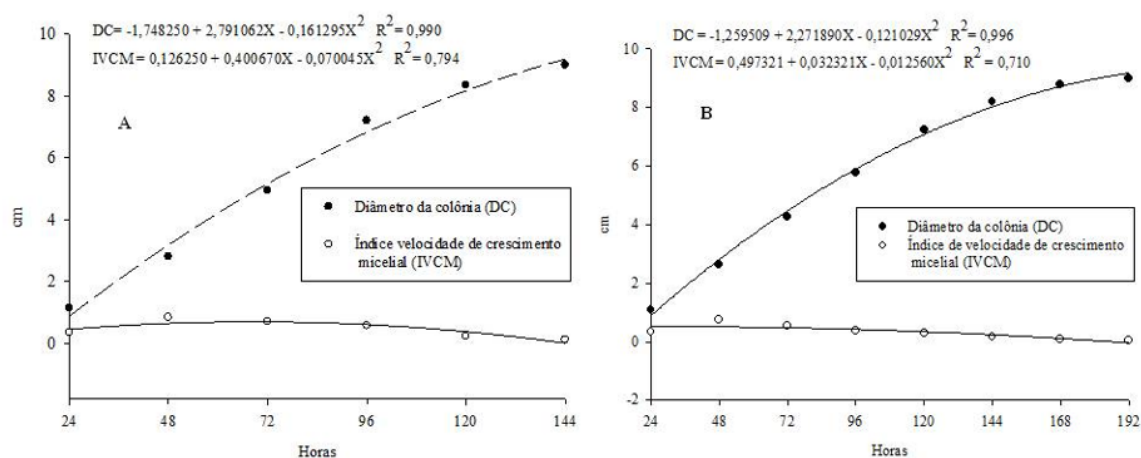


FIGURA 1: Análise de regressão para diâmetro da colônia e índice de velocidade de crescimento micelial de *Fusarium acuminatum* (A) e *Fusarium verticillioides* (B) em meio BDA, incubado a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h.

FIGURE 1: Regression analysis for the colony diameter and mycelial growth speed index of *Fusarium acuminatum* (A) and *Fusarium verticillioides* (B) on PDA, incubated at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ with photoperiod of 12 h.

aéreo abundante de coloração branca, enquanto que na superfície inferior da cultura foi observada coloração vermelho-carmim, variando entre tons de bronzeado e de marrom. *Fusarium verticillioides* desenvolveu micélio aéreo de coloração branca, porém, ao longo do crescimento, foi observada uma pigmentação violácea, corroborando a descrição de Leslie e Summerell (2006). Em relação à coloração na superfície inferior da cultura, observaram-se tons de bronze-acinzentado até violeta-acinzentado, ocorrendo também alguns tons de violeta-escuro

(Tabela 2).

Em meio CLA foram observadas as características das estruturas (Figura 2), concordando com as informações descritas por Leslie e Summerell (2006), além das descrições de Nelson et al. (1983). *Fusarium acuminatum* apresentou esporodóquios de coloração laranja-pálida a marrom-escuro, macroconídios delgados e fortemente curvados ($35,7 \times 5,0 \mu\text{m}$) em forma de foice e com uma média de três septos. A célula basal apresentou forma distinta e a célula apical

TABELA 2: Características morfológicas de *Fusarium acuminatum* e *Fusarium verticillioides*, em meio de cultura BDA, isolados a partir de sementes de *Cordia americana*.

TABLE 2: Morphological characteristics of *Fusarium acuminatum* and *Fusarium verticillioides* isolated from *Cordia americana* seeds.

Características morfológicas	<i>Fusarium acuminatum</i> (F1CW)	<i>Fusarium verticillioides</i> (F2CW, F3CW e F4CW)
Pigmentação da cultura	Vermelho-carmim, bronze a marrom	Bronze a violeta-acinzentado, violeta-escuro
Coloração micélio aéreo	Branca	Branca, pigmentação violácea
Tamanho de macroconídio	$14,27 \times 2,0 \mu\text{m}$	$17,3 \times 1,13 \mu\text{m}$
Número médio de septos	3 (três)	4 (quatro)
Esporodóquio	Presente	Presente
Microconídios	Presentes/esparsos	Presentes/abundantes
Clamidósporo	Presente/isolados ou em cadeia	Ausente
Conidióforo	Monofialides	Monofialides ramificadas ou não

