

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO - UFES  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS - CCAE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL - PPGPV

MATHEUS RICARDO DA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E GRAU DE ESPECIALIZAÇÃO DE  
ESPÉCIES DO COMPLEXO *Fusarium solani* EM CAFEEIRO CONILON**

ALEGRE, ES

2020

MATHEUS RICARDO DA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E GRAU DE ESPECIALIZAÇÃO DE  
ESPÉCIES DO COMPLEXO *Fusarium solani* EM CAFEEIRO CONILON**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal, na linha de pesquisa de Fitossanidade/Fitopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Willian Bucker Moraes

Coorientadores: Prof. Dr. André da Silva Xavier  
Prof. Dra. Taís Cristina Bastos Soares  
Prof. Dr. Fábio Ramos Alves  
Prof. Dr. Leônidas Leoni Belan

ALEGRE, ES

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de  
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

R672c Rocha, Matheus Ricardo, 1995-  
Caracterização molecular e grau de especialização de espécies  
do complexo *Fusarium solani* em cafeeiro conilon / Matheus  
Ricardo Rocha. - 2020.  
75 f.

Orientador: Willian Bucker Moraes.

Coorientadores: André da Silva Xavier, Taís Cristina Bastos  
Soares, Fábio Ramos Alves, Leônidas Leoni Belan.

Dissertação (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e  
Engenharias.

1. Fitopatologia. 2. *Fusarium*. 3. Cafeeiro. 4. Especialização.  
5. Agronomia. I. Moraes, Willian Bucker. II. Xavier, André da  
Silva. III. Soares, Taís Cristina Bastos. IV. Alves, Fábio Ramos.  
V. Belan, Leônidas Leoni. VI. Universidade Federal do Espírito  
Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. VII. Título.

CDU: 63

---

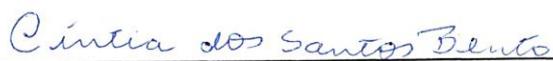
**MATHEUS RICARDO DA ROCHA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E GRAU DE ESPECIALIZAÇÃO DE  
ESPÉCIES DO COMPLEXO *Fusarium solani* EM CAFEEIRO CONILON**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Produção Vegetal, na linha de pesquisa Fitossanidade/Fitopatologia.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2020.

Comissão Examinadora:



**Profa. Dra. Cíntia dos Santos Bento**  
Universidade federal do Espírito Santo  
Membro Externo ao PPGPV



**Dr. Guilherme de Resende Camara**  
Centro de Tecnologia Mineral  
Membro Externo - CETEM/NRES



**Prof. Dr. Willian Bucker Moraes**  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientador

## DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus queridos pais Roberlany Alves da Rocha e Oslene Ricardo da Rocha e ao meu irmão Davi Ricardo da Rocha aos quais devo toda a minha gratidão pelo suporte, carinho, conselhos e por serem meu símbolo de caráter e humildade dos quais tento me espelhar diariamente.

*“Our choices reveal that really  
who we are, much more than  
our qualities.”*

- Alvo Percival Wulfrico Brian Dumbledore

*Be intense and always be in love!*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Oslene Ricardo da Rocha e Roberlany Alves da Rocha que não mediram esforços e nunca deixaram de me apoiar em todas as minhas decisões, por facilitarem a solução de problemas que achava ser inimagináveis de resolver sozinho, por todo amor incondicional pelo qual fui criado, por me proporcionar os maiores momentos de alegria, por estar presentes nos momentos aos quais mais precisei e por me perturbar quando claramente havia uma necessidade;

Ao meu Professor orientador Willian Bucker Moraes, que desde o primeiro momento me deu a oportunidade e hoje, considero um dos meus pilares de crescimento e autoconhecimento durante a jornada que tive na UFES. Obrigado por não medir esforços e ser um segundo pai!

Ao meu Coorientador André da Silva Xavier que desde o primeiro momento se mostrou um pai. Obrigado pela paciência e por ser capaz de me acalmar em momentos de desespero, assim como toda orientação!

À minha Coorientadora Taís Cristina Bastos Soares pela paciência e suporte. Obrigado por possibilitar o desenvolvimento deste estudo, com toda a estrutura e decisões claras e determinação para a conclusão deste trabalho;

Aos meus queridos Familiares que mesmo tendo pouco contato, torciam por mim e comemoravam a cada vitória;

À minha amiga de coração Lorenza Bandeira de Paula. Talvez não seja capaz de descrever o crescimento que proporcionamos um ao outro durante esses dois anos, com certeza evoluímos juntos. Obrigado pelos momentos de alegria, mas principalmente por ser uma segunda mãe em momentos de angústia!

À minha amiga Isadora Rogrigues Garcia por ser minha companheira fiel todos os dias durante esta jornada;

A todos os meus amigos do VALHE que com certeza foram os meus principais pilares durante os dois últimos anos de jornada. Crescemos e regredimos ao mesmo tempo juntos. Obrigado pelas noites de distração, pelos compartilhamentos em momentos de angústias. Talvez não tenha palavras suficientes que me façam descrever a importância que fizeram e fazem em meu cotidiano!

Aos meus queridos amigos Luan Soares de Souza e Vanessa Dalapicola que mesmo estando longe cultivamos e mantivemos nossa amizade com a mesma conexão de amigos próximos. Provando que distância não é um empecilho justificável!

A banca avaliadora pela disponibilidade de dedicar parte do seu tempo para avaliação deste trabalho;

A toda estrutura do NUDEMAFI e equipe do LEMP, assim como o LAVIB e o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho e por estar sempre presentes nos momentos de dúvida assim como nos de descontração;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão do financiamento para realização deste trabalho;

A Univesidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCAUE-UFES) por todo apoio e estrutura estudantil e de pesquisa disponibilizada;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

ROCHA, Matheus Ricardo. **Caracterização molecular e grau de especialização de espécies do complexo *Fusarium solani* em cafeeiro conilon**. 2020. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES. Orientador: Prof. Dr. Willian Bucker Moraes. Co-orientadores: Prof. Dr. André da Silva Xavier; Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Taís Cristina Bastos Soares, Prof. Dr. Fábio Ramos Alves; Prof. Dr. Leônidas Leoni Belan.

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de cafés, e o estado do Espírito Santo tem a maior produção de café conilon. Entretanto, sintomas de murcha e amarelecimento têm sido relatados com a sintomatologia característica da murcha causada por patógenos do gênero *Fusarium* (*F. solani*, *F. lateritium* e *F. decemcellulare*) em lavouras comerciais de cafeeiro conilon, causando o seu declínio. Neste estudo, objetivou-se caracterizar molecularmente isolados de *Fusarium* spp. agentes etiológicos da murcha de fusarium em cafeeiros conilon e da fusariose em culturas de importância para o Espírito Santo e investigar a existência de especialização em *F. solani* associado à murcha de Fusarium na cultura do cafeeiro conilon. Os fragmentos parciais dos genes *TEF1- $\alpha$* , *RPB1* e *RPB2*, foram amplificados de isolados de *Fusarium* spp., obtidos de plantas de *Coffea canephora*, *Passiflora edulis*, *Phaseolus vulgaris*, *Piper nigrum* e *Carica papaya* para análises de BLASTn e estudos de Filogenia por inferência bayesiana. Foi realizada a inoculação cruzada de isolados de *F. solani* obtidos das culturas do maracujazeiro, feijoeiro, pimenteira-do-reino e mamoeiro com o isolado proveniente da cultura do cafeeiro conilon (03CC). Os testes de patogenicidade foram conduzidos em casa de vegetação, utilizando-se a metodologia de corte de raízes. Suspensões de esporos ajustadas para  $1 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> dos isolados monospóricos de *Fusarium* spp., foram inoculadas. Plantas de cafeeiro conilon (Clone CV02) foram inoculadas com o isolado de *F. solani*, agente etiológico da murcha de fusarium em cafeeiro conilon, este mesmo isolado foi inoculado nas culturas do maracujazeiro, feijoeiro, pimenteira-do-reino e mamoeiro. Cada tratamento foi composto por 10 repetições e cada repetição por uma unidade amostral, avaliando-se semanalmente a manifestação de sintomas característicos da murcha. A filogenia do locus *RPB1* e dos loci regiões *RPB1+RPB2* separou espécies filogeneticamente distintas de *Fusarium* obtidos de *C. canephora*: 01CC, 02CC e 03CC nos complexos *lateritium* (FlatSC), *decemcellulare* (FdecSC) e *solani* (FSSC) respectivamente, determinando a nomenclatura *Fusarium* sp. Nos testes de patogenicidade foi constatada a existência de um grau de especialização do isolado 03CC em plantas de cafeeiros, devido ao não desenvolvimento da doença nas demais culturas em estudo, assim como nas testemunhas (controles negativos). Para os isolados obtidos de outras culturas e inoculados em *C. canephora*, houve amarelecimento generalizado dos cafeeiros em relação às testemunhas que permaneceram verdes e assintomáticas, porém não houve progresso da doença. Os isolados obtidos do feijoeiro não manifestaram sintomas em *C. canephora* e em *P. vulgaris*. Com este estudo evidenciou-se a importância do entendimento da especialização de espécies de *Fusarium*, que associada a uma correta taxonomia facilita a elaboração de metodologias de manejo a murcha de fusarium do cafeeiro conilon.

**Palavras-chave:** *Coffea canephora*, Interação planta-patógeno, Fungos fitopatogênicos, genes housekeeping.

## ABSTRACT

ROCHA, Matheus Ricardo. **Molecular characterization and degree of specialization of *Fusarium solani* species in conilon coffee.** 2020. Dissertation (Master in Plant Production) - Federal University of Espírito Santo, Alegre – ES. Advisor: Prof. Dr. Willian Bucker Moraes. Co- advisors: Prof. Dr. André da Silva Xavier; Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Taís Cristina Bastos Soares, Prof. Dr. Fabio Ramos Alves; Prof. Dr. Leônidas Leoni Belan.

Brazil is the world's largest producer and exporter of coffee, and the State of Espírito Santo has the largest production of Conilon coffee. However, symptoms of wilt and yellowing have been reported with the characteristic symptoms of wilt caused by pathogens of the *Fusarium* genus (*F. solani*, *F. lateritium* and *F. decemcellulare*) in commercial conilon crops, causing their decline. This study aimed to characterize molecularly isolates of *Fusarium* spp. etiological agents of fusarium wilt in conilon coffee and fusariosis in cultures of importance to Espírito Santo and to investigate the existence of specialization in *F. solani* associated with Fusarium wilt in the culture of conilon coffee. The partial fragments of the *TEF1- $\alpha$* , *RPB1* and *RPB2* genes, were amplified from *Fusarium* spp. Isolates, obtained from plants of *Coffea canephora*, *Passiflora edulis*, *Phaseolus vulgaris*, *Piper nigrum* and *Carica papaya* for BLASTn and Phylogeny studies by Bayesian inference. Cross-inoculation of isolates of *F. solani* obtained from the cultures of passion fruit, beans, black pepper, and papaya was carried out with the isolate from the culture of the conilon coffee tree (03CC). The pathogenicity tests were carried out in a greenhouse, using the root cutting methodology. Spore suspensions adjusted to  $1 \times 10^6$  conidia.mL<sup>-1</sup> of monosporic isolates of *Fusarium* spp., were inoculated. The suspensions were inoculated in conilon coffee plants (CV02), as well as the isolate of *F. solani*, etiological agent of Fusarium wilt in conilon coffee, was inoculated in passion fruit, bean, pepper and papaya cultures. Each treatment consisted of 10 repetitions and each repetition by a sample unit, evaluating the manifestation of symptoms characteristic of fusariosis weekly. The phylogeny of the *RPB1* and *RPB1 + RPB2* regions separated phylogenetically distinct species of *Fusarium* obtained from *C. canephora*: 01CC, 02CC and 03CC in the *lateritium* (FlatSC), *decemcellulare* (FdecSC) and *solani* (FSSC) complexes, respectively, determining the nomenclature *Fusarium* sp. In the pathogenicity tests, it was verified the existence of a degree of specialization of the 03CC isolate in coffee plants, due to the non-development of the disease in the other cultures under study, as well as in the controls in the negative controls. For the isolates obtained from other cultures and inoculated in *C. canephora*, there was a general yellowing of the coffee trees in relation to the controls that remained green and asymptomatic, but there was no progress of the disease. The isolates obtained from the common bean showed no symptoms in *C. canephora* and *P. vulgaris*. This study showed the importance of understanding the specialization of *Fusarium* species, which associated with a correct taxonomy facilitates the development of management methodologies for Fusarium wilt in coffee conilon.

**Keywords:** *Coffea canephora*, *Plant-pathogen interaction*, *Phytopathogenic fungi*, *Genes housekeeping*.

## SUMÁRIO

<b>1 HIPÓTESES</b> .....	12
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	13
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
<b>3 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	16
4.2 COLEÇÃO DE FUNGOS.....	16
4.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	17
<b>4.2.1 Obtenção de isolados monospóricos</b> .....	<b>17</b>
<b>4.2.2 Extração de DNA</b> .....	<b>18</b>
<b>4.2.3 Amplificação por PCR</b> .....	<b>18</b>
<b>4.2.4 Edição e Alinhamento das sequências</b> .....	<b>19</b>
<b>4.2.5 Filogenia bayesiana</b> .....	<b>20</b>
4.3 INOCULAÇÃO CRUZADA OU COMPARATIVA.....	20
<b>4.3.1 Experimento de patogenicidade de <i>F. solani</i> obtido do cafeeiro conilon (<i>Coffea canephora</i>) em diferentes espécies de plantas</b> .....	<b>20</b>
<b>4.3.2 Experimento de patogenicidade de isolados de <i>F. solani</i> obtidos de diferentes hospedeiros em <i>Coffea canephora</i></b> .....	<b>22</b>
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
5.1 ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS <i>LOCI RPB1+RPB2</i> PARA OS ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp. obtidos de <i>coffea canephora</i> , <i>passiflora edulis</i> , <i>phaseolus vulgaris</i> , <i>pipper nigrum</i> e <i>caryca papaya</i> .....	23
5.2 INOCULAÇÃO CRUZADA OU COMPARATIVA.....	29
<b>5.2.1 Patogenicidade de <i>Fusarium solani</i> (03CC), agente etiológico da murcha de fusarium em cafeeiros conilon, em hospedeiros diversos</b> .....	<b>29</b>
<b>5.2.2 Patogenicidade de <i>Fusarium solani</i> obtido de outros hospedeiros em <i>coffea canephora</i> (Clone CV02)</b> .....	<b>29</b>

<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	32
6.1 ANÁLISE FILOGENÉTICA .....	32
6.2 INOCULAÇÃO CRUZADA OU COMPARATIVA.....	40
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	47
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48
<b>APÊNDICE A – FILOGENIA DA REGIÃO <i>RPB1</i></b> .....	56
<b>APÊNDICE B – FILOGENIA DA REGIÃO <i>RPB2</i></b> .....	58
<b>APÊNDICE C – MORFOLOGIA <i>Fusarium</i> spp.</b> .....	60
<b>APÊNDICE D – FIGURA SUPLEMENTAR 2</b> .....	62
<b>APÊNDICE E – FIGURA SUPLEMENTAR 3</b> .....	63
<b>APÊNDICE F – FIGURA SUPLEMENTAR 4</b> .....	65
<b>APÊNDICE G – FIGURA SUPLEMENTAR 5</b> .....	66
<b>APÊNDICE H – FIGURA SUPLEMENTAR 6</b> .....	67
<b>APÊNDICE I – FIGURA SUPLEMENTAR 7</b> .....	68
<b>APÊNDICE J – TABELA SUPLEMENTAR 1</b> .....	69
<b>ANEXO A – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS REGIÕES <i>RPB1</i> E <i>RPB2</i> AMPLIFICADAS</b> .....	70
<b>ANEXO B – TABELA SUPLEMENTAR 2</b> .....	71

## 1 HIPÓTESES

- A reconstrução filogenética com base nas regiões *RPB1* e *RPB2* isoladamente é capaz de discriminar *Fusarium* spp. obtidas do cafeeiro conilon e hospedeiros contrastantes;
- Árvores filogenéticas geradas a partir da concatenação de *RPB1* e *RPB2* são capazes de discriminar espécies filogeneticamente distintas, incluindo agentes etiológicos da fusariose em diversos hospedeiros, bem como suas especializações hospedeiras;
- Há um grau de especialização em nível de hospedeiro para a espécie de *Fusarium solani*, agente etiológico da murcha de Fusarium em cafeeiro conilon;
- Isolados de *F. solani*, agente etiológico da fusariose nas culturas do maracujazeiro, feijoeiro, pimenteira-do-reino e mamoeiro não são capazes de causar murcha em cafeeiros conilon (Clone CV02).

## 2 OBJETIVO GERAL

Caracterizar molecularmente isolados de *Fusarium* spp., agentes etiológicos da murcha de fusarium em cafeeiro conilon e da fusariose em culturas de importância para o Espírito Santo e investigar a existência de especialização em *F. solani* associado à murcha de fusarium na cultura do cafeeiro conilon.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir árvores filogenéticas dos *loci* *RPB1* e *RPB2* isoladamente;
- Construir uma árvore filogenética mediante a concatenação dos *loci* *RPB1+RPB1* de isolados de *Fusarium* spp. patogênicos ao cafeeiro e culturas de importância para o estado do ES;
- Verificar a suscetibilidade de diferentes culturas de importância econômica para o estado do Espírito Santo a *Fusarium solani*, agente etiológico da murcha de fusarium em cafeeiro conilon;
- Verificar a suscetibilidade do cafeeiro conilon (Clone CV02) a isolados de *F. solani*, agente etiológico da fusariose em culturas contrastantes de importância para o estado do Espírito Santo.

### 3 INTRODUÇÃO

O cafeeiro é cultivado em regiões de clima tropical e subtropical, sendo o café uma das principais *commodityes* relacionadas a transações globais, perdendo em termos financeiros apenas para o petróleo (DONG et al., 2017). Atualmente, o Brasil é o principal produtor de café, e o estado do Espírito Santo produz 70% do café conilon brasileiro, totalizando 20% do total produzido mundialmente (USDA, 2019).

Apesar da elevada produção de café conilon no Espírito Santo, doenças causadas por fitopatógenos têm atrasado sua cadeia produtiva, devido à redução da produtividade de cafezais. Sintomas de murcha, amarelecimento e seca de ramos plagiotrópicos e ortotrópicos têm sido relatados em lavouras comerciais de conilon, diagnosticados como a sintomatologia característica da murcha de fusarium, causada por fitopatógenos do gênero *Fusarium* (BELAN et al., 2018).

