

Universidade Federal do Piauí

Compatibilidade sexual de populações de *Fusarium sacchari* e espécies de *Fusarium* envolvidas na podridão do topo em cana-de-açúcar

Maria Raquel Veras de Carvalho

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento para obtenção do título de “Mestre”.

Teresina

2017

Maria Raquel Veras de Carvalho
Licenciada em Ciências Biológicas

**Compatibilidade sexual de populações de *Fusarium sacchari* e espécies de
Fusarium envolvidas na podridão do topo em cana-de-açúcar**

Orientador:

Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior

Coorientador:

Prof. Dr. Maruzanete Pereira de Melo

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento para a obtenção do título de “Mestre”.

Teresina
2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

C331c Carvalho, Maria Raquel Veras de
Compatibilidade sexual de populações de *Fusarium sacchari* e
espécies de *Fusarium* envolvidas na podridão do topo em cana-
de-açúcar - Maria Raquel Veras de Carvalho - 2017.
68 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento)–Univer-
sidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.
Orientação: Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior

1. Plantas – Doenças 2. Pokkah boeng 3. Espécies biológicas
3. Fator de alongação 1- α (*TEF* - 1 α) I. Título

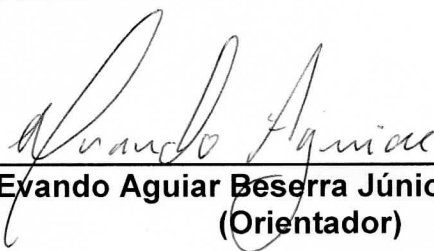
CDD 581.2

Compatibilidade sexual de populações de *Fusarium sacchari* e espécies de *Fusarium* envolvidas na podridão do topo em cana-de-açúcar

**Maria Raquel Veras de Carvalho
Licenciada em Ciências Biológicas**

Aprovada em 29/05/2017

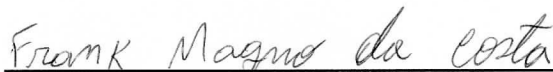
Comissão Julgadora:



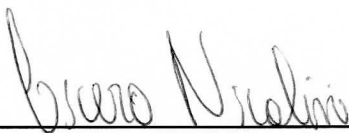
**Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior CCA/UFPI
(Orientador)**



**Prof. Dr. Maruzanete Pereira de Melo – PPGM/PNPD
(Coorientador)**



Prof. Dr. Frank Magno da Costa – UESPI



Prof. Dr. Cícero Nicolini – UESPI

Aos meus pais, Odival e Ducarmo, e a minha
irmã Vera, por tanto amor e carinho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por esse momento de realização, por iluminar meus caminhos durante toda minha vida, guiando os meus passos, dando-me forças, coragem e proteção. *O Senhor é o meu rochedo, e o meu lugar forte, e o meu libertador; o meu Deus, a minha fortaleza, em quem confio; o meu escudo, a força da minha salvação, e o meu alto refúgio* (Salmos 18:2).

À Universidade Federal do Piauí, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado em Genética e Melhoramento, bem com ao seu corpo docente por ensinarem além de teorias o amor à genética.

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

Ao meu orientador, Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior, pela excelente orientação. A quem aprendi a respeitar e admirar como orientador, pesquisador e professor.

Ao meu coorientador, Dr. Maruzanete Pereira de Melo, por me ajudar em cada etapa do nosso trabalho, pelos ensinamentos e amizade. Pessoa que tenho imenso carinho e respeito.

Ao Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar da UFPI (PMGCA-UFPI), por ceder a casa de vegetação para que os experimentos fossem conduzidos e por disponibilizar o carro para que todas as coletas fossem realizadas.

À Embrapa Milho e Sorgo, nas pessoas de Dagma Dionisia e Elaine Aparecida por contribuir na execução do experimento.

À equipe do Laboratório de Fitopatologia da UFPI, Abel Borges, Daniela de Sousa, Diego Viana, Enayra Souza, Prof^a Dra. Eulália, Gerusa Santos, Glenda Silveira, Juliana Silva e Mynor García pela amizade, por toda a ajuda na realização desse trabalho e por juntos partilharmos experiências do dia a dia da pesquisa.

As técnicas do Laboratório de Fitopatologia, Marta Suane e Antônia, por sempre estarem dispostas a colaborar com o trabalho.

Aos amigos de turma do Mestrado em Genética e Melhoramento, Eliene, Fernanda, Jessica, Marilha, Pedro, Yeda e em especial a Eugênia com quem dividi muito mais do que um apartamento, compartilhamos as alegrias, tristezas, dúvidas e ansiedades que um mestrado trás consigo. Jamais esquecerei nossas aulas, trabalhos e provas regadas de muito riso e um pouco de desespero.

Aos amigos que fiz na pós graduação, Janaina Mendes, Jayara Silva, Jessica Lustosa e Solange França, pela amizade, companheirismo e ajuda. Obrigada por tornarem essa nossa caminha mais leve, divertida e nossos momentos de descontração inesquecíveis.

Aos meus pais, Odival e Ducarmo, pela educação, instrução e exemplo que recebi, agradeço por terem sonhado os meus sonhos e por ter a certeza de que terei sempre amparo caso eu tropece.

A minha irmã Vera, amiga de todas as horas, pelo exemplo, amizade e cumplicidade.

A família linda de Paulo, Helen e especialmente Sophia, a criança mais carinhosa e amável que já conheci. Obrigada por serem mais que vizinhos vocês também foram minha família aqui.

As minhas queridas amigas Emanuelle Santos, Nazaré, Neila Souza e Thamyres Soares pelas conversas jogadas fora, conselhos em momentos difíceis, confiança em dividir suas vidas comigo e pelos momentos únicos e inesquecíveis que vivi com vocês.

A todos os meus familiares pelo amor, conselhos e torcida para que eu alcançasse meus objetivos. Obrigada por todos os dias, mesmo geograficamente distantes, me ensinarem com ações o verdadeiro significado da palavra família.

Muito Obrigada!

“Lembre da minha ordem: Seja forte e corajoso! Não fique desanimado, nem tenha medo, porque eu, o SENHOR, seu Deus, estarei com você em qualquer lugar para onde você for!”

Josué 1: 9

“Eu vejo a mão de Deus trabalhando através dos mecanismos da evolução. Se Deus escolheu criar seres humanos a sua imagem e decidiu que os mecanismos da evolução fossem um elegante modo de cumprir esse objetivo, quem somos nós para dizer que não foi assim?”

Francis Collins

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 A cultura da cana-de-açúcar	15
2.2 Podridão do topo em cana-de-açúcar	16
2.3 Compatibilidade sexual e sua importância no estudo de população	19
2.4 Importância da caracterização molecular de <i>Fusarium</i>	22
REFERÊNCIAS	26
3. COMPATIBILIDADE SEXUAL DE POPULAÇÕES DE <i>Fusarium sacchari</i> EM CANA-DE-AÇÚCAR.....	31
RESUMO.....	31
ABSTRACT	32
3.1 INTRODUÇÃO	33
3.2 METODOLOGIA.....	34
3.2.1 Coleta, isolamento e preservação	34
3.2.2 Caracterização morfológica.....	35
3.2.3 Teste de homotalismo	35
3.2.4 Indução da fase sexuada	36
3.2.5 Cálculo do tamanho efetivo da população.....	36
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
3.3.1 Isolados obtidos	37
3.3.2 Teste de homotalismo	38
3.3.3 Indução da fase sexuada	42
3.3.4 Cálculo do tamanho efetivo da população.....	44
3.4 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	46
4. PRIMEIRO RELATO DE <i>Fusarium andiyazi</i> E DUAS NOVAS LINHAGENS DO COMPLEXO <i>Fusarium fujikuroi</i> EM CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL	49
RESUMO.....	49
ABSTRACT	50

4.1 INTRODUÇÃO	51
4.2 METODOLOGIA.....	52
4.2.1 Coleta, isolamento e preservação	52
4.2.2 Caracterização morfológica.....	52
4.2.3 Caracterização molecular.....	53
4.2.4 Teste de patogenicidade, agressividade e gama de hospedeiros.....	54
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.3.1 Obtenção de isolados.....	54
4.3.2 Caracterização morfológica.....	57
4.3.3 Caracterização molecular.....	60
4.3.4 Teste de patogenicidade, agressividade e gama de hospedeiros.....	62
4.4 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS.....	66

RESUMO

CARVALHO. M. R. V. de. **Compatibilidade sexual de populações de *Fusarium sacchari* e espécies de *Fusarium* envolvidas na podridão do topo em cana-de-açúcar.** 2017. 68p. Dissertação para obtenção do título de Mestre na área de concentração de Genética e Melhoramento - Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, 2017.

No Brasil, observa-se em cultivos de cana-de-açúcar sintomas de má formação ou distorção do topo, doença conhecida como podridão do topo ou Pokkah boeng. Essa doença já foi relatada em quase todos os países onde a cana-de-açúcar é cultivada, tendo como agentes etiológicos seis espécies de *Fusarium*. No Brasil, ainda não há relatos consistentes de qual patógeno está associado a essa doença. Também não é conhecida a estrutura de populações desses agentes etiológicos. Desta forma, este estudo tem como objetivos: (i). Confirmar, através da técnica de compatibilidade sexual, se o agente associado à podridão do topo em cana-de-açúcar no Brasil é *Fusarium sacchari*, bem como conferir a relação de *Mating type* e o tamanho efetivo da população dessa espécie no Brasil. (ii). Identificar e caracterizar espécies de *Fusarium* causadoras de podridão do topo em cana-de-açúcar nos estados de Alagoas, Maranhão e Pernambuco, através de marcadores morfológicos, sequenciamento e filogenia do gene *TEF-1 α* , além de teste de patogenicidade, agressividade e gama de hospedeiros. Amostras de plantas com sintomas típicos de podridão do topo foram coletadas nos estados de Alagoas, Maranhão, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco e Piauí. Setenta e nove isolados de *Fusarium* spp. foram obtidos, dos quais 68 exibiram microconídios em falsas cabeças e polifialides. Destes 68 isolados, cinco apresentaram-se homotáticos e 63 heterotáticos, sendo estes identificados pela técnica de compatibilidade sexual como *F. sacchari*, confirmando esta espécie como principal patógeno associado à podridão do topo em cana-de-açúcar no Brasil. Os isolados heterotáticos exibiram uma proporção de 29 *MAT-1* e 34 *MAT-2*. O tamanho efetivo da população foi de $N_{e(mt)} = 99\%$ e $N_{e(f)} = 95\%$. Quarenta e um, dos 63 isolados heterotáticos, apresentaram comportamento hermafrodita, enquanto 22 foram fêmeas estéreis. Portanto, pode-se inferir que a população de *F. sacchari* está realizando reprodução sexuada em campo no Brasil. Dos 11 isolados que não cruzaram com os testadores de *F. sacchari* e foram identificados apenas como *Fusarium* spp., seis, tiveram o gene *TEF-1 α* amplificado por Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, PCR) e sequenciados. Baseado na filogenia do gene *TEF-1 α* e marcadores morfológicos, quatro isolados foram identificados como *F. andiyazi* e dois isolados não agruparam com nenhuma espécie de *Fusarium* conhecida, portanto, são pertencentes a duas novas linhagens de *Fusarium*, relacionadas filogeneticamente à *F. musae* e *F. verticillioides*. Os isolados de *F. andiyazi* foram patogênicos a cana-de-açúcar, milho, sorgo e milheto, enquanto que as novas linhagens foram patogênicas a cana-de-açúcar. De acordo com teste de Tukey não houve diferença de agressividade entre os isolados.

Palavras-chave: Pokkah boeng, espécies biológicas, fator de alongação 1- α (*TEF-1 α*).

ABSTRACT

CARVALHO. M. R. V. De. **Sexual compatibility of *Fusarium sacchari* populations and *Fusarium* species involved in top rot in sugarcane.** 2017. 68p. Dissertation for obtaining the title of master in the area of concentration of genetics and breeding - Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, 2017.

In Brazil, symptoms of malformation or distortion of the top in sugarcane is observed, a disease known as top rot or Pokkah boeng. This disease has been reported in almost all countries where sugarcane is cultivated, with six species of *Fusarium* as etiological agents. In Brazil, there are still no consistent reports of which pathogen is associated with this disease. The population structure of these etiological agents is also not known. Therefore, this study aims to: (i). Confirm, through the technique of sexual compatibility, if the agent associated with top rot in sugarcane in Brazil is *Fusarium sacchari*, and check the relationship of Mating type and the effective size of the population of this species in Brazil. (ii). To identify and characterize *Fusarium* species causing top rot in sugarcane in the states of Alagoas, Maranhão and Pernambuco, through morphological characteristics, sequencing and phylogeny of the *TEF-1 α* gene, as well as the pathogenicity, aggressiveness and range of hosts. Samples of plants with typical symptoms of top rot were collected in the states of Alagoas, Maranhão, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco and Piauí. Seventy-nine isolates of *Fusarium* spp. were obtained, of which 68 exhibited microconidia in false heads and polyphalid. Of these 68 isolates, five were homotallic and 63 heterotalic, being identified by the sexual compatibility technique as *F. sacchari*, confirming this species as the main pathogen associated with top rot in sugarcane in Brazil. Heterotalic isolates exhibited a ratio of 29 MAT-1 and 34 MAT-2. The effective population size was $N_e (mt) = 99\%$ and $N_e (f) = 95\%$. Forty-one of the 63 heterotypic isolates presented hermaphrodite behavior, while 22 were sterile females. Therefore, it can be inferred that the *F. sacchari* population is performing sexual reproduction in the field in Brazil. Of the 11 isolates that did not cross with *F. sacchari* testers and were identified only as *Fusarium* spp., six had the gene *TEF-1 α* amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) and sequenced. Based on the phylogeny of the *TEF-1 α* gene and morphological characteristics, four isolates were identified as *F. andiyazi* and two isolates did not cluster with any known *Fusarium* species, therefore, they belong to two new *Fusarium* strains, phylogenetically related to *F. musae* and *F. verticillioides*. The isolates of *F. andiyazi* were pathogenic to sugarcane, corn, sorghum and millet, while the new strains were pathogenic to sugarcane. According to Tukey's test there was no difference in aggressiveness among the isolates.

Keywords: Pokkah boeng, biological species, elongation factor 1- α (*TEF-1 α*).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1 - Localização geográfica dos estados e municípios onde as amostras foram coletadas..... 35
- Figura 3.2 - *Fusarium sacchari*: Sintomas de podridão do topo (A-B); Cultura em BDA (C); Peritécios em CA (D); Peritécios exsudando ascósporos (E); Ascósporos 1-4 septos (F); Microconídios em polifiálides (G); Microconídios (H). Barra: E-H = 40 µm..... 43
- Figura 4.1 - *Fusarium andiyazi*. Teste de patogenicidade em cana-de-açúcar: Testemunha (A) e planta inoculada (B); Macroconídios e microconídios (C); Pseudoclamidósporo (D); Microconídios em cadeias longas (E) Barra C-E = 40 µm..... 57
- Figura 4.2 - *Fusarium* sp 1. Teste de patogenicidade em cana-de-açúcar: Testemunha (A) e planta inoculada (B); Macroconídios, microconídios e mesoconídios (C); Microconídios em cadeia curta (D); Microconídios em cadeias cadeia curta e falsa cabeça (E). Barra: D-E = 40 µm..... 58
- Figura 4.3 - *Fusarium* sp 2. Teste de patogenicidade em cana-de-açúcar: Testemunha (A) e planta inoculada (B); Macroconídios, microconídios (C); Falsas cabeças (D); Falsa cabeça em monofiálide longa (E); Barra: C-F = 40 µm..... 59
- Figura 4.4 - Árvore filogenética construída por Inferência Bayesiana de sequências da região *TEF-1α*, mostrando a relação filogenética entre espécies do Complexo de Espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC). Os valores de probabilidade “a posteriori” estão representados nos entroncamentos da árvore. *Fusarium inflexum* e *Fusarium oxysporum* foram utilizadas como outgroup. 61
- Figura 4.5 - Níveis de agressividade dos isolados de acordo com o comprimento diâmetro da lesão em colmos de cana-de-açúcar. Teste Tukey a 5% de probabilidade..... 63
- Figura 4.6 - Teste de gama de hospedeiros com os isolados CMM 3316 e CMM 3318 e suas respectivas testemunhas. Milho (A); Sorgo (B); Milheto (C)..... 64
- Figura 4.7 - Níveis de agressividade dos isolados de acordo com o comprimento da lesão em colmos de milho, sorgo e milheto. Teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	- Isolados de <i>Fusarium</i> provenientes de espécies de cana-de-açúcar utilizados neste estudo e indicativos de <i>Mating type</i> , fêmea estéril, hermafrodita e homotalismo. Teresina, PI, 2017.....	39
Tabela 4.1	- Isolados de <i>Fusarium</i> provenientes de cana-de-açúcar utilizados neste estudo e sequências de referências disponíveis no GenBank empregadas nas análises filogenéticas. Teresina, PI, 2017.....	55
Tabela 4.2	- Dimensões comprimento/largura de macroconídios e microconídios de isolados obtidos de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.) causadores de podridão do topo, em comparação com isolados obtidos de outras espécies do complexo <i>Fusarium fujikuroi</i> citadas na literatura. Teresina, PI, 2017.....	60

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma planta da família Poaceae, que apresenta elevada capacidade de acumular açúcares sob a forma de sacarose em células do parênquima dos internódios (ROCHA et al., 2007; VETTORE et al., 2003). Embora haja divergência em relação aos países, não há contradições nas citações da Ásia como centro de origem (ARTSCHWAGER; BRANDES, 1958).

A cultura é plantada em mais de 100 países, sendo o Brasil o maior produtor mundial (FAO, 2014a), com destaque para os estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás. Na Região Nordeste, o maior produtor é o estado de Alagoas (IBGE, 2016). A cana-de-açúcar é utilizada como matéria prima para as agroindústrias do açúcar, etanol, aguardente, cachaça de alambique, açúcar mascavo, rapadura, melaço, alimentação de animais e geração de energia, sendo assim uma importante fonte de geração de empregos e renda (MARQUES et al., 2009).

Um dos motivos limitantes para produção de cana-de-açúcar é a ocorrência de doenças provocadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides que afetam a quantidade do rendimento e a qualidade do produto (YAMANE, 2016). A podridão do topo, também chamada Pokkah boeng, é uma doença fúngica, registrada pela primeira vez na ilha de Java (ABBOTT, 1953). Esta enfermidade está presente na maioria, se não em todos os países produtores de cana-de-açúcar do mundo, entre eles China, Malásia e África do Sul (GOVENDER et al., 2010; LIN et al., 2014; RAID; ROTT, 2006; SITI NORDAHLIAWATE et al., 2008).

Várias espécies de *Fusarium* foram relatadas como agentes causais da podridão do topo em outros países, tais como *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* (LIN et al., 2014), *Fusarium sacchari* (GOSWAMI et al., 2014), *Fusarium oxysporum* (BAO et al., 2016), *Fusarium moniliforme* e *Fusarium subglutinans* (ELLIS et al., 2004). No Brasil, foi registrada a ocorrência de *F. moniliforme* e *F. subglutinans* provocando sintomas de podridão do topo (SILVEIRA et al., 2012; TOKESHI, 1997). No entanto, essas identificações estão fundamentadas apenas em marcadores morfológicos, sendo necessária uma revisão utilizando novos métodos.

A identificação correta dos patógenos é etapa inicial que subsidia o controle de doenças. Para a identificação de espécies de *Fusarium* pode-se fazer uso da técnica de cruzamento (compatibilidade sexual), onde isolados testadores

previamente caracterizados são cruzados com os isolados de espécies não identificadas. Esta técnica permite identificar e diferenciar espécies pela capacidade de produzir descendentes férteis ou não, além de possibilitar determinar o tipo de acasalamento, calcular o tamanho efetivo da população e inferir se existem barreiras reprodutivas entre diferentes populações (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

As técnicas moleculares também são ferramentas importantes para identificar e agrupar espécies de *Fusarium*. O gene fator de alongação 1- α (*TEF-1 α*), que codifica uma parte essencial da maquinaria de tradução de proteínas, é uma boa alternativa de identificação de *Fusarium*, devido apresentar elevado polimorfismo de sequência entre espécies intimamente relacionadas (AMATULLI et al., 2010).