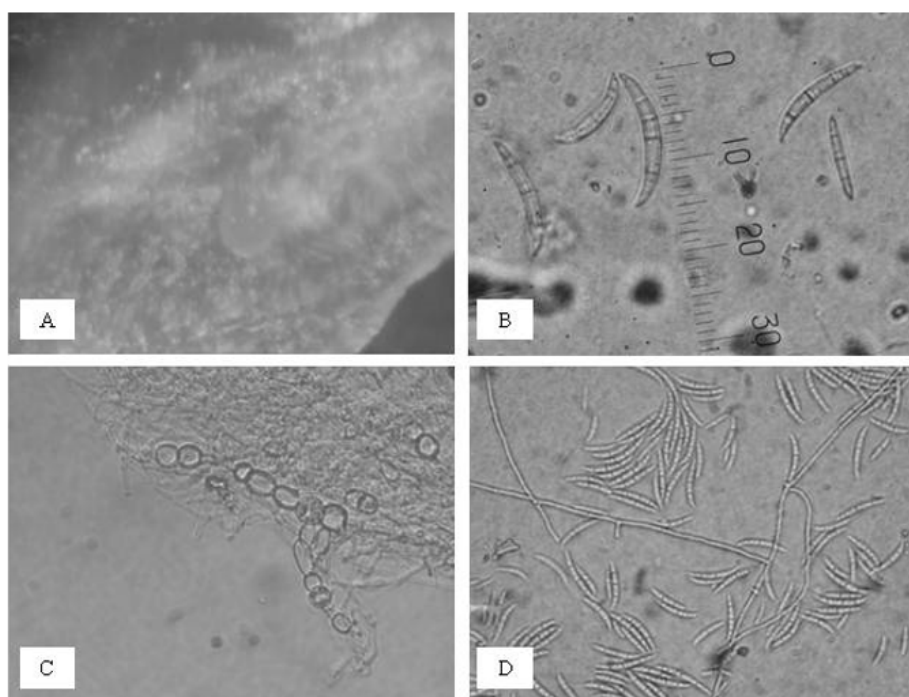


FIGURA 2: Características morfológicas da cultura de *Fusarium acuminatum* em meio folha de cravo (CLA) vista em microscópio óptico com aumento de 40 x. Esporodóquio (A); medida microscópica de macroconídio (B); clamidósporos (C) e conidióforo em monofíalide (D).

FIGURE 2: Morphological characteristics of *Fusarium acuminatum* in carnation leaf agar (CLA) culture as seen in an optical microscope with a magnification of 40 x. Sporodochia (A); microscopic measurements macroconidia (B); chlamydospores (C) and monofialides in conidiophore (D).

formato alongado, enfatizando a curvatura do esporo. A formação de microconídios foi escassa. Além dessas características foi constatada a presença de clamidósporos, de forma isolada, em cadeia ou agrupados. De acordo com Nelson et al. (1983), a presença de clamidósporos em *Fusarium acuminatum* é uma característica importante na distinção de *Fusarium graminearum*, pois as duas espécies apresentam semelhanças na forma dos macroconídios.

Fusarium verticillioides em meio CLA apresentou macroconídios com forma falcada (acanoada) ou reta com paredes finas, a célula basal em forma de pé e a célula apical relativamente alongada, tamanho médio dos macroconídios de 43,8 x 2,8 μm com 4 septos, de acordo com as descrições de Leslie e Summerell (2006) e Nelson et al. (1983). Os microconídios são formados em monofíalides e dispostos em cadeias, ocasionalmente produzidas em pares com aparência de “orelha de coelho” (Figura 3). *Fusarium verticillioides* não forma clamidósporos, característica importante para distingui-lo de *Fusarium nygamai* (LESLIE;

SUMMERELL, 2006).

Através da amplificação da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) por PCR (Figura 4), sequenciamento e comparação com sequências depositadas no *GenBank*, foi construído o dendrograma para essa região. Observou-se que o isolado F1 foi alocado no mesmo grupo que as espécies *Fusarium acuminatum*, *Fusarium armeniacum* e *Gibberella acuminata*. De acordo com Leslie e Summerell (2006), *Fusarium armeniacum* é uma subespécie de *Fusarium acuminatum* e *Gibberella acuminata* é a fase sexuada de *Fusarium acuminatum*. Nesse grupo, foi apresentado elevado suporte de *bootstrap* de 95. Esses resultados poderiam sugerir que o isolado F1CW, dentro desse clado, foi geneticamente mais próximo dessas espécies do que entre isolados de outros ramos.