No controle de doenças de plantas, a correta diagnose é imprescindível na tomada de decisão. Entretanto, a complexa taxonomia de *Fusarium*, que abrange mais de 300 espécies filogeneticamente distintas, dificulta metodologias mais genéricas de identificação, como análises de The Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) e morfológica (SUMMEREILL et al., 2019; O'DONNELL et al., 2015). Além disso, a identificação com base na morfologia macroconidial requer elevado conhecimento e é considerada isoladamente inadequada para o gênero (ŠIŠIĆ et al., 2018). Neste sentido, a identificação precisa das espécies do gênero *Fusarium* tem sido realizada com uso de filogenia, possibilitando classificar em *formae speciales* quanto a especificidade, e em nível de hospedeiro e raças quando é em nível de cultivar (AOKI et al., 2014).

Para discriminar espécies filogeneticamente distintas de *Fusarium*, apenas três *loci* marcadores atendem aos critérios, sendo esses o fator de alongamento de translação 1- $\alpha$  (*TEF1*), a maior subunidade da RNA polimerase (*RPB1*), e a segunda maior subunidade (*RPB2*), sendo ortólogos e aplicáveis em toda a extensão do gênero (O'DONNELL et al., 2015). Análises de filogenia do gênero relevam 20 clados ou “complexos” diferentes, entre eles, o complexo *Fusarium solani* (FSSC) é considerado um dos mais importantes, devido ao seu potencial de dano em culturas de importância agrícola, sendo a espécie *F. solani* seu principal representante (SNYDER; HANSEN, 1941; CHUNG et al., 2011; SUMMEREILL et al., 2019).

O complexo *Fusarium solani* (FSSC) é frequentemente associado a uma elevada gama de hospedeiros, caracterizando algumas das mais importantes doenças disseminadas pelo solo, como murchas e apodrecimento radicular; estas distribuídas mundialmente em mais de 100 culturas de importância agrícola (ŠIŠIĆ et al., 2018). No entanto, espécies individuais do FSSC são associadas a um ou poucos hospedeiros, classificando as espécies em 10 *formae speciales* (*phaseoli*, *pisi*, *cucurbitae*, *batatas*, *radicicola*, *robiniae*, *mori*, *piperis*, *eumartii* e *xanthoxyli*) e duas raças (TOUSSOUN et al., 1961; SUGA et al., 2000; CHUNG et al., 2011; BUENO et al., 2014).

O FSSC é intensivamente estudado, mas, sua associação e possível especialização com o cafeeiro conilon ainda é desconhecida. Neste estudo, objetivou-se caracterizar molecularmente isolados de *Fusarium* spp., agentes etiológicos da murcha de fusarium em cafeeiro conilon e da fusariose em culturas de importância para o Espírito Santo e investigar a existência de especialização de *F. solani* associado à murcha de fusarium na cultura do cafeeiro conilon.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2 COLEÇÃO DE FUNGOS

Plantas de cafeeiros conilon provenientes de lavouras comerciais, com sintomas característicos de murcha de fusarium (MF) (BELAN et al., 2018) foram coletadas no estado do Espírito Santo, Brasil, e utilizadas para isolar o agente etiológico. Fragmentos do tecido vascular sintomáticos foram desinfestados com álcool 70% e hipoclorito 1%, lavados com água destilada estéril e transferidos para placas de petri contendo iscas de cenouras. Após dez dias de incubação, o micélio crescido do fungo foi transferido a placas de petri contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar). As placas foram então mantidas a 25°C com 12 horas de fotoperíodo durante 8-10 dias. Após as colônias terem sido identificadas como do gênero *Fusarium*, pela presença de macroconídios fusoides, foram então preservadas de acordo com a metodologia proposta por Castelhani (1939).

Dezesseis isolados de *F. solani*, um isolado de *F. decemcellulare* e um de *F. lateritium* foram utilizados neste estudo, sendo um isolado de *F. solani* de cafeeiros conilon (*C. canephora*), três isolados de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.), cinco isolados de maracujazeiro (*Passiflora edulis*), cinco isolados de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), dois isolados de mamoeiro (*Carica papaya*) e um isolado de *F. decemcellulare* e *F. lateritium* do cafeeiro conilon. As culturas estoque utilizadas foram derivadas de microconídios únicos a partir de isolados mistos provenientes da Micoteca do Laboratório de Epidemiologia e Manejo de Doenças de Plantas Agrícolas e Florestais (LEMP), para os isolados do cafeeiros, O Instituto Biológico (IB) da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), para os isolados obtidos das culturas do maracujazeiro e feijoeiro e pela Micoteca da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), para os isolados obtidos da pimenteira-do-reino e mamoeiro. A origem de cada isolado está descrita na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Hospedeiros e origem geográfica dos isolados de *Fusarium* spp. utilizados neste estudo

Isolado	Nome da Espécie	Hospedeiro	Ano de isolamento	Origem Geográfica
01CC	<i>Fusarium lateritium</i>	<i>Coffea canephora</i>	2018	Jeronimo Monteiro, ES, BRA
02CC	<i>Fusarium decemcellulare</i>	<i>Coffea canephora</i>	2018	Jeronimo Monteiro, ES, BRA
03CC	<i>Fusarium solani</i>	<i>Coffea canephora</i>	2018	Jeronimo Monteiro, ES, BRA
01PE	<i>Fusarium solani</i>	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2007	Pederneiras, SP, BRA
02PE	<i>Fusarium solani</i>	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2007	Bauru, SP, BRA
03PE	<i>Fusarium solani</i>	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2007	Jaú, SP, BRA
04PE	<i>Fusarium solani</i>	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2007	Borborema, SP, BRA
05PE	<i>Fusarium solani</i>	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	2007	Campos de Goytacazes, RJ, BRA
01PV	<i>Fusarium solani</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	2008	Argentina
02PV	<i>Fusarium solani</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1960	Int. Patol. INTA
03PV	<i>Fusarium solani</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-	Minas Gerais, BRA
04PV	<i>Fusarium solani</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-	Vargem Grande do Sul, SP
05PV	<i>Fusarium solani</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-	Botucatu, SP, BRA
01CP	<i>Fusarium solani</i>	<i>Carica papaya</i>	2010	Touros, RN, BRA
02CP	<i>Fusarium solani</i>	<i>Carica papaya</i>	2010	Touros, RN, BRA
01PN	<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i>	<i>Piper nigrum</i>	2009	Baião, PA, BRA
02PN	<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i>	<i>Piper nigrum</i>	2009	Baião, PA, BRA
03PN	<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i>	<i>Piper nigrum</i>	2009	Baião, PA, BRA

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

### 4.2.1 Obtenção de isolados monospóricos

A metodologia utilizada para obtenção de culturas monospóricas seguiu recomendações propostas por Leslie & Summerell (2006) com modificações. Suspensões de diluições seriadas de suspensões de esporos e transferidas a placas de petri contendo meio de cultura BDA e mantidas a 25° C durante dois dias em incubadora BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio). Um conídio germinado foi transferido para placa de petri contendo BDA e mantido a 25° C por 10 dias, com 12 horas de fotoperíodo em BOD. Os isolados monospóricos foram então preservados de acordo com a metodologia proposta por Castelhani (1939) para os testes de patogenicidade e caracterização molecular.

#### 4.2.2 Extração de DNA

Para a extração de DNA, discos de 6 mm dos isolados monospóricos repicados previamente em meio de cultura BDA foram cortados, transferidos para 50 ml de BDL (Batata Dextrose Líquida) em erlenmeyers individuais de 125 ml esterilizados, e incubados por 10 dias a 25°C no escuro, com agitação de 120 rpm (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Os micélios resultantes foram então secos em bomba de Vácuo (Bomba de Vácuo duplo Estágio, Modelo SL-62, SOLAB, Brasil), com auxílio de um funil de Büchner e papel filtro, moídos até formarem um pó homogêneo em nitrogênio líquido, com auxílio de almofariz e pistilo. O DNA foi então extraído utilizando a metodologia proposta por Doyle & Doyle (1987) e armazenado a -20°C. Finalmente, o DNA foi quantificado em Nanodrop (NanoDrop™ 2000/2000c, Waltham, Massachusetts, USA) e diluído a 40 ng.µl-1.

#### 4.2.3 Amplificação por PCR

Três regiões do DNA dos 18 isolados de *Fusarium* ssp. foram amplificadas com os primers descritos na **Tabela 2**. Determinaram-se as sequências parciais dos genes para a maior subunidade da RNA polimerase (*RPB1*), utilizando os iniciadores F7, F9 e o iniciador interno G2R, a segunda maior subunidade da RNA polimerase (*RPB2*), utilizando os iniciadores 5f2, 7cr e o gene parcial do fator de alongamento de translação 1α (*TEF1*) utilizando os iniciadores EF1 e EF2 (O'DONNELL et al., 2010). A representação esquemática das regiões *RPB1* e *RPB2* amplificadas segue no **ANEXO A**.

**Tabela 2.** Primers usados para Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e sequenciamento neste estudo

Locus	Produto Genético	Tamanho da sequência obtida (bp)	Primer		Uso <sup>b</sup>		Referência (s) da fonte
			Designação	Sequencia (5'-3') <sup>a</sup>	PCR	Sequenciamento	
<i>TEF1-α</i>	Fator de translação 1α	703-758 <sup>d</sup>	EF1	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	•	•	O'Donnell et al. (1998)
			EF2	GGARGTACCAGTSATCATG	•	•	Jaklitsch (2009)
<i>RPB1</i>	Maior subunidade da RNA polimerase	937-1600 <sup>e</sup>	F7	CRACACAGAAGAGTTTGAAGG	•	•	O'Donnell et al. (2010)
			F9	TCARGCCCATGCGAGAGTTGTC	•		O'Donnell et al. (2010)
			G2R	GTCATYTG DGT DGC DGGYTCDCC		•	Benjamin Hall <sup>e</sup>
<i>RPB2</i>	Segunda maior subunidade da RNA polimerase	855-996 <sup>f</sup>	5f2	GGGGWGAYCAGAAGAAGGC	•	•	Reeb et al. (2004)
			5cr	CCCATRGCTTG YTRCCCAT	•	•	Liu et al. (1999)

<sup>a</sup> D = A, G ou T; R = A ou G; S = C ou G; W = A ou T; Y = C ou T.

<sup>b</sup> •, Primer Usado pra o proposito indicado.

<sup>c</sup> Primer da região RPB1 (G2R) desenhado por Benjamin Hall (<http://faculty.washington.edu/benhall/>).

<sup>d</sup>, <sup>e</sup>, <sup>f</sup> - intervalo parcial de tamanho da sequência de TEF1- $\alpha$ , RPB1 E RPB2, respectivamente.

Para as regiões *RPB1*, *RPB2* e *TEF- $\alpha$*  as reações de PCR foram conduzidas usando o termociclador (VERITI 96-WELL Thermal cycler, Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) com os seguintes ciclos de amplificação: 1 ciclo inicial de 5 min a 95° C e 35 ciclos de 1 min a 94° C, 1 min a 55° C para TEF1- $\alpha$ , 60° C para RPB1 e RPB2 e 2 min a 72° C, seguidos por 1 ciclo de 10 min a 72° C. O gel de agarose utilizado na eletroforese foi a 1% (O'DONELL et al., 2010).

As reações da cadeia polimerase (PCR) foram conduzidas em uma mistura de reação de 20  $\mu$ l, contendo 1x de tampão 5x Buffer, MgCl<sub>2</sub> 1,3 mM, 0,4 mM (dNTPs), 0,2 mM de cada *primer*, 1,25 unidades de GoTaq G2 Flexi DNA polymerase (Promega®, BRA) e 120 ng.  $\mu$ l<sup>-1</sup> de DNA molde.

Os amplicons foram então purificados por precipitação com PEG 8000 e enviados para sequenciamento em ambas as direções (*forward* e *reverse*) com os mesmos pares de *primers* utilizados durante as amplificações, garantindo a integridade das sequências. Para o sequenciamento da região *RPB1* utilizou-se o *primer* interno G2R, com o intuito de cobrir o sequenciamento de toda a região amplificada (O'DONNEL et al., 2010).

Os serviços de sequenciamento foram realizados pela empresa Myleus Biotecnologia, Belo Horizonte, Brasil (<http://myleus.com/>). As sequências foram comparadas com as disponíveis no banco de dados do GenBank na página eletrônica do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e analisadas para níveis de identidade, usando o algoritmo BLASTn como análise preliminar.

#### 4.2.4 Edição e Alinhamento das sequências

Após o sequenciamento e análises de BLASTn, as sequências foram importadas para o Geneious Prime 2019.0.4 (Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand) (KEARSE et al. 2012), das quais, com base na análise dos eletroferogramas, eliminaram-se os resíduos (nucleotídeos) com baixa qualidade do sequenciamento.

Os isolados escolhidos para as diferentes regiões neste estudo (**ANEXO B**), foram selecionados para representar a morfologia conhecida e a filogenética de espécies de *Fusarium* spp., incluindo indivíduos representantes de todos os 20 complexos do

gênero (O'DONNELL et al., 2013). Estes, juntamente com as regiões amplificadas no presente estudo, foram importados para o Software Sequencher 5.4 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, EUA) para edição. Alinhamentos manuais completos das sequências foram realizados com a introdução de intervalos para compensar a presença de inserção/deleções (*indels*). Após o alinhamento de todas as sequências, estas foram cortadas em ambos os lados (5' - 3'), com o intuito de eliminar fragmentos que não foram obtidos para todas as regiões.

#### **4.2.5 Filogenia bayesiana**

As relações filogenéticas dos indivíduos de *Fusarium* spp. foram inferidas por inferência bayesiana por meio do Software MRBAYERS v3.1.2 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003), usando o banco de dados, A (*RPB1*) e B (*RPB2*), separadamente. Posteriormente, o melhor modelo de evolução molecular foi estimado para cada região pelo Software MRMODELTEST v2.3 (NYLANDER, 2004), pelo critério de informação de Akaike (AKAIKE, 2003). Para cada região gênica, o Critério de Informação de Akaike indicou os modelos mais adequados entre os 24 modelos de evolução molecular, como a seguir: GTR+I+G (*RPB1*) e GTR+I+G (*RPB1*). O parâmetro de temperatura da cadeia foi de 0,25. A amostragem foi realizada a cada 100 árvores, sendo descartadas as 250 primeiras como *burn-in*. O desvio padrão das duas corridas foi inferior a 0,01. Os valores dos tamanhos efetivos das amostras (ESS) analisados no Software Tracer v.1.5 (DRUMMOND et al. 2012) foram superiores a 200 para todas as estatísticas.

### **4.3 INOCULAÇÃO CRUZADA OU COMPARATIVA**

#### **4.3.1 Experimento de patogenicidade de *F. solani* obtido do cafeeiro conilon (*Coffea canephora*) em diferentes espécies de plantas**

Os testes de patogenicidade foram realizados utilizando-se mudas de pimenteira-do-reino (Cv. Tucunatan), mamoeiro (Cv. Aliança), feijoeiro (Cv. BRS Estilo), maracujazeiro (Cv. Sol do Cerrado) e plântulas de cafeeiros conilon (Clone CV02), sendo todas estas cultivares plantadas no estado do Espírito Santo e relatadas como hospedeiras de *F. solani*. A metodologia de inoculação utilizada foi a proposta por Belan et al. (2018), com modificações para algumas das culturas. As mudas de padrão comercial foram provenientes de viveiro comercial Terra Viva (Afonso Cláudio, ES, BRA) e os cafeeiros foram propagados por estaquia e inoculados com 2 meses de

idade. Os feijoeiros foram semeados em substrato Carolina soil® esterilizado e a inoculação ocorreu no estágio V3, aproximadamente 25 dias após a emergência, quando as plantas apresentavam a primeira folha composta.

Os testes foram conduzidos em casa de vegetação, na área experimental do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES) (-20.751182 S, -41.488741 W). O isolado O3CC, agente etiológico da murcha de fusarium em cafeeiro conilon, foi repicado em meio de cultura BDA e incubado por 10 dias em BOD a 25°C, com 12h de fotoperíodo. O número de esporos foi contado com auxílio de uma câmara de Neubauer e estas foram então ajustadas para  $1 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>.

Para as culturas do cafeeiro conilon, pimenteira-do-reino, maracujazeiro e mamoeiro a inoculação foi realizada de acordo com a metodologia de corte de raízes como proposta por Menezes et al. (1976) com as adaptações propostas por Belan et al. (2018). Assim, as mudas foram retiradas de tubetes contendo substrato, nos quais foram propagadas, e o sistema radicular foi lavado em água corrente. Os sistemas radiculares das plantas foram então seccionados a 1 cm da coifa, emergidas nas suspensões de esporos a  $1 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> durante 20 minutos e finalmente transplantadas a novos tubetes contendo substrato. Os tratamentos controle foram compostos pela imersão das raízes seccionadas em água destilada esterilizada para cada cultura. Devido à fragilidade do sistema radicular do feijoeiro, a inoculação para a cultura foi realizada pela metodologia de fermento de raiz. A metodologia consistiu no fermento das raízes ainda envazadas com uma lâmina esterilizada, onde posteriormente uma alíquota de 50 ml das suspensões de esporos  $1 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> foi distribuída sobre a superfície do substrato, próximo ao colo das plantas.

O experimento de patogenicidade foi realizado em DIC (Delineamento Inteiramente Casualizado), com cinco diferentes hospedeiros. Cada tratamento foi composto por 10 repetições e cada repetição por uma unidade amostral, caracterizando uma planta. A descrição detalhada dos tratamentos do experimento de inoculação segue no **APÊNDICE J** (Tratamentos T1 a T10).

Os tratamentos de testemunhas negativa foram compostos por plantas dos cinco hospedeiros que participaram da metodologia de inoculação de corte de raízes,

porém, emergidas em água destilada esterilizada. Cada tratamento composto por 10 repetições e cada repetição, uma unidade amostral, caracterizando uma planta (**APÊNDICE J**, T1 a T5).

Após a inoculação, as plantas foram avaliadas semanalmente, por um período de três meses, observando a manifestação de sintomas de amarelecimento, murcha, nanismos, lesões na região do caule e seca das plantas, que caracteriza a sintomatologia da fusariose para os hospedeiros em estudo (COLEMAN e, 2016; KIM et al., 2019).