Diante do exposto, este estudo tem como objetivos: (i). Confirmar, através da técnica de compatibilidade sexual, se o agente associado à podridão do topo em cana-de-açúcar no Brasil é *Fusarium sacchari*, bem como conferir a relação de *Mating type* e o tamanho efetivo da população dessa espécie no Brasil. (ii). Identificar e caracterizar espécies de *Fusarium* causadoras de podridão do topo em cana-de-açúcar nos estados de Alagoas, Maranhão e Pernambuco, através de marcadores morfológicos, sequenciamento e filogenia do gene *TEF-1 α* , além de teste de patogenicidade, agressividade e gama de hospedeiros.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea perene, pertencente ao gênero *Saccharum* L. e família Poaceae, sendo esta uma família economicamente importante que inclui cereais como milho, trigo, arroz, sorgo e muitas espécies forrageiras. As variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil e no mundo são híbridos multiespecíficos, recebendo a designação *Saccharum* spp. (ELLIS et al., 2004; VETTORE et al., 2003; YAMANE, 2016).

Na literatura científica, especialmente a partir de 1928, a maioria dos relatos é de que uma espécie de *Saccharum* selvagem localizada em Nova Guiné, *Saccharum robustum*, deu origem pela ocorrência de poliploidia e de seleção a um grupo de canas tropicais cultivadas, *Saccharum officinarum*. Em um segundo momento, a migração de formas de *S. officinarum* no sudeste da Ásia, rica em açúcar, porém mais suscetível a doenças hibridizou com formas de estado selvagem, *Saccharum spontaneum*, pobre em açúcar, no entanto, mais resistentes aos problemas do campo como as doenças de podridão radicular e mosaico, além de ser amplamente distribuída originando vários grupos de cana cultivadas subtropicais, entre elas *Saccharum sinense* e *Saccharum barberi* (ARTSCHWAGER; BRANDES, 1958; MARQUES, 2009).

O seu ingresso nas Américas ocorreu a partir da segunda expedição de Cristóvão Colombo, em 1493, através das caravelas que transportavam mudas de cana-de-açúcar incorporadas aos mantimentos, a fim de serem utilizadas nas novas terras como alimento. Da mesma forma foi introduzida no Brasil em 1502, por Martim Afonso de Souza, proveniente de mudas da Ilha da Madeira. A alfândega de Lisboa ainda faz referência ao ingresso do açúcar brasileiro, produto derivado da cana-de-açúcar, nos anos de 1520 e 1526 (CESNIK, 2007).

A cana-de-açúcar é cultivada comercialmente em regiões tropicais e subtropicais e é conhecida por ser uma das mais antigas plantas cultivadas no mundo. As variedades que são adequadas para o cultivo nas regiões subtropicais são diferentes das que são bem sucedidas nas regiões tropicais. O ambiente mais favorável para o crescimento ideal da cana é o qual há chuva (ou irrigação) durante a sua época de crescimento, acrescido de um período relativamente seco em sua

pré-colheita; as horas de sol também devem ser abundantes durante todo o cultivo (ELLIS et al., 2004).

O principal produto da cana-de-açúcar é a sacarose, que acumula-se em grandes quantidades nos entrenós do seu colmo. Essa sacarose é extraída e purificada em fábricas especializadas, onde é utilizada como matéria-prima na indústria de alimentos ou é fermentada para produzir etanol, um combustível de baixa emissão de carbono (VETTORE et al., 2003). Dessa forma, essa matéria-prima apresenta grande importância econômica para o Brasil, pois dela é derivado ainda uma infinidade de subprodutos tradicionais como melão, aguardente, bagaço, torta de filtro, vinhaça, plásticos, xaropes etc. (NOGUEIRA et al., 2008).

A cultura atualmente é plantada em diversos países como Índia, China, Tailândia, México e Colômbia (FAO, 2014b). No entanto, o Brasil é o maior produtor com aproximadamente 733 milhões de toneladas colhidas em 2016, em uma área plantada de 9.669.481 hectares. Das 27 unidades federativas brasileiras, apenas 3 estados não produzem cana-de-açúcar: Amapá, Rondônia e Santa Catarina (IBGE, 2016).

O estado de São Paulo foi responsável por cerca de 54% da produção nacional em 2016. Já o estado de Alagoas, maior produtor da região Nordeste, obteve produção de 21.628.299 toneladas de cana-de-açúcar, o Maranhão contribuiu com uma produção de 2.993.209 t e o Piauí com 876.413 t sendo responsável por 0,1% da produção brasileira (IBGE, 2016).

2.2 Podridão do topo em cana-de-açúcar

A podridão do topo (conhecida também como Pokkah boeng) trata-se de uma expressão em Javanês (idioma falado em Java, uma ilha localizada na Indonésia, sudeste da Ásia) referente a uma má formação ou distorção do topo em cana-de-açúcar, onde até então o agente etiológico foi identificado como *F. moniliforme* (ABBOTT, 1953).

Os sintomas da podridão do topo apresentam diferentes níveis. Em casos menos graves, ocorre clorose na base das folhas e, ocasionalmente, do meio ao

longo da lâmina foliar. Esta clorose apresenta aparência desuniforme. O aumento da severidade leva a torção e distorção das folhas. Quando certo número de folhas são afetadas juntas, folhas jovens não conseguem se separar totalmente uma da outra durante o desenvolvimento. Em casos muito graves, o patógeno pode necrosar o tecido no ponto de crescimento, levando à morte (CROFT et al., 2000). No estágio mais avançado toda a parte superior (ponto de crescimento) da planta morre (referida como "top rot") (RAID; ROTT, 2006).

A severidade dos sintomas varia devido à susceptibilidade da cultivar e em virtude das condições ambientais que regem o desenvolvimento do patógeno. A podridão do topo é favorecida por período com alta precipitação, seguida de condições climáticas secas. A cana-de-açúcar que tem de três a sete meses de idade e que cresce vigorosamente parece ser a mais suscetível (RAID; ROTT, 2006).

A disseminação do patógeno ocorre principalmente por esporos através do vento e com menor frequência através de semente. A infecção ocorre comumente através do eixo ao longo da margem de uma folha. Esporos que são inseridos no eixo germinam e crescem no tecido interno das folhas. O fungo atinge a porção imatura da haste por meio dos feixes vasculares. Ele pode passar pelos feixes vasculares da bainha da folha sem entrar no tecido circundante, mas lesões são frequentemente encontradas na bainha (RAID; ROTT, 2006).

A podridão do topo já foi relatada em quase todos os países onde a cana-de-açúcar é cultivada e muitos trabalhos de identificação do agente causal da doença foram realizados, geralmente pela avaliação dos caracteres morfológicos, teste de patogenicidade e análise filogenética (BAO et al., 2016; LIN et al., 2014; SITI NORDAHLIAWATE et al., 2008). Nesses trabalhos mais de uma espécie de *Fusarium* foi associada com a doença, muito embora *F. sacchari* geralmente seja a espécie predominante (GOSWAMI et al., 2014; LESLIE et al., 2005; NIRENBERG; O'DONNELL, 1998; SITI NORDAHLIAWATE et al., 2008).

Na China foram registrados *F. verticillioides*, *F. proliferatum* (LIN et al., 2014) e *F. oxysporum* (BAO et al., 2016) como agentes causais da podridão do topo por meio da morfologia, teste de patogenicidade e análise filogenética. Enquanto que na Malásia Peninsular, com o uso do teste de patogenicidade, o patógeno encontrado

foi *F. sacchari* (SITI NORDAHLIAWATE et al., 2008). Já na África do Sul, utilizando técnicas de biologia molecular, identificou-se às espécies *Fusarium andiyazi*, *F. sacchari* e *F. proliferatum* (GOVENDER et al., 2010). Todas as espécies de *Fusarium* acima citadas podem sobreviver em material vegetal em decomposição e isolados podem ser recuperados de culturas infectadas (RAID; ROTT, 2006).

No Brasil, no estado de Minas Gerais, a doença foi observada em anos que apresentavam baixas temperaturas, escassez de água e solos com desequilíbrio nutricional (SILVEIRA et al., 2012). Os patógenos encontrados no país foram caracterizados pela morfologia e identificados como *F. moniliforme* e *F. subglutinans* (TOKESHI, 1997). Porém, os nomes *Fusarium subglutinans* sensu lato e *F. moniliforme* são nomes obsoletos e não devem ser utilizados pela comunidade científica. Baseado em estudo moderno de biologia molecular, estas morfoespécies se desmembraram em várias espécies filogenéticas (SEIFERT et al., 2003; LESLIE; SUMMERRELL, 2006).

Fusarium sacchari, principal espécie associada à podridão do topo, também é capaz de causar podridão de raiz em outras gramíneas, incluindo culturas economicamente importantes como sorgo, milho, arroz comercial e arroz selvagem, sendo, portanto, uma ameaça a gramíneas cultivadas, pois proporciona a sobrevivência do patógeno (PETROVIC et al., 2013).

Os marcadores morfológicos de *F. sacchari* são semelhantes aos de outras espécies pertencentes ao complexo *Fusarium fujikuroi* (FFSC), tais como *F. circinatum* e *F. subglutinans* (LESLIE; SUMMERRELL, 2006), *Fusarium tuiense* (LIMA et al., 2012), *Fusarium temperatum* (SCALFLAIRE et al., 2011) *Fusarium mangiferae* (KVAS et al., 2009) e *Fusarium guttiforme* (NIRENBERG; O'DONNELL, 1998). Dessa forma, *F. sacchari* não pode ser diferenciado dessas espécies de forma confiável, apenas com avaliação dos marcadores morfológicos, portanto, é importante o emprego do conceito de espécie filogenética e espécie biológica (LESLIE; SUMMERRELL, 2006).

A única medida de controle satisfatória para a podridão do topo em cana-de-açúcar seria o uso de cultivares resistentes (CROFT et al., 2000). Entretanto, até o momento não existem relatos do desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar resistentes às espécies de *Fusarium* associadas à podridão do topo. Urdaneta;

Borges (2008) avaliaram cinco doenças na cana-de-açúcar causadas por fungos, entre elas estava podridão do topo, causada por *F. verticillioides*, onde foram avaliados 14 cultivares, dos quais três se apresentaram altamente suscetíveis (V71-39, V99-23 e V99-262), enquanto as 11 restantes apresentaram sintomas pouco visíveis ou estavam dentro da gama de resistência de acordo com método de avaliação utilizado.

O método de controle atualmente utilizado consiste no descarte de clones altamente suscetíveis que são eventualmente identificados em programas de melhoramento (CROFT et al., 2000). Sabe-se que populações de diferentes cruzamentos diferem em relação à frequência de plantas suscetíveis à podridão do topo, e isto indica que a suscetibilidade é herdada geneticamente. Além disso, a complexidade genética devido à poliploidia em cana-de-açúcar torna difícil o entendimento completo da herança de caracteres (LYRENE et al., 1977).

2.3 Compatibilidade sexual e sua importância no estudo de população

A importância do cruzamento (*Mating*) e a escolha de parceiros são pontos extremamente relevantes nos ciclos de vida de organismos que se reproduzem sexuadamente. A expressão tipo de acasalamento (*Mating types*) é utilizada como referência a uma regulação genética da especificidade de acasalamento e desenvolvimento sexual em muitos fungos filamentosos e não filamentosos. Um largo entendimento filogenético sobre o tipo de acasalamento é relevante devido ao papel fundamental da reprodução sexuada nos ciclos de vida dos fungos e a atuação significativa do sexo na genética de populações e evolução (KRONSTAD; STABEN, 1997).

Loci *MAT* são definidos geneticamente pela segregação na descendência de elementos que controlam o desenvolvimento sexual e a produção de esporos sexuais. Sempre que a questão é examinada detalhadamente nos ascomicetos um único locus *MAT* é encontrado apresentando duas formas alternativas, definindo assim dois tipos de acasalamento. Alguns fungos requerem isolados de tipos de acasalamento opostos para uma interação compatível, sendo, portanto, denominados heterotáticos (auto-estéreis). Enquanto as espécies capazes de

submeter-se a reprodução sexuada quando um único isolado está presente são homotáticas (auto-fértil) (TURGEON, 1998).

Fungos pseudohomotáticos apresentam em seus ascósporos dois núcleos, um de cada tipo de acasalamento. Os ascósporos binucleados germinam, são auto-férteis, ou segregam hifas do tipo de cruzamento oposto para permitir a fecundação cruzada. Os homotáticos podem completar o ciclo de vida com culturas que são iniciadas a partir de um esporo ou fragmento micelial que contém um único núcleo, neste caso ambos os idiomorfos de tipo de acasalamento são presentes ou fundidos. Já organismos heterotáticos requerem dois parceiros de tipos de cruzamento opostos com *MAT* idiomorfos compatíveis para um ciclo sexual completo (NI et al., 2012).

No gênero *Fusarium* são conhecidas espécies heterotáticas e homotáticas. As espécies pertencentes ao FFSC são predominantemente heterotáticas, enquanto que a única espécie deste complexo que se tem relato de homotalismo é *F. sacchari* (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

A fertilidade sexual é um parâmetro prático, importante quando o conceito de espécies biológicas está sendo aplicado. O conceito biológico de espécie geralmente requer alguma evidência de cruzamento sexual que produza descendentes férteis quando dois isolados são atribuídos a uma espécie comum (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

A técnica de compatibilidade sexual vêm sendo empregada na descrição de novas espécies de *Fusarium* pertencentes ao FFSC. Esse complexo engloba 13 espécies que apresentam a fase sexuada induzida em condições de laboratório (LESLIE et al., 2005; LIMA et al., 2012; SCAUFLAIRE et al., 2011; VAN HOVE et al., 2011; ZELLER et al., 2003). No Brasil, *Fusarium udum*, o agente etiológico da murcha em feijão-guandu e *Crotalaria* spp. foi confirmado através de compatibilidade sexual como pertencente a uma nova *Mating population* (MELO, 2014).

Durante o procedimento de reprodução sexuada é indispensável que haja a interação entre dois esporos morfologicamente idênticos, mas fisiologicamente diferentes, sendo a reprodução sexuada dependente da existência de dois alelos de um mesmo loco, *MAT-1* e *MAT-2*. No caso das espécies heterotáticas, um isolado

deve possuir o alelo *MAT-1* e o outro isolado sexualmente compatível necessariamente deve possuir o alelo *MAT-2* (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Nas populações que se reproduzem de forma sexuada há maior diversidade genética do que as populações que apresentam apenas a forma assexuada de reprodução. Em indivíduos que se reproduzem de forma sexuada, ocorrem recombinações, e por isso seus descendentes apresentam maiores possibilidades de exibir caracteres diversos, como a capacidade de suplantar a resistência do hospedeiro, e de apresentar resistência contra determinados grupos de fungicidas (MCDONALD; LINDE, 2002).

Outra característica que apresenta certa complexidade ao cruzamento é se o patógeno se apresenta como macho, fêmea ou hermafrodita. Um indivíduo considerado ideal em uma população heterotálica é o hermafrodita auto-estéril, que é apto a fornecer ambos os gametas, masculino e feminino. A partir do momento em que a estrutura feminina é fertilizada por um gameta masculino, então esta irá amadurecer originando ascósporos que são provenientes dos produtos meióticos de um núcleo diplóide, biparental (LESLIE; KLEIN, 1996).

O gameta masculino pode ser obtido através de ascósporos, macroconídios, microconídios ou fragmentos de hifas. A estrutura da fêmea é na maioria das vezes mais aprimorada, requerendo um alto grau de especialização celular e o desenvolvimento de uma estrutura altamente organizada. A estrutura reprodutiva feminina normalmente é limitada à reprodução sexual, ao passo que o gameta masculino em geral não é tão limitado (LESLIE; KLEIN, 1996).

Um estudo na Argentina utilizando 203 isolados de *F. verticillioides*, os tipos de acasalamento segregaram em 74:129. Essa proporção foi significativamente diferente de 1:1, resultando em uma diminuição no tamanho efetivo da população com base no tipo de acasalamento, $N_{e(mt)}$, para 92,6%, da contagem real (população total). Entre os isolados, 105 foram hermafroditas, apresentando um tamanho efetivo da população relativo a frequência de isolados fêmea estéril e hermafrodita, $N_{e(f)}$, de 89,8% da contagem real (REYNOSO et al., 2006).

Na Tanzânia, 175 isolados de *Fusarium thapsinum* provenientes de sorgo, segregaram seus tipos de acasalamento em 113:62, sendo 142 fêmeas estéreis e

33 hermafroditas resultado na diminuição para 59% o $N_{e(f)}$ e para 91% o $N_{e(mt)}$ (MANSUETUS et al., 1997). No Brasil, estudos dessa natureza foram realizados com 300 isolados de *F. verticillioides* provenientes das três principais climas zonais em que se cultiva milho. Nesse mesmo estudo foi demonstrada a distribuição de *Mating type*, a frequência de fêmeas estéreis e hermafroditas, havendo diferenças quanto à origem geográfica (GOMES, 2013).

A compatibilidade sexual de isolados de *F. sacchari* obtidos de arroz selvagem na Austrália revelou a presença de 15 isolados *MAT-1* e 9 isolados *MAT-2*. Nesse estudo a proporção de *Mating types* não foi significativamente diferente da esperada de 1:1 (PETROVIC et al., 2013). No entanto, esse trabalho apresentou uma amostragem limitada, pois foram utilizados 24 isolados, enquanto trabalhos dessa natureza são empregados 80 (BRITZ et al., 1998) e até mesmo 300 (GOMES, 2013) isolados.

2.4 Importância da caracterização molecular de *Fusarium*

Existe uma preocupação por parte dos micologistas e fitopatologistas com o crescente aumento de espécies de *Fusarium* e a necessidade de identificá-las. O conceito de espécies morfológicas é de extrema importância para a classificação inicial e baseia-se na idéia de que um "tipo" ou um indivíduo morfológico pode representar toda variação dentro da espécie. Ambos os caracteres físicos e fisiológicos têm sido utilizados como marcadores morfológicos para distinguir espécies de *Fusarium*, no entanto, uma das dificuldades enfrentadas se refere ao fato do número de caracteres detectáveis úteis para distinguir espécies ser muito menor do que o número de espécies, além de serem influenciadas pelo ambiente, podendo provocar erros de identificação (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Desse modo, nos últimos 20 anos, as técnicas moleculares de identificação empregando a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polimerase Chain Reaction*) seguida de sequenciamento de DNA, vêm sendo apresentadas como ferramentas essenciais para contornar as lacunas existentes na taxonomia tradicional, que levava em consideração apenas os marcadores morfológicos (SILVA et al., 2013). Os métodos moleculares vêm revolucionando a taxonomia, pois

permitem a identificação de novas espécies sem a necessidade do uso da biologia, patologia, toxicologia e ecologia dos táxons (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Estudos com sequências de DNA têm sido utilizadas para gerar caracteres que normalmente são tratados cladisticamente para formar filogenias. Embora qualquer grupo de caracteres suficientemente numerosos possa formar a base de uma linhagem filogenética, na prática sequências de DNA de vários genes "conservados" são usadas para essa finalidade (SUMMERELL et al., 2003). Métodos dessa natureza proporcionam uma investigação mais precisa da mutabilidade genética, revelada por variações em regiões codificadoras. Esses procedimentos apresentam resultados extremamente reproduzíveis e informativos (LEE et al., 2001).

Análises filogenéticas devem ser feitas em isolados cuidadosamente caracterizados morfológicamente e, se possível, deve-se incluir descrições de características específicas dos isolados como por exemplo: origem geográfica, hospedeiros, produção de metabólitos secundários e testes de patogenicidade. Pois, a utilização de isolados identificados incorretamente pode amplificar as dificuldades relacionadas com as delimitações das espécies além de ocultar as ligações evolutivas entre espécies (KRISTENSEN et al., 2005).