Com o sequenciamento da região do fator de alongação 1- α (TEF1- α) foram obtidos altos valores de cobertura e similaridade, que aumentam a confiabilidade do alinhamento. Na construção do dendrograma (Figura 5) verificou-se que o isolado F1CW foi alocado no mesmo clado que as espécies:

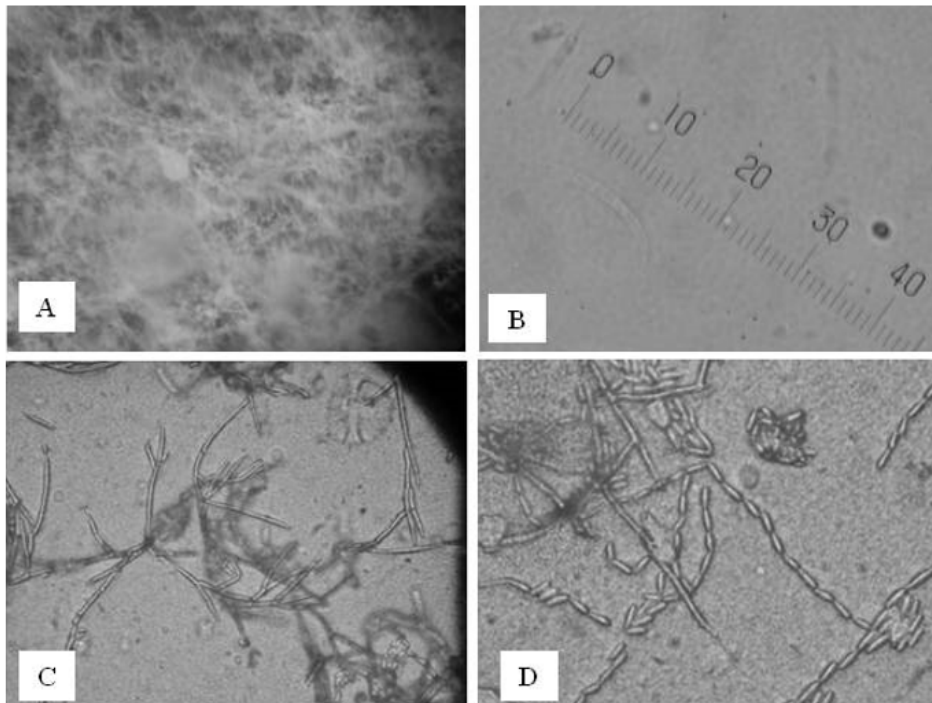


FIGURA 3: Características morfológicas da cultura de *Fusarium verticillioides*, em meio folha de cravo-ágar (CLA), vistas em microscópio ótico com aumento de 40 x. Esporodóquio (A); medida microscópica de macroconídio (B); conidióforo em monofiálide (C) e microconídios em longas cadeias (D).

FIGURE 3: Morphological characteristics of *Fusarium verticillioides* culture in carnation leaf agar (CLA) as seen in an optical microscope with a magnification of 40 x. Sporodochia (A); microscopic measurements macroconidia (B); monophialides in conidiophore (C) and microconidia chains (D).

Fusarium acuminatum, *Fusarium armeniacum*, *Fusarium armeniacum* e *Fusarium armeniacum*. O elevado suporte de *bootstrap*, igual a 100, indicou que não houve desvio entre os dados originais da matriz de similaridade e os dados utilizados para a construção do dendrograma, o que explica adequadamente os dados. Portanto, de acordo com o sequenciamento da região ITS e TEF 1- α , pode-se concluir a caracterização molecular deste isolado, pois os resultados corroboram a análise morfológica e fornecem subsídios suficientes para enquadrá-lo como *Fusarium acuminatum*.