#### **4.3.2 Experimento de patogenicidade de isolados de *F. solani* obtidos de diferentes hospedeiros em *Coffea canephora***

Dezesseis isolados de *F. solani*, sendo cinco de maracujazeiro (01PE, 02PE, 03PE, 04PE, 05PE), cinco de isolados de feijoeiro (01PV, 02PV, 03PV, 04PV, 05PV), dois isolados de mamoeiro (01CP, 02CP) e três isolados de pimenteira-do-reino (01PN, 02PN E 03PN) foram avaliados quanto a patogenicidade para *C. canephora* (Clone CV02) (Tabela 1).

O teste de patogenicidade foi realizado em DIC, onde a inoculação dos 16 isolados foi realizada em cafeeiros conilon (Clone CV02). Cada tratamento foi composto por 10 repetições e cada repetição por uma unidade amostral, caracterizando uma planta. Tratamentos adicionais representando as testemunhas positivas foram compostos pela inoculação dos 16 isolados em seus respectivos hospedeiros de origem. Inoculando-se nos hospedeiros: pimenteira-do-reino (01PN, 02PN E 03PN), mamoeiro (01CP, 02CP), feijoeiro (01PV, 02PV, 03PV, 04PV, 05PV), maracujazeiro (01PE, 02PE, 03PE, 04PE, 05PE). A descrição detalhada dos tratamentos do experimento de inoculação segue no **APÊNDICE J** (T11 a T40).

Os tratamentos testemunha negativa foram compostos por plantas dos quatro hospedeiros que participaram da metodologia de inoculação de corte de raízes, entretanto, emergidas em água destilada esterilizada. Cada tratamento composto por 10 repetições e cada repetição, uma unidade amostral, caracterizando uma planta Tratamentos (**APÊNDICE J**, T1 a T5).

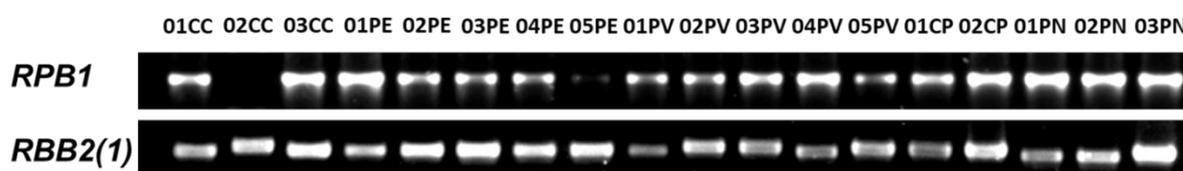
Após a inoculação, as plantas foram avaliadas semanalmente, por um período de três meses, observando a manifestação de sintomas de amarelecimento, murcha, nanismos, lesões na região do caule e seca das plantas, que caracteriza a

sintomatologia característica da fusariose para os hospedeiros em estudo (COLEMAN e, 2016; BELAN et al., 2018; KIM et al., 2019).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS LOCI *RPB1*+*RPB2* PARA OS ISOLADOS DE *Fusarium* spp. OBTIDOS DE *Coffea canephora*, *Passiflora edulis*, *Phaseolus vulgaris*, *Piper nigrum* E *Caryca papaya*.

As sequências amplificadas das regiões *RPB1* e *RPB2* dos isolados de *Fusarium solani*, *F. lateritium* e *F. decemcellulare* patogênicos ao cafeeiro conilon e dos isolados de *F. solani* patogênicos às demais culturas em estudo, geraram fragmentos de 937 a 958 pb (*RPB1*) e 855 a 996 pb (*RPB2*) de comprimento, evidenciados na eletroforese (**Figura 1**). Para a padronização do ponto inicial e final do alinhamento das sequências, incluindo espécies de grupos externos (*Fusarium* spp.) obtidas no GenBank, removeu-se os nucleotídeos em excesso nas extremidades 5' e 3'. Assim, foram obtidas sequências com comprimento de 992 pb para *RPB1*, e 698 para *RPB2*. As sequências concatenadas dos fragmentos das duas regiões geraram sequências de 1620 pb de comprimento.



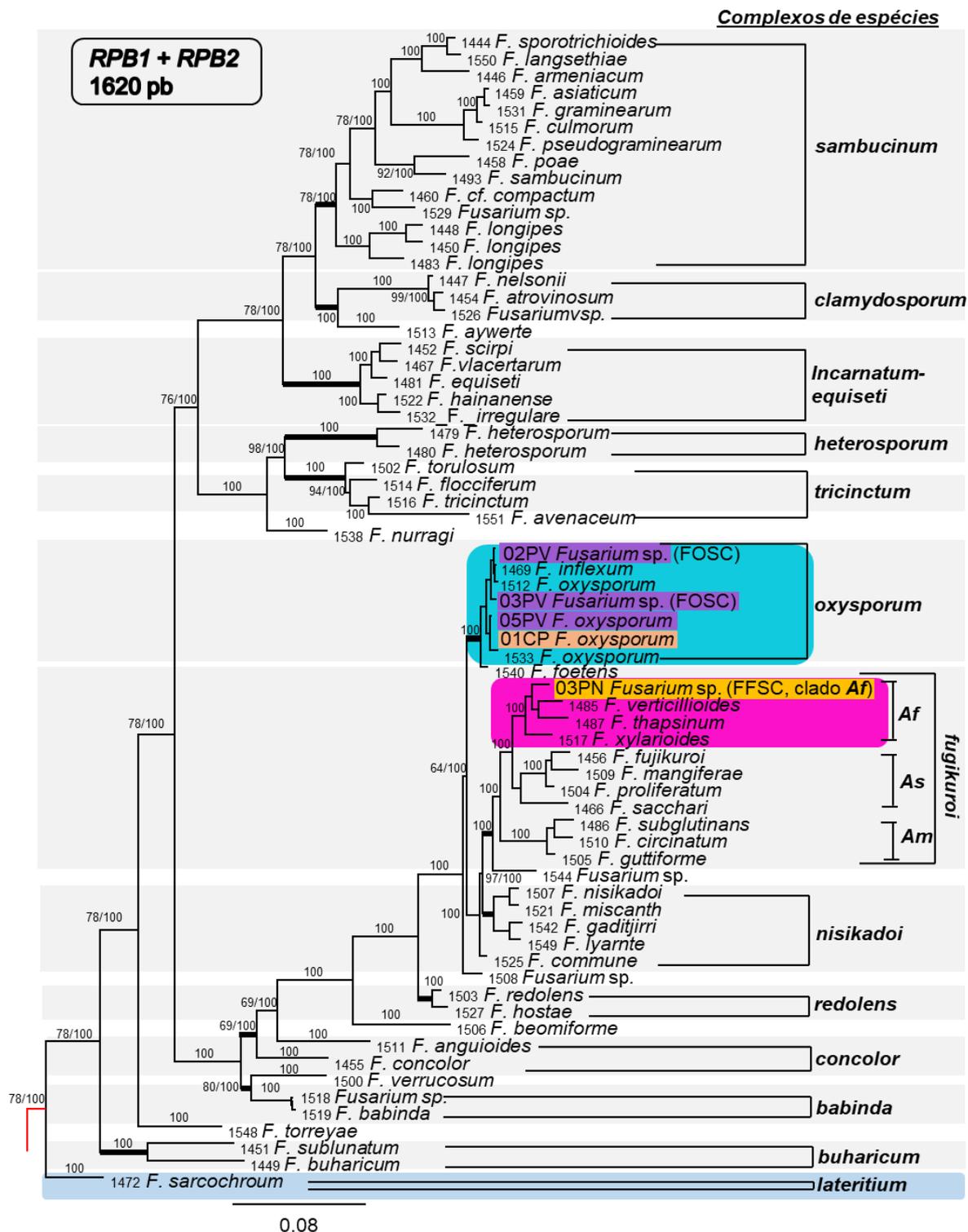
**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose a 1% dos isolados de *Fusarium* spp. presentes neste estudo para as regiões de *RPB1* e *RPB2* amplificadas. As bandas conferem as regiões amplificadas de 937 a 958 pb de comprimento para *RPB1* e de 855 a 996 pb de comprimento para *RPB2*. A segunda coluna do fragmento da região *RPB1* representa a não amplificação para o isolado 02CC *Fusarium* sp. (FdecSC).

Foram geradas árvores filogenéticas para cada região genômica em estudo, com exceção de *TEF1-α*. A maior subunidade da RNA polimerase (*RPB1*) (**APÊNDICE A**) e a segunda maior subunidade da RNA polimerase (*RPB2*) (**APÊNDICE B**) separadamente, e a concatenada para as duas regiões (**Figura 2**).

A melhor estimativa da filogenia dos isolados de *Fusarium* spp. em estudo segue na **Figura 2**, cuja árvore é a com maior probabilidade *a posteriori*. Neste estudo, foram incorporados 18 isolados de *Fusarium*, dos quais, 16 destes supostamente fazem parte do Complexo *Fusarium solani* (FSSC), 1 do complexo *F. lateritium* (FlatSC) e 1

do complexo *F. decemcellulare* (FdecSC). As demais 110 sequências, representando indivíduos de todos os complexos de *Fusarium*, foram retiradas do *GenBank*.

Há um padrão de variação genética que agrupou os isolados com base na afinidade filogenética dos indivíduos, caracterizado pela similaridade das sequências das regiões em estudo, sendo representada por indivíduos pertencentes a todos os complexos de *Fusarium*. Além disso, 19 dos 20 internódios correspondentes aos cladogramas dos 20 complexos foram fortemente suportados pela análise de *bootstrapping a posteriori*, com valores superiores a 70%. Apenas o Complexo *concolor*, apresentou resultado considerado médio (69% de *bootstrapping*).



**Figura 2** – Árvore filogenética de indivíduos de *Fusarium* spp. gerada a partir da concatenação de fragmentos da região RPB1 e RPB2 por inferência bayesiana, gerando a árvore com maior probabilidade a *posteriori*. A árvore foi enraizada com a espécie *Hypocrea* sp. (*Hypocreaceae*). Cada espécie é identificada por um número de acesso exclusivo compatível com o número de acesso do *GenBank* (ANEXO C – Tabela complementar 2). Ramos pretos espessados identificam seis linhagens basais não-*Fusarium* (destacadas em verde claro) e 20 complexos de espécies com nomes informais e fortemente apoiados no *Fusarium* (= *Terminal Fusarium Clade* [TFC] sensu GRÄFENHAN et al., 2011; O'DONNELL et al., 2013). Números acima dos internódios representam suporte a *bootstrap* pela probabilidade *posteriori*, somente um único valor é indicado quando eles eram idênticos. Ramos espessados em vermelho identificam dois internódios que não são suportados pelo *bootstrapping* da estatística *posteriori* (suporte <70%). Três subclados biogeograficamente estruturados no complexo de espécies de *fujikuroi*

são identificados da seguinte forma: **As** = Asiático, **Af** = Africano, **Am** = Americano. Asteriscos pretos em negrito destacam os três clados referentes à subdivisão do complexo *Fusarium solani* (FSSC). O comprimento dos ramos é indicado pela escala na base da árvore. A identificação da espécie na árvore representa o “Terminal Fusarium Clade” monofilético (TFC) em que foram agrupadas.

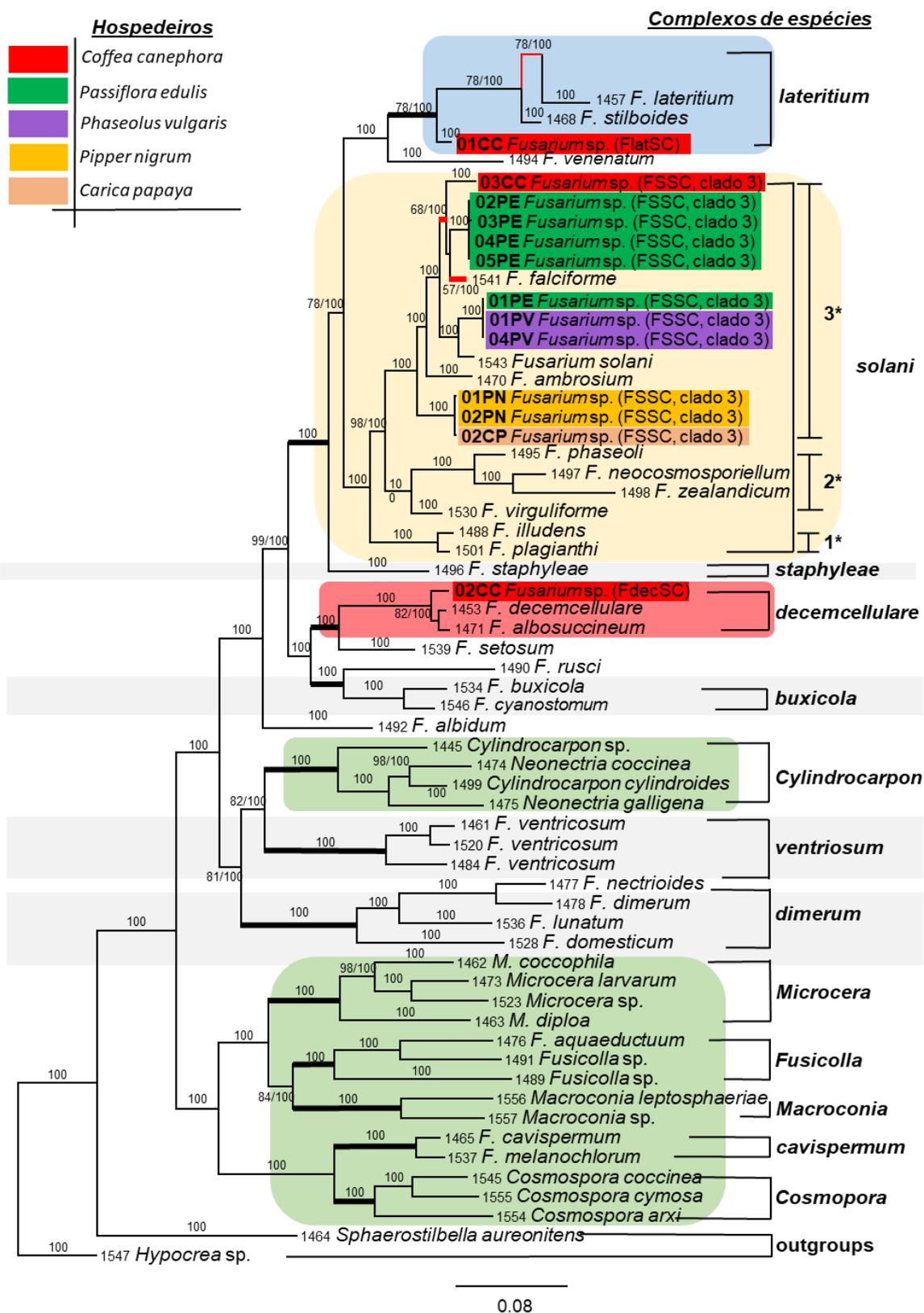


Fig. 2 (continuação)



para o agrupamento da espécie *F. faciforme* (57% de *bootstrapping*) na filogenia de *RPB1+RPB2*, sendo esta a espécie que apresenta ancestral comum mais próximo com 03CC, 02PE, 03PE, 04PE e 05PE.

Os isolados 01PE, 01PV e 04PV agruparam-se em um TFC pertencente ao FSSC, clado 3, entretanto, em nenhum TFC representado pelas espécies até então descritas do FSSC. Os isolados 01PN, 02PN e 02CP agruparam-se no clado 3 do FSSC, com maior proximidade da espécie *F. ambrosium*. Os isolados 02PV, 03PV, 05PV e 01CP, obtidos das culturas do feijoeiro e mamoeiro se agruparam no complexo *oxysporum* (FOSC), sendo *F. oxysporum* a principal espécie representante, juntamente com a espécie *F. inflexum*. Estes resultados foram obtidos na filogenia concatenada de *RPB1+RPB2* (**Figura 1**) e de *RPB1* (**APÊNDICE A**).

O isolado 03PN, responsável por causar a morte da pimenteira-do-reino em quatro semanas se agrupou no clado pertencente ao complexo *fugikuroi*, com maior proximidade da espécie *F. verticillioides*, pertencente ao subclado **Af**, que classifica indivíduos biogeograficamente estruturados do continente africano.

Com base na filogenia da **Figura 2**, os isolados em estudos pertencem a diferentes espécies e em muitos casos complexos diferentes do FSSC, assim, denominam-se de forma geral como isolados de *Fusarium* spp., devido à nova classificação. Todos os isolados de *Fusarium* spp. obtidos das culturas do maracujazeiro, feijoeiro, pimenteira-do-reino e mamoeiro tiveram alto suporte estatísticos em seus respectivos agrupamentos, com 100% de *bootstrapping* pela probabilidade a *posteriori* bayesiana.

Na filogenia obtida para a região *RPB2*, separadamente, o agrupamento de diversos indivíduos, realçados em amarelo escuro no **APÊNDICE B**, foram comprometidos, divergindo dos reais complexos em que fazem parte, assim como em complexos separados em subclados, como o FSSC e o complexo *fugikuroi* (FFSC), em que os indivíduos foram agrupados erroneamente, dificultando a discriminação destas espécies. Além disso, uma das espécies utilizadas como “*outgroup*” (*Sphaerostilbella aureonitens*) foi agrupada no complexo *Cylindrocarpon*, do qual não faz parte.

## 5.2 INOCULAÇÃO CRUZADA OU COMPARATIVA

### 5.2.1 Patogenicidade de *Fusarium solani* (03CC), agente etiológico da murcha de fusarium em cafeeiros conilon, em hospedeiros diversos

A patogenicidade de *Fusarium solani* (03CC) foi testada utilizando a metodologia de inoculação de suspensão conidial. As suspensões de esporos eram compostas por microconídios e macroconídios fusoides septados como descritos por Belan et al. (2018). Um mês após a inoculação com o isolado 03CC, as plantas de *Coffea canephora* (Clone CV02) apresentaram sintomas de amarelecimento generalizado de folhas e ramos, e após dois meses da inoculação, esses sintomas progrediram para sintomas iniciais de seca, a partir do colo das plantas. No mesmo período, as plantas do tratamento testemunha negativa (plantas em que foram realizados os cortes nas raízes e imersas em água destilada esterilizada) permaneceram verdes e assintomáticas (**APÊNDICE D**). Além disso, um atraso quanto ao crescimento foi constatado quando comparado à testemunha negativa (**APÊNDICE D**, imagem C).