Regiões conservadas no genoma têm sido extensivamente utilizadas na identificação de espécies, entre elas pode-se destacar os "genes housekeeping" onde os mais empregados são: actina (ACT), β -tubulina (TUB), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), ubiquitina (UBQ), fosfogliceratoquinase (PGK), dentre outros (LLANOS, et al., 2015; REBOUÇAS et al., 2013).

O gene fator de alongação 1- α (*TEF-1 α*), que codifica um fator essencial da maquinaria de tradução celular, é uma sequência altamente informativa e tornou-se o principal marcador de escolha para a identificação de *Fusarium* spp., mesmo em comparação com outras regiões gênicas, tais como a calmodulina, beta-tubulina e histona H3 (AMATULLI et al., 2010; BEZUIDENHOUT et al., 2006; DIVAKARA et al., 2013; WANG et al., 2010).

Outros genes também são rotineiramente usados na identificação e filogenia do gênero *Fusarium* juntos com o *TEF-1 α* (AMATULLI et al., 2010). Entre eles estão a segunda maior subunidade da RNA polimerase (RPB2), onde pode-se identificar

como espécie nova, *Fusarium burgessii*, associada a solos australianos (LAURENCE et al., 2011). Outro exemplo foi a identificação de *Fusarium paranaense*, como novo um membro do complexo *Fusarium solani* (FSSC) causando podridão radicular em soja, no Brasil (COSTA et al., 2015). O sequenciamento dos genes *TEF1- α* e *TUB2* também foram utilizados na identificação do agente etiológico da malformação da mangueira no Brasil, apontando *F. tuiense* sp. nov., como um novo membro do FFSC (LIMA et al., 2012).

O rDNA de eucariotos expressa os genes 18S, 5,8S e 28S, os quais são intercalados por regiões chamadas ITS1 e ITS2 (ITS, do inglês Internal Transcribed Spacer). O rDNA encontra-se repetido centenas de vezes no genoma fúngico. Devido à região 18S ser mais conservada, adota-se esta região para determinar parentescos distantes entre indivíduos, em contrapartida, a região 28S está sujeita a ocorrer mais mutações sendo utilizada para a comparação de gêneros ou em algumas situações de espécies distintas. Têm-se também os fragmentos ITS que evoluem rapidamente, sendo assim ideais para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo categorias infra-específicas. Dessa forma, devido o rDNA apresentar regiões altamente conservadas e outras variáveis o mesmo é utilizado para análise em diferentes níveis taxonômicos (LEE; TAYLOR, 1992).

Na China, foram isolados fungos causando sintomas de podridão do topo em cana-de-açúcar, onde utilizou-se observação morfológica e análise filogenética da região ITS, onde chegou-se ao resultado de que dos 101 isolados obtidos, 94 eram *F. verticillioides*, que foi estreitamente relacionado com *F. sacchari*, enquanto apenas sete isolados eram *F. proliferatum*, que foi estreitamente relacionado com *Fusarium fujikuroi* (LIN et al., 2014).

Estudos baseados em sistemática molecular revelaram que, o que se chamava de *F. moniliforme*, na verdade são várias espécies que apresentam morfologia semelhante e deram origem ao FFSC, o qual atualmente inclui pelo menos 60 espécies ou linhagens filogenéticas distintas (AL-HATMI et al., 2016; AOKI et al., 2014; HERRON et al., 2015; LAURENCE et al., 2015; LIMA et al., 2012; O'DONNELL et al., 1998; SCAUFLAIRE et al., 2011; VAN HOVE et al., 2011).

Esse complexo é considerado monofilético, apresentando uma série de espécies como *Fusarium sterilihyphosum*, *F. circinatum*, *F. mangiferae*, *F.*

subglutinans com características morfológicas semelhantes e sobrepostas que dificultam a sua diferenciação (LESLIE; SUMMERELL, 2006). A maioria das espécies desse complexo estão associadas a doenças em plantas economicamente importantes, tais como a malformação da mangueira, devido a presença de fungos como *F. tuiense* e *F. mangiferae* (ANSARI et al., 2013; LIMA et al., 2012), a fusariose da espiga do milho causado por *Fusarium asiaticum* e *Fusarium graminearum* (ZHANG et al., 2013), podridão de pimenta provocada por *F. concentricum* (WANG et al., 2013) entre outras.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, E. V. Sugarcane and its diseases. **The Yearbook of Agriculture. US Dept. of Agriculture, Washington, DC**, p. 526-535, 1953.
- AL-HATMI, A. M.; MIRABOLFATHY, M.; HAGEN, F.; NORMAND, A. C.; STIELOW, J. B.; KARAMI-OSBO, R.; DE HOO, G. S. DNA barcoding, MALDI-TOF, and AFLP data support *Fusarium ficicrescens* as a distinct species within the *Fusarium fujikuroi* species complex. **Fungal Biology**, v. 120, n. 2, p. 265-278, 2016.
- AMATULLI, M. T.; SPADARO, D.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Molecular identification of *Fusarium* spp. associated with bakanae disease of rice in Italy and assessment of their pathogenicity. **Plant Pathology**, v. 59, n. 5, p. 839-844, 2010.
- ANSARI, M. W.; SHUKLA, A.; PANT, R. C.; TUTEJA, N. First evidence of ethylene production by *Fusarium mangiferae* associated with mango malformation. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 1, p. 86-73, 2013.
- AOKI, T.; O'DONNELL, K.; GEISER, D. M. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, n. 3, p. 189-201, 2014.
- ARTSCHWAGER, E.; BRANDES, E. W. **Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) classification, characteristics and descriptions of representative clones**. UNITED STATES: Agricultural Research Service, Crops Research Division, 1958.
- BAO, Y. X.; SUN, H. J.; LI, Y. F.; DUAN, Z. Z.; MCCORD, P. H.; CUI, Y. P.; ZHANG, M. Q. BAO, Y. X. First Report of *Fusarium oxysporum* Isolate gx3 Causing Sugarcane Pokkah Boeng in Guangxi of China. **Plant Disease**, v. 100, n. 8, p. 1785, 2016.
- BEZUIDENHOUT, C. C.; PRINSLOO, M.; VAN DER WALT, A. M. Multiplex PCR-based detection of potential fumonisin-producing *Fusarium* in traditional African vegetables. **Environmental Toxicology**, v. 21, n. 4, p. 360-366, 2006.
- BRITZ, H.; WINGFIELD, M. J.; COUTINHO, T. A.; MARASAS, W. F. O.; LESLIE, J. F. Female fertility and mating type distribution in a south african population of *Fusarium subglutinans* f. sp. pini. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 2094–2095, 1998.
- CESNIK, R. Melhoria da cana-de-açúcar: marco sucro-alcooleiro no Brasil. **Com Ciência: Revista Eletrônica de Jornalismo Científico**, p. 1–4, 2007.
- CHULZE, S. N.; RAMIREZ, M. L.; TORRES, A.; LESLIE, J. F. Genetic variation in *Fusarium* section Liseola from no-till maize in Argentina. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5312–5315, 2000.
- COSTA, S. S.; MATOS, K. S.; TESSMANN, D. J.; SEIXAS, C. D.; PFENNING, L. H. *Fusarium paranaense* sp. nov., a member of the *Fusarium solani* species complex causes root rot on soybean in Brazil. **Fungal Biology**, v. 120, n. 1, p. 51–60, 2015.
- CROFT, B.; MAGAREY, R.; WHITTLE, P. Disease Management. In: HOGARTH, D. M.; ALLSOPP, P. G.(Eds). **Manual Of Cane Growing**. Brisbane, p. 263-289, 2000.

DIVAKARA, S. T.; SANTOSH, P.; AIYAZ, M.; VENKATA RAMANA, M.; HARIPRASAD, P.; NAYAKA, S. C.; NIRANJANA, S. R. Molecular identification and characterization of *Fusarium* spp. associated with sorghum seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 6, p. 1132-1139, 2013.

ELLIS, R.; JAMES, G.; MERRY, B.; WEEKES, D.; YATES, B.; DIGGES, P.; FORBER, G.; TODD, M.; BERDING, N.; COX, M.; HOGARTH, M.; BAILEY, R.; LESLIE, G.; IRVINE, J. **Sugarcane**. 2. ed. p. 216. 2004.

FAO. **FAOSTAT**, 2014a. Disponível em:
<<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

FAO. **FAOSTAT**, 2014b. Disponível em:
<<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

GOMES, A. A. M. **Frequência de hermafroditas e distribuição de tipos de acasalamento em populações de *Fusarium verticillioides* associadas ao milho em diferentes zonas climáticas do Brasil**. 2013. 45 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013.

GOSWAMI, D.; HANDIQUE, P. J.; DEKA, S. Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium sacchari*-the causal organism of pokkah boeng disease of sugarcane. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 548-557, 2014.

GOVENDER, P.; MCFARLANE, S. A.; RUTHERFORD, R. S. *Fusarium* species causing pokkah boeng and their effect on *Eldana saccharina* walker (Lepidoptera: Pyralidae). **Proceedings of the Annual Congress - South African Sugar Technologists' Association**.v. 83, p. 267-270, 2010.

HERRON, D. A.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. D.; RODAS, C. A.; MARINCOWITZ, S.; STEENKAMP, E. T. Novel taxa in the *Fusarium fujikuroi* species complex from Pinus spp. **Studies in Mycology**, v. 80, p. 131-150, 2015.

IBGE. **Indicadores IBGE Estatística da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro v.29 n.2 p.1-74 set., 2016. Disponível em:
<ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_201609.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2016.

KRISTENSEN, R.; TORP, M.; KOSIAK, B.; HOLST-JENSEN, A. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. **Mycological Research**, v. 109, n. 02, p. 173-186, 2005.

KRONSTAD, J. W.; STABEN, C. Mating type in filamentous fungi. **Annual Review of Genetics**, v. 31, n. 1, p. 245-276, 1997.

KVAS, M.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J.; STEENKAMP, E. T. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. **Fungal Diversity**, v. 34, p. 1-21, 2009.

LAURENCE, M. H.; SUMMERELL, B. A.; BURGESS, L. W.; LIEW, E. C. Y. *Fusarium burgessii* sp. nov. representing a novel lineage in the genus *Fusarium*. **Fungal Diversity**, v. 49, n. 1, p. 101-112, 2011.

- LAURENCE, M. H.; WALSH, J. L.; SHUTTLEWORTH, L. A.; ROBINSON, D. M.; JOHANSEN, R. M.; PETROVIC, T.; LIEW, E. C. Y. Six novel species of *Fusarium* from natural ecosystems in Australia. **Fungal Diversity**, v. 77, n. 1, p. 349-366, 2015.
- LEE, H. K.; TEWARI, J. P.; TURKINGTON, T. K. A PCR-based assay to detect *Rhynchosporium secalis* in barley seed. **Plant Disease**, v. 85, n. 2, p. 220-225, 2001.
- LEE, S. B.; TAYLOR, J. W. Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 636-653, 1992.
- LESLIE, J. F.; KLEIN, K. K. Female fertility and mating type effects on effective population size and evolution in filamentous fungi. **Genetics**, v. 144, n. 2, p. 557–567, 1996.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. 1. ed. Iowa-USA: Blackwell Pub, p. 388, 2006.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S.; DOE, F. J. Description of *Gibberella sacchari* and neotypification of its anamorph *Fusarium sacchari*. **Mycologia**, v. 97, n. 3, p. 718–724, 2005.
- LIMA, C. S.; PFENNING, L. H.; COSTA, S. S.; ABREU, L. M.; LESLIE, J. F. *Fusarium tupiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. **Mycologia**, v. 104, n. 6, p. 12-052, 2012.
- LIN, Z.; XU, S.; QUE, Y.; WANG, J.; COMSTOCK, J. C.; WEI, J.; MCCORD, PER H.; CHEN, B.; CHEN, R.; ZHANG, M. Species-specific detection and identification of *Fusarium* species complex, the causal agent of sugarcane pokkah boeng in China. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1-13, 2014.
- LLANOS, A.; FRANÇOIS, J. M.; PARROU, J-L. Tracking the best reference genes for RT-qPCR data normalization in filamentous fungi. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1, 2015.
- LYRENE, P. M.; DEAN, J. L.; JAMES, N. I. Inheritance of resistance to pokkah boeng in sugarcane crosses. **Phytopathology**, v. 67, n. 4, p. 689-692, 1977.
- MANSUETUS, A. S. B.; ODVODY, G. N.; FREDERIKSEN, R. A.; LESLIE, J. F. Biological species in the *Gibberella fujikuroi* species complex (*Fusarium* section *Liseola*) recovered from sorghum in Tanzania. **Mycological Research**, v. 101, n. 7, p. 815–820, 1997.
- MARQUES, D.; VILLARI, A. C.; LERAYER. Guia da cana-de-açúcar: avanço científico beneficia o país. **Conselho de Informação sobre Biotecnologia**, p. 20, 2009.
- MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 66, n. 7, p. 1793–1793, 2002.
- MELO, M. P. **Espécies biológicas e filogenéticas do *Fusarium fujikuroi* species complex**. 2014. 132f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2014.

NI, MIN; FERETZAKI, M.; SUN, S.; WANG, X.; HEITMAN, J. Sex in Fungi. **Annual Review of Genetics**, v. 45, p. 405–430, 2012.

NIRENBERG, H. I.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, v. 90, n. 3, p. 434–458, 1998.

NOGUEIRA, L. A. H.; SEABRA, J. E. A.; BEST, G.; LEAL, M. R. L. V.; POPPE, M. K. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. **BNDES, Rio de Janeiro**, v. 316, 2008.

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

PETROVIC, T.; BURGESS, L. W.; COWIE, I.; WARREN, R. A.; HARVEY, P. R. Diversity and fertility of *Fusarium sacchari* from wild rice (*Oryza australiensis*) in Northern Australia, and pathogenicity tests with wild rice, rice, sorghum and maize. **European Journal of Plant Pathology**, v. 136, n. 4, p. 773–788, 2013.

RAID, R. N.; ROTT, P. Sugarcane Pokkah Boeng Disease. **Agronomy Department, University of Florida, Gainesville**, p. 1–2, 2006.

REBOUÇAS, E. D. L.; COSTA, J. J. D. N.; PASSOS, M. J.; PASSOS, J. R. D. S.; HURK, R. V. D.; SILVA, J. R. V. Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 1, p. 143-154, 2013.

REYNOSO, M. M.; TORRES, A. M.; CHULZE, S. N. Biological species in the *Gibberella fujikuroi* species complex isolated from maize kernels in Argentina. **Plant Pathology Journal**, v. 5, n. 3, p. 350-355, 2006.

ROCHA, F. R.; PAPINI-TERZI, F. S.; NISHIYAMA, M. Y.; VÊNCIO, R. Z.; VICENTINI, R.; DUARTE, R. D.; ROSA JR, V. E. D.; VINAGRE, F.; BARSALOBRES, C.; MEDEIROS, A. H.; RODRIGUES, F. A.; ULIAN, E. C.; ZINGARETTI, S. M.; GALBIATTI, J. A.; ALMEIDA, R. S.; FIGUEIRA, A. V. O.; HEMERLY, A. S.; SILVA-FILHO, M. C.; MENOSSI, M.; SOUZA, G. M. A. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC Genomics**, v. 8, n. 1, p. 1-22, 2007.

SCAUFLAIRE, J.; GOURGUE, M.; MUNAUT, F. *Fusarium temperatum* sp. nov. from maize, an emergent species closely related to *Fusarium subglutinans*. **Mycologia**, v. 103, n. 3, p. 586–97, 2011.

SILVA, C. N. DA; ANGELOTTI, J.; NEVES, D. L. DAS; TESSMANN, D. J. Identificação e Prevalência de Espécies de *Fusarium* Associadas a Grãos de Milho no Estado do Paraná. ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR, 8, 2013, Maringá. **Anais...** Maringá: UNICESUMAR, 2013, p. 1-4.

SILVEIRA, L. C. I. D.; BARBOSA, M. H. P.; KIST, V.; DAROS, E.; PETERNELLI, L. A.; SOUZA, V. F. M. D.; RIBEIRO, S. N. R.; VILARINHO, F. M. Sugarcane: cultivar RB937570. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 160-163, 2012.

- SITI NORDAHLIAWATE, M. S.; NUR AIN IZZATI, M. Z.; AZMI, A. R.; SALLEH, B. Distribution, morphological characterization and pathogenicity of *Fusarium sacchari* associated with pokkah boeng disease of sugarcane in Peninsular Malaysia. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 31, n. 2, p. 279–286, 2008.
- SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant Disease**, v. 87, n. 2, p. 117-128, 2003.
- TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum* spp.) In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, v.2, p.207-225,1997.
- TURGEON, B. G. Application of mating type gene technology to problems in fungal biology. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, n. 77, p. 115–137, 1998.
- URDANETA, J.; BORGES, J. A. Comportamiento de Cinco Patologías Fúngicas en 14 Cultivares de Caña de Azúcar (*Saccharum* Spp.). **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 25, n. 3, p. 455-469, 2008.
- VAN HOVE, F.; 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**, v. 103, n. 3, p. 570–585, 2011.
- VETTORE, A. L.; DA SILVA, F. R.; KEMPER, E. L.; SOUZA, G. M.; DA SILVA, A. M.; FERRO, M. I. T.; NOBREGA, M. P. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Research**, v. 13, n. 12, p. 2725–2735, 2003.
- WANG, J. H.; FENG, Z. H.; HAN, Z.; SONG, S. Q.; LIN, S. H.; WU, A. B. First report of pepper fruit rot caused by *Fusarium concentricum* in China. **Plant Disease**, v. 97, n. 12, p. 1657-1657, 2013.
- WANG, J.; WANG, X.; ZHOU, Y.; DU, L.; WANG, Q. Fumonisin detection and analysis of potential fumonisin-producing *Fusarium* spp. in asparagus (*Asparagus officinalis* L.) in Zhejiang Province of China. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 5, p. 836-842, 2010.
- YAMANE, T. Sugarcane. **Encyclopedia Britannica**. 22 Abr, 2016. Disponível em: <<http://academic.eb?britannica.ez17.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/111047>>. Acesso em: 07 out. 2016.
- ZELLER, K. A.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S.; LESLIE, J. F. *Gibberella konza* (*Fusarium konzum*) sp. nov. from prairie grasses, a new species in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, v. 95, n. 5, p. 943–954, 2003.
- ZHANG, J. B.; WANG, J. H.; GONG, A. D.; CHEN, F. F.; SONG, B.; LI, X.; LI, H. P.; PENG, C. H.; LIAO, Y. C. Natural occurrence of fusarium head blight, mycotoxins and mycotoxin-producing isolates of *Fusarium* in commercial fields of wheat in Hubei. **Plant Pathology**, v. 62, n. 1, p. 92-102, 2013.

3. COMPATIBILIDADE SEXUAL DE POPULAÇÕES DE *Fusarium sacchari* EM CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO

A cana-de-açúcar exerce função de destaque para a economia do Brasil, sendo este o maior produtor mundial. Entre os diversos motivos que restringem à produção de cana-de-açúcar estão a ocorrência de doenças. A podridão do topo é uma enfermidade que foi encontrada em vários países onde a cana-de-açúcar é cultivada. Algumas espécies de *Fusarium* já foram relatadas, no entanto, *F. sacchari* é a espécie que prevalece causando deformação no topo da planta infectada. Espécies biológicas de *Fusarium* podem ser identificadas através do cruzamento com isolados testadores, além disso, essa técnica possibilita realizar estudos de biologia de população. Desta forma, os objetivos deste estudo foram confirmar, através da técnica de compatibilidade sexual, se o agente associado a podridão do topo em cana-de-açúcar no Brasil é *Fusarium sacchari*, bem como conferir a relação de *Mating type* e o tamanho efetivo da população dessa espécie no Brasil. Setenta e nove isolados de *Fusarium* spp. foram obtidos, dos quais 68 exibiram microconídios em falsas cabeças e polifiálides. Destes 68 isolados, cinco apresentaram comportamento homotáticos e 63 heterotáticos, sendo estes identificados pela técnica de compatibilidade sexual e marcadores morfológicos como *F. sacchari*, confirmando esta espécie como principal patógeno associado à podridão do topo em cana-de-açúcar no Brasil. Os isolados heterotáticos exibiram uma proporção de 29 *MAT-1* e 34 *MAT-2*, além disso, 41 apresentaram comportamento hermafrodita, enquanto 22 foram fêmeas estéreis. O tamanho efetivo da população foi de $N_{e(mt)} = 99\%$ e $N_{e(f)} = 95\%$ da população total. Portanto, pode-se inferir que a população de *F. sacchari* está realizando reprodução sexuada em campo no Brasil.