Na confecção do dendrograma para os isolados F2CW, F3CW e F4CW, através da amplificação da região ITS, verificou-se que todos os isolados foram alocados no mesmo grupo, composto pela fase sexuada de *Fusarium verticillioides* (*Gibberella moniliformis* ou *Gibberella fujikuroi*), apresentando suporte de *bootstrap* igual a 99 (Figura 6). Além dessas espécies, agruparam-se também, *Fusarium proliferatum* e *Fusarium*

subglutinans, que pertencem à mesma seção que *Fusarium verticillioides* (seção Liseola) e, portanto, apresentam características morfológicas semelhantes. A conservação de *locus* em *Fusarium verticillioides* e *Fusarium subglutinans* mostra duas espécies intimamente relacionadas, apresentando o mesmo haplotipo e conformando um mesmo clado (SILVA et al., 2006). Isolados de *Fusarium subglutinans* encontraram-se no dendrograma a uma distância genética menor de *Fusarium verticillioides* se comparado com a distância de *Fusarium proliferatum* (QUERALES, 2010).

Para a região TEF 1- α (Figura 7) verificou-se que os isolados F2CW, F3CW e F4CW se alocaram no grupo do complexo *Gibberella fujikuroi*, apresentando valores de *bootstrap* confiáveis (igual a 92). Nesse grupo foi alocado *Fusarium verticillioides*, considerado anamorfo de *Gibberella moniliformis* Wineland, segundo Leslie e Summerell (2006), ou *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw (NELSON et al., 1983).

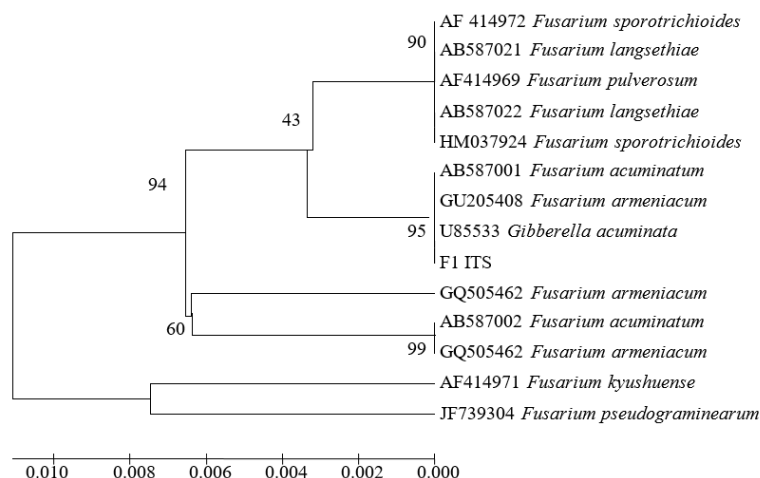


FIGURA 4: Dendrograma baseado no método *Neighbor-joining* derivado das sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, com base em 1000 réplicas de *bootstrap*, do isolado F1CW (*Fusarium acuminatum*) e de sequências obtidas no *GenBank* de diferentes isolados de *Fusarium* spp. O número nas ramificações representa o valor de *bootstrap*.

FIGURE 4: Dendrogram based on Neighbor-Joining method from the sequence ITS1-5.8S-ITS2 from rDNA region, based on 1000 replicates of the bootstrap of the isolated F1CW (*Fusarium acuminatum*) and *GenBank* sequences obtained from different *Fusarium* spp. The number on the branches indicate the bootstrap value.

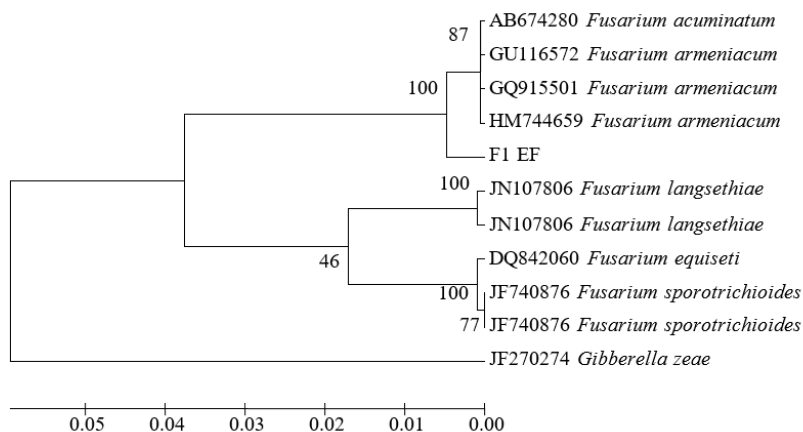


FIGURA 5: Dendrograma baseado no método *Neighbor-joining* derivado das sequências da região TEF1- α , com base em 1000 réplicas de *bootstrap*, do isolado F1CW (*Fusarium acuminatum*) e de sequências obtidas no *GenBank* de diferentes isolados de *Fusarium* spp. O número nas ramificações representa o valor de *bootstrap*.