Os sintomas da doença, conforme descritos anteriormente, não ocorreram nas plantas de *Passiflora edulis* (Cv. Sol do Cerrado), *Phaseolus vulgaris* (Cv. BRS Estilo), *Piper nigrum* (Cv. Tucunadan) e *Carica papaya* (Cv. Aliança). Assim, o isolado 03CC foi patogênico apenas às plantas de cafeeiro conilon, em relação aos demais tratamentos que permaneceram assintomáticos, logo, semelhantes às testemunhas negativas (**APÊNDICE D, E, F e G**).

### 5.2.2 Patogenicidade de *Fusarium solani* obtido de outros hospedeiros em *coffea canephora* (Clone CV02)

Os Isolados de *Fusarium* spp. obtidos de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum*) promoveram sintomas de amarelecimento nas mudas de cafeeiros decorridos dois meses após a inoculação. Entretanto, diferente do tratamento em que as mudas de cafeeiro foram inoculadas com o isolado 03CC, não houve progresso dos sintomas para seca do colo das plantas.

Jás as plantas de pimenta-do-reino, uma semana após a inoculação com os isolados 01PN e 02PN, apresentaram sintomas de amarelecimento e, decorrido três semanas da inoculação, houve a morte das mesmas. As plantas inoculadas com o isolado 03PN, levaram três semanas para apresentarem os sintomas de amarelecimento e

quatro semanas para morrerem, confirmando uma menor agressividade desse isolado quando comparado aos isolados 01PN e 02PN (**APÊNDICE E**).

As testemunhas negativas de cafeeiros e pimenteiros-do-reino permaneceram assintomáticos durante o teste, assim como o tratamento de pimenteira-do-reino inoculada com o isolado 03CC, que não apresentou sintomas de amarelecimento e/ou crescimento paralisado (nanismo) (**APÊNDICE D e E**).

As mudas de cafeeiro inoculadas com os isolados obtidos de maracujazeiros (*Passiflora edulis*) (01PE, 02PE, 03PE, 04PE, 05PE), após dois meses da inoculação do experimento, apresentaram sintomas de amarelecimento generalizado, assim como crescimento reduzido quando comparadas às testemunhas negativas, caracterizando patogenicidade dos isolados obtidos de *P. edulis* às plantas de *C. canephora* (Clone CV02), entretanto, não houve manifestação de sintomas de seca, como constatado nas mudas de cafeeiro inoculadas com o isolado 03CC.

Nas plantas de maracujazeiros inoculados com seus respectivos patógenos, houve paralização total do crescimento das plantas, que foi constatada duas semanas após a inoculação, sintoma este que se manteve até o quarto mês do experimento, quando comparadas à testemunha negativa e ao tratamento de maracujazeiro inoculado com o isolado de *F. solani*, obtido de cafeeiros conilon (03CC), que não paralisaram o crescimento e nem manifestaram sintomas de amarelecimento, permanecendo totalmente assintomáticos (**APÊNDICE F**).

As mudas de cafeeiro conilon inoculadas com os isolados obtidos do mamoeiro (01CP e 02CP) apresentaram sintomas de amarelecimento generalizado de ramos e folhas, após um mês da inoculação, quando comparado à testemunha negativa, em que os cafeeiros permaneceram verdes e assintomáticos. Entretanto, assim como os tratamentos anteriores, onde foram inoculados isolados obtidos de pimenteira-do-reino e maracujazeiro em cafeeiros conilon, não ocorreu sintoma de seca, iniciando a parte do colo das plantas de cafeeiros, sintoma este evidenciado nos cafeeiros inoculados com o isolado 03CC, agente etiológico da murcha do cafeeiro conilon (**APÊNDICE G e C**).

As plantas de mamoeiro inoculados com seus respectivos patógenos, apresentaram os sintomas duas semanas após a inoculação, iniciando com amarelecimento generalizado e perdas foliares, progredindo para lesões necróticas no caule das

plantas e senescência ao final de quatro semanas após a inoculação. Por conseguinte, este comportamento foi constatado apenas para o tratamento inoculado com o isolado 01CP, onde o tratamento inoculado com o isolado 02CP permaneceu assintomático. Desta forma, o tratamento testemunha negativa, assim como o tratamento de mamoeiro inoculado com o isolado 03CC e 02CP permaneceram assintomáticos, não manifestando nenhum dos sintomas descritos anteriormente (**APÊNDICE G**).

Quanto aos isolados obtidos do feijoeiro inoculados em mudas de cafeeiro conilon, após três meses de condução dos testes de patogenicidade, foi constatada a não manifestação de sintomas relacionados à murcha de fusarium ou fusariose, assim, os cafeeiros permaneceram verdes e assintomáticos, quando comparados à testemunha negativa, assim como os tratamentos que manifestaram sintomatologia característica da doença (**APÊNDICE I**). Os isolados de feijoeiro inoculados em seu respectivo hospedeiro também não manifestaram sintomatologia característica da fusariose, permanecendo verdes e assintomáticos, quando comparados ao tratamento de controle negativo e o inoculado com isolado 03CC (**APÊNDICE H**).

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Para a identificação precisa de espécies do gênero *Fusarium* spp. e suas respectivas especializações em nível de hospedeiro (*formae speciales*) e/ou cultivar (raças) sugere-se que além da caracterização de critérios morfológicos e culturais, sejam realizados testes de patogenicidade em diferentes hospedeiros e análises de filogenia das regiões *TEF1- $\alpha$* , *RPB1* e *RPB2*, que são descritos como marcadores universais do gênero, aplicáveis em toda a sua extensão e informativos para diversos grupos de fungos (SCHOCH et al., 2009; O'DONNELL et al., 2013).

Porém, como constatado na filogenia da região dos *loci RPB1+RPB2* associada à classificação morfológica de *Fusarium* proposta por Gerlach & Nirenberg (1982) (**APÊNDICE C**) a discriminação de espécies com base apenas na morfologia é inapropriada, pois espécies do mesmo complexo podem apresentar mesma morfologia, como integrantes do FSSC. Além disso, espécies pertencentes a complexos diferentes ainda podem apresentar o mesmo padrão morfológico. Neste sentido, a característica é inapropriada para discriminar isolados não só **em** nível de espécie, mas como de complexos (O'Donnell et al., 2013).

O'Donnell et al. (2013) reforçam que estudos de morfologia macroconidial, usualmente utilizada para o gênero, podem se mostrar artificiais, pois a característica não é considerada sinapormórfica, não obedecendo a um padrão para diversos grupos e apresenta elevada instabilidade fenotípica, ou seja, indivíduos pertencentes à mesma espécie podem apresentar variação morfológica relacionada principalmente a fatores ambientais. Além disso, são morfológicamente indistinguíveis de indivíduos não patogênicos e espécies de um mesmo complexo (FRAVEL et al., 2003; GRÄFENHAN et al., 2011; EDEL-HERMANN, 2019).

A identificação de espécies de *Fusarium* não é fácil. Neste sentido, pesquisadores têm dado preferência a técnicas moleculares de identificação, sendo bem-sucedidos há mais de 10 anos, com base em marcadores moleculares de banda e o polimorfismo existente em fragmentos de genes, que apesar de serem conservados para o gênero, apresentam polimorfismo capaz de discriminar espécies de *Fusarium* spp., como *TEF1- $\alpha$* , *RPB1* e *RPB2* (WUFF et al., 2010; O'DONNELL et al., 2013).

O BLASTn realizado com os fragmentos das sequências obtidas das regiões *RPB1* e *RPB2* dos isolados em estudo, no Banco de dados do GenBank, mostrou alta similaridade com os agrupamentos obtidos na filogenia expressa na **Figura 2, mas**, em sua maioria, não houve descrição da espécie, identificando-as apenas como membro dos complexos em evidência no presente estudo. Além disso, quando identificada a espécie, houve complexidade em se determinar a real identidade do isolado, devido à semelhança entre a pontuação máxima de identidade das espécies intimamente relacionadas.

No presente estudo, as relações filogenéticas entre as espécies representantes de todos os complexos do gênero *Fusarium* spp. foram congruentes com aquelas descritas previamente, corroborando com a filogenia obtida por O'Donnell et al. (2013) e Waalwijk et al. (2018). Assim, o comprimento reduzido das regiões concatenadas *RPB1* e *RPB2* amplificadas, de 1660 pb, não comprometeu o agrupamento para os indivíduos nos seus respectivos complexos, quando comparado aos resultados obtidos por O'Donnell et al. (2013), em que o somatório das regiões amplificadas de *RPB1* e *RPB2* foi de 3383 pb de comprimento. Os autores relatam que a filogenia de *RPB1+RPB2* fornece a primeira filogenia robusta em todo o gênero, onde a maioria dos clados identificados ultrapassa os limites seccionais até então relatados nas filogenias realizadas para *Fusarium* spp.

Para alguns poucos indivíduos, houve divergência quanto às relações filogenéticas para a filogenia dos *loci RPB1+RPB2*, quando comparados aos estudos de O'Donnell et al. (2013). A espécie *F. neocosmosporiellum* se agrupou no clado 2, quando esta não pertence a nenhum dos subclados até então descritos no FSSC e a espécie *F. zealandicum* que se agrupou também no clado 2 do FSSC, em divergência do complexo que realmente pertence (*staphyleae*). De forma geral, o polimorfismo dos fragmentos das regiões amplificadas foi suficiente para discriminar as espécies do gênero *Fusarium* spp., agrupando-as nos seus respectivos complexos.

Para alguns poucos complexos, como FSSC, FlatSC e o complexo *staphyleae* os agrupamentos da filogenia isolada do *locus RPB1* se apresentou mais congruente com filogenias anteriormente realizadas, que apresentam suporte mais robusto quanto à quantidade de informações (pares de bases) (O'DONNELL et al., 2013; O'DONNELL et al. 2015; WAALWIJK et al., 2018). Além disso, apresentou melhor suporte

estatístico pelas análises de *bootstrapping*, neste sentido, para estes complexos, a filogenia de *RPB1* é completa e mais confiável.

Os agrupamentos indevidos na filogenia concatenada, portanto, estão relacionados ao *locus RPB2*, que como constatado na filogenia isolada do *locus* (**APÊNDICE C**), houve diversas divergências quanto aos agrupamentos de muitas espécies, que além disso, agrupou a espécie *Sphaerostilbella aureonitens* no clado *Cylindrocarpon*, caracterizada como uma das espécies “*outgroup*” e, portanto, com maior distância filogenética dos complexos em estudo. Neste sentido, a filogenia do *locus RPB2* não é confiável, não devendo ser analisada isoladamente.

A filogenia das regiões concatenadas apresenta melhor uniformidade quanto a distribuição dos complexos e suas relações filogenéticas, comparando-se aos estudos anteriores de O’Donnell et al. (2013), que caracterizam conseqüentemente as suas relações evolutivas. Neste sentido, quanto à discriminação de espécies, as duas filogenias, tanto a concatenada quanto a de *RPB1* são representativas e coerentes, mas em estudos evolutivos de espécies do gênero, a filogenia concatenada dos *loci* deve ser priorizada.

O isolado 01CC se agrupou no complexo *lateritium*, com maior proximidade da espécie *F. stilboides*, esta relatada por Gordon et al. (1956) primeiramente como patogênica ao *Coffea* sp. e confirmada como patogênica *C. canephora* por Serani et al. (2007). O agrupamento do presente estudo para o indivíduo corrobora com os resultados da análise de BLASTn em relação ao complexo ao qual foi agrupado. Na busca de se identificar a identidade da espécie do isolado em estudo, este não se agrupou com nenhuma das três espécies até então caracterizadas na filogenia do presente estudo.

O complexo *lateritium* atualmente é representado por 11 espécies filogeneticamente distintas, destas, apenas 3 apresentam nomenclatura binomial (*F. lateritium*, *F. stilboides* e *F. sarcochroum*), estando representadas na filogenia deste estudo (O’DONNELL et al. 2015). Assim, o isolado em estudo (01CC) não apresentou monofília com as espécies descritas. Neste sentido, o isolado é considerado filogeneticamente distinto dos indivíduos com taxonomia binomial no complexo, classificando-se com *Fusarium* sp. (FlatSC).

O isolado 02CC se agrupou no complexo *decemcellulare* (FdecSC), corroborando com a análise de BLASTn para as três regiões em estudo, entretanto, pela interpretação da filogenia da **Figura 1**, as espécies *F. decemcellulare* e *F. albumsuccineum* foram estritamente mais relacionadas entre si, quando comparadas ao isolado do cafeeiro. Assim, o isolado em estudo (02CC), apesar de ter o mesmo ancestral comum mais recente relacionado ao clado que comporta as duas espécies, não apresentou monofilia com nenhuma das mesmas.

O FdecSC é representado por 10 espécies filogeneticamente distintas, em que apenas duas delas, representadas na filogenia do presente estudo, apresentam nomenclatura binomial. Como o isolado obtido de cafeeiros conilon (02CC) não apresentou monofilia com nenhuma destas espécies, assim a nomenclatura atual do mesmo deve ser *Fusarium* sp. (FdecSC).

Na análise bayesiana da região *RPB1+RPB2* o isolado 03CC foi agrupado no clado 3 do FSSC, entretanto, em divergência do clado pertencente a *F. solani*, previamente identificado pelas análises de BLASTn realizadas por Belan et al. (2018) para a região *TEF1-α* e com a das regiões do presente estudo realizadas no banco de dados do GenBank.

Análises de BLASTn exigem uma análise “cuidadosa” dos principais “hits”, pois muitas das sequências depositadas no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), *Fusarium* ID (<http://isolate.fusariumdb.org/guide.php>, GEYSER et al., 2004) e *Fusarium* MLST (<http://fusarium.mycobank.org/>), principais plataformas relacionadas para esta abordagem, são identificadas incorretamente, estão em sua maioria caracterizadas apenas em nível de gênero e a taxonomia de muitos indivíduos está desatualizada (BIDARTONDO et al. 2008; KANG et al. 2010).

O FSSC é composto por mais de 60 espécies filogeneticamente distintas, sendo que apenas oito possuem uma nomenclatura binomial (*F. falciforme*, *F. solani*, *F. ambrosium*, *F. neocosmosporiellum*, *F. phaseoli*, *F. firguliforme*, *F. illudens* e *F. plagiathanthi*). Desta forma, o isolado em estudo (03CC) é caracterizado como representante do clado 3 do FSSC, **que**, não apresentou monofilia com nenhum dos indivíduos com nomenclatura binomial do FSSC, representados na filogenia do presente estudo. Neste sentido, o isolado deve ser classificado como *Fusarium* sp. (FSSC, Clado 3), caracterizando espécies filogeneticamente distintas pouco descritas.

Para o isolado 03CC, *F. falciforme* foi a espécie do complexo mais próxima, apresentando suporte estatístico médio pelo *bootstrapping a posteriori* bayesiano. Quando comparado à filogenia obtida por O'Donnell et al. (2013) em análises de Máxima Parcimônia (MP) e Inferência Bayesiana (IB), o indivíduo apresentou a mesma posição quanto ao seu agrupamento, com o mesmo ancestral comum mais recente (*F. solani*). Nesta análise, a filogenia do *locus RPB1* deve ser priorizada, pois para espécies do FSSC, a distribuição foi melhor suportada pelo *bootstrapping* e corrobora com estudos previamente descritos, assim, o ancestral comum mais recente para o 03CC é *F. solani* (**APÊNDICE B**).

Para os isolados que se agruparam no FSSC, o polimorfismo das regiões de *RPB1* e *RPB2* concatenadas, com exceção do isolado 03CC, não foi suficiente para discriminar espécies filogeneticamente distintas de *Fusarium* spp. com base em seus respectivos hospedeiros, sendo capaz de separar apenas em nível de espécie.

Segundo Edel-Hermann et al. (2019), O Espaçador Interno Transcrito (ITS) é proposto como “barcode” universal para identificação de espécies do gênero, entretanto, a região tem sido relatada como incapaz de identificar todas as espécies de forma inequívoca. Assim, *TEF1- $\alpha$* , *RPB1* e *RPB2* são *loci* filogeneticamente informativos de *Fusarium* e permitem a identificação de espécies, principalmente quando analisados em conjunto (O'DONNELL et al., 2015). Espécies de *Fusarium* que possuem especificidade em nível de hospedeiro, necessitam de marcadores específicos, tendo atualmente como alvo estudos relacionados a genes efetores ou genes que de forma geral são relacionados à patogenicidade (EDEL-HERMANN et al., 2019).

Os isolados 02PE, 03PE, 04PE E 05PE formaram um TFC caracterizando a mesma espécie filogeneticamente distinta, com maior proximidade da espécie *F. falciforme*, devido ao ancestral mais comum suportado tanto para a filogenia de *RPB1* quanto a concatenada de *RPB1+ RPB2*. Os isolados 01PE, 03PN e 04CP formaram um TFC, representando uma única espécie filogenética e com maior proximidade da espécie *F. solani*. Assim como os isolados 01PN, 02PN e 03CP que formaram um único TFC, sendo representantes próximos as espécies *F. solani* e *F. ambrosium*. Neste sentido, estes indivíduos não são representados pelas espécies com nomenclatura binomial presentes na filogenia deste estudo, sendo, portanto, classificados como *Fusarium* sp. (FSSC, Clado 3).

Parte dos isolados em estudo, obtidos dos demais hospedeiros e providos pela micoteca da UFRPE e O Instituto Biológico (IB) da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) são pertencentes de outras espécies não representantes do FSSC. Quatro isolados necessitaram de uma reclassificação, assim, os isolados obtidos do feijoeiro (02PV, 03PV e 05PV) e mamoeiro (01CP) agruparam no FOOSC, que devido ao ancestral comum mais recente classificaram-se como *F. oxysporum* e *Fusarium* sp. (**Figura 1**). Para os indivíduos que se agruparam no FOOSC, houve suporte pela análise de BLASTn.

O isolado 03PN, previamente descrito como *F. solani* f. sp. *piperis*, se agrupou no complexo *fugikuroi* (FFSC), com maior proximidade filogenética das espécies *F. verticillioides* e *F. thapsinum*. Estes resultados são suportados pela análise de BLASTn, que obteve maior identidade com espécie *F. pseudocircinatum*, um dos representantes do FFSC, não presente na filogenia em estudo, com 99,9% de identidade para *RPB1* e 95% de identidade para *RPB2*.

Além disso, a espécie até então descrita como *F. pseudocircinatum* pelas análises de BLASTn e como representante do FFSC pela filogenia do presente estudo, não é relatada na literatura em associação com a espécie *Pipiper nigrum*. Assim, para esse isolado, necessita-se de estudos mais aprofundados quanto às suas relações filogenéticas, incluindo as regiões amplificadas de *RPB1* e *RPB2* de indivíduos de *F. pseudocircinatum* e demais espécies com classificação binomial na análise de filogenia, com o intuito de confirmar se a espécie descrita pela análise de BLASTn é de uma espécie com nomenclatura binomial descrita ou se está representada em uma das 34 espécies filogeneticamente distintas atualmente sem nomenclatura binomial do FFSC (LAWRENCE et al., 2015).