Palavras-chave: Espécies biológicas, podridão do topo, Pokkah boeng

SEXUAL COMPATIBILITY OF *Fusarium sacchari* POPULATIONS IN SUGARCANE

ABSTRACT

Sugarcane plays a prominent role in Brazil's economy, being the largest producer in the world. Among the various reasons that restrict the production of sugarcane are the occurrence of diseases. Top rot is a disease that has been found in almost every country where sugarcane is grown. Some species of *Fusarium* have already been reported, however, *F. sacchari* is the one that prevails causing deformation at the top of the infected plant. Biological species of *Fusarium* can be identified by crossing with tester strains, in addition, this technique makes possible to carry out studies of population biology. Thus, the objectives of this study were to confirm, through the technique of sexual compatibility, if the agent associated with top rot in sugarcane in Brazil is *Fusarium sacchari*, as well as to check the *Mating type* relation and the effective size of the population of this species in Brazil. Seventy-nine isolates of *Fusarium* spp. were obtained, of which 68 exhibited microconidia in false heads and polyphalid. Of these 68 isolates, five presented behavior homothallic and 63 heterothallic, being these identified by the technique of sexual compatibility and morphological markers as *F. sacchari*, confirming this species as main pathogen associated to the top rot in sugarcane in Brazil. The heterotalic isolates exhibited a ratio of 29 MAT-1 and 34 MAT-2, in addition, 41 presented hermaphrodite behavior, while 22 were sterile females. The effective population size was $N_{e(mt)} = 99\%$ and $N_{e(f)} = 95\%$ of the total population. Therefore, it can be inferred that the *F. sacchari* population is performing sexual reproduction in the field in Brazil.

Keywords: Biological species, Pokkah boeng, top rot

3.1 INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar possui sua origem no continente asiático, portanto, é típica de climas tropicais e subtropicais, dessa forma, encontrou na América um ambiente favorável para sua expansão (SILVA; SILVA, 2012). Atualmente, exerce uma função de destaque para a economia do Brasil, sendo este o maior produtor mundial (DA SILVA et al., 2012). No entanto, existem diversos motivos que restringem a produção de cana-de-açúcar, como a ocorrência e severidade de doenças que levam à perda de produtividade (SANTOS, 2009).

A podridão do topo (Pokkah boeng) é uma doença que já foi encontrada em quase todos os países onde a cana-de-açúcar é cultivada como Malásia (SITI NORDAHLIAWATE et al., 2008), Índia (GOSWAMI et al., 2014) e China (LIN et al., 2014). Algumas espécies de *Fusarium* já foram relatadas causando podridão do topo em cana-de-açúcar, no entanto, *Fusarium sacchari* prevalece provocando deformação no topo da planta infectada (GOSWAMI et al., 2014; LESLIE et al., 2005; NIRENBERG; O'DONNELL, 1998; SITI NORDAHLIAWATE et al., 2008).

No Brasil, essa doença é normalmente encontrada em cana-de-açúcar, mas não existem estimativas de perdas. A literatura relata *Fusarium moniliforme* e *Fusarium subglutinans* como os agentes causais da podridão do topo no país (TOKESHI, 1997). Entretanto, por meio do sequenciamento de genes “housekeeping”, análise filogenética e técnica de compatibilidade sexual, essas espécies se desmembraram em várias espécies filogenéticas e biológicas (LESLIE; SUMMERELL, 2006; O'DONNELL et al., 1998).

A fertilidade sexual de fungos é de grande importância no momento em que os conceitos de espécies biológicas estão sendo utilizados. Essas espécies biológicas podem ser identificadas através de cruzamentos com isolados testadores. Este é um método considerado fácil, simples e extremamente relevante para contornar os limites da identificação morfológica quando espécies são muito semelhantes, como é o caso de algumas espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* (FFSC) (LESLIE, 1995).

Várias espécies do FFSC, o qual inclui *F. sacchari*, foram identificadas e descritas como novas espécies utilizando-se a técnica de compatibilidade sexual: *Fusarium tupiense*, *Fusarium musae* e *Fusarium temperatum* (LESLIE;

SUMMERELL, 2006; LIMA et al., 2012; SCAUFLAIRE et al., 2011; VAN HOVE et al., 2011). Além disso, essa técnica possibilita determinar o tipo de acasalamento, calcular o tamanho efetivo da população e inferir se existem barreiras reprodutivas entre diferentes populações (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Desta forma os objetivos deste estudo foram confirmar, através da técnica de compatibilidade sexual, se o agente associado à podridão do topo em cana-de-açúcar no Brasil é *Fusarium sacchari*, bem como conferir a relação de *Mating type* e o tamanho efetivo da população desta espécie no Brasil.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Coleta, isolamento e preservação

Amostras de plantas de cana-de-açúcar com sintomas de podridão do topo foram coletadas nas principais regiões produtoras dos estados de Alagoas, Maranhão, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco e Piauí (Figura 3.1). Folhas e colmos com sintomas foram lavados com detergente neutro em água corrente e secados a temperatura ambiente. Com auxílio de um estilete foram obtidos pequenos fragmentos colonizados; posteriormente estes segmentos foram desinfestados com etanol 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2% por 3 minutos, enxaguados duas vezes em água destilada e esterilizada (ADE) e secados em papel filtro esterilizado. Em seguida os fragmentos foram plaqueados em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e mantidos em estufa incubadora a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 h, durante quatro dias.

Para todos os isolados foi realizado cultivo monospórico e estes foram preservados em microtubos, e armazenados no laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da Universidade Federal do Piauí – UFPI.

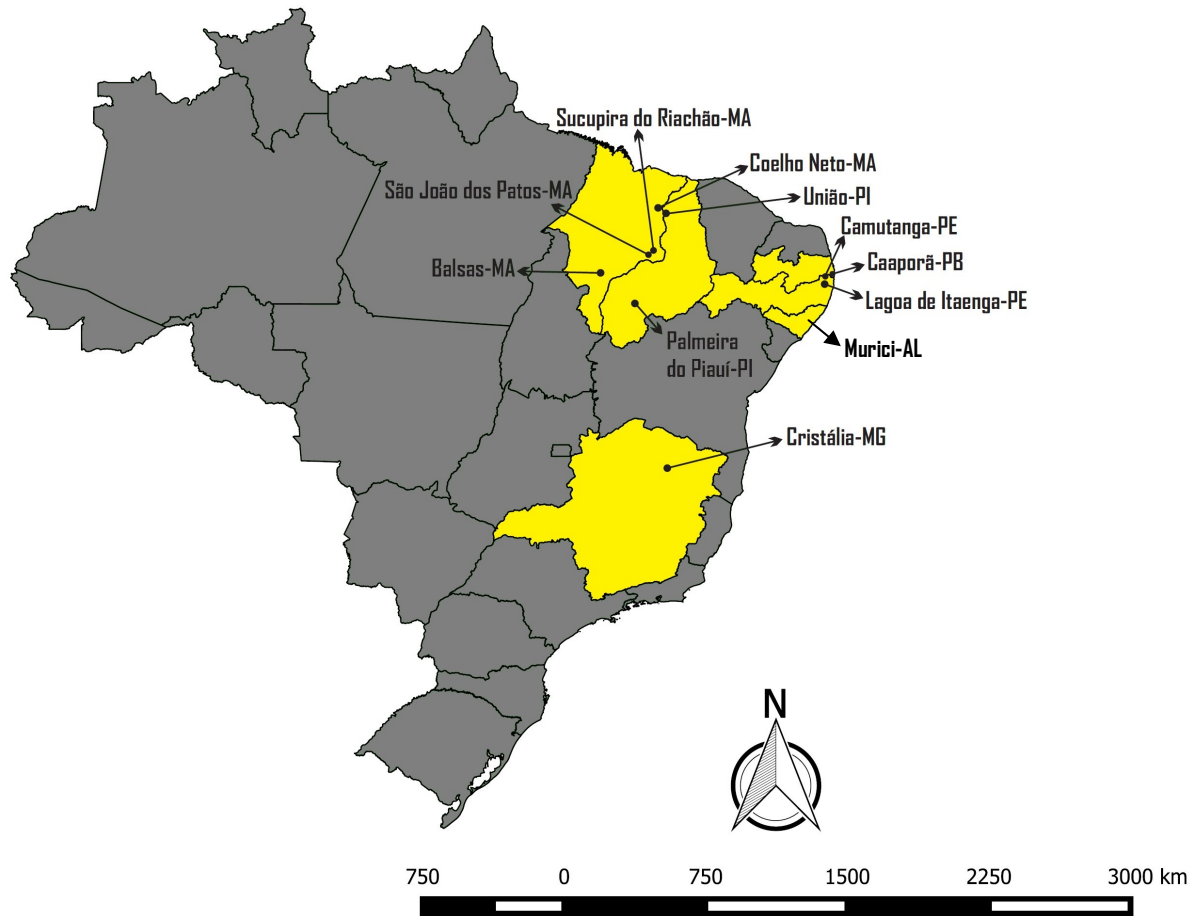


Figura 3.1 - Localização geográfica dos estados e municípios, onde amostras de cana-de-açúcar foram coletadas.

3.2.2 Caracterização morfológica

Todos os isolados obtidos foram transferidos para os meios BDA e Spezieller Nährstoffarmer agar (SNA), com fragmentos secos e esterilizados de folhas de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.), afim de identificá-los. As culturas foram incubadas a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 h, por 10 a 14 dias. A caracterização morfológica foi realizada de acordo com Summerell et al. (2003), com posterior montagem de lâminas para observação das estruturas fúngicas ao microscópio óptico.

3.2.3 Teste de homotalismo

Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo cenoura-ágar (CA), e incubados a 25 ± 2 °C no escuro por sete dias. Após o período de incubação, foram transferidos 2 mL de ADE para a superfície da colônia e

distribuídos utilizando alça de Drigalski, de modo a umedecer completamente o micélio. As culturas foram incubadas a 25 ± 2 °C, e fotoperíodo de 12 h (adaptado de LESLIE; SUMMERELL, 2006). Os testes foram repetidos para a confirmação dos resultados.

3.2.4 Indução da fase sexuada

Para avaliar a taxa de fertilidade, isolados testadores de *F. sacchari* pertencentes a tipos opostos de acasalamento foram cruzados com os 79 isolados coletados nos estados de Alagoas, Maranhão, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco e Piauí (Tabela 3.1).

Os cruzamentos foram realizados de acordo com Leslie; Summerell (2006). A princípio, os isolados utilizados como parental masculino (coletados no campo) foram cultivados em tubo de ensaio contendo BDA. A incubação foi realizada a 25 ± 2 °C sob 12 h de luz fluorescente combinada com 12 h de escuro por 7 dias. Os isolados utilizados como parental feminino (testadores) foram cultivados em placas de Petri (60 x 15 mm) contendo meio CA a 25 ± 2 °C no escuro pelo mesmo período. Após 7 dias, uma suspensão de esporos do parental masculino foi obtida pela adição de 2 mL de ADE. Em seguida, essa suspensão foi adicionada à superfície da colônia do parental feminino. Com uma alça de Drigalski, a suspensão foi distribuída uniformemente para umedecer o micélio. As placas foram incubadas a 25 ± 2 °C sob 12 h de luz fluorescente combinada com 12 h de escuro por 30 dias. Posteriormente, o papel dos parentais foram invertidos em cruzamentos recíprocos.

3.2.5 Cálculo do tamanho efetivo da população

As equações utilizadas para calcular o tamanho efetivo da população (N_e) foram propostas por Leslie; Klein (1996), com base na proporção do tipo de acasalamento dentro da população [$N_{e(mt)}$], e na frequência relativa de isolados fêmea estéril e hermafrodita [$N_{e(f)}$].

O [$N_{e(mt)}$] foi determinado pela equação $N_{e(mt)} = (4 N_{mat1} \times N_{mat2}) / (N_{mat1} + N_{mat2})$, onde N_{mat-1} é referente ao número de isolados com idiomorfo *MAT-1* e N_{mat-2} ao número de isolados que possuem o outro idiomorfo *MAT-2*. Essa equação foi primeiramente proposta por Wright (1931) para diplóides com dois sexos distintos,

sendo usada para diminuir o tamanho da população em fungos ascomicetos, se ambos os tipos de acasalamento não forem igualmente frequentes.

E o $[N_{e(f)}]$ foi calculado pela equação $N_{e(f)} = (4N^2N_h)/(N+N_h)^2$, onde N é o número total de isolados e N_h o número de hermafroditas. Esta equação tem por base que, em populações no campo, muitos isolados são férteis como macho, mas não como fêmeas, devido a mutações e seleção contra hermafroditismo durante a propagação vegetativa. Em populações em que a reprodução sexual é importante, isolados fêmeas estéreis que se comportam apenas como machos são rapidamente perdidos por causa de sua desvantagem seletiva em relação aos hermafroditas que podem contribuir tanto com gametas masculinos como com gametas femininos para a próxima geração. Se a população se reproduz assexuadamente por grande parte do seu ciclo de vida, é provável haver a predominância de isolados com características de fêmea estéril. Quando uma população se reproduz sexuadamente, a relativa escassez de isolados com características de fêmea limita o tamanho efetivo da população (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Isolados obtidos

Foram obtidos 79 isolados de *Fusarium* spp., oriundos de *Saccharum* spp. com sintomas de podridão do topo. Além destes, foram incluídos no estudo dois isolados de *F. sacchari*, CML 768 e CML 769 (isolados testadores, material de referência), cedidos pela Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil (Tabela 3.1).

Dos 79 isolados obtidos, 68 apresentaram microconídios em falsas cabeças e polifiálides. Enquanto que 11 isolados exibiram a presença de microconídios em cadeias e além da produção de clamidósporos e pseudoclamidósporos. Como diversas espécies de *Fusarium* apresentam as mesmas características, não foi possível a identificação dos mesmos com base apenas em marcadores morfológicos.

3.3.2 Teste de homotalismo

Dos 68 isolados com microconídios em falsas cabeças e polifiálides, 63 apresentaram comportamento heterotático e cinco apresentaram-se homotáticos (Tabela 3.1). A formação de peritécios ocorreu duas semanas após a indução da autofecundação, havendo exsudação de ascósporos de coloração alaranjada da terceira até a quarta semana de cultivo. Os isolados homotáticos apresentaram características morfológicas típicas de *F. sacchari*.

A reprodução sexual no gênero *Fusarium* pode ser homotática ou heterotática. As espécies do FFSC são prevalentemente heterotáticas, porém há relatos de homotalismo para *F. sacchari* (LESLIE; SUMMERELL, 2006). O homotalismo também foi observado em *Fusarium solani*, agente causal da podridão da raiz do maracujazeiro na Austrália (PEGG et al., 2002).

A vantagem do homotalismo é que não há necessidade do cruzamento para a obtenção de descendência homozigótica para determinada característica, o que colaborou para conhecer o desenvolvimento sexual de *Fusarium graminearum*, uma espécie predominantemente homotática, desta forma, pode formar corpos de frutificação sem um parceiro sexual (CAVINDER et al., 2012).

Tabela 3.1 - Isolados de *Fusarium* provenientes de espécies de cana-de-açúcar utilizados neste estudo e indicativos de *Mating type*, fêmea estéril, hermafrodita e homotalismo. Teresina, PI, 2017.

Código	Espécie	Origem	Ano de Isol.	Mat	Fêmea estéril	Hermafrodita	Homotalico
CML 768	<i>F. sacchari</i>	USA	1988	2			
CML 769	<i>F. sacchari</i>	USA	1988	1			
MP 407	<i>F. sacchari</i>	Cristália, MG	2014	2	x		
MP 410	<i>F. sacchari</i>	Cristália, MG	2014	1	x		
MPM 01	<i>F. sacchari</i>	União, PI	2014	1		x	
MPM 04	<i>F. sacchari</i>	União, PI	2014	2		x	
MPM 05	<i>F. sacchari</i>	União, PI	2014	1		x	
MPM 07	<i>F. sacchari</i>	União, PI	2014	1	x		
MPM 21	<i>F. sacchari</i>	União, PI	2015	2		x	
MPM 44	<i>F. sacchari</i>	União, PI	2015	1	x		
MPM 46	<i>F. sacchari</i>	União, PI	2015	1		x	
MPM 47	<i>F. sacchari</i>	União, PI	2015	2		x	
MPM 49	<i>F. sacchari</i>	União, PI	2015	1		x	
MPM 50	<i>F. sacchari</i>	União, PI	2015	2	x		
MPM 51	<i>F. sacchari</i>	União, PI	2015	2		x	
MPM 55	<i>F. sacchari</i>	Caaporã, PB	2015	1		x	
MPM 75	<i>F. sacchari</i>	Coelho Neto, MA	2015	2		x	
MPM 76	<i>F. sacchari</i>	Coelho Neto, MA	2015	1		x	
MPM 77	<i>F. sacchari</i>	Coelho Neto, MA	2015	2		x	
MPM 78	<i>F. sacchari</i>	Coelho Neto, MA	2015	2		x	
MPM 79	<i>F. sacchari</i>	Coelho Neto, MA	2015	1		x	
MPM 80	<i>F. sacchari</i>	Coelho Neto, MA	2015	2		x	
MPM 81	<i>F. sacchari</i>	Coelho Neto, MA	2015	2		x	
MPM 82	<i>F. sacchari</i>	Coelho Neto, MA	2015	1		x	
MPM 83	<i>F. sacchari</i>	Coelho Neto, MA	2015	1		x	
MPM 85	<i>F. sacchari</i>	Coelho Neto, MA	2015	2		x	
MPM 88	<i>F. sacchari</i>	Coelho Neto, MA	2015				x

“Continua”

“Continuação”

Código	Espécie	Origem	Ano de Isol.	Mat	Fêmea estéril	Hermafrodita	Homotático
MPM 104	<i>F. sacchari</i>	Palmeiras do Piauí, PI	2015				x
MPM 166	<i>Fusarium</i> sp.	Lagoa de Itaenga, PE	2016				
MPM 167	<i>Fusarium</i> sp.	Lagoa de Itaenga, PE	2016				
MPM 168	<i>Fusarium</i> sp.	Lagoa de Itaenga, PE	2016				
MPM 170	<i>F. sacchari</i>	Lagoa de Itaenga, PE	2016	2		x	
MPM 172	<i>Fusarium</i> sp.	Lagoa de Itaenga, PE	2016				
MR 02	<i>F. sacchari</i>	São João dos Patos, MA	2016	1	x		
MR 03	<i>F. sacchari</i>	São João dos Patos, MA	2016	1		x	
MR 04	<i>F. sacchari</i>	São João dos Patos, MA	2016	2		x	
MR 05	<i>F. sacchari</i>	São João dos Patos, MA	2016	1	x		
MR 07	<i>F. sacchari</i>	São João dos Patos, MA	2016	2		x	
MR 08	<i>F. sacchari</i>	São João dos Patos, MA	2016	1		x	
MR 14	<i>F. sacchari</i>	Sucupira do Riachão, MA	2016	2		x	
MR 17	<i>F. sacchari</i>	Sucupira do Riachão, MA	2016	2		x	
MR 19	<i>F. sacchari</i>	Sucupira do Riachão, MA	2016				x
MR 21	<i>F. sacchari</i>	Sucupira do Riachão, MA	2016	1		x	
MR 22	<i>Fusarium</i> sp.	Sucupira do Riachão, MA	2016				
MR 24	<i>F. sacchari</i>	Sucupira do Riachão, MA	2016	1	x		
MR 25	<i>F. sacchari</i>	Sucupira do Riachão, MA	2016	2		x	
MR 26	<i>F. sacchari</i>	Sucupira do Riachão, MA	2016	1		x	
MR 27	<i>F. sacchari</i>	Sucupira do Riachão, MA	2016	1		x	
MR 30	<i>F. sacchari</i>	Sucupira do Riachão, MA	2016	1		x	
MR 33	<i>F. sacchari</i>	Balsas, MA	2016	2		x	
MR 39	<i>F. sacchari</i>	Balsas, MA	2016	2	x		
MR 41	<i>F. sacchari</i>	Balsas, MA	2016	2	x		
MR 42	<i>F. sacchari</i>	Balsas, MA	2016	1		x	
MR 44	<i>F. sacchari</i>	Balsas, MA	2016	2	x		