FIGURE 5: Dendrogram based on Neighbor-Joining method from the sequences TEF1- α region, based on 1000 replicates of the bootstrap of the isolated F1CW (*Fusarium acuminatum*) and *GenBank* sequences obtained from different *Fusarium* spp. The number on the branches indicate the bootstrap value.

O sequenciamento das regiões ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA e TEF1- α oferece indícios que permitiriam classificar os isolados estudados como *Fusarium acuminatum* (F1CW) e *Fusarium verticillioides* (F2CW, F3CW e F4CW). A identificação a partir de caracteres morfológicos

complementou a molecular e houve convergência entre os resultados obtidos nestes estudos. Este é o primeiro relato dessas espécies de *Fusarium* como patogênicas à *Cordia americana* no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

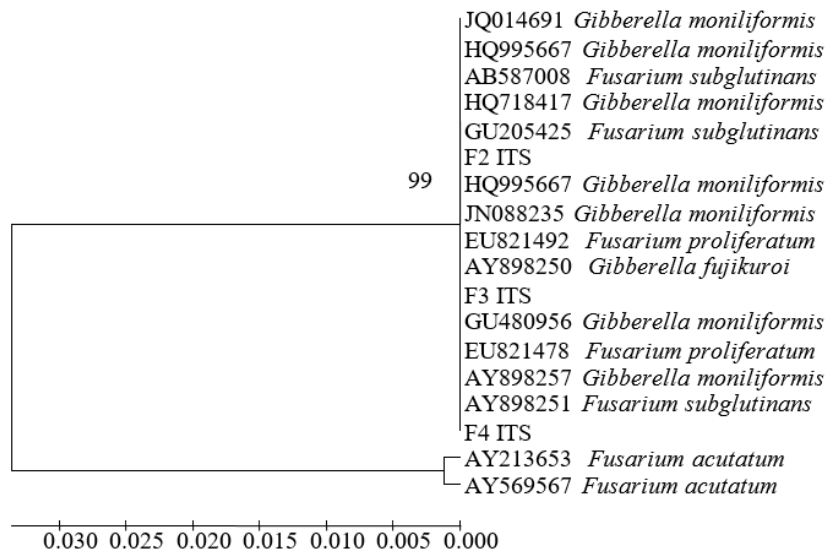


FIGURA 6: Dendrograma baseado no método *Neighbor-joining* derivado das sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, com base em 1000 réplicas de *bootstrap*, dos isolados F2CW, F3CW e F4CW (*Fusarium verticillioides*) e de sequências obtidas no *GenBank* de diferentes isolados de *Fusarium* spp. O número nas ramificações representa o valor de *bootstrap*.

FIGURE 6: Dendrogram based on Neighbor-Joining method from the sequence of ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA region, based on 1000 replicates of the bootstrap of the isolated F1CW (*Fusarium verticillioides*) and *GenBank* sequences obtained from different *Fusarium* spp. The number on the branches indicate the bootstrap value.