Os isolados fornecidos por instituições externas do presente estudo foram caracterizados previamente, descritos na **Tabela 2**, sendo indivíduos da espécie *F. solani*, mas, com base nos estudos da filogenia dos *loci RPB1+RPB2* uma nova nomenclatura é sugerida, sendo representada na **Figura 2**. Neste sentido, sugere-se que a identificação anterior dos isolados não seguiu análises mais completas para identificação destas espécies, como filogenia, sendo atualmente relatada como a metodologia mais suportada para a identificação de espécies do gênero *Fusarium* spp.

O uso da filogenia é indispensável em estudos de taxonomia, principalmente em complexos como o FSSC, onde o compartilhamento de caracteres morfológicos pode se mostrar indistinguível para indivíduos de complexos em comum e em muitos casos para complexos diferentes (**APÊNDICE C**), e, além disso, demandam elevados conhecimentos taxonômicos envolvidos da morfologia macroconidial de *Fusarium* spp. No presente estudo, os isolados obtidos das plantas das culturas do maracujazeiro e feijoeiro não produziram macroconídios, assim, a utilização da ferramenta de identificação não foi possível.

A identificação de espécies é primordial no programa de manejo de doenças em plantas, que exigem métodos moleculares de identificação, devido principalmente a sua precisão, rapidez, e a elevada especificidade do patógeno que pode classificar indivíduos em nível de raças, caracterizando a especificidade em nível de cultivares, casos muito comuns em FSSC e FOSC (COLEMAN et al., 2016; EDEL-HERMANN et al., 2019).

Neste trabalho também se constatou que as diferentes linhagens filogenéticas de *Fusarium* spp. patogênicas ao maracujazeiro, mamoeiro e pimenteira-do-reino são capazes de gerar sintomas em cafeeiros conilon (Clone CV02), o que caracteriza a não-especificidade dessas linhagens aos seus respectivos hospedeiros. Apesar do agrupamento dos isolados de *Fusarium* spp. obtidos de *C. canephora* em FlatSC (01CC), FdescSC (02CC) e FSSC (03CC), previamente propostos por Belan et al. (2018), a extensa gama de linhagens filogenéticas do gênero dificulta a adequada taxonomia de linhagens individuais, principalmente as que não foram devidamente descritas com nomenclatura binomial, sendo necessário a denominação *Fusarium* sp.

De forma geral, para os isolados que na filogenia do presente estudo não foram representados pelas espécies descritas existem duas possibilidades: serem representantes de espécies filogeneticamente distintas já descritas, porém sem nomenclatura binomial ou serem possíveis novas linhagens filogenéticas que necessitam ser caracterizadas. Neste sentido, existe a necessidade de grupos maiores de isolados representantes das três espécies patogênicas ao cafeeiro conilon, dos quais devem ser realizadas compilações das características morfológicas e filogenéticas para determinar a possibilidade de uma nova espécie filogeneticamente distinta, além das regiões amplificadas de todas as linhagens dos complexos para as regiões em estudo nas análises de filogenia.

É importante que os representantes do gênero *Fusarium* spp. tenham uma taxonomia estável com conceitos genéricos e de espécies bem definidos, facilitando a diagnose de doenças. Entretanto, ao todo, mais 300 espécies filogeneticamente distintas foram identificadas para o gênero *Fusarium* spp, onde atualmente, apenas metade destas é devidamente descrita (SUMMERELL et al., 2019). Neste estudo, foi possível caracterizar fragmentos de regiões capazes de discriminar espécies filogeneticamente distintas para isolados de *Fusarium* spp. obtidos do cafeeiro conilon, assim como para isolados obtidos do maracujazeiro, feijoeiro, pimenteira-do-reino e mamoeiro, com base nas suas relações filogenéticas com espécies previamente descritas.

## 6.2 INOCULAÇÃO CRUZADA OU COMPARATIVA

*Fusarium* spp. tem sido relatado como agente etiológico da murcha de fusarium em cafeeiro conilon no estado do Espírito Santo, mas, sua patogenicidade em diferentes hospedeiros não é conhecida. O isolado de *Fusarium* obtido de cafeeiro conilon apresenta especificidade em nível de hospedeiro, não proporcionando o desenvolvimento da doença em plantas das espécies *Passiflora edulis* (Cv. Sol do Cerrado), *Phaseolus vulgaris* (Cv. BRS Estilo), *Piper nigrum* (Cv. Tucunadan) e *Carica papaya* (Cv. Aliança), cultivares cultivadas no estado do Espírito Santo e confirmadas como hospedeiros de fungos do FSSC.

Experimentos de patogenicidade são essenciais na classificação e taxonomia de espécies de *Fusarium*, principalmente quando há suspeita de uma possível especialização do indivíduo ou na descoberta de novos patossistemas, como no presente estudo. Desta forma, os testes de patogenicidade devem ocorrer nas espécies vegetais de origem, assim como em demais possíveis hospedeiros, com o intuito de confirmar sua especificidade (EDEL-HERMANN, 2019).

A especificidade em nível de hospedeiro de um determinado patógeno, como a observada no presente estudo para *C. canephora* (Clone CV02) associada a *F. solani*, pode ser explicada por características relacionadas ao ambiente, patógeno e hospedeiro, evoluindo em diferentes cenários (HARTMANN et al., 2017). Para patossistemas como as doenças causadas por indivíduos do FSSC, a especificidade em nível de hospedeiro pode ser determinada, em grande parte, devido à combinação de genes relacionados a suscetibilidade ou resistência do hospedeiro e os respectivos genes efetores do patógeno (FARIS et al., 2010 ; LIU et al., 2013 ; BOURRAS et al., 2015). Van Dam et al. (2018), em estudos de comparações genômicas de genomas completos extraídos de *formae speciales* de *Fusarium* spp., constataram que o repertório de genes efetores seria o principal responsável pela especialização de fitopatógenos do gênero.

Condições ambientais, principalmente temperatura e umidade, são fatores adicionalmente determinantes na suscetibilidade do hospedeiro, assim como no desenvolvimento da doença, incluindo a necessidade de estudos epidemiológicos nestes patossistemas que considerem a influência do ambiente e reafirmem a especialização do agente etiológico (CZEMBOR et al., 2015; SCHEIDT et al., 2019).

Espécies de *Coffea* spp. (*C. canephora*, *C. arabica* e *C. liberica*) são relatadas como hospedeiros primários de indivíduos de *Fusarium* spp., responsáveis pela murcha de fusarium em países da África Central, Etiópia, República do Congo e Uganda, países onde ocorreram os primeiros relatos do declínio (WALLER et al., 2017; MUSOLI et al. 2008). Entretanto, indivíduos pertencentes a espécies de *Fusarium* spp. são relatados em diferentes hospedeiros, como *Solanum lycopersicum* e *Gossypium* spp., não tendo sido relatados para as culturas em estudo. Neste estudo, apesar da especialização relatada, a gama de possíveis hospedeiros é ampla para o FSSC, o que demanda testes de patogenicidade de possíveis hospedeiros de famílias próximas ou não, com o intuito de reafirmar uma possível especialização e sugerir uma nova *forma specialis* (COLEMAN et al., 2016).

Como realizado no presente estudo, Edel-Hermann et al. (2019) afirmam que para caracterizar especificidade de indivíduos de *Fusarium* faz-se necessário a realização de testes de patogenicidade em culturas cultivadas próximas ou cultivadas em rotação, com hospedeiros suscetíveis conhecidos. No presente estudo, a prioridade dada foi referente a culturas de importância para o Espírito Santo, e que caso fosse confirmada a patogenicidade para 03CC geraria uma preocupação direta relacionada ao manejo, pois o cafeeiro conilon é geralmente cultivado próximo a outras culturas, em policultivos e substituição de culturas (FERRÃO et al., 2018).

Para designar uma nova *forma specialis* é necessário que a espécie apresente elevada especificidade quanto ao hospedeiro, sendo restrito a uma ou poucas espécies de plantas, caso evidenciado para o patossistema em estudo. De forma geral, integrantes do FSSC são generalistas, em que isolados individuais são capazes de causar doenças em diferentes culturas de importância agrícola com distribuição mundial, sendo de famílias próximas ou não (CHUNG et al., 2011). Os resultados do presente trabalho dá indício da especialização do representante do FSSC, agente etiológico da murcha em cafeeiro conilon, sendo até então caracterizado como um patógeno não generalista.

Os isolados obtidos das demais culturas, com exceção da cultura do feijoeiro, foram capazes de causar sintomas de amarelecimento em plantas de cafeeiro conilon (Clone CV02), constatando a não especificidade destes para as suas respectivas culturas, divergindo do resultado obtido na inoculação do isolado obtido da cultura do cafeeiro conilon (03CC), que apresentou especificidade em nível de hospedeiro.

Os isolados obtidos da cultura da pimenteira-do-reino, identificados previamente como *F. solani* f. sp. *piperis* são designados como um especialista para a cultura, entretanto, foi capaz de causar sintoma de amarelecimento em cafeeiros conilon. Este resultado reafirma o obtido pela análise de filogenia (**Figura 2**), onde os isolados obtidos da cultura da pimenteira-do-reino se agruparam em diferentes TFC's, que não o de *F. solani*, caracterizando como isolados de *Fusarium* sp., não sendo, portanto, da espécie *F. solani* f. sp. *piperis*.

Além disso, até o momento, apenas espécies com nomes binomiais de *Fusarium*, sendo elas *F. solani*, *F. solani* f. sp. *piperis* e *F. oxysporum*, são caracterizadas na literatura por serem agentes etiológicos da fusariose em pimenteira-do-reino (COSTA PEREIRA et al., 2019; AARTHI, S.; KUMAR, 2019; WIRATNO et al., 2019). Neste sentido, os isolados 01PN, 02PN e 03PN podem ser caracterizados como espécies filogeneticamente distintas das descritas até o momento como agentes etiológicos da fusariose em pimenteiras-do-reino, com base na associação dos resultados obtidos nos testes de patogenicidade e análise de filogenia.

Os isolados obtidos de maracujazeiro caracterizam-se por pertencer todos ao complexo FSSC (**Figura 2**). Indivíduos do FSSC são amplamente relatados como agentes etiológicos da fusariose em maracujazeiro, (PLOETZ et al., 2006), entretanto, em seu total, como espécies já descritas como nomenclatura binomial. No presente estudo, os isolados que causaram os sintomas mais intensos de amarelecimento nas mudas de cafeeiro foram os obtidos da cultura do maracujazeiro (**APÊNDICE G**), não se enquadrando em nenhum dos TFC's representados na filogenia deste estudo.

Neste sentido, duas conclusões podem ser realizadas: novas espécies filogeneticamente distintas do FSSC causam doença no maracujazeiro e manifestam sintomas em cafeeiros conilon ou parte dos estudos anteriores, que não envolveram filogenia, discriminaram seus isolados em níveis mais basais de identificação, como estudos de BLASTn, caracterizados por isoladamente serem inadequados, ou identificação morfológica. A identificação de espécies do FSSC por morfologia macroconidial são inadequadas para discriminar espécies dentro de um complexo, como podem ser constatados no APÊNDICE D, e em muitos casos, entre representantes de complexos diferentes. No APÊNDICE D, por exemplo, a espécie *F. staphyleae*, representante do complexo *staphyleae* possui a mesma morfologia que

as espécies agrupadas no FSSC, o que caracterizaria a mesma espécie se a identificação fosse com base apenas em morfologia macroconidial.

Para os isolados de mamoeiro inoculados em plantas de cafeeiros (01CP e 02CP), apenas o isolado 01CP, da espécie *F. oxysporum* (**Figura 2**) foi capaz de gerar doença nos mamoeiros, por conseguinte, os dois isolados causaram amarelecimento nos cafeeiros. *F. oxysporum* é relatado como agente etiológico da murcha de fusarium em mamoeiros (NISHIJIMA, 1994), assim como membros do FSSC (DATHAK et al., 1976), entretanto este último não se mostrou patogênico, além disso, pertence a uma espécie filogeneticamente distinta das presentes na filogenia em estudo.

Os isolados obtidos do feijoeiro, que foram identificados como *Fusarium* sp. do FOSC e FSSC (**Figura 2**), foram considerados não patogênicos a Cultivar BRS estilo e o clone CV02 do cafeeiro conilon. A Cultivar BRS estilo é relatada por Melo et al. (2017) como hospedeiro de *Fusarium* spp., incluindo *F. solani* e *F. oxysporum*, estando entre os isolados identificados neste estudo, causando murcha e morte das plantas. Não manifestou sintomatologia da fusariose, principalmente amarelecimento relatado nos tratamentos de cafeeiros inoculados com isolados obtidos das demais culturas.

Apesar de não se poder afirmar a patogenicidade dos isolados obtidos do feijoeiro, os tratamentos inoculados com estes permaneceram verdes, assim como os tratamentos de controle negativo, contrastando com os tratamentos de cafeeiros amarelecidos, em que foram inoculados isolados obtidos das culturas do maracujazeiro, pimenteira-do-reino e mamoeiro.

Desta forma, estes tratamentos representam uma segunda testemunha mais importante que o tratamento de controle negativo, pois além do estresse abiótico do qual foi submetido o controle negativo, pelo corte das raízes da metodologia de inoculação, os tratamentos foram submetidos a um estresse de origem biótica, em que inoculou-se isolados caracterizados como não patogênicos, mas de culturas de fungos de *Fusarium* spp. que cresciam e produziam conídios, representando diferentes espécies.

De forma geral, quatro meses após a inoculação, não houve progresso dos sintomas de amarelecimento para seca ou morte das plantas, como relatado no tratamento inoculado com o isolado 03CC, com início de seca no colo das plantas dois meses após a inoculação (**APÊNDICE A**). Neste sentido, a manifestação dos sintomas de

amarelecimento pode ter sido gerada pelo estresse que as plantas foram submetidas, principalmente pela agressividade da metodologia de inoculação, podendo ter sido determinante no estabelecimento da doença.

Doenças causadas por fitopatógenos que infestam o solo, que incluem os gêneros *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp. e *Rhizopus* spp., por exemplo, necessitam, em muitos casos, de portas de entrada que exponham os tecidos mais suscetíveis na planta, como o tecido vascular comumente colonizado por *Fusarium* (COSTA et al., 2010). Assim, a danificação dos tecidos mais externos, que para muitos patossistemas está relacionado a barreiras de resistência estruturais, pode ser decisivo para o início da infecção e o posterior estabelecimento da doença (AGRIOS et al., 2005; CASTRO et al., 2010).

A inoculação por corte de raízes é uma medida drástica, porém, propícia a colonização patogênica, por expor os tecidos mais internos e conseqüentemente aumento dos pontos infectivos (GRIGOLETTI JUNIOR, 1985; POZO et al., 1999; POZO et al., 2002; AKKÖPRÜ; DEMIR, 2005). Chen et al. (2017) constataram que isolados anteriormente nunca encontrados em associação com algum hospedeiro em condições de campo apresentaram sintomatologia característica, com baixa agressividade, quando inoculados em campos de inoculação, podendo estar relacionados à agressividade da metodologia utilizada para a inoculação.

A adaptação e/ou extensão da gama de *Fusarium* sp. (03CC), agente etiológico da murcha de fusarium em cafeeiros conilon, é uma característica que deve ser amplamente estudada, assim como sua especialização, tendo resposta direta em metodologias de controle apropriadas a patógenos com ampla gama de hospedeiros (ROMBERG; DAVIS, 2007; PINARIA et al., 2010; CHUNG et al., 2011). As doenças causadas por indivíduos do FSSC são frequentemente associadas a podridões radiculares, murchas, nanismo, lesões na região do caule e seca, sendo em sua maioria cosmopolitas e disseminadas pelo solo (COLEMAN e, 2016; KIM et al., 2019). Seu controle por métodos convencionais, sendo por meio de fungicidas ou desinfestação do solo, geralmente é oneroso, de baixa eficiência e ecologicamente inviável (MCCREIGHT et al. 2003).

No caso do *Fusarium* sp. (03CC), relatou-se neste estudo a existência de especificidade para a cultura, não tendo sido constatada a doença para outras culturas

em estudo inoculadas com o isolado 03CC. Esta informação é primordial na implementação de estratégias de manejo para produtores e extensionistas, possibilitando menor preocupação na implementação de policultivos relacionados às culturas em estudo, e a possibilidade de práticas culturais de manejo, como rotação ou até substituição de culturas em regiões onde a presença do patógeno é confirmada, apesar de não ser conhecido o tempo de permanência do patógeno infestando o solo.

O cultivo do café consorciado no Espírito Santo, sombreado ou não, é de importância para pequenos e médios produtores e amplamente difundido como uma prática agroecológica, de aproveitamento do espaço entre linhas de plantio ou no aumento da qualidade do café (FERRÃO et al., 2017). Nestes sistemas, entender a associação de agentes causais com diferentes hospedeiros é fundamental, e o consórcio de culturas com espécies de mesma família ou próximas pode ser preocupante, devido à possibilidade de serem hospedeiros comuns de um determinado patógeno (BOUDREAU, 2013). Neste sentido, um dos focos deste estudo foi englobar culturas importantes para o estado e que possivelmente poderiam estar associadas ao cafeeiro conilon, gerando respostas diretas relacionadas ao manejo quanto aos patossistemas em estudo.

Quanto aos isolados obtidos dos demais hospedeiros de *Fusarium* spp. e que foram capazes de manifestar amarelecimento nos cafeeiros, as metodologias de manejo devem ser cautelosas. Patógenos que infestam o solo com ampla gama de hospedeiros ou generalistas são problemáticos quando introduzidos em uma determinada área, sendo necessários, em muitos casos, a substituição da cultura, pois a erradicação do inóculo não é possível ou ecologicamente inviável.

Doenças causadas por *Fusarium* spp., como afirmado anteriormente, são cosmopolitas, estando amplamente distribuídas nas regiões produtoras do Espírito Santo, sendo responsáveis pelo declínio do maracujazeiro, pimenteira-do-reino e mamoeiro (SERRANO et al., 2010; SILVA et al., 2011; SCHMILDT et al., 2018). Com base neste estudo, em condições de casa de vegetação, os isolados de *Fusarium* spp. obtidos dos hospedeiros diversos, com exceção do feijoeiro, foram capazes de manifestar sintomas de amarelecimento em *C. canephora* (Clone CV02). Neste sentido, constatando-se a presença destes patógenos em uma determinada área, um

manejo adequado deve ser viabilizado, tendo-se em mente a possibilidade de serem agentes etiológicos de cafeeiros conilon.