“Continua”

"Conclusão"

Código	Espécie	Origem	Ano de Isol.	Mat	Fêmea estéril	Hermafrodita	Homotálico
MR 48	<i>F. sacchari</i>	Balsas, MA	2016	1		x	
MR 49	<i>F. sacchari</i>	Balsas, MA	2016				x
MR 54	<i>F. sacchari</i>	Camutanga, PE	2016	1		x	
MR 55	<i>F. sacchari</i>	Camutanga, PE	2016	2	x		
MR 57	<i>F. sacchari</i>	Camutanga, PE	2016	2	x		
MR 59	<i>F. sacchari</i>	Camutanga, PE	2016	1	x		
MR 61	<i>F. sacchari</i>	Camutanga, PE	2016	1	x		
MR 63	<i>F. sacchari</i>	Lagoa de Itaenga, PE	2016	2		x	
MR 64	<i>Fusarium</i> sp.	Lagoa de Itaenga, PE	2016				
MR 65	<i>F. sacchari</i>	Lagoa de Itaenga, PE	2016	2	x		
MR 69	<i>F. sacchari</i>	Lagoa de Itaenga, PE	2016	2		x	
MR 71	<i>F. sacchari</i>	Lagoa de Itaenga, PE	2016	1	x		
MR 75	<i>F. sacchari</i>	Lagoa de Itaenga, PE	2016	2	x		
MR 77	<i>F. sacchari</i>	União, PI	2016	2		x	
MR 78	<i>F. sacchari</i>	União, PI	2016	1	x		
MR 79	<i>F. sacchari</i>	União, PI	2016	2		x	
MR 80	<i>F. sacchari</i>	União, PI	2016				x
MR 82	<i>F. sacchari</i>	União, PI	2016	2		x	
MR 83	<i>F. sacchari</i>	União, PI	2016	2	x		
MR 84	<i>F. sacchari</i>	União, PI	2016	2	x		
MR 87	<i>F. sacchari</i>	União, PI	2016	1		x	
MR 88	<i>F. sacchari</i>	União, PI	2016	2	x		
MR 105	<i>Fusarium</i> sp.	Murici - AL	2016				
MR 106	<i>Fusarium</i> sp.	Murici - AL	2016				
MR 107	<i>Fusarium</i> sp.	Murici - AL	2016				
MR 108	<i>Fusarium</i> sp.	Murici - AL	2016				
MR 110	<i>Fusarium</i> sp.	Murici - AL	2016				

*Os isolados testadores de *Fusarium sacchari* (CML 768 e CLM 769) são provenientes de *Saccharum officinarum*, enquanto que os isolados coletados no Brasil foram obtidos de *Saccharum* spp.

1 3.3.3 Indução da fase sexuada

2 Todos os 79 isolados obtidos em campo, foram cruzados com os dois
3 isolados testadores padrão de *F. sacchari* CML768 (*MAT-2*) e CML769 (*MAT-1*),
4 onde, para 63 houve a formação de peritécios e exsudação de ascósporos com um
5 dos dois isolados testadores confirmando as suas identidades como isolados
6 heterotáticos de *F. sacchari* (LESLIE et al., 2005). Desta forma podemos afirmar que
7 o patógeno que predomina associado à podridão do topo no Brasil é *F. sacchari*.

8 A formação de protoperitécios foi observada a partir da primeira até a
9 segunda semana após o cruzamento, e a formação de peritécios ocorrendo a partir
10 da segunda semana, e a exsudação de cirros de ascósporos ocorrendo entre a
11 terceira e quarta semana após a realização dos cruzamentos (Figura 3.2 D e E).

12 Os peritécios produzidos em condições de laboratório foram superficiais,
13 agregados ou solitários, não apresentando base estromática, com formato obovoíde.
14 Os ascos possuem oito ascósporos, com 1-4 septos, com presença de constrição
15 nos septos (Figura 3.2 E e F). Ascósporos obtidos de cruzamentos germinaram em
16 SNA, produzindo culturas típicas de *F. sacchari*. Devido os isolados deste estudo
17 cruzarem com os isolados testadores, fica evidente que a população de *F. sacchari*
18 do Brasil não apresenta barreira reprodutiva com isolados originados dos Estados
19 Unidos (origem dos isolados testadores).

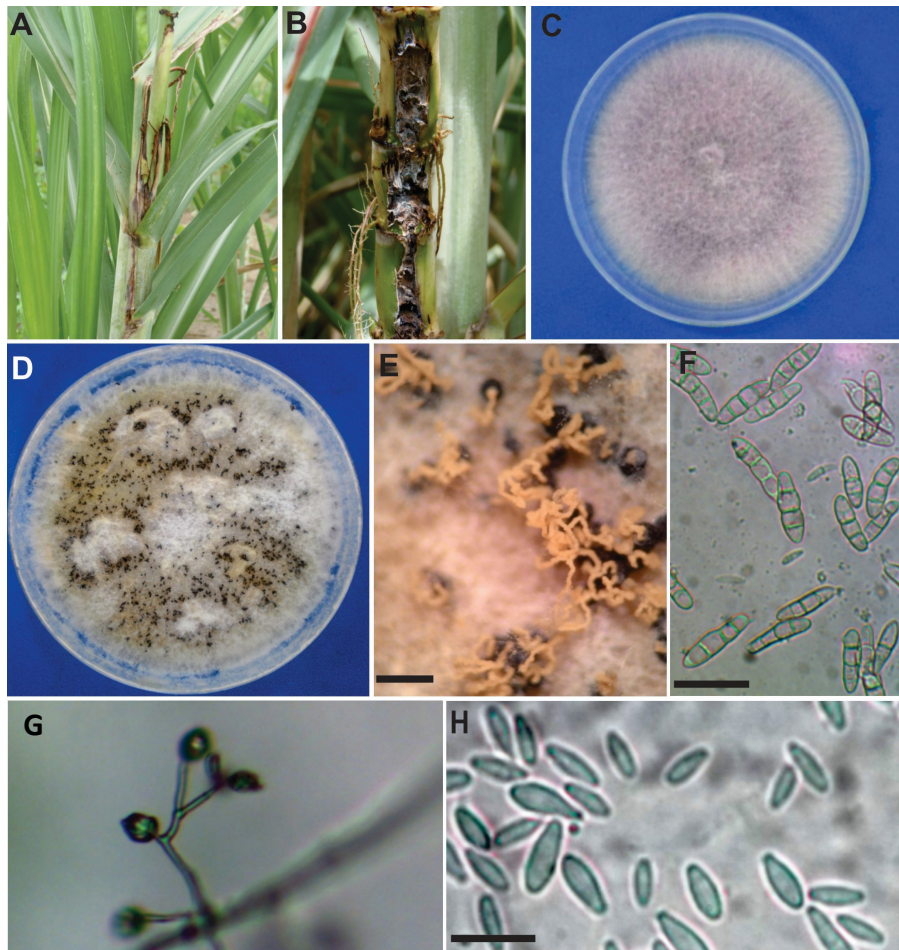
20 Dos 63 isolados heterotáticos, 29 apresentaram *MAT-1* e 34 apresentaram
21 *MAT-2* (Tabela 3.1). Os tipos de acasalamento são esperados numa proporção de
22 1:1 em ascomicetos heterotáticos uma vez que se sabe que o traço está sob o
23 controle de um locus mendeliano (LESLIE; KLEIN, 1996). Desta forma, neste estudo
24 a segregação não foi significativamente diferente do esperado de 1:1.

25 Em estudos realizados com *F. temperatum* isolado de milho nativo e
26 comercial colhido na Argentina, ambos os tipos de acasalamento foram encontrados
27 e a proporção *MAT-1* e *MAT-2*, foi de 20:18, estando, portanto, próxima de 1:1. No
28 entanto, neste mesmo trabalho, isolados de *F. subglutinans* apresentaram proporção
29 *MAT-1* e *MAT-2* de 9:3, ou seja, diferente do esperado (FUMERO et al., 2015).

30 A proporção de alelos do tipo de acasalamento próximo a 1:1 sugere possível
31 ocorrência de reprodução sexual em campo (PALACIOS et al., 2015). Enquanto que

1 quando os alelos não estão presentes em frequências iguais na população é
 2 provável que a reprodução assexuada esteja ocorrendo nos isolados de campo
 3 (VENTURINI et al., 2011). Assim, acredita-se que os isolados de *F. sacchari* deste
 4 estudo podem estar realizando reprodução sexuada em condição natural.

5 Em isolados de *F. sacchari* proveniente de arroz selvagem da Austrália, a
 6 relação de *MAT-1* e *MAT-2* foi de 15:9. A proporção de *Mating types* não foi
 7 significativamente diferente da esperada de 1:1 (PETROVIC et al., 2013). No entanto
 8 nesse trabalho foram avaliados apenas 24 isolados, enquanto que em estudos desta
 9 natureza recomenda-se utilizar maior número de amostras, como 80 (BRITZ et al.,
 10 1998), 181 (VENTURINI et al., 2011) e até mesmo 300 isolados (GOMES, 2013).



11

12

13 **Figura 3.2** - *Fusarium sacchari*: Sintomas de podridão do topo (A-B);

14 Cultura em BDA (C); Peritécios em CA (D); Peritécios exsudando

15 ascósporos (E); Ascósporos 1-4 septos (F); Microconídios em polifialides

16 (G); Microconídios (H). Barra: E-H = 40 µm

3.3.4 Cálculo do tamanho efetivo da população

O tamanho efetivo da população, com base no tipo de acasalamento, resultou em $N_{e(mt)}$ de 99% (contagem da população total). Desta forma, a frequência dos diferentes tipos de acasalamento não reduziu o tamanho efetivo da população. O mesmo ocorre para outras populações de *Fusarium*, como de *F. subglutinans* f. sp. *pini* isolados de *Pinus* spp. (BRITZ et al., 1998) e de *F. temperatum* do milho (FUMERO et al., 2015).

Entre os 63 isolados heterotáticos, 41 apresentaram comportamento hermafrodita e 22 fêmeas estéreis. Nesse caso, o tamanho efetivo da população em função da frequência de hermafroditas e fêmeas estéreis $N_{e(f)}$ foi de 95%. Os valores de $N_{e(f)}$ foram superiores aos de *F. sacchari* proveniente de arroz selvagem, com $N_{e(f)}$ de 15% (PETROVIC et al., 2013) e de *Fusarium verticillioides* associada ao milho com 55% (VENTURINI, et al., 2011) no entanto, foram semelhantes a *Fusarium circinatum* com frequência de $N_{e(f)}$ 92% (BRITZ et al., 2005).

A taxa de hermafroditismo deste trabalho foi considerada alta em relação às demais populações de *Fusarium* descritas na literatura científica. Em populações que se reproduzem predominantemente de forma sexuada, aqueles isolados fêmeas estéreis, que atuam apenas como macho, são mais facilmente perdidos em virtude de sua desvantagem seletiva em relação aos hermafroditas que atuam doando e recebendo esporos (BRITZ et al., 1998). Desta forma, devido à alta presença de hermafroditas, acredita-se que esta população de *F. sacchari* do Brasil esteja realizando reprodução sexuada em condições naturais.

Se a população se reproduz assexuadamente por grande parte do seu ciclo de vida, é provável haver a predominância de isolados com características de fêmea estéril. Quando uma população se reproduz sexuadamente, a relativa escassez de isolados com características de fêmea estéril limita o tamanho efetivo da população (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Todavia, essas características não foram observadas. Apesar da quantidade relativamente baixa de fêmeas estéreis isso não diminuiu de forma relevante o tamanho efetivo da população.

A presença de ambos os tipos de acasalamento na população, com frequências não significativamente diferentes daquelas esperadas em cruzamentos

1 sob controle de um locus mendeliano (1:1), juntamente com o tamanho efetivo da
2 população $N_{e(mt)}$ de 99% e $N_{e(f)}$ de 95%, indicam que a população está realizando
3 reprodução sexuada em campo (LESLIE; KLEIN, 1996).

4 Além disso, foi possível observar peritécios com cirros de ascósporos nos
5 colmos de cana-de-açúcar em condições naturais. Para as espécies do FFSC foi
6 constatada a presença da fase sexuada na natureza para *Fusarium xylarioides* e *F.*
7 *verticillioides* (SUMMERELL et al., 1998; LEPOINT et al., 2005). A reprodução
8 sexuada de *Fusarium in situ* é considerada rara devido a necessidade da ocorrência
9 de ambos os *Mating types* no mesmo local, além das condições de temperatura,
10 nutrição e luz favoráveis (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

11 A diversidade genética será maior em populações que se reproduzem de
12 forma sexuada, em relação às populações que se reproduzem de forma apenas
13 assexuada. Isso é importante para o controle de patógenos vegetais, uma vez que a
14 variabilidade poderia influenciar a resposta do fungo a novas práticas agrícolas, a
15 introdução de novas cultivares com diferentes níveis de resistência ou a aplicação
16 de fungicidas ou agentes de biocontrole (PALACIOS et al., 2015).

17

18 **3.4 CONCLUSÕES**

19 De acordo com o teste de compatibilidade sexual *F. sacchari* é o principal
20 patógeno associado à podridão do topo no Brasil.

21 A população de *F. sacchari* em cana-de-açúcar é predominantemente
22 heterotática e hermafrodita, havendo a presença de ambos os tipos de
23 acasalamento (*MAT-1* e *MAT-2*), em uma proporção de 29:34. Entretanto, existe a
24 presença de isolados homotáticos.

25 A frequência dos diferentes tipos de acasalamento e a baixa frequência de
26 fêmeas estéreis não reduziu de forma significativa o tamanho efetivo da população
27 que apresentaram $N_{e(mt)}$ de 99% e $N_{e(f)}$ de 95%.

28

29

1 **REFERÊNCIAS**

- 2 BRITZ, H.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; MARASAS, W. F. O.;
3 WINGFIELD, M. J. Diversity and differentiation in two populations of *Gibberella*
4 *circinata* in South Africa. **Plant Pathology**, v. 54, n. 1, p. 46-52, 2005.
- 5 BRITZ, H.; WINGFIELD, M. J.; COUTINHO, T. A.; MARASAS, W. F. O.; LESLIE, J.
6 F. Female fertility and *mating type* distribution in a south african population of
7 *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64,
8 n. 6, p. 2094–2095, 1998.
- 9 CAVINDER, B.; SIKHAKOLLI, U.; FELLOWS, K. M.; TRAIL, F. Sexual development
10 and ascospore discharge in *Fusarium graminearum*. **Journal of Visualized**
11 **Experiments**, v. e3895, n. 61, p. 1-5, 2012.
- 12 DA SILVA, T. G.; DE MOURA, M. S.; ZOLNIER, S.; SOARES, J. M.; VIEIRA, V. J. D.
13 S.; JÚNIOR, W. G. Requerimento hídrico e coeficiente de cultura da cana-de-açúcar
14 irrigada no semiárido brasileiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e**
15 **Ambiental**, v. 16, n. 1, p. 64-71, 2012.
- 16 FUMERO, M. V.; REYNOSO, M. M.; CHULZE, S. *Fusarium temperatum* and
17 *Fusarium subglutinans* isolated from maize in Argentina. **International Journal of**
18 **Food Microbiology**, v. 199, p. 86-92, 2015.
- 19 GOMES, A. A. M. **Frequência de hermafroditas e distribuição de tipos de**
20 **acasalamento em populações de *Fusarium verticillioides* associadas ao milho**
21 **em diferentes zonas climáticas do Brasil**. 2013. 45 f. Dissertação (Mestrado em
22 Fitopatologia) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013.
- 23 GOSWAMI, D.; HANDIQUE, P. J.; DEKA, S. Rhamnolipid biosurfactant against
24 *Fusarium sacchari* - the causal organism of pokkah boeng disease of sugarcane.
25 **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 548-557, 2014.
- 26 LEPOINT, P. C. E.; MUNAUT, F. T. J.; MARAITE, H. M. M. *Gibberella xylarioides*
27 sensu lato from Coffea canephora: a new mating population in the *Gibberella fujikuroi*
28 species complex. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8466-
29 8471, 2005.
- 30 LESLIE, J. F. *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. **Canadian**
31 **Journal of Botany**, v. 73, n. S1, p. 282-291, 1995.
- 32 LESLIE, J. F.; KLEIN, K. K. Female fertility and mating type effects on effective
33 population size and evolution in filamentous fungi. **Genetics**, v. 144, n. 2, p. 557–
34 567, 1996.
- 35 LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. 1. ed. Iowa-
36 USA: Blackwell Pub., p. 388, 2006.
- 37 LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S.; DOE, F. J. Description of
38 *Gibberella sacchari* and neotypification of its anamorph *Fusarium sacchari*.
39 **Mycologia**, v. 97, n. 3, p. 718–724, 2005.
- 40 LIMA, C. S.; PFENNING, L. H.; COSTA, S. S.; ABREU, L. M.; LESLIE, J. F.
41 *Fusarium tupiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that

- 1 causes mango malformation in Brazil. **Mycologia**, v. 104, n.6, p. 12-052, 2012.
- 2 LIN, Z.; XU, S.; QUE, Y.; WANG, J.; COMSTOCK, J. C.; WEI, J.; MCCORD, PER H.;
3 CHEN, B.; CHEN, R. Species-specific detection and identification of *Fusarium*
4 species complex, the causal agent of sugarcane pokkah boeng in China. **PLoS ONE**,
5 v. 9, n. 8, p. 1-13, 2014.
- 6 NIRENBERG, H. I.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* species and combinations within
7 the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, v. 90, n. 3, p. 434–458, 1998.
- 8 O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematics and
9 phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, p. 465-493,
10 1998.
- 11 PALACIOS, S. A.; SUSCA, A.; HAIDUKOWSKI, M.; STEA, G.; CENDOYA, E.;
12 RAMÍREZ, M. L.; TORRES, A. M. Genetic variability and fumonisin production by
13 *Fusarium proliferatum* isolated from durum wheat grains in Argentina. **International**
14 **Journal of Food Microbiology**, v. 201, p. 35-41, 2015.
- 15 PEGG, K. G.; WILLINGHAM, S. L.; O'BRIEN, R. G.; COOKE, A. W.; COATES, L. M.
16 Base rot of golden passionfruit caused by a homothallic strain of *Fusarium solani*.
17 **Australasian Plant Pathology**, v. 31, n. 3, p. 305-306, 2002.
- 18 PETROVIC, T.; BURGESS, L. W.; COWIE, I.; WARREN, R. A.; HARVEY, P. R.
19 Diversity and fertility of *Fusarium sacchari* from wild rice (*Oryza australiensis*) in
20 Northern Australia, and pathogenicity tests with wild rice, rice, sorghum and maize.
21 **European Journal of Plant Pathology**, v. 136, n. 4, p. 773–788, 2013.
- 22 SANTOS, A. S. dos. Doenças causadas por fungos e bactérias em cana-de-
23 açúcar. **Instituto Biológico: Campinas**, p. 11-17, 2009.
- 24 SCAUFLAIRE, J.; GOURGUE, M.; MUNAUT, F. *Fusarium temperatum* sp. nov. from
25 maize, an emergent species closely related to *Fusarium subglutinans*. **Mycologia**, v.
26 103, n. 3, p. 586–97, 2011.
- 27 SILVA, J. P. N. Da; SILVA, M. R. N. Da. **Noções da Cultura da Cana-de-Açúcar.**
28 **Inhumas**: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, p. 105, 2012.
- 29 SITI NORDAHLIAWATE, M. S.; NUR AIN IZZATI, M. Z.; AZMI, A. R.; SALLEH, B.
30 Distribution, morphological characterization and pathogenicity of *Fusarium sacchari*
31 associated with pokkah boeng disease of sugarcane in Peninsular Malaysia.
32 **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 31, n. 2, p. 279–286, 2008.
- 33 SUMMERELL, B. A.; BURGESS, L. W.; BULLOCK, S.; BACKHOUSE, D.; TRI, N.
34 D. Occurrence of perithecia of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium*
35 *moniliforme*) on maize stubble in northern Vietnam. **Mycologia**, p. 890-895, 1998.
- 36 SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. A utilitarian approach to *Fusarium*
37 identification. **Plant Disease**, v. 87, n. 2, p. 117, 2003.
- 38 TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum* spp.) In: KIMATI,
39 H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M.
40 (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 3. ed. São
41 Paulo: Editora Agronômica Ceres, v.2, p.207-225, 1997.