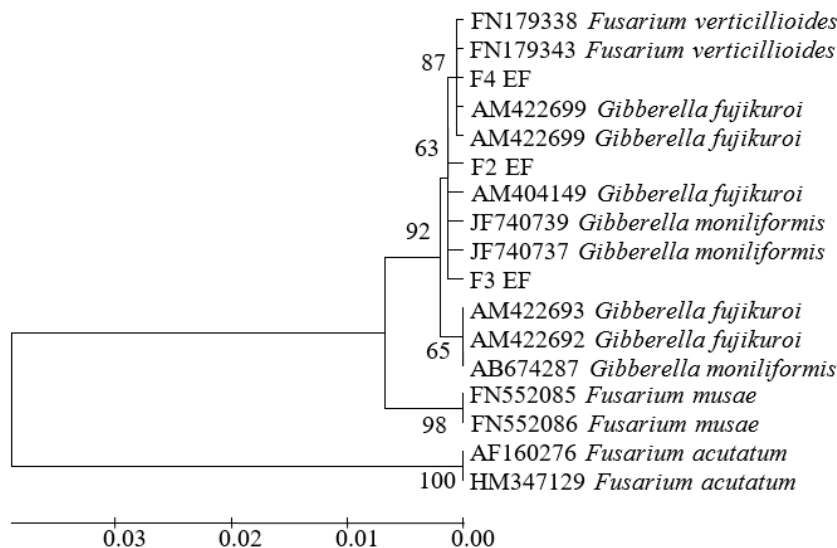


FIGURA 7: Dendrograma baseado no método *Neighbor-joining* derivado das sequências da região TEF1- α , com base em 1000 réplicas de *bootstrap*, dos isolados F2CW, F3CW e F4CW (*Fusarium verticillioides*) e de sequências obtidas no *GenBank* de diferentes isolados de *Fusarium* spp. O número nas ramificações representa o valor de *bootstrap*.

FIGURE 7: Dendrogram based on Neighbor-Joining method from the sequences TEF1- α region, based on 1000 replicates of the bootstrap of the isolated F1CW (*Fusarium verticillioides*) and *GenBank* sequences obtained from different *Fusarium* spp. The number on the branches indicate the bootstrap value.

CONCLUSÕES

As espécies *Fusarium acuminatum* e *Fusarium verticillioides* são transmitidas pelas sementes e são patogênicas a *Cordia americana*, causando tombamento de plântulas em pré e pós-emergência, com apodrecimento das raízes e necrose do hipocótilo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Ithaca, v. 12, p. 13-18, 1990.

FERNANDEZ, M. R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1993. 128 p.

FERREIRA, D. F. **Estatística básica**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2009. 664 p.

GERLACH, W.; NIRENBERG, H. **The genus Fusarium – a pictorial atlas**. Berlin: Biologische Bundesanstalt für Land – und. Forstwirtschaft, 1982. 406 p.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, n. 41 p. 95-98. 1999.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; SANTOS, A. F. Detecção, transmissão, patogenicidade e controle químico de fungos em sementes de paineira (*Ceiba speciosa*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 2, p. 134-139, 2010.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium laboratory manual**. 1. ed. USA: Blackwell Publishing, 2006. 388 p.

MACIEL, C. G. et al. First report of *Fusarium sambucinum* associated on *Pinus elliottii* seeds in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97, n. 7, p. 995, 2013.

MARTÍN-PINTO, P.; PAJARES, J.; DÍEZ, J. Pathogenicity of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium oxysporum* on *Pinus nigra* seedlings in northwest Spain. **Forest Path**, v. 38, n. 2, p. 78-82, 2008.

MORENO, J. A. **Clima do Rio Grande do Sul**.

Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, 1961. 73 p.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, 1991.

POLETTI, I. et al. Caracterização e patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. causadores de podridão-de-raízes aa erva-mate. **Floresta**, Curitiba: v. 42, n. 1, p. 95-104, 2012.

QUERALES, P. J. **Caracterização morfológica e genética de *Fusarium* spp. isolado de sementes e associados a podridão do colmo do milho (*Zea mays* L.)**. 2010. 81 f. Tese (Doutorado em Ciências – Fitopatologia) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo, 2010.

REHNER, S. A.; BUCKLEY, E. A. Beauveria phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia**, v. 97, n. 1, p. 84-98, 2005.

SILVA, V. N. et al. Characterization and genetic variability of *F. verticillioides* strains isolated from corn and sorghum in Brazil based on fumonisins production, microsatellites, mating type locus, and mating crosses. **Canadian Journal of Microbiology**, Saskatoon, v. 52, p. 798-804, 2006.

SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. Na utilitarian approach o *Fusarium* identification. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 2, p. 117-128, 2003.

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 596-1599, 2007.

WATANABE, M. et al. Evaluation of genetic markers for identifying isolates of the species of the genus *Fusarium*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 2500-2504, 2011.

WHITE, T. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 11, n. 3, p. 513-522, 1990.