Neste estudo, associado a assinaturas genômicas, foi confirmada a não patogenicidade de *Fusarium* sp. (FSSC, Clado 3) a culturas de importância para o estado, caracterizando o indivíduo como não generalista para os diferentes hospedeiros. Entretanto, os isolados obtidos de diferentes culturas foram capazes de infectar o cafeeiro conilon (Clone CV02), manifestando a sintomatologia característica da fusariose de amarelecimento nos cafeeiros.

## 7 CONCLUSÕES

- A filogenia do *locus RPB1* é capaz de discriminar espécies de *Fusarium* spp., associadas a murcha de fusarium em cafeeiro conilon e fusariose em hospedeiros contrastantes;
- A filogenia do *locus parcial RPB2* não é capaz de discriminar todas as espécies filogeneticamente distintas de *Fusarium* spp., não sendo confiável isoladamente para estudos do gênero;
- A filogenia com base na concatenação de *RPB1+RPB2* é capaz de discriminar espécies filogeneticamente distintas de *Fusarium*, agrupando os isolados em estudos em seus respectivos complexos, entretanto, não discrimina em nível de hospedeiro e deve ser priorizada em estudos evolutivos do gênero;
- Existe especificidade em nível de hospedeiro para o isolado de *Fusarium* sp. (FSSC, Clado 3), agente etiológico da murcha de fusarium em cafeeiro conilon, não ocorrendo a manifestação de sintomas quando inoculado nos demais hospedeiros em estudo.

## REFERÊNCIAS

- AARTHI, S.; KUMAR, N. Stenting Propagation-A Method in Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Using Wild Species of Piper as Rootstock. **International Journal of Innovative Horticulture**, 8(1), 35-39, 2019.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5. ed. Amsterdan: Elsevier; Academic Press, 2005. 922p.
- AKAIKE, H. **Information theory and an extension of maximum likelihood principle**. In: Petrov BN, Csaki F, editors. Second International Symposium on Information Theory. Budapest: Akademiai Kiado; p. 267–281, 1973. doi: 10.1007/978-1-4612-0919-5\_38
- AOKI, T.; O'DONNELL, K.; GEISER, D. M. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. **Journal of General Plant Pathology**, 80, 189–201, 2014. doi: 10.1007/s10327-014-0509-3
- BAAYEN, R. P.; O'DONNELL, K.; BONANTS, P. J. M.; CIGELNIK, E.; KROON, L. P. N. M.; ROEBROECK, E. J. A.; WAALWIJK, C. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and non monophyletic *formae speciales* causing wilt and rot disease. **Phytopathology**, 90:891–900, 2000.
- BELAN, L. L.; BELAN, L. L.; RAFAEL, A. M.; LORENZONI, R. M.; SOUZA-SOBREIRA, F. B.; SOARES, T. C. B.; MORAES, W. B. First report of *Fusarium* species associated with *Fusarium* wilt in *Coffea canephora* plants in Brazil. **Plant disease**, 102(9), 1859-1859, 2018. doi: 10.1094/pdis-01-18-0186-pdn
- BIDARTONDO, M. I.; BRUNS, T. D.; BLACKWELL, M.; EDWARDS, I.; TAYLOR, A. F. S.; HORTON, T. Preserving accuracy in GenBank. **Science**, 319, 1616, 2008. doi: 0.1126/science.319.5870
- BOUDREAU, M. A. Diseases in Intercropping Systems. **Annual Review of Phytopathology**, 51(1), 499–519, 2013. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102246
- BOURRAS, S.; MCNALLY, K. E.; BEN-DAVID, R.; PARLANGE, F.; ROFFLER, S.; PRAZ, C. R., KELLER, B. Multiple avirulence loci and allele-specific effector recognition control the Pm3 race-specific resistance of wheat to powdery mildew. **Plant Cell**, 27: 2991–3012, 2015. doi:10.1105/tpc.15.00171
- BUENO, C. J.; FISCHER, I. H.; ROSA, D. D.; FIRMINO, A. C.; HARAKAVA, R.; OLIVEIRA, C. M. G., FURTADO, E. L. *Fusarium solani* f. sp. *passiflorae*: a new forma specialis causing collar rot in yellow passion fruit. **Plant pathology**, 63(2), 382-389, 2014. doi:10.1105/tpc.15.00171
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Higiene**, Baltimore, 24, 270-276, 1939.

CASTRO, N. R.; COELHO, R. S. B.; LARANJEIRA, D.; PIMENTEL, R. M. DE M.; FERREIRA, C. P. Murcha de fusário em helicônia: fontes de resistência, método alternativo de detecção e defesa estrutural. **Summa Phytopathologica**, 36(1), 30–34, 2010. doi: 10.1590/s0100-54052010000100005

CHEN, X.; KANG, Z. **Stripe rust**. Springer Netherlands, 2017.

CHUNG, W. C.; CHEN, L. W.; HUANG, J. H.; HUANG, H. C.; CHUNG, W. H. A new 'forma specialis' of *Fusarium solani* causing leaf yellowing of Phalaenopsis: Leaf yellowing of Phalaenopsis. **Plant Pathology**, 60, 244–252, 2011.

CHUNG, W. C.; CHEN, L. W.; HUANG, J. H.; HUANG, H. C.; CHUNG, W. H. A new "forma specialis" of *Fusarium solani* causing leaf yellowing of Phalaenopsis. **Plant Pathology**, 60(2), 244–252, 2010. doi:10.1111/j.1365-3059.2010.02376.x

COLEMAN, J. J. The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. **Molecular plant pathology**, 17(2), 146-158, 2016. doi: doi.org/10.1111/mpp.12289

COSTA PEREIRA, C. A.; SALGADO DE CASTRO, G. L.; RODRIGUES, P. C.; SILVA, G. B.; AMARAL DE OLIVEIRA, D.; BATISTA DE SOUZA, C. R. An endophytic *Pseudomonas* sp. of *Piper tuberculatum* promotes growth on *Piper nigrum* through increase of root biomass production. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 101420, 2019. doi:10.1016/j.pmpp.2019.101420

COSTA, M. D.; LOVATO, P. E.; SETE, P. B. Micorrização e indução de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases e resistência à fusariose em porta-enxerto de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 45(4), 376–383, 2010. doi:10.1590/s0100-204x2010000400005

CZEMBOR, E.; STĘPIEŃ, Ł.; WAŚKIEWICZ, A. Effect of environmental factors on *Fusarium* species and associated mycotoxins in maize grain grown in Poland. **PloS one**, 10(7), 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0133644

DONG, W.; ZHAO, J.; HU, R.; DONG, Y.; TAN, L. Differentiation of Chinese robusta coffees according to species, using a combined electronic nose and tongue, with the aid of chemometrics. **Food Chemistry**, 229, 743–51, 2017. doi:10.1016/j.foodchem.2017.02.149

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant ONA from fresh tissue. **Focus**, 12, 13-15, 1987.

DRUMMOND, A. J.; SUCHARD, M. A.; XIE, D.; RAMBAUT; A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**. 2012;29: 1969–1973. doi: 10.1093/molbev/mss075

EDEL-HERMANN, V.; LECOMTE, C. Current status of *Fusarium oxysporum formae speciales* and races. **Phytopathology**, 109(4), 512-530, 2019. doi:10.1094/phyto-08-18-0320-rvw

FARIS, J. D.; ZHANG, Z.; LU, H.; LU, S.; REDDY, L.; CLOUTIER, S. A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA 107: 13544–13549, 2010. doi: 10.1073/pnas.1004090107

FERRÃO, R. G.; DE MUNER, L. H.; DA FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A. G. **Café Conilon**. Vitória, ES: Incaper, 2017, 2016.

FRAVEL, D.; OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. **New Phytologist** 157:493-502, 2003. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00700.x

GEISER, D. M.; DEL MAR JIMÉNEZ-GASCO, M.; KANG, S.; MAKALOWSKA, I.; VEERARAGHAVAN, N.; WARD, T. J. O'DONNELL, K. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA Sequence Database for Identifying Fusarium. **European Journal of Plant Pathology**, 110(5/6), 473–479, 2004. doi:10.1023/b:ejpp.0000032386.75915.a0

GERLACH, W.; NIRENBERG, H. **The genus Fusarium – a pictorial atlas**. Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem 209, 1–406, 1982.

GORDON, W.L. The occurrence of Fusarium species in Canada. Taxonomy and geographical distribution of Fusarium species in soil. **Canadian Journal of Botany**. 34, 833–846, 1956. doi: 10.1139/b59-021

GRÄFENHAN, T.; SCHROERS, H.-J.; NIRENBERG, H.I.; SEIFERT, K.A. An overview of the taxonomy, phylogeny, and typification of nectriaceous fungi in *Cosmospora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella*, and *Volutella*. **Studies in Mycology**. 68, 79–113, 2011. doi:10.3114/sim.2011.68.04

HARTMANN, F. E.; SÁNCHEZ-VALLET, A.; MCDONALD, B. A.; CROLL, D. A fungal wheat pathogen evolved host specialization by extensive chromosomal rearrangements. **The ISME journal**, 11(5), 1189-1204, 2017. doi: 10.1038/ismej.2016.196

KANG, S.; MANSFIELD, M. A.; PARK, B.; GEISER, D. M.; IVORS, K. L.; COFFEY, M. D.. The promise and pitfalls of sequence-based identification of plant-pathogenic fungi and oomycetes. **Phytopathology**, 100, 732–737, 2010. doi: 10.1094/phyto-100-8-0732

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONESHAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C. Geneious

basic: na integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**. 28(12):1647– 1649, 2012.

KIM, W.; CAVINDER, B.; PROCTOR, R. H.; O'DONNELL, K.; TOWNSEND, J. P.; TRAIL, F. Comparative genomics and transcriptomics during sexual development gives insight into the life history of the cosmopolitan fungus *Fusarium neocosmosporiellum*. **Frontiers in microbiology**, 10, 1247, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.01247

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**, 77(1), 349–366, 2015. doi:10.1007/s13225-015-0337-6

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium Laboratory Manual**. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2006.

LIU, W.; LIU, J.; NING, Y.; DING, B.; WANG, X.; WANG, Z.; WANG, G.-L. Recent progress in understanding PAMP- and effector-triggered immunity against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Molecular Plant**. 6: 605–620, 2013. doi:10.1093/mp/sst015

LIU, Y. J.; WHELEN, S.; HALL, B. D. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. **Molecular Biology and Evolution**. 16:1799–1808, 1999. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026092

MA, L. J.; GEISER, D. M.; PROCTOR, R. H.; ROONEY, A. P.; O'DONNELL, K.; TRAIL, F., KAZAN, K. *Fusarium* pathogenomics. **Annual review of microbiology**, 67, 399-416, 2013. doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155650

MCCREIGHT, J. D.; MATHERON, M. E.; TICKES, B. R.; PLATTS, B. Occurrence of fusarium root rot race 1 on lettuce in Yuma, Arizona. **Hort Science** 38:664, 2003.

MOREIRA, E. C. O.; PINHEIRO, D. G.; GORDO, S. M. C.; RODRIGUES, S. M.; PESSOA, E.; SCHALLER, H.; DARNET, S. Transcriptional profiling by RNA sequencing of black pepper (*Piper nigrum* L.) roots infected by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. **Acta Physiologiae Plantarum**, 39(10), 2017. doi: 10.1007/s11738-017-2538-y.

MOREIRA, E. C.; PINHEIRO, D. G.; GORDO, S. M.; RODRIGUES, S. M.; PESSOA, E.; SCHALLER, H.; SAMPAIO, I. Transcriptional profiling by RNA sequencing of black pepper (*Piper nigrum* L.) roots infected by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. **Acta Physiologiae Plantarum**, 39(10), 239, 2017. doi: 10.1007/s11738-017-2538-y

MOUSSA, T. A. A.; AL-ZAHRANI, H. S.; KADASA, N. M. S.; AHMED, S. A.; DE HOOG, G. S.; AL-HATMI, A. M. S. Two new species of the *Fusarium fujikuroi* species complex

isolated from the natural environment. **Antonie van Leeuwenhoek**, 110(6), 819–832, 2017. doi: 10.1007/s10482-017-0855-1.

MUSOLI, C. P.; PINARD, F.; CHARRIER, A.; KANGIRE, A.; TEN HOOPEN, G. M.; KABOLE, C.; CILAS, C. Spatial and temporal analysis of coffee wilt disease caused by *Fusarium xylarioides* in *Coffea canephora*. **European Journal of Plant Pathology**, 122(4), 451–460, 2008. doi: 10.1007/s10658-008-9310-5

NALIM, F. A.; SAMUELS, G. J.; WIJESUNDERA, R. L.; GEISER, D. M. New species from the *Fusarium solani* species complex derived from perithecia and soil in the Old World tropics. **Mycologia**, 103, 1302–1330, 2011. doi: 10.3852/10-307.

NISHIJIMA, W., Papaya. In: Ploetz, R.C. (Ed.), Compendium of Tropical Fruit Disease. **American Phytopathological Society**, St. Paul, MN, pp. 54e70, 1994.

NYLANDER, J. A. A. **MrModeltest v2** (Software). Program distributed by the author. Uppsala: Uppsala University, Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala.

O'DONNELL, K.; WARD, T. J.; ROBERT, V. A. R. G.; CROUS, P. W.; GEISER, D. M.; KANG, S. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. **Phytoparasitica**, 43(5), 583-595, 2015. doi: 10.1007/s12600-015-0484-z

O'DONNELL, K.; ROONEY, A. P.; PROCTOR, R. H.; BROWN, D. W.; MCCORMICK, S. P.; WARD, T. J.; ROBERT, V. A. Phylogenetic analyses of *RPB1* and *RPB2* support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. **Fungal Genetics and Biology**, 52, 20-31, 2013. doi: 10.1016/j.fgb.2012.12.004

O'DONNELL, K.; SUTTON, D. A.; RINALDI, M. G.; SARVER, B. A.; BALAJEE, S. A.; SCHROERS, H. J.; AOKI, T. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. **Journal of Clinical Microbiology**, 48(10), 3708-3718, 2010. doi: 10.1128/jcm.00989-10

O'DONNELL, K.; KISTLER, H. C.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R. C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA 95:2044–49, 1998. doi: 10.1073/pnas.95.5.2044

PATHAK, V. N., GOYAL, J. P.; BHATANAGAR, L. G. Effect of chemical and hot water treatment on *Fusarium* and *Rhizopus* rots of papaya. **Indian Phytopathology**. 29: 210-211, 1976.

PINARIA, A. G.; LIEW, E. C. Y.; BURGESS, L. W. *Fusarium* Species Associated with Vanilla Stem Rot in Indonesia. **Australasian Plant Pathology**, 39, 176 – 83, 2010. doi:10.1071/ap09079

PLOETZ, R. C. *Fusarium*-Induced Diseases of Tropical, Perennial Crops. **Phytopathology**, 96(6), 648–652, 2006. doi: 10.1094/phyto-96-0648

REEB, V.; LUTZONI, F., ROUX, C. Contribution of *RPB2* to multilocus phylogenetic studies of the euascomycetes (Pezizomycotina, Fungi) with special emphasis on the lichen-forming Acarosporaceae and evolution of polyspory. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. Evol. 32:1036–1060, 2004. doi: 10.1016/j.ympev.2004.04.012

ROCHA, F. S.; F., G. H. S.; SILVA, T. C. S. R.; AMARAL, F. L.; MUNIZ, M. F. S.; PEREIRA, E. A. Caracterização de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, produção de fitotoxina e incidência da fusariose no norte de Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, 42(1), 67-72, 2016. doi: 10.1590/0100-5405/2100

ROMBERG, M. K.; DAVIS, R. M. Host range and phylogeny of *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* from potato and tomato in California. **Plant Disease**, 91, 585–92, 2007. doi:10.1094/pdis-91-5-0585

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, 19: 1572–1574, 2003. doi: doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180

SCHEIDT, B. T.; CASA, R. T.; FIORENTIN, O. A.; MARTINS, F. C.; KUHNEM, P.; LIMA, A. D.; FARIAS, M. Determination of the most susceptible phenological stage of rice panicles to infection by species of *Fusarium graminearum*. **Summa Phytopathologica**, 45(3), 243-246, 2019. doi: 10.1590/0100-5405/192513

SCHMILDT, E. R.; OLIARI, L. S.; ALEXANDRE, R. S.; SILVA, F. O. dos R. da, SCHMILDT, O. Histological aspects of mini-grafting of *passiflora edulis* sims. And *passiflora mucronata* lam. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 40(2), 2018. doi:10.1590/0100-29452018174

SCHOCH, C. L.; SUNG, G.-H.; LÓPEZ-GIRÁLDEZ, F.; TOWNSEND, J.P.; MIADLIKOWSKA, J. The ascomycota tree of life: a phylum wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. **Systematic Biology**, 58, 224–239, 2009. doi: 10.1093/sysbio/syp020

SCHROERS, H.-J.; SAMUELS, G. J.; ZHANG, N.; SHORT, D. P. G.; JUBA, J.; GEISER, D. M. Epitypification of *Fusisporium (Fusarium) solani* and its assignment to a common phylogenetic species in the *Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, 108(4), 806–819. doi: 10.3852/15-255, 2016.

SERANI, S.; TALIGOOOLA, H. K.; HAKIZA, G. J. An investigation into *Fusarium* spp. associated with coffee and banana plants as potential pathogens of robusta coffee. **African Journal of Ecology**, 45(s1), 91–95, 2007. doi:10.1111/j.1365-2028.2007.00744.x

**SERRANO**, L. A. L.; CATTANEO, L. F.; FERREGUETTI, G. A. Adubo de liberação lenta na produção de mudas de mamoeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 32(3), 874–883, 2010. doi: 10.1590/s0100-29452010005000084

SILVA, S.O.; NETO, A.P.D.; SILVA, M.B. Pimenta-do-reino: importância da defesa fitossanitária para a sustentabilidade da atividade na região norte do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v. 1, n. 1, p. 88-92, 2011.