- 1 VAN HOVE, F.; WAALWIJK, C.; LOGRIECO, A.; MUNAUT, F.; MORETTI, A.
2 *Gibberella musae* (*Fusarium musae*) sp. nov., a recently discovered species from
3 banana is sister to *F. verticillioides*. **Mycologia**, v. 103, n. 3, p. 570-585, 2011.
- 4 VENTURINI, G.; ASSANTE, G.; TOFFOLATTI, S. L.; VERCESI, A. Mating behavior
5 of a Northern Italian population of *Fusarium verticillioides* associated with
6 maize. **Journal of Applied Genetics**, v. 52, n. 3, p. 367-370, 2011.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

4. PRIMEIRO RELATO DE *Fusarium andiyazi* E DUAS NOVAS LINHAGENS DO COMPLEXO *Fusarium fujikuroi* EM CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL

RESUMO

Uma das doenças da cana-de-açúcar é a podridão do topo (Pokkah boeng), responsável pela deformação caulinar e foliar no topo da planta. Atualmente, sabe-se que a podridão do topo é causada por algumas espécies do gênero *Fusarium*, no entanto, não se conhece quais as espécies que contribuem para a ocorrência da doença no Brasil. Assim, objetivou-se identificar e caracterizar espécies de *Fusarium* causadoras de podridão do topo em cana-de-açúcar nos estados de Alagoas, Maranhão e Pernambuco, através de marcadores morfológicos, sequenciamento e filogenia do gene *TEF-1 α* , além de teste de patogenicidade, agressividade e gama de hospedeiros. As análises micro-morfológica e molecular utilizando o gene *TEF-1 α* confirmaram a identidade dos isolados CMM 3316, CMM 3318, CMM 3354 e CMM 3356 como *Fusarium andiyazi*, com “Bayesian posterior probability” (Bpp) de 0,72. Dois isolados, CMM 3319 e CMM 3351, apresentaram características morfológicas diferentes e agruparam juntos com Bpp de 1,0, no entanto, são distantes entre si e distantes das demais espécies de *Fusarium*, portanto, foram considerados duas novas linhagens filogenéticas. Todos os isolados foram patogênicos a cana-de-açúcar. Além disso, os isolados CMM 3316 e CMM 3318 foram patogênicos a milho, sorgo e milheto. De acordo com teste de Tukey não houve diferença de agressividade entre os isolados. Os postulados de Koch foram completados após reisolamento dos isolados. Este é o primeiro relato de infecção natural de *F. andiyazi* e novas linhagens do Complexo *Fusarium fujikuroi* em cana-de-açúcar no Brasil.

Palavras-chave: Pokkah boeng, gene *TEF-1 α* , *Saccharum* spp.

1 **FIRST REPORT OF *Fusarium andiyazi* AND TWO NEW LINEAGE OF THE**
2 ***Fusarium fujikuroi* COMPLEX IN SUGARCANE IN BRAZIL**

3
4 **ABSTRACT**

5 One of the diseases of sugarcane is top rot (Pokkah boeng), responsible for
6 the caulinar and leaf deformation at the top of the plant. It is now known that top rot is
7 caused by some species of the genus *Fusarium*, however, it is not known which
8 species contribute to the occurrence of the disease in Brazil. The objective of this
9 study was to identify and characterize *Fusarium* species causing top rot in sugarcane
10 in the states of Alagoas, Maranhão and Pernambuco, through morphological
11 markers, sequencing and phylogeny of the *TEF-1 α* gene, as well as pathogenicity
12 test, aggressiveness and range of hosts. Micro-morphological and molecular
13 analyzes using the *TEF-1 α* gene confirmed the identity of isolates CMM 3316, CMM
14 3318, CMM 3354 and CMM 3356 as *Fusarium andiyazi*, with Bayesian posterior
15 probability (Bpp) of 0.72. Two isolates, CMM 3319 and CMM 3351, presented
16 different morphological characteristics and grouped together with Bpp of 1,0,
17 however, they are distant from each other and distant from the other *Fusarium*
18 species, therefore, two new phylogenetic lines were considered. All isolates were
19 pathogenic to sugarcane. In addition, CMM 3316 and CMM 3318 isolates were
20 pathogenic to maize, sorghum and millet. According to Tukey's test there was no
21 difference in aggressiveness among the isolates. Koch's postulates were completed
22 after reisolation of the isolates. This is the first report of natural infection of *F.*
23 *andiyazi* and new strains of the *Fusarium fujikuroi* Complex in sugarcane in Brazil.

24
25
26 **Keywords:** Pokkah boeng, *TEF-1 α* gene, *Saccharum* spp.

1 4.1 INTRODUÇÃO

2 A podridão do topo (Pokkah boeng), causada por *Fusarium* spp., é uma
3 doença que proporciona distorção no topo da cana-de-açúcar e seu primeiro relato
4 ocorreu na ilha de Java (ABBOTT, 1953; TOKESHI, 1997). Atualmente, tem-se
5 registro das espécies *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium*
6 *subglutinans*, *Fusarium sacchari*, *Fusarium andiyazi* e *Fusarium oxysporum*
7 associadas à podridão do topo no mundo (BAO et al., 2016; ELLIS et al., 2004;
8 GOSWAMI et al., 2014; GOVENDER et al., 2010; HSUAN et al., 2011; LIN et al.,
9 2014; ZAKARIA et al., 2011).

10 Vários estudos também confirmaram a existência de diversas espécies de
11 *Fusarium* associadas a plantas da família Poaceae, causando doenças ou se
12 comportando como patógenos latentes (CARTER et al., 2008; LESLIE et al., 2004;
13 LESLIE; SUMMERELL, 2006; PETROVIC et al., 2013).

14 No Brasil, foi confirmada a ocorrência da podridão do topo em plantios de
15 cana-de-açúcar. Os fungos associados a essa doença foram *Fusarium moniliforme* e
16 *F. subglutinans* (TOKESHI, 1997). No entanto, essas identificações foram baseadas
17 somente nos marcadores morfológicos, atualmente insuficientes para uma correta
18 identificação ao nível de espécie.

19 Com o advento da análise filogenética de genes “housekeeping” diversas
20 morfoespécies de *Fusarium* se desmembraram em várias outras espécies. Por
21 exemplo, o que se chamava de *F. moniliforme*, após o emprego do conceito de
22 espécie filogenética, deu origem ao complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*
23 (FFSC), composto por aproximadamente 70 espécies filogenéticas e 13 espécies
24 biológicas (AOKI et al., 2014; HERRON et al., 2015; LAURENCE et al., 2016;
25 LESLIE; SUMMERELL, 2006; LIMA et al., 2012; O’DONNELL et al., 1998;
26 SCAUFLAIRE et al., 2011; VAN HOVE et al., 2011). Desta forma, o nome *F.*
27 *moniliforme*, não deve ser utilizado pela comunidade científica devido se tratar de
28 nome em desuso (SEIFERT et al., 2003).

29 As espécies desse complexo estão distribuídas em três grandes clados,
30 denominados clados americano, asiático e africano. Esse agrupamento é apoiado na
31 teoria da biogeografia, que é baseada na evolução de espécies de *Fusarium* com

1 seus respectivos hospedeiros (KVAS et al., 2009; O'DONNELL et al., 1998;
2 O'DONNELL, 2000).

3 Apesar da importância que a cana-de-açúcar exerce na economia brasileira e
4 da relevância patogênica que diversas espécies que *Fusarium* tem sobre culturas
5 economicamente importantes, ainda são inconclusivos os trabalhos de identificação
6 de espécies de *Fusarium* provocando podridão do topo no Brasil.

7 Portanto, este trabalho tem como objetivo identificar e caracterizar espécies
8 de *Fusarium* causadoras de podridão do topo em cana-de-açúcar nos estados de
9 Alagoas, Maranhão e Pernambuco, através de marcadores morfológicos,
10 sequenciamento e filogenia do gene *TEF-1 α* , além de teste de patogenicidade,
11 agressividade e gama de hospedeiros.

12

13 **4.2 METODOLOGIA**

14 **4.2.1 Coleta, isolamento e preservação**

15 Amostras de plantas de cana-de-açúcar com sintomas de podridão do topo
16 foram coletadas nos estados de Alagoas, Maranhão e Pernambuco. Porções
17 sintomáticas (folhas e caules) foram lavadas com detergente neutro em água
18 corrente, e secadas a temperatura ambiente. Posteriormente, foram desinfestadas
19 superficialmente com etanol 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2% por 3
20 minutos, lavadas duas vezes em água destilada e esterilizada (ADE) e secas em
21 papel filtro esterilizado. As amostras foram plaqueadas em meio de cultura Batata-
22 Dextrose-Ágar (BDA) e incubadas em BOD (Biochemistry Oxygen Demand) a 25 ± 2
23 °C, com fotoperíodo de 12 h, por quatro dias. Por fim, em todos os isolados foi
24 realizado cultivo monospórico e estes foram preservados em microtubos. Os
25 isolados escolhidos para sequenciamento foram depositados na coleção de culturas
26 de fungos fitopatogênicos "Prof^a. Maria Menezes" – CMM, da Universidade Federal
27 Rural de Pernambuco.

28

29 **4.2.2 Caracterização morfológica**

30 Os isolados foram caracterizados utilizando meio de cultura BDA e Spezieller
31 Nährstoffarmer agar (SNA). O cultivo em BDA foi útil para avaliação da taxa de

1 crescimento micelial, aspecto da cultura e pigmentação da colônia. Para avaliar a
2 pigmentação da colônia, um disco de micélio foi transferido para o centro de uma
3 placa, seguido de incubação a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 h, por 10 dias
4 (SUMMERELL et al., 2003).

5 Em SNA foram observadas características micro-morfológicas, com
6 fragmentos secos e esterilizados de folhas de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.). Após
7 10 dias de incubação a 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 h, foram registradas a presença
8 ou não e cor de esporodóquios; tamanho, formato de microconídios e
9 macroconídios; tipos de fiálides, presença ou não de clamidósporos, presença ou
10 não de microconídios em falsas cabeças.

11

12 **4.2.3 Caracterização molecular**

13 O DNA dos isolados foi extraído utilizando WizardGenomic DNA Purification
14 Kit® (Promega). As reações de amplificação foram realizadas utilizando o kit
15 GoTaq® Colorless Master Mix (Promega), usando os primers *TEF-1* (forward; 5'–
16 ATGGGTAAGGAGGACAAGAC–3') e *TEF-2* (reverse; 5'–
17 GGAAGTACCAGTGATCATGTT–3') (O'DONNELL et al., 1998) correspondentes ao
18 gene *TEF* (Elongation factor 1- α). Os fragmentos amplificados foram purificados
19 utilizando-se o Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kit® (Promega) e
20 preparados para sequenciamento de DNA.

21 Os produtos da amplificação foram sequenciados, nas direções senso e
22 antisenso, em sequenciador automático no Instituto Biológico de São Paulo. Os
23 eletroferogramas gerados foram analisados visualmente no programa SeqAssem
24 ver. 07/2008 (SequentiX – Digital DNA Processing, Klein Raden, Alemanha) e as
25 sequências editadas foram comparadas na base de dados GenBank, National
26 Center for Biotechnological Information – NCBI, por meio da ferramenta BLAST*n*.

27 A Inferência Bayesiana foi realizada utilizando o programa MrBayes v 3.2.6
28 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). O programa MrModelTest v 2.3 foi utilizado
29 para a determinação dos modelos de substituição nucleotídica mais apropriados ao
30 alinhamento das sequências nucleotídicas do gene *TEF-1 α* . O modelo mais
31 apropriado foi GTR+G. As árvores foram amostradas ao acaso a cada 1000
32 gerações e 25% das árvores iniciais foram descartadas. As árvores foram editadas
33 pelo programa Figtree 3.1 (RAMBAU, 2009). Sequências de referências do gene

1 *TEF-1 α* de espécies da *Fusarium*, disponíveis no GenBank, foram incluídas nas
2 análises.

3

4 **4.2.4 Teste de patogenicidade, agressividade e gama de hospedeiros**

5 O teste de patogenicidade foi conduzido em mudas de cana-de-açúcar,
6 variedade RB021754, entre dezembro de 2016 e março de 2017, em estufa do
7 Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI,
8 Brasil. A determinação para gama de hospedeiro foi feita em milho, sorgo e milheto.
9 Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA a 25
10 ± 2 °C sob 12 h de fotoperíodo por 7 dias.

11 Foram utilizadas oito plantas para a inoculação de cada isolado e para
12 testemunha. A inoculação foi realizada com palitos de madeira esterilizados. Com a
13 ponta do palito foi retirada uma pequena porção do micélio do fungo e este foi
14 inserido na base de colmos. Nas testemunhas os palitos foram introduzidos sem
15 inóculo. Os palitos permaneceram inseridos nos colmos até o momento da
16 avaliação. Após 30 dias da inoculação, realizou-se a avaliação, através de cortes
17 longitudinais dos colmos (VISWANATHAN et al., 2011).

18 A agressividade do isolado foi avaliada através da medição precisa das
19 dimensões das lesões com auxílio de uma régua. Todo o experimento foi organizado
20 em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com oito repetições empregadas
21 por tratamento (isolado). As diferenças de agressividade foram determinadas pela
22 análise de dados com ANOVA, com médias comparadas ao teste de Tukey com
23 nível de significância de 5% usando o programa Assistat.

24

25 **4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

26 **4.3.1 Obtenção de isolados**

27 De 11 isolados obtidos, seis (CMM 3319, CMM 3351, CMM 3354, CMM 3356
28 CMM 3316 e CMM 3318) foram escolhidos de acordo com a morfologia e origem de
29 coleta para caracterização morfológica, sequenciamento e análise filogenética do
30 gene *TEF-1 α* , além de teste de patogenicidade, agressividade e gama de
31 hospedeiros (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Isolados de *Fusarium* provenientes de cana-de-açúcar utilizados neste estudo e sequências de referências disponíveis no GenBank empregadas nas análises filogenéticas. Teresina, PI, 2017.

Código	Espécie	Hospedeiro	Origem	Ano de Isol.	TEF-1 α *	Crescimento cm/dia
CMM 3319	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Saccharum</i> spp.	Sucupira do Riachão - MA	2016	x	1,4
CMM 3351	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Saccharum</i> spp.	Lagoa de Itaenga - PE	2016	x	1,45
MR105		<i>Saccharum</i> spp.	Murici – AL	2016		
CMM 3354	<i>F. andiyazi</i>	<i>Saccharum</i> spp.	Murici – AL	2016	x	1,45
CMM 3356	<i>F. andiyazi</i>	<i>Saccharum</i> spp.	Murici – AL	2016	x	1,5
MR108		<i>Saccharum</i> spp.	Murici – AL	2016		
MR110		<i>Saccharum</i> spp.	Murici – AL	2016		
MPM166		<i>Saccharum</i> spp.	Lagoa de Itaenga - PE	2015		
CMM 3316	<i>F. andiyazi</i>	<i>Saccharum</i> spp.	Lagoa de Itaenga - PE	2015	x	1,4
CMM 3318	<i>F. andiyazi</i>	<i>Saccharum</i> spp.	Lagoa de Itaenga - PE	2015	x	1,49
MPM172		<i>Saccharum</i> spp.	Lagoa de Itaenga - PE	2015		
NRRL 13308	<i>F. acutatum</i>	Desconhecido	Índia		AF160276	
NRRL 22945	<i>F. ananatum</i>	<i>Ananas comosus</i>	Inglaterra		AF160297	
NRRL 13602	<i>F. anthophilum</i>	<i>Hippeastrum</i> sp.	Alemanha		AF160292	
NRRL 20476	<i>F. bactridioides</i>	<i>Cronartium conigenum</i>	EUA		AF160290	
NRRL 25300	<i>F. begoniae</i>	<i>Begonia elatior</i>	Alemanha		AF160293	
NRRL 25446	<i>F. brevicatenulatum</i>	<i>Striga asiática</i>	Madagascar		AF160265	
NRRL 13618	<i>F. bulbicola</i>	<i>Nerine bowdenii</i>	Países baixos		AF160294	
NRRL 25331	<i>F. circinatum</i>	<i>Pinus radiata</i>	EUA		AF160295	
NRRL 25181	<i>F. concentricum</i>	<i>Musa sapientum</i>	Costa Rica		AF160282	
NRRL 25302	<i>F. denticulatum</i>	<i>Ipomoea batatas</i>	EUA		AF160269	
NRRL 28852	<i>F. fractiflexum</i>	<i>Cymbidium</i> sp.	Japão		AF160288	
NRLL 13566	<i>F. fujikuroi</i>	<i>Oryza sativa</i>	Taiwan		AF160279	
NNRLL 20433	<i>F. inlexum</i>	<i>Vicia faba</i>	Alemanha		AF8479	
NRRL 25200	<i>F. lactis</i>	<i>Ficus carica</i>	EUA		AF160272	
NRRL 25226	<i>F. mangiferae</i>	<i>Mangifera indica</i>	Índia		AF160281	

“Continua”

“Conclusão”

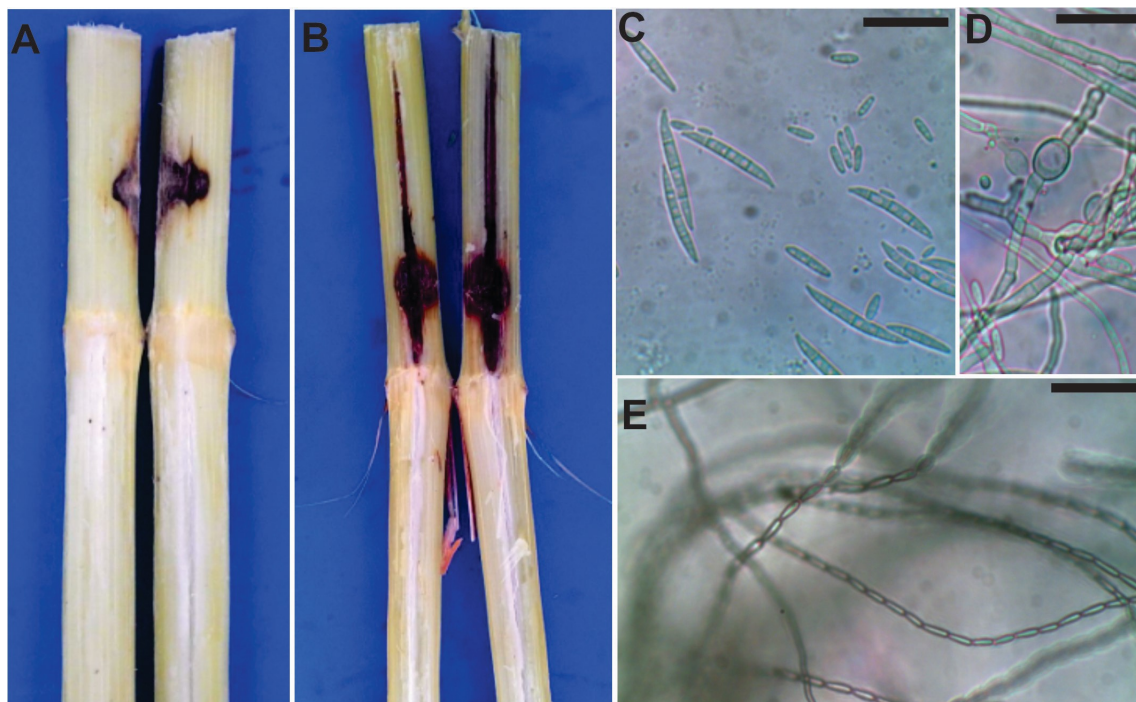
Código	Espécie	Hospedeiro	Origem	Ano de Isol.	TEF-1 α *	Crescimento cm/dia
NRRL 53147	<i>F. mexicanum</i>	<i>Mangifera indica</i>	México		GU737282	
NRRL 13604	<i>F. napiforme</i>	<i>Pennisetum typhoides</i>	África do Sul		AF160266	
NRRL 13448	<i>F. nygamai</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	Austrália		AF160273	
NRRL 22902	<i>F. oxysporum</i>	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	EUA		AF160312	
NRRL 13617	<i>F. phyllophilum</i>	<i>Dracaena deremensis</i>	Itália		AF160274	
NRRL 22944	<i>F. proliferatum</i>	<i>Cattleya</i> sp.	Alemanha		AF160280	
NRRL 25206	<i>F. pseudoanthophilum</i>	<i>Zea mays</i>	Zimbabwe		AF160264	
NRRL 22946	<i>F. pseudocircinatum</i>	<i>Solanum</i> sp.	Gana		AF160271	
NRRL 13592	<i>F. pseudonygamai</i>	<i>Pennisetum typhoides</i>	Nigéria		AF160263	
NRRL 25208	<i>F. ramigenum</i>	<i>Ficus carica</i>	EUA		AF160267	
NRRL 13999	<i>F. sacchari</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	Índia		AF160278	
MRC 2802	<i>F. sterilihyphosum</i>	<i>Mangifera indica</i>	África do Sul		AF160300	
NRRL 22016	<i>F. subglutinans</i>	<i>Zea mays</i>	EUA		AF160289	
NRRL 13613	<i>F. succisae</i>	<i>Succisa pratensis</i>	Alemanha		AF160291	
MUCL 52450	<i>F. temperatum</i>	<i>Zea mays</i>	Bélgica		HM067695	
NRRL 22045	<i>F. thapsinum</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	África do Sul		AF160270	
CML 262	<i>F. tuiense</i>	<i>Mangifera indica</i>	Brasil		DQ452859	
NRRL 22949	<i>F. udum</i>	Desconhecido	Alemanha		AF160275	
NRRL 22172	<i>F. verticillioides</i>	<i>Zea mays</i>	Alemanha		AF160262	
NRRL 25486	<i>F. xylarioides</i>	<i>Coffea</i> sp.	Costa do Marfim		AY707136	

*Gene sequenciado para análise filogenética. **CMM**: Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos Prof^a. Maria Menezes. **CML**: Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil. **MUCL**: Micoteca da Universidade Católica de Lovaina. **NRRL**: Centro Nacional para Aproveitamento de Pesquisa Agrícola, Peoria, Illinois, EUA. **MRC**: Conselho de Pesquisa Médica, Tygerberg, África do Sul.