ŠIŠIĆ, A.; BAĆANOVIĆ-ŠIŠIĆ, J.; AL-HATMI, A. M.; KARLOVSKY, P.; AHMED, S. A.; MAIER, W.; FINCKH, M. R. The '*forma specialis*' issue in *Fusarium*: a case study in *Fusarium solani* f. sp. *psii*. **Scientific reports**, 8(1), 1-17, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-19779-z

SNYDER, W. C.; HANSEN, H. N. The species concept in *Fusarium* with reference to section *Martiella*. **American Journal of Botany**, 28:738-742, 1941. doi:10.1002/j.1537-2197.1941.tb11002.x

SUGA, H.; HASEGAWA, T.; MITSUI, H.; KAGEYAMA, K.; HYAKUMACHI, M. Phylogenetic analysis of the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* based on the rDNA-ITS region. **Mycological Research**. 104, 1175–1183, 2000. doi: 10.1017/s0953756200002719

SUMMERELL, B. A. Resolving *Fusarium*: Current Status of the Genus. **Annual Review of Phytopathology**, 57(1), 2019. doi:10.1146/annurev-phyto-082718-100204.

TOUSSOUN, T. A.; SNYDER, W. C. The pathogenicity, distribution and control of two races of *Fusarium* (*Hypomyces*) *solani* f.sp. *cucurbitae*. **Phytopathology**. 51, 17–22 1961.

U. S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. **Coffee: World Markets and Trade**. United States Department of Agriculture 2020. Disponível em: < <https://www.fas.usda.gov/data/coffee-world-markets-and-trade/> >. Acesso em: 09 fev. 2020.

VAN DAM, P.; DE SAIN, M.; TER HORST, A.; VAN DER GRAGT, M.; REP, M. Use of comparative genomics-based markers for discrimination of host specificity in *Fusarium oxysporum*. **Applied and Environmental Microbiology**. 84:1-20, 2018. doi: 10.1128/AEM.01868-17

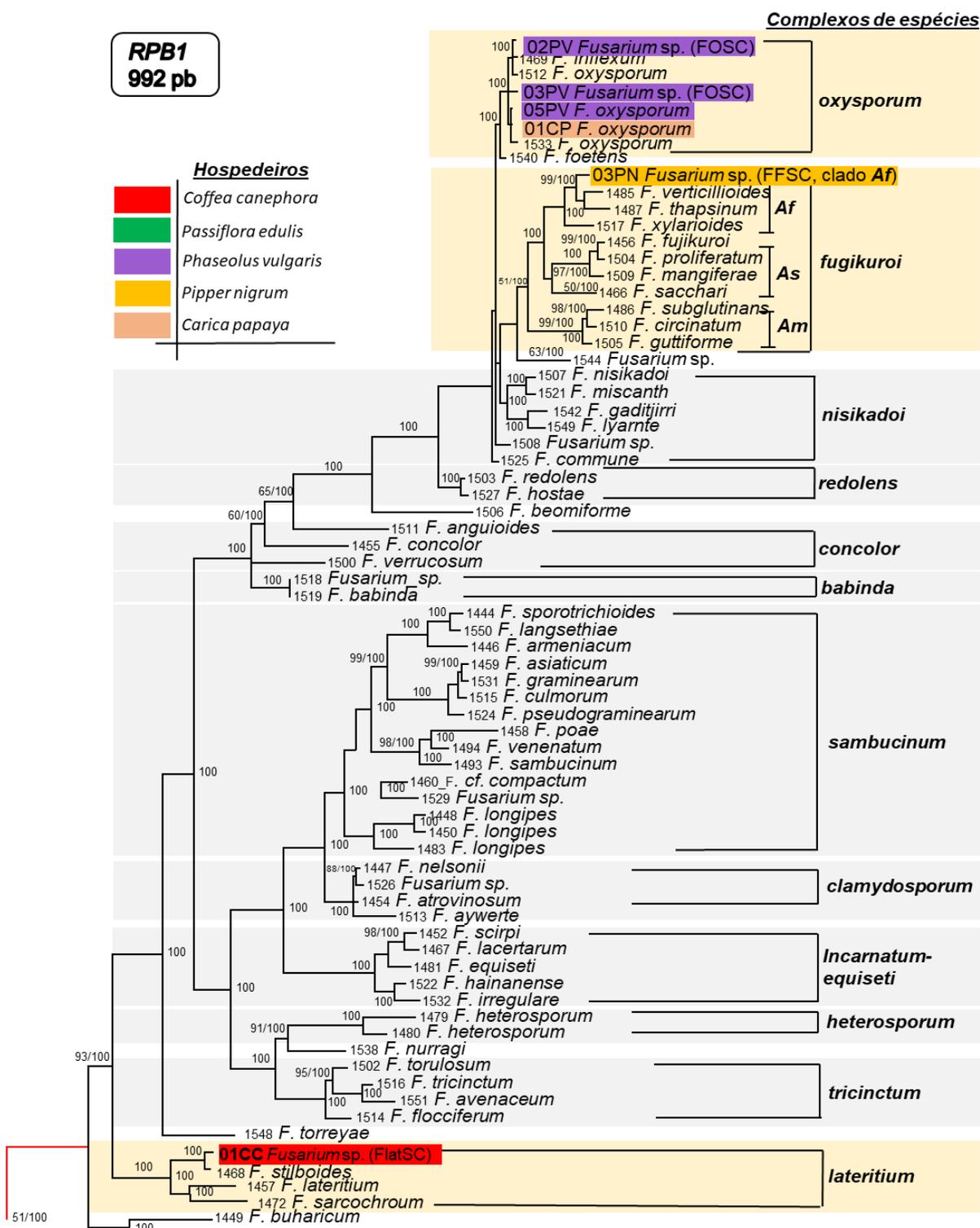
WAALWIJK, C.; TAGA, M.; ZHENG, S.-L.; PROCTOR, R. H.; VAUGHAN, M. M.; O'DONNELL, K. Karyotype evolution in *Fusarium*. **IMA Fungus**, 9(1), 13–33, 2018. doi:10.5598/ima fungus.2018.09.01.02

WALLER, J. M.; BIGGER, M.; HILLOCKS, R. J. **Coffee pests, diseases and their management**. CABI, 2007.

WIRATNO, W.; SYAKIR, M., SUCIPTO, I.; PRADANA, A. P. Isolation and characterization of endophytic bacteria from roots of *Piper nigrum* and their activities against *Fusarium oxysporum* and *Meloidogyne incognita*. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, 20(3), 682-687, 2019. Doi: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d200310>

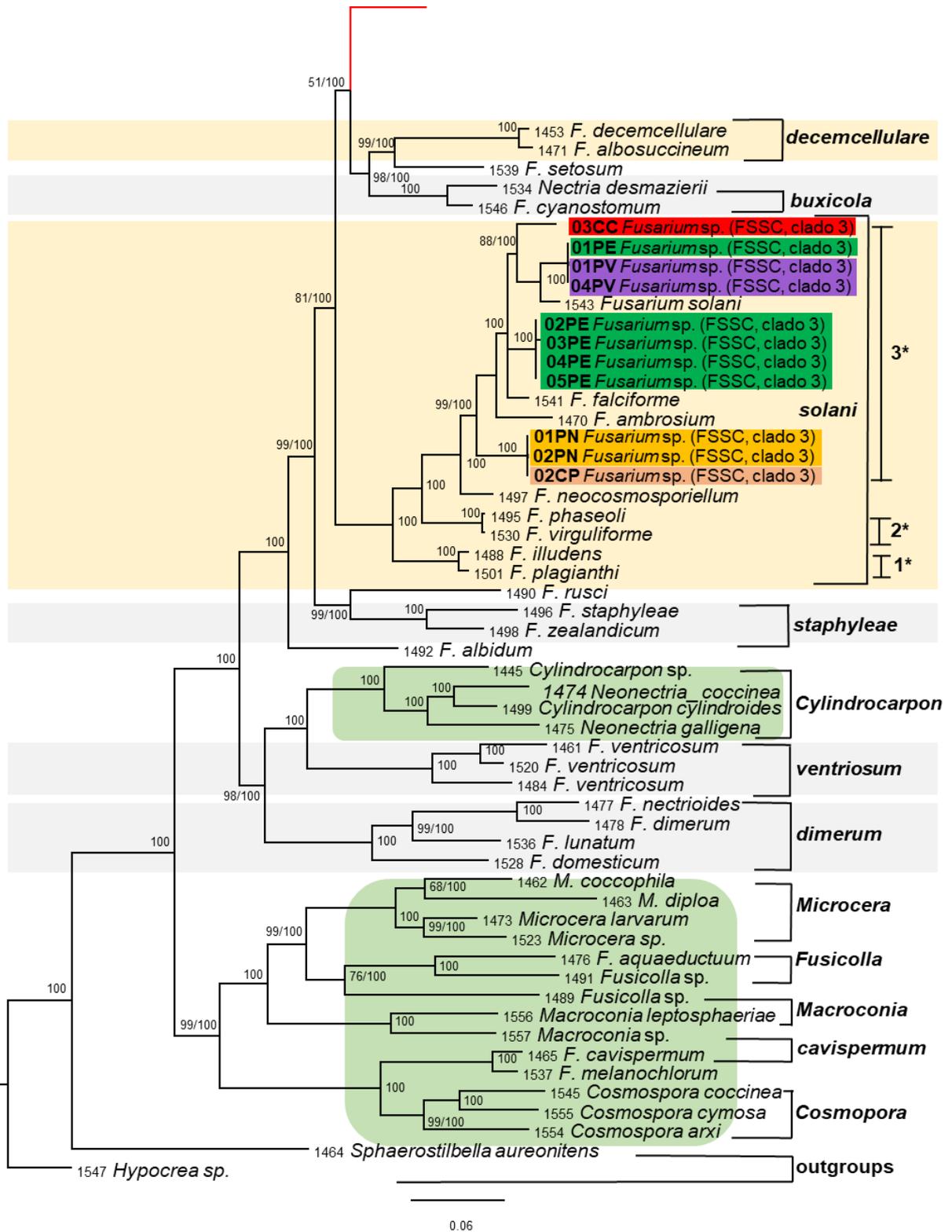
WULFF E.G.; SORENSEN J.L.; LÜBECK M.; NIELSEN K.F.; THRANE U.; TORP J. *Fusarium* spp. associated with rice Bakanae: ecology, genetic diversity, pathogenicity and toxigenicity. **Environmental Microbiology**, 12:649-657, 2010. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02105.x

## APÊNDICE A – FILOGENIA DA REGIÃO RPB1

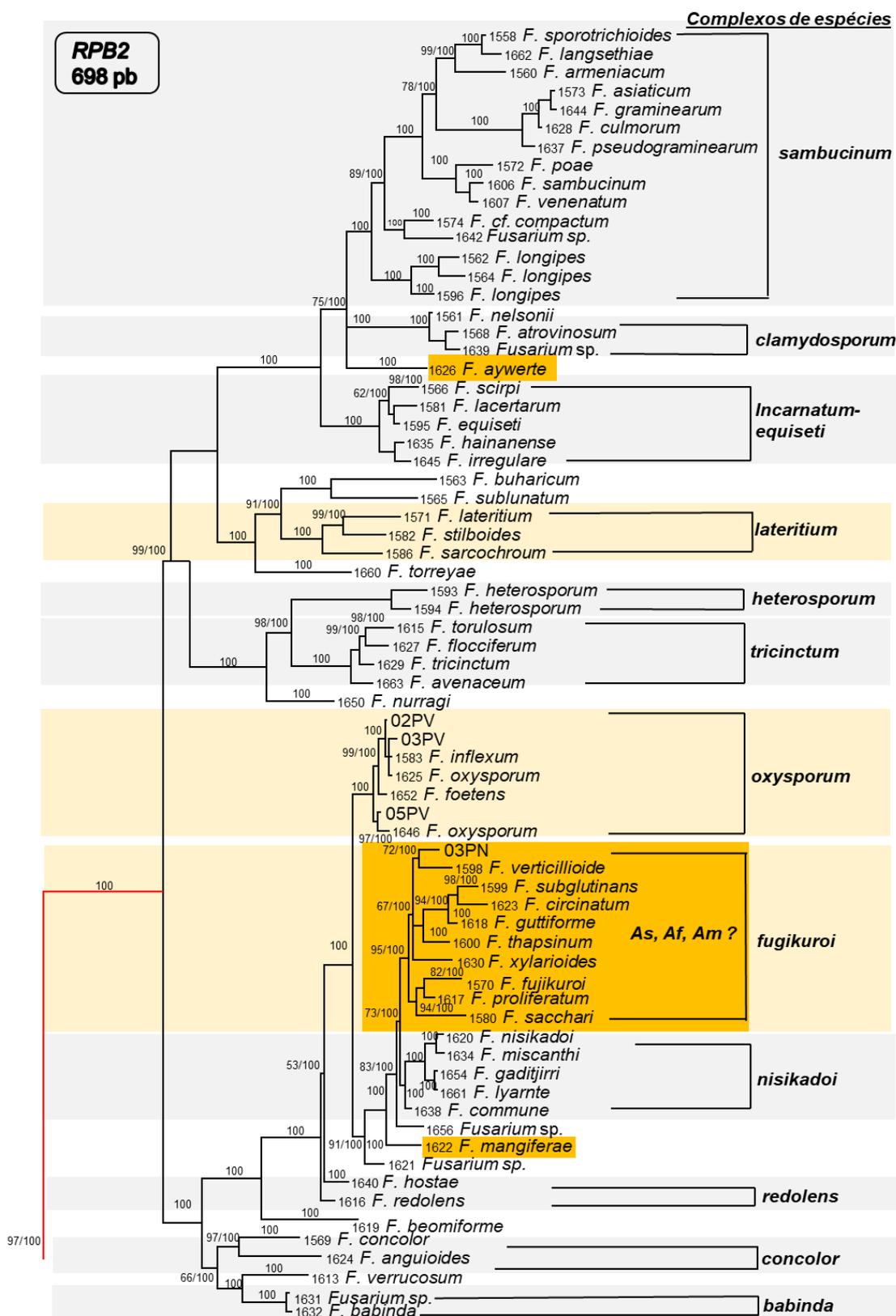


Árvore filogenética de indivíduos de *Fusarium* spp. gerada a partir do fragmento da região RPB1 (992 pb) por inferência bayesiana, gerando a árvore com maior probabilidade a *posteriori*. A árvore foi enraizada com a sequência de *Hypocrea* sp. (Hypocreaceae). Cada espécie é identificada por um número de acesso exclusivo compatível com o número de acesso do GenBank (Anexo C – Tabela complementar 2). Clados destacados em verde claro identificam seis linhagens basais não-Fusarium, clados em amarelo claro identificam complexos importantes para este estudo, clados destacados em cinza destacam os demais complexos de *Fusarium* spp., complexos estes com nomes informais e fortemente apoiados no Fusarium (= *Terminal Fusade Clade* [TFC] sensu Gräfenhan et al., 2011; O'Donnel et al., 2013). Números acima dos internódios representam suporte a *bootstrap* pela probabilidade *posteriori*, somente um único valor é indicado quando eles eram idênticos. Três subclados

biogeograficamente estruturados no complexo de espécies de *fujikuroi* são identificados da seguinte forma: **As** = Asiático, **Af** = Africano, **Am** = Americano. Asteriscos pretos em negrito destacam os três clados referentes à subdivisão do complexo *Fusarium solani* (FSSC). A escala abaixo da árvore indica a substituição de nucleotídeos por sítio. O isolado 02CC obtido de *Coffea canephora* não se encontra presente, pois não amplifica para a região.