1 4.3.2 Caracterização morfológica

2 Quatro isolados (CMM 3316, CMM 3318, CMM 3354 e CMM 3356)
 3 produziram microconídios formados em cadeias longas e em falsas cabeças. Foi
 4 observada a presença de monofiálides longas. Os macroconídios apresentaram 3-5
 5 septos e microconídios com 0-1 septo. Constatou-se ainda a presença de
 6 pseudoclamidósporos nas extremidades das hifas e baixa produção de
 7 esporodóquios. Em BDA, as culturas apresentaram coloração branca alaranjada e
 8 produção abundante de micélio com aspecto conotoso (Figura 4.1 C, D e E).

9 De acordo com os caracteres morfológicos, os isolados se assemelham a
 10 *Fusarium musae*, *F. andiyazi*, e *F. verticillioides*. Entretanto, *F. verticillioides* não
 11 produz pseudoclamidósporos, enquanto, *F. andiyazi* e *F. musae* são indistinguíveis,
 12 pois compartilham os mesmos marcadores morfológicos (LESLIE; SUMMERELL,
 13 2006; MARASAS et al., 2001; VAN HOVE et al., 2011).



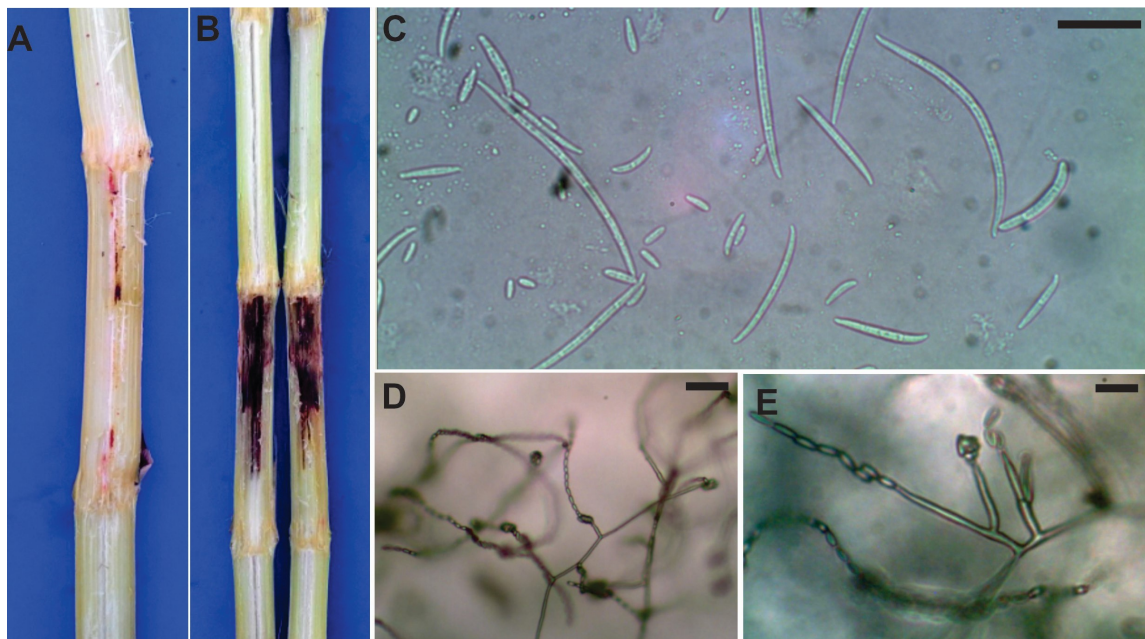
14

15 **Figura 4.1** - *Fusarium andiyazi*. Teste de patogenicidade em cana-de-açúcar: Testemunha (A)
 16 e planta inoculada (B); Macroconídios e microconídios (C); Pseudoclamidósporo (D);
 17 Microconídios em cadeias longas (E). Barra C-E = 40 µm.

18

19 Entre os isolados CMM 3319 e CMM 3351 foram observados marcadores
 20 morfológicos diferentes. O isolado CMM 3319, apresentou micélio de coloração
 21 branco alaranjado, com produção abundante de micélio. Os microconídios

1 apresentaram formato oval, e foram produzidos em falsa cabeça e em cadeias
 2 curtas sobre monofiálides (Figura 4.2 C, D e E). Esse isolado produz macroconídios
 3 morfologicamente distintos. Os macroconídios produzidos em esporodóquios são
 4 retilíneos, com presença de 3-5 septos, exibindo célula pé e apical não pronunciada.
 5 Enquanto, que os macroconídios produzidos em micélio aéreo são curvados, com
 6 presença de 3-5 septos. Foram observados também a presença de poucos
 7 mesoconídios curvados com 1-2 septos (Figura 4.2 C). Os clamidósporos foram
 8 geralmente produzidos nas extremidades de hifas.



9

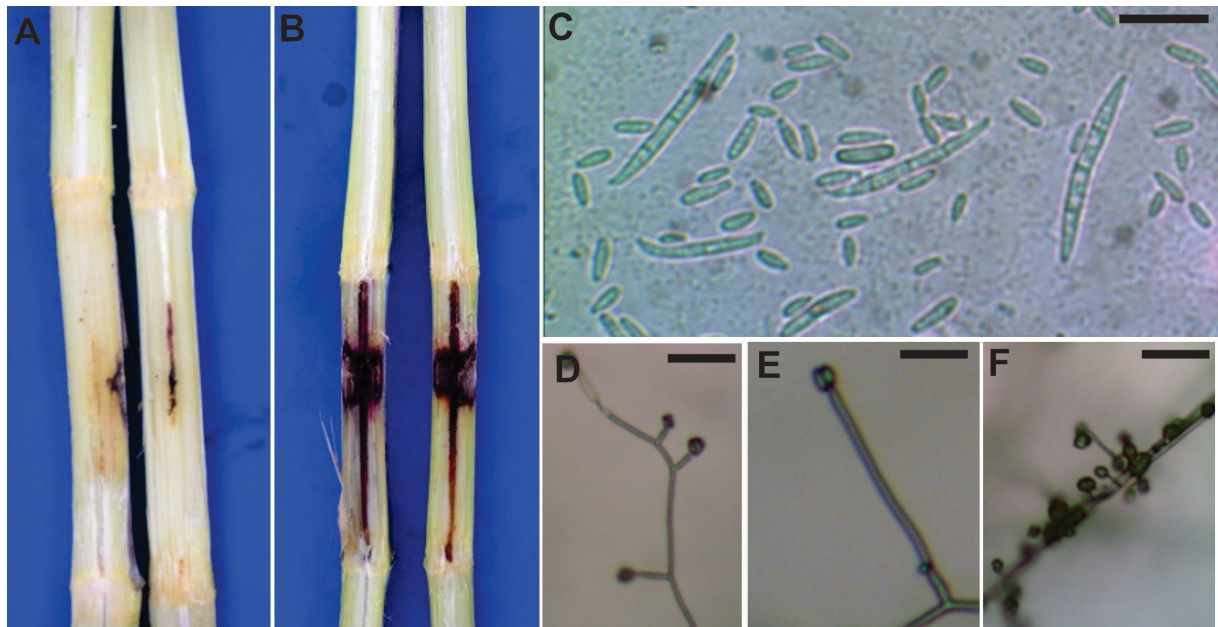
10 **Figura 4.2** - *Fusarium* sp 1. Teste de patogenicidade em cana-de-açúcar: Testemunha (A) e
 11 planta inoculada (B); Macroconídios, microconídios e mesoconídios (C); Microconídios em
 12 cadeia curta (D); Microconídios em cadeia curta e falsa cabeça (E). Barra: D-E = 40
 13 μm .

14

15 Essa nova linhagem filogenética apresenta características morfológicas
 16 semelhantes à *Fusarium nygamai*, *F. fujikuroi* e *F. proliferatum*, devido a presença
 17 de cadeias curtas de microconídios. No entanto, não apresenta a produção de
 18 polifiálides, característica típica dessas espécies. Dessa forma, pode ser
 19 considerada distinta das espécies mencionadas (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

20 Enquanto que a linhagem CMM 3351 apresentou coloração salmão a violeta e
 21 produção abundante de micélio de aspecto cotonoso. Os microconídios possuem
 22 formato reniforme, apresentando de 0-1 septo e foram produzidos em falsas
 23 cabeças, sobre monofiálides longas e ramificadas (Figura 4.2 C, D e E). A produção

1 de esporodóquio foi baixa, mesmo utilizando fragmentos de folhas de cravo e
 2 pedaços de papel de filtro em SNA. Os macroconídios apresentaram formato falcado
 3 com 3-5 septos, observando-se a predominância de 3 septos (Figura 4.2 C). Os
 4 clamidósporos estavam exibidos em grupos ou solitários.



5

6 **Figura 4.3** - *Fusarium* sp 2. Teste de patogenicidade em cana-de-açúcar: Testemunha (A) e planta
 7 inoculada (B); Macroconídios, microconídios (C); Falsas cabeças (D); Falsa cabeça em monofíalide
 8 longa (E); Barra: C-F = 40 µm.

9

10 Essa linhagem representada pelo isolado CMM 3351 compartilha os mesmos
 11 marcadores morfológicos de *F. oxysporum*. No entanto, existem espécies do FFSC
 12 que também produzem clamidósporos, como *Fusarium udum* e *Fusarium secorum*
 13 (LESLIE; SUMMERELL, 2006; SECOR et al., 2014).

14 Todos os isolados foram morfológicamente identificados como membros do
 15 FFSC. A coloração de cultura em BDA, o formato e septação de microconídios,
 16 assim como a dificuldade de produção de esporodóquio em SNA são características
 17 típicas desse complexo (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

18 Os isolados com produção de microconídios em cadeia longa e
 19 pseudoclamidósporo (CMM 3354, CMM 3356, CMM 3316 e CMM 3318), assim
 20 como (CMM 3319 e CMM 3351) apresentaram comprimento e largura de
 21 macroconídios e microconídios dentro dos padrões daqueles descritos para
 22 espécies do FFSC, no entanto, variáveis entre si (Tabela 4.2). Isso demonstra a

1 flexibilidade morfológica desse complexo, que muitas vezes torna inviável a
2 identificação de suas espécies através de morfologia (O'DONNELL et al., 1998).

3

4 **Tabela 4.2.** Dimensões comprimento/largura de macroconídios e microconídios de isolados
5 obtidos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) causadores de podridão do topo, em
6 comparação com isolados obtidos de outras espécies do complexo *Fusarium fujikuroi*
7 citadas na literatura. Teresina, PI, 2017

Isolado/ Espécie	Macroconídio*	Microconídio*	Referência
CMM 3319	17,28-49,59 x 1,68-2,75	3,58-17,97 x 1,15-2,6	Neste estudo
CMM 3351	12,05-16,97 x 1,45-2,38	3,39-9,47 x 1,30-2,7	Neste estudo
<i>Fusarium mangiferae</i>	25 x 42	7,8 x 2,8	Kumar et al. 2016
<i>Fusarium parvisorum</i>	12,5-29,5 x 1,5-3	7-13 x 1,5-3	Herron et al. 2015
<i>Fusarium andiyazi</i>	14-42 x 2-3,5	5-23 x 1,5-4,0	Marasas et al. 2001
CMM 3356	13,5-22,41 x 1,7-2,4	2,5-5,84 x 1,2-2,1	Neste estudo
CMM 3316	14,67-20,56 x 1,8-2,9	3,63-6,63 x 0,98-2,01	Neste estudo
CMM 3318	10-24,15 x 1,4-2,4	2,7-5,97 x 1,2-1,9	Neste estudo

8 *Comprimento x largura (µm)

9

10 4.3.3 Caracterização molecular

11 A amplificação do gene *TEF-1α* dos seis isolados produziu fragmentos que
12 variaram de 627 a 679 pb. A comparação das sequências nucleotídicas obtidas
13 neste estudo com aquelas contidas no GenBank, revelou que os isolados CMM
14 3316, CMM 3318, CMM 3354 e CMM 3356 apresentaram 99% de similaridade com
15 *F. andiyazi*, CMM 3319 99% com *F. verticillioides* e CMM 3351 99% com *Fusarium*
16 sp.

17 A análise filogenética dos isolados que produziram microconídios em cadeias
18 longas (CMM 3316, CMM 3318, CMM 3354 e CMM 3356) agruparam com isolado de
19 referência de *F. andiyazi* (CBS 119857) com "Bayesian posterior probability" (Bpp)
20 de 0,72, enquanto que, os isolados com produção de conídios em cadeias curtas
21 (CMM 3319 e CMM 3351) não agruparam com nenhuma espécie descrita, formando
22 um clado distinto com elevado Bpp (1) (Figura 4.4).

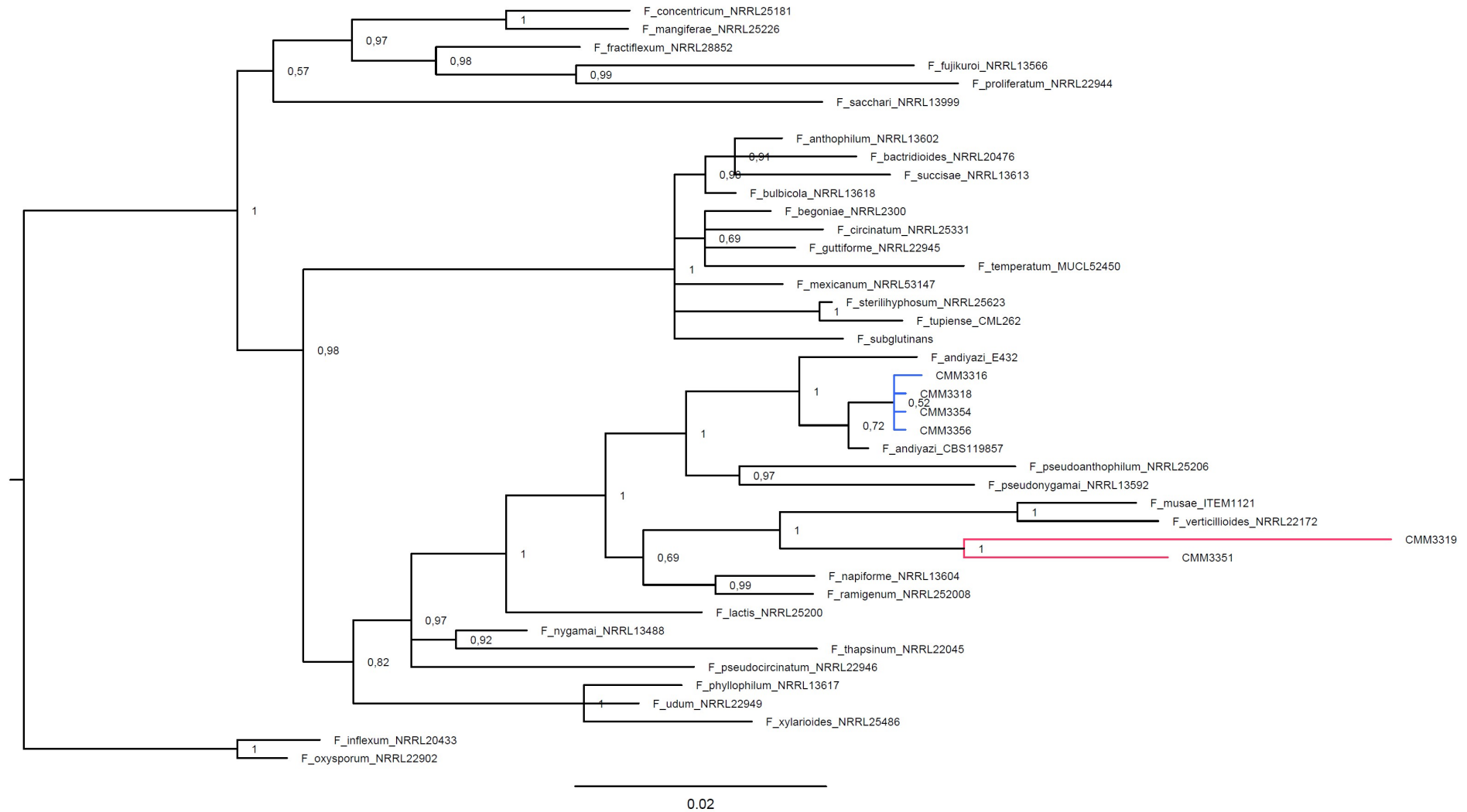


Figura 4.4 - Árvore filogenética construída por Inferência Bayesiana de seqüências da região *TEF-1 α* , mostrando a relação filogenética entre espécies do Complexo de Espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC). Os valores de probabilidade "a posteriori" estão representados nos entroncamentos da árvore. *Fusarium inflexum* e *Fusarium oxysporum* foram utilizadas como outgrup.

1 *Fusarium andiyazi* é um importante patógeno descrito originalmente
2 associado a podridão de colmo em plantas de sorgo na África do Sul (MARASAS et
3 al., 2001). Essa espécie também foi encontrada em milho e arroz causando podridão
4 de espiga e em grãos (MADANIA et al., 2013; PRÀ et al., 2010). A ocorrência de *F.*
5 *andiyazi* foi registrada em algumas plantas como endófito ou patógeno latente, além
6 de ser uma espécie amplamente distribuída nas regiões de clima tropical (LESLIE;
7 SUMMERELL, 2006).

8 As novas linhagens filogenéticas, representadas pelos isolados CMM 3319 e
9 CMM 3351, formaram um clado distinto e vizinho a *F. musae* e *F. verticillioides*,
10 portanto, ambos pertencem ao clado africano (Figura 4.4). Para essas linhagens não
11 se aplica a teoria da biogeografia, pois os fungos possuem centro de origem na
12 África e o hospedeiro apresenta centro de origem no continente asiático. Acredita-se
13 que na domesticação da cana-de-açúcar em países africanos o fungo pode ter
14 migrado de outras Poaceae para o hospedeiro *Saccharum* spp. É provável que o
15 fungo, tenha sido introduzido no Brasil através de transporte de material propagativo
16 infectado.

17 A disseminação de *Fusarium* spp., causadores de doenças em gramíneas,
18 por material propagativo vem sendo relatado na literatura. A espécie *F. temperatum*,
19 pertencente ao clado americano, foi descrita em milho na Bélgica, tendo sido
20 provavelmente disseminado via sementes contaminadas ou como endófito
21 (SCAUFLAIRE et al., 2011). Mais tarde, a mesma espécie foi encontrada causando
22 podridão de espiga em milho, no norte da Argentina, reforçando a observação dos
23 pesquisadores europeus (FUMERO et al., 2015).

24 São escassos os estudos sobre a podridão do topo em cana-de-açúcar
25 causada por espécies de *Fusarium* no Brasil, apesar do impacto significativo na
26 produção que essa doença tem causando em outros países como na Índia, onde no
27 decorrer dos anos 2007-2013, constatou-se incidência da doença em até 90% nas
28 cultivares recomendadas comercialmente (VISHWAKARMA et al., 2013).

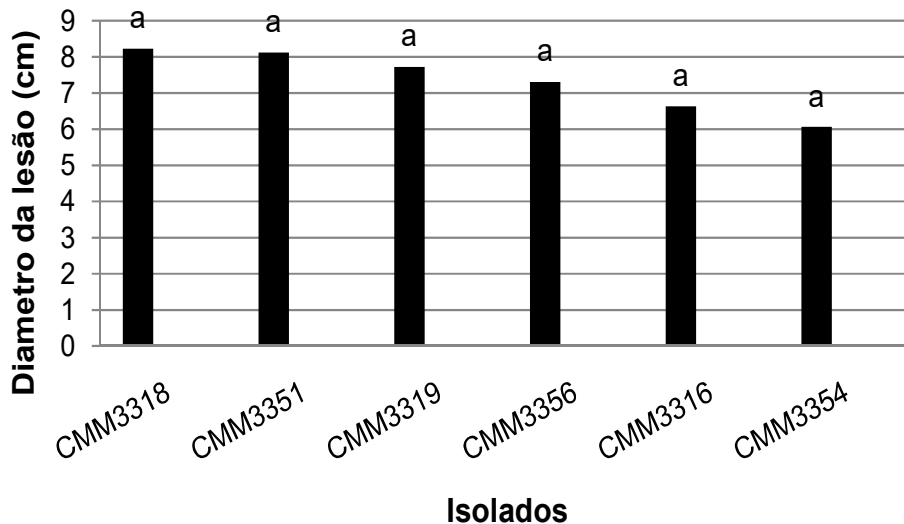
29

30

31

1 4.3.4 Teste de patogenicidade, agressividade e gama de hospedeiros

2 Todos os seis isolados foram patogênicos as plantas de cana-de-açúcar
 3 inoculadas (Figuras 4.1 A-B, 4.2 A-B e 4.3 A-B), apresentando colonização
 4 sistêmica. Os sintomas consistiram em necrose de coloração vermelha a preta a
 5 partir do ponto de inoculação. Nas plantas testemunhas, não foram observados
 6 sintomas. Os fungos foram reisolados de todas as plantas inoculadas, completando
 7 os postulados de Koch. Nenhum fungo foi reisolado das plantas testemunhas. Os
 8 isolados apresentaram o mesmo nível de agressividade de acordo com teste de
 9 Tukey (Figura 4.5).
 10



11 **Figura 4.5** - Níveis de agressividade dos isolados de acordo com o comprimento da
 12 lesão em colmos de cana-de-açúcar. Teste Tukey a 5% de probabilidade
 13
 14
 15

16 Para nosso conhecimento, este é o primeiro registro de *F. andiyazi* e de
 17 novas linhagens de *Fusarium* pertencentes ao FFSC causando podridão do topo em
 18 cana-de-açúcar no Brasil.

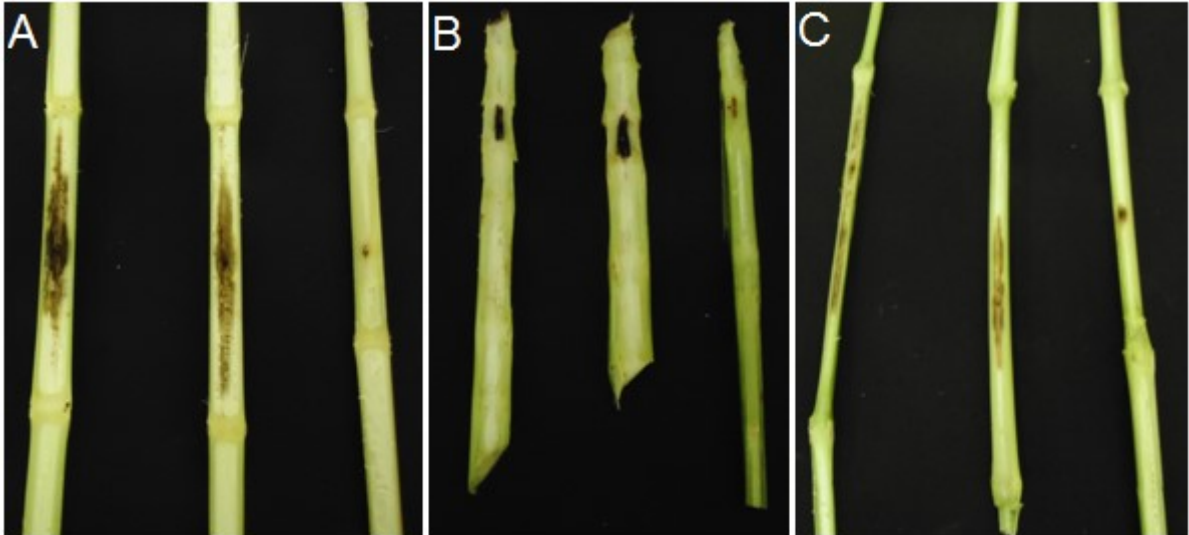
19 Os isolados CMM 3316 e CMM 3318 identificados com *F. andiyazi* foram
 20 usados para o teste de gama de hospedeiros onde os mesmos causaram podridão
 21 do colmo em milho, milho e sorgo (Figura 4.6 e 4.7).

22 O presente estudo é uma ferramenta valiosa da gama de espécies
 23 causadoras de doenças em cana-de-açúcar, sendo importante para demais estudos

1 que visem estabelecer estratégias de manejo, como o uso de fungicidas e o
2 desenvolvimento de variedades resistentes.

3

4



5

6 **Figura 4.6** - Teste de gama de hospedeiros com os isolados CMM 3316 e CMM 3318 e suas
7 respectivas testemunhas. Milho (A); Sorgo (B); Milheto (C).

8

9 Na avaliação de gama de hospedeiro foram utilizadas 2 cultivares para milho
10 (BES1040 e 30F35F), duas para sorgo (BR304 e DKB551) e uma cultivar para
11 milheto (BRS1501). Na estimativa de agressividade os dois tratamentos
12 apresentaram diferentes níveis apenas para uma das cultivares de milho (30F35F)
13 (Figura 4.7).

14

15

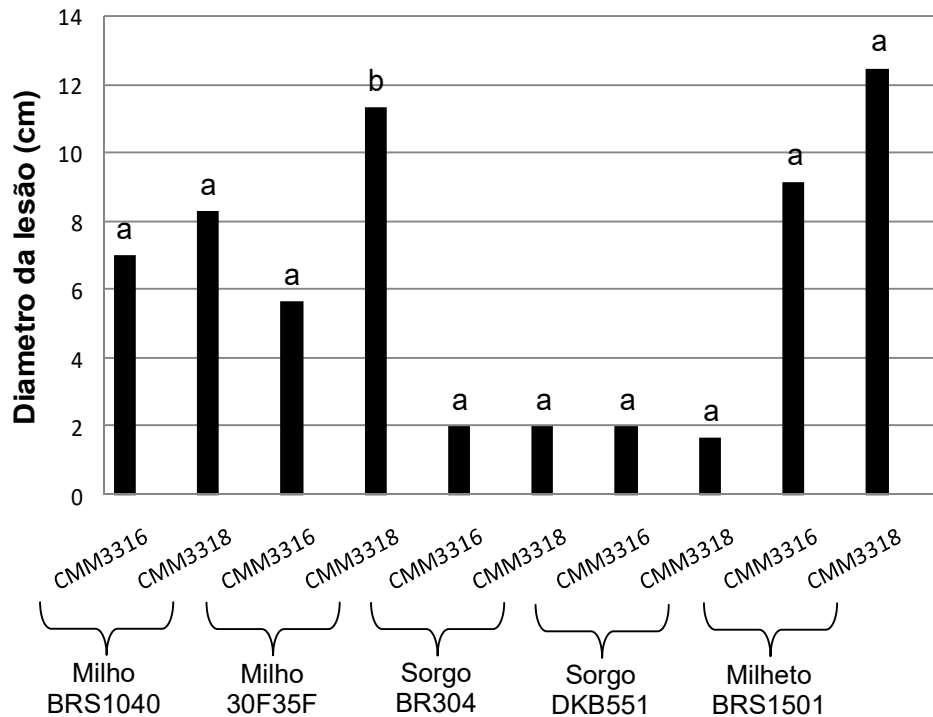


Figura 4.7 – Níveis de agressividade dos isolados de acordo com o comprimento da lesão em colmos de milho, sorgo e milheto. Teste de Tukey a 5% de probabilidade

4.4 CONCLUSÕES

Os isolados CMM 3316, CMM 3318, CMM 3354 e CMM 3356 foram identificados a partir de sua morfologia e sequenciamento como *F. andyazi*.

Os isolados CMM 3319 e CMM 3351 são duas novas linhagens filogenéticas do FFSC, pertencentes ao clado africano.

No teste de patogenicidade todos os isolados causaram podridão de colmo em cana-de-açúcar, mas não apresentaram diferentes níveis de agressividade.

Além da cana-de-açúcar, os isolados CMM 3316 e CMM 3318 foram patogênicos a milho, sorgo e milheto.

1 REFERÊNCIAS

- 2 ABBOTT, E. V. Sugarcane and its diseases. **The Yearbook of Agriculture. US**
3 **Dept. of Agriculture, Washington, DC**, p. 526-535, 1953.
- 4 AOKI, T.; O'DONNELL, K.; GEISER, D. M. Systematics of key phytopathogenic
5 *Fusarium* species: current status and future challenges. **Journal of General Plant**
6 **Pathology**, v. 80, n. 3, p. 189-201, 2014.
- 7 BAO, Y. X.; SUN, H. J.; LI, Y. F.; DUAN, Z. Z.; MCCORD, P. H.; CUI, Y. P.; ZHANG,
8 M. Q. BAO, Y. X. First Report of *Fusarium oxysporum* isolate gx3 causing sugarcane
9 pokkah boeng in Guangxi of China. **Plant Disease**, v. 100, n. 8, p. 1785, 2016.
- 10 CARTER, L. L. A.; LESLIE, J. F.; WEBSTER, R. K. Population structure of *Fusarium*
11 *fujikuroi* from California rice and water grass. **Phytopathology**, v. 98, n. 9, p. 992-
12 998, 2008.
- 13 ELLIS, R.; JAMES, G.; MERRY, B.; WEEKES, D.; YATES, B.; DIGGES, P.;
14 FORBER, G.; TODD, M.; BERDING, N.; COX, M.; HOGARTH, M.; BAILEY, R.;
15 LESLIE, G. **Sugarcane**. 2. ed. p. 216. 2004.
- 16 FUMERO, M. V.; REYNOSO, M. M.; CHULZE, S. *Fusarium temperatum* and
17 *Fusarium subglutinans* isolated from maize in Argentina. **International Journal of**
18 **Food Microbiology**, v. 199, p. 86-92, 2015.
- 19 GOSWAMI, D.; HANDIQUE, P. J.; DEKA, S. Rhamnolipid biosurfactant against
20 *Fusarium sacchari* - the causal organism of pokkah boeng disease of sugarcane.
21 **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 548-557, 2014.
- 22 GOVENDER, P.; MCFARLANE, S. A.; RUTHERFORD, R. S. *Fusarium* species
23 causing pokkah boeng and their effect on *Eldana saccharina* walker (Lepidoptera:
24 Pyralidae). **Proceedings of the Annual Congress - South African Sugar**
25 **Technologists' Association**.v. 83, p. 267-270, 2010.
- 26 HERRON, D. A.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. D.; RODAS, C. A.;
27 MARINCOWITZ, S.; STEENKAMP, E. T. Novel taxa in the *Fusarium fujikuroi* species
28 complex from *Pinus* spp. **Studies in Mycology**, v. 80, p. 131-150, 2015.
- 29 HSUAN, H. M.; SALLEH, B.; ZAKARIA, L.. Molecular identification of *Fusarium*
30 species in *Gibberella fujikuroi* species complex from rice, sugarcane and maize from
31 Peninsular Malaysia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 10, p.
32 6722-6732, 2011.
- 33 KUMAR, P.; KAMLE, M.; MISRA, A. K.; O'DONOVAN, A.; PAGANO, M.; MODI, D. R.
34 Identification and characterization of *Fusarium mangiferae* as pathogen of mango
35 malformation in India. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, 2016.
- 36 KVAS, M.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J.;
37 STEENKAMP, E. T. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella*
38 *fujikuroi* complex. **Fungal Diversity**, v. 34, p. 1-21, 2009.
- 39 LAURENCE, M. H.; WALSH, J. L.; SHUTTLEWORTH, L. A.; ROBINSON, D. M.;
40 JOHANSEN, R. M.; PETROVIC, T.; LIEW, E. C. Y. Six novel species of *Fusarium*

- 1 from natural ecosystems in Australia. **Fungal Diversity**, v. 77, n. 1, p. 349-366, 2016.
- 2 LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. 1. ed. Iowa-
3 USA: Blackwell Pub., p. 388, 2006.
- 4 LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; LOGRIECO, A.; MULÈ, G.; MORETTI, A.; RITIENI, A.
5 Species diversity of and toxin production by *Gibberella fujikuroi* species complex
6 strains isolated from native prairie grasses in Kansas. **Applied and Environmental**
7 **Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2254-2262, 2004.
- 8 LIMA, C. S.; PFENNING, L. H.; COSTA, S. S.; ABREU, L. M.; LESLIE, J. F.
9 *Fusarium tuiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that
10 causes mango malformation in Brazil. **Mycologia**, v. 104, n.6, p. 12-052, 2012.
- 11 LIN, Z.; XU, S.; QUE, Y.; WANG, J.; COMSTOCK, J. C.; WEI, J.; MCCORD, PER H.;
12 CHEN, B.; CHEN, R.; ZHANG, M. Species-specific detection and identification of
13 *Fusarium* species complex, the causal agent of sugarcane pokkah boeng in China.
14 **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1-13, 2014.
- 15 MADANIA, A.; ALTAWIL, M.; NAFFAA, W.; VOLKER, P. H.; HAWAT, M.
16 Morphological and molecular characterization of *Fusarium* isolated from maize in
17 Syria. **Journal of Phytopathology**, v. 161, n. 7-8, p. 452-458, 2013.
- 18 MARASAS, W. F.; RHEEDER, J. P.; LAMPRECHT, S. C.; ZELLER, K. A.; LESLIE, J.
19 F. *Fusarium andiyazi* sp. nov., a new species from sorghum. **Mycologia**, p. 1203-
20 1210, 2001.
- 21 O'DONNELL, K.; NIRENBERG, H. I.; AOKI, T.; CIGELNIKI, E. A. A multigene
22 phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional
23 phylogenetically distinct species. **Mycoscience**, v. 41, n. 1, p. 61-78, 2000.
- 24 O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematics and
25 phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, p. 465-493,
26 1998.
- 27 PETROVIC, T.; BURGESS, L. W.; COWIE, I.; WARREN, R. A.; HARVEY, P. R.
28 Diversity and fertility of *Fusarium sacchari* from wild rice (*Oryza australiensis*) in
29 Northern Australia, and pathogenicity tests with wild rice, rice, sorghum and maize.
30 **European Journal of Plant Pathology**, v. 136, n. 4, p. 773-788, 2013.
- 31 PRÀ, M. D.; TONTI, S.; PANCALDI, D.; NIPOTI, P.; ALBERTI, I. First report of
32 *Fusarium andiyazi* associated with rice bakanae in Italy. **Plant Disease**, v. 94, n. 8,
33 p. 1070-1070, 2010.
- 34 RAMBAU, T. A. Figtree 3.1. Versão 1, 2009. Disponível em:
35 <<http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/FigTree-AR.shtml>. Acesso em 30 jan.
36 2017.
- 37 RONQUIST, F.; HUELSENENCK, J. P. MrBayes3: Bayesian phylogenetic inference
38 under mixed models. **Bioinformatics**, v.19, p. 1572-1574, 2003.
- 39 SCAUFLAIRE, J.; GOURGUE, M.; MUNAUT, F. *Fusarium temperatum* sp. nov. from
40 maize, an emergent species closely related to *Fusarium subglutinans*. **Mycologia**, v.
41 103, n. 3, p. 586-97, 2011.

- 1 SECOR, G. A.; RIVERA-VARAS, V.; CHRIST, D. S.; MATHEW, F. M.; KHAN, M. F.;
2 VARRELMANN, M.; BOLTON, M. D. Characterization of *Fusarium secorum*, a new
3 species causing *Fusarium* yellowing decline of sugar beet in north central
4 USA. **Fungal biology**, v. 118, n. 9, p. 764-775, 2014.
- 5 SEIFERT, K. A.; AOKI, T.; BAAYEN, R. P.; BRAYFORD, D.; BURGESS, L. W.;
6 CHULZE, S.; LOGRIECO, A. The name *Fusarium moniliforme* should no longer be
7 used. **Mycological Research**, v. 107, n. 06, p. 643-644, 2003.
- 8 SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. A utilitarian approach to *Fusarium*
9 identification. **Plant Disease**, v. 87, n. 2, p. 117-128, 2003.
- 10 TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum* spp.) In: KIMATI,
11 H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M.
12 (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 3. ed. São
13 Paulo: Editora Agronômica Ceres, v.2, p.207-225, 1997.
- 14 VAN HOVE, F.; WAALWIJK, C.; LOGRIECO, A.; MUNAUT, F.; MORETTI, A.
15 *Gibberella musae* (*Fusarium musae*) sp. nov., a recently discovered species from
16 banana is sister to *F. verticillioides*. **Mycologia**, v. 103, n. 3, p. 570–585, 2011.
- 17 VISHWAKARMA, S.; KUMAR, P.; NIGAM, A.; SINGH, A.; KUMAR, A. Pokkah
18 boeng: An emerging disease of sugarcane. **Journal of Plant Pathology**
19 **Microbiology**, v. 4, n. 2, 2013.
- 20 VISWANATHAN, R.; POONGOTHAI, M.; MALATHI, P. Pathogenic and molecular
21 confirmation of *Fusarium sacchari* causing wilt in sugarcane. **Sugar Tech**, v. 13, n. 1,
22 p. 68-76, 2011.
- 23 ZAKARIA, L.; HSUAN, H. M.; SALLEH, B. Mating populations of *Fusarium* section
24 liseola from rice, sugarcane and maize. **Tropical Life Sciences Research**, v. 22, n.
25 2, p. 93, 2011.