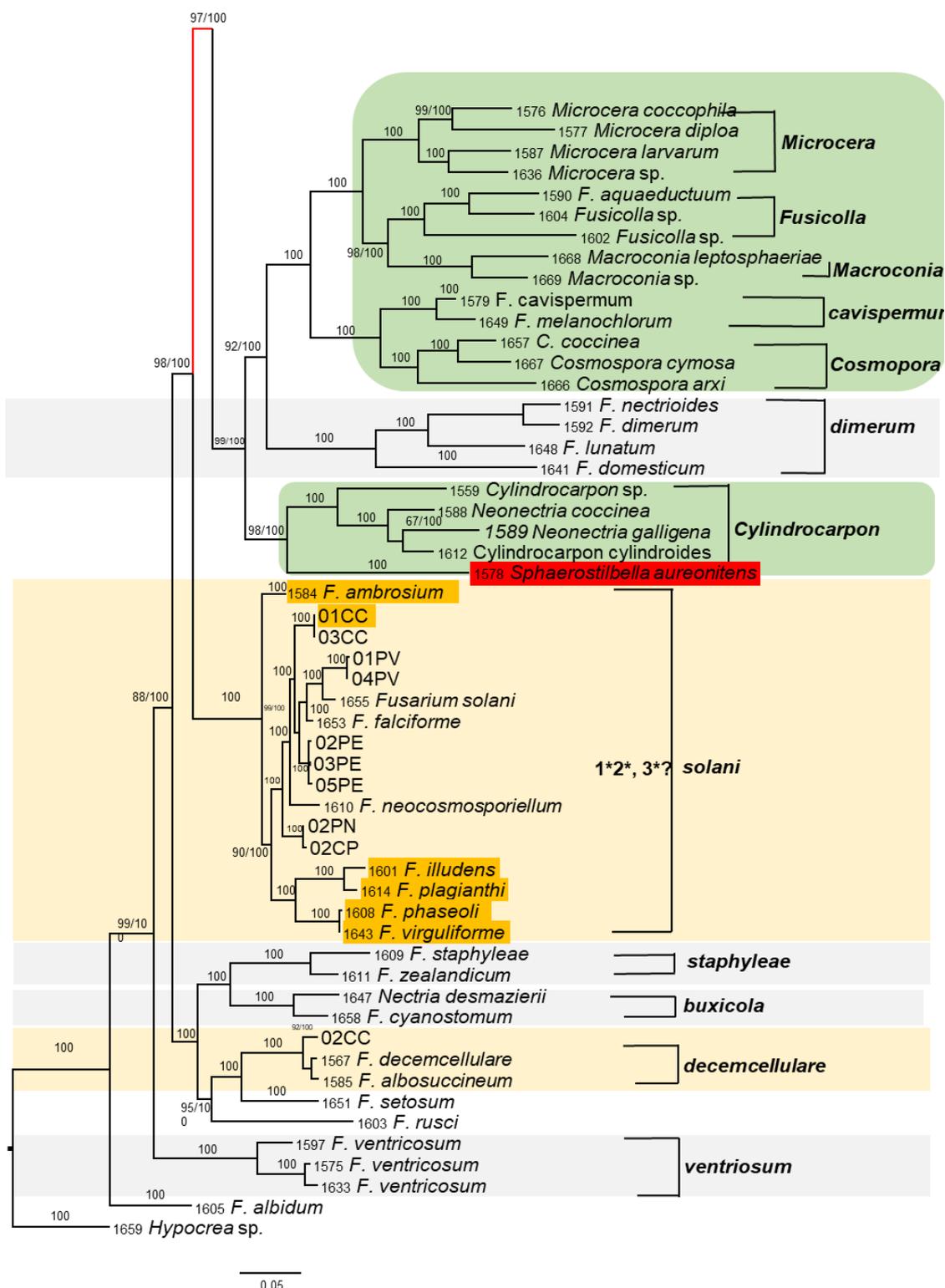


## APÊNDICE B – FILOGENIA DA REGIÃO RPB2

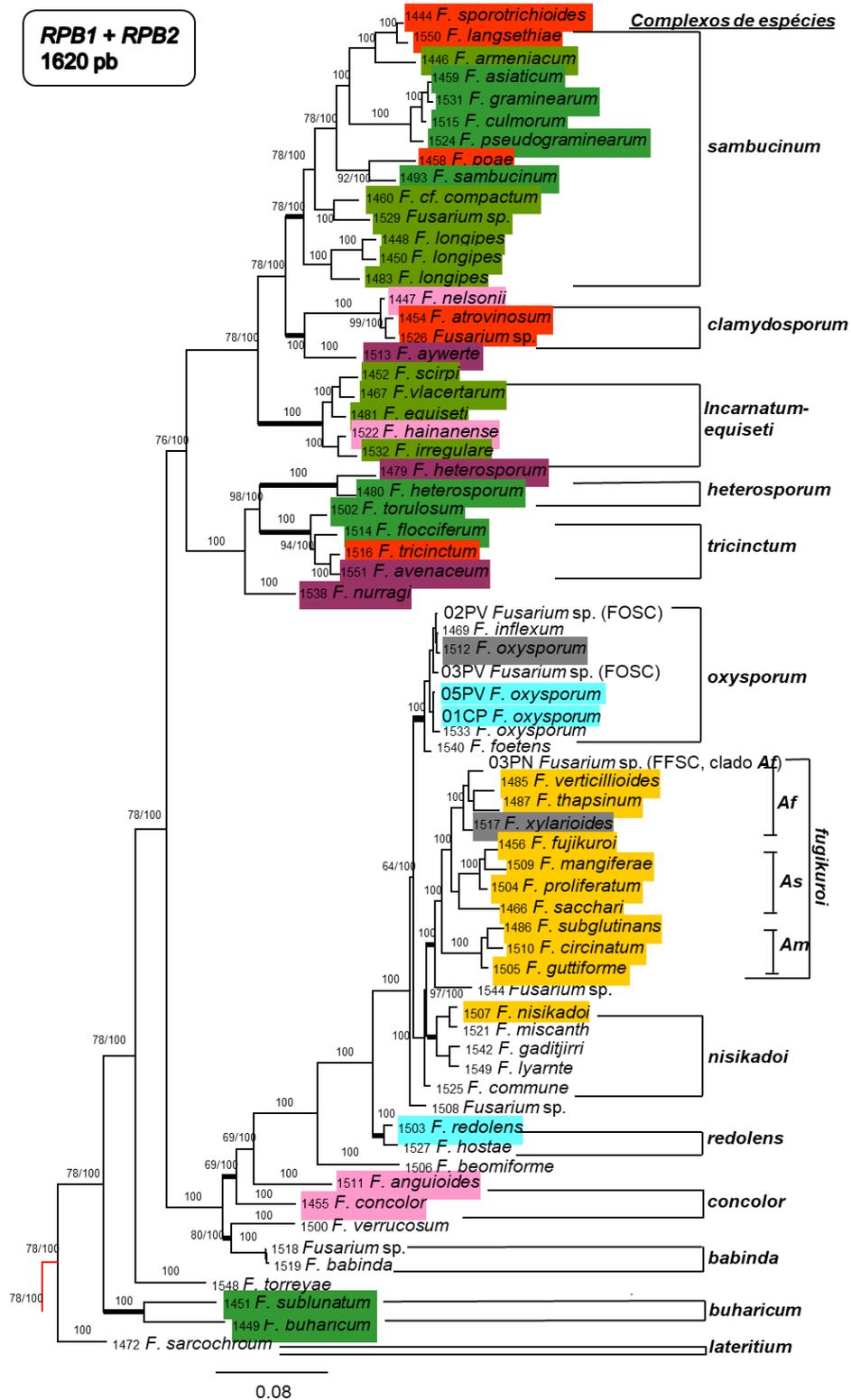


Árvore filogenética de indivíduos de *Fusarium* spp. gerada a partir do fragmento da região RPB2 (698 PB) por inferência bayesiana, gerando a árvore com maior probabilidade a posteriori. A árvore foi enraizada com a sequência de *Hypocrea* sp. (Hypocreaceae). Cada espécie é identificada por um número de acesso exclusivo compatível com o número de acesso do GenBank (Anexo C – Tabela complementar 2). Clados destacados em verde claro identificam seis linhagens basais não-Fusarium, clados em amarelo claro identificam complexos

importantes para este estudo, clados destacados em cinza destacam os demais complexos de *Fusarium* spp., complexos estes com nomes informais e fortemente apoiados no Fusarium (= *Terminal Fusade Clade* [TFC] sensu Gräfenhan et al., 2011; O'Donnel et al., 2013). Indivíduos destacados em amarelo escuro destacam agrupamentos que não concordam com estudos anteriores (O'DONNELL et al., 2013; O'DONNELL et al., 2013 2015). Números acima dos internódios representam suporte a *bootstrap* pela probabilidade *posteriori*, somente um único valor é indicado quando eles eram idênticos. Três subclados biogeograficamente estruturados no complexo de espécies de *fujikuroi* são identificados da seguinte forma: **As** = Asiático, **Af** = Africano, **Am** = Americano. Asteriscos pretos em negrito destacam os três clados referentes à subdivisão do complexo *Fusarium solani* (FSSC). A escala abaixo da árvore indica a substituição de nucleotídeos por sítio.

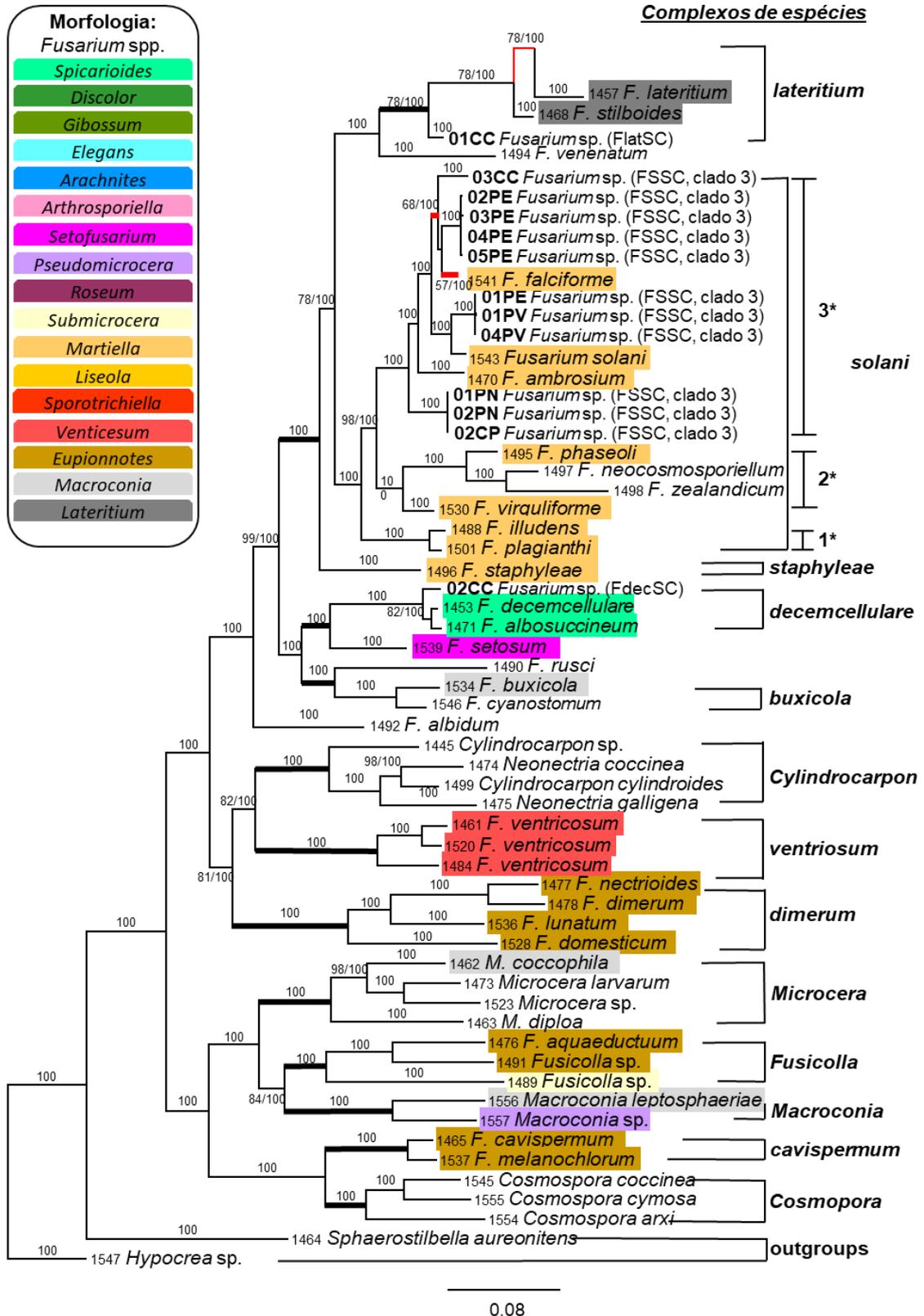


## APÊNDICE C – MORFOLOGIA *Fusarium* spp.



Classificação morfológica com base em macroconídios das espécies de *Fusarium* spp. proposta por Gerlach & Nirenberg (1982) e revisada por O'Donnel et al. (2013) representada na filogenia dos *loci* concatenados *RPB1* e *RPB2* (1620) por inferência bayesiana, gerando a árvore com maior probabilidade a *posteriori*. A árvore foi enraizada com a sequência de *Hypocrea* sp. (*Hypocreaceae*). Cada espécie é identificada por um número de acesso exclusivo compatível com o número de acesso do *GenBank* (Anexo C – Tabela complementar 2). Clados são identificados com nomes informais e fortemente apoiados no *Fusarium* (= *Terminal Fusade Clade* [TFC] sensu Gräfenhan et al., 2011; O'Donnel et al., 2013). Números acima dos internódios representam suporte a *bootstrap*

pela probabilidade *posteriori*, somente um único valor é indicado quando eles eram idênticos. Três subclados biogeograficamente estruturados no complexo de espécies de *fujikuroi* são identificados da seguinte forma: **As** = Asiático, **Af** = Africano, **Am** = Americano. Asteriscos pretos em negrito destacam os três clados referentes à subdivisão do complexo *Fusarium solani* (FSSC). A escala abaixo da árvore indica a substituição de nucleotídeos por sítio.



## APÊNDICE D – FIGURA SUPLEMENTAR 2

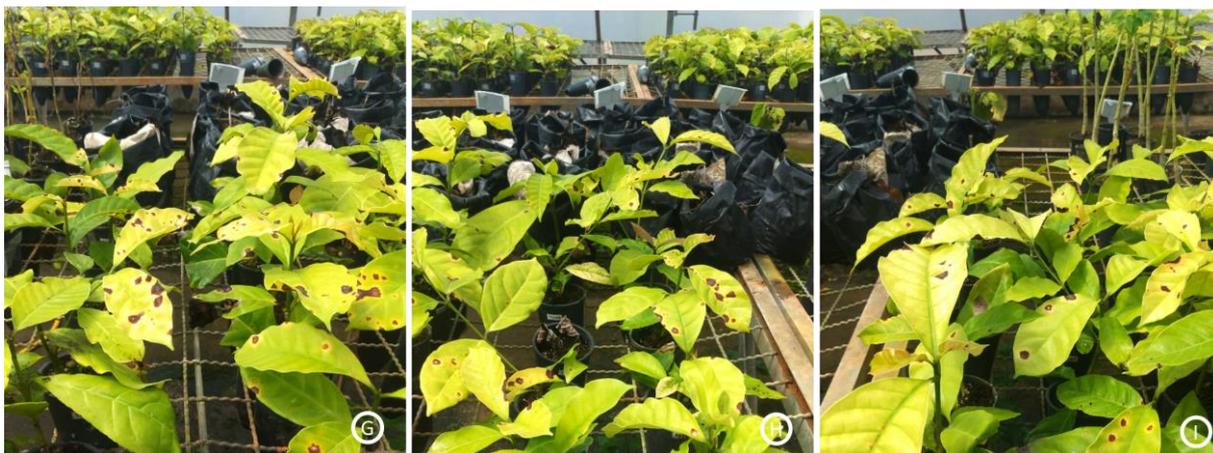


Tratamentos de *Coffea canephora* de controle negativo (A, D.2 e E.2), inoculados com *Fusarium*, agente etiológico do murcho de Fusarium em cafeeiro (03CC) (B, D.1 e E.1) e inoculados com isolados obtidos das culturas do maracujazeiro (01PE, 02PE, 03PE) (C.1, C.2, C.3), pimenteira-do-reino (01PN) (C.4) e mamoeiro (01CP) (C.5).

### APÊNDICE E – FIGURA SUPLEMENTAR 3



Tratamentos de *Piper Nigrum* (Cv. Tucunadan) inoculados com seus respectivos agentes etiológicos, manifestando a sintomatologia característica da fusariose, após duas semanas (A), manifestando amarelecimento generalizado, três (E e F) e quatro (B, C e D) semanas da inoculação, com senescência total das pimenteiras-do-reino. Tratamentos inoculados com os isolados 01PN (B.1), 02PN (B.2) E 03PN (B.3) e tratamentos de controle negativo (C.2) e o inoculado com *Fusarium*, agente etiológico da Murcha de Fusarium em cafeeiros (03CC) (C.1) 4 semanas após a inoculação.



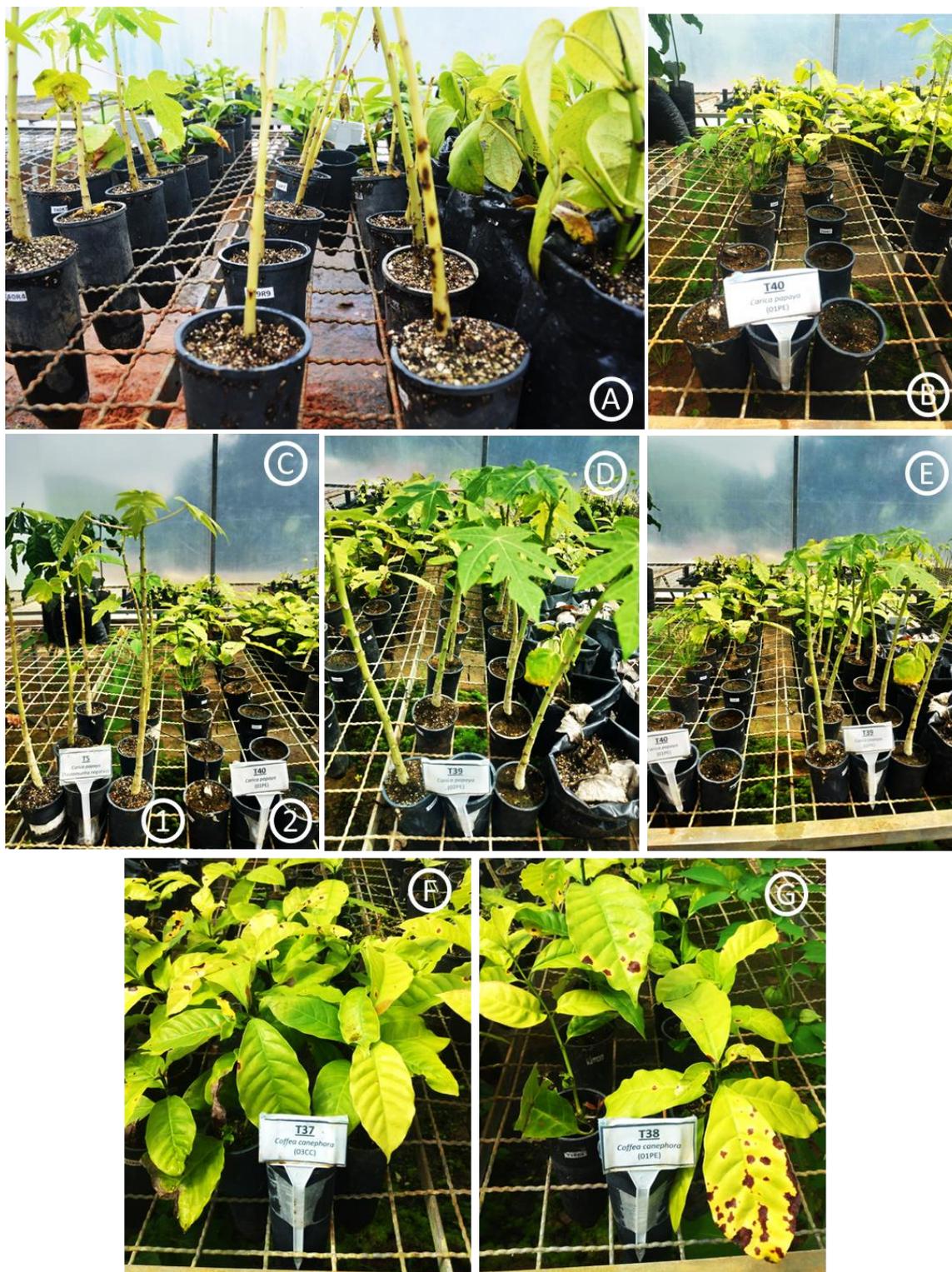
APÊNDICE F (continuação)

#### APÊNDICE F – FIGURA SUPLEMENTAR 4



Tratamentos de *Passiflora edulis* (Cv. Sol do Cerrado) 2 meses após a inoculação com seus respectivos agentes causais da fusariose 01PE(F) 02PE(G), 03PE(H), 04PE(I), 05PE(J), assim como o controle negativo (B, D) e o tratamento inoculado com o isolado de *Fusarium* obtido de *Coffea canephora* (03CC) (B, C).

## APÊNDICE G – FIGURA SUPLEMENTAR 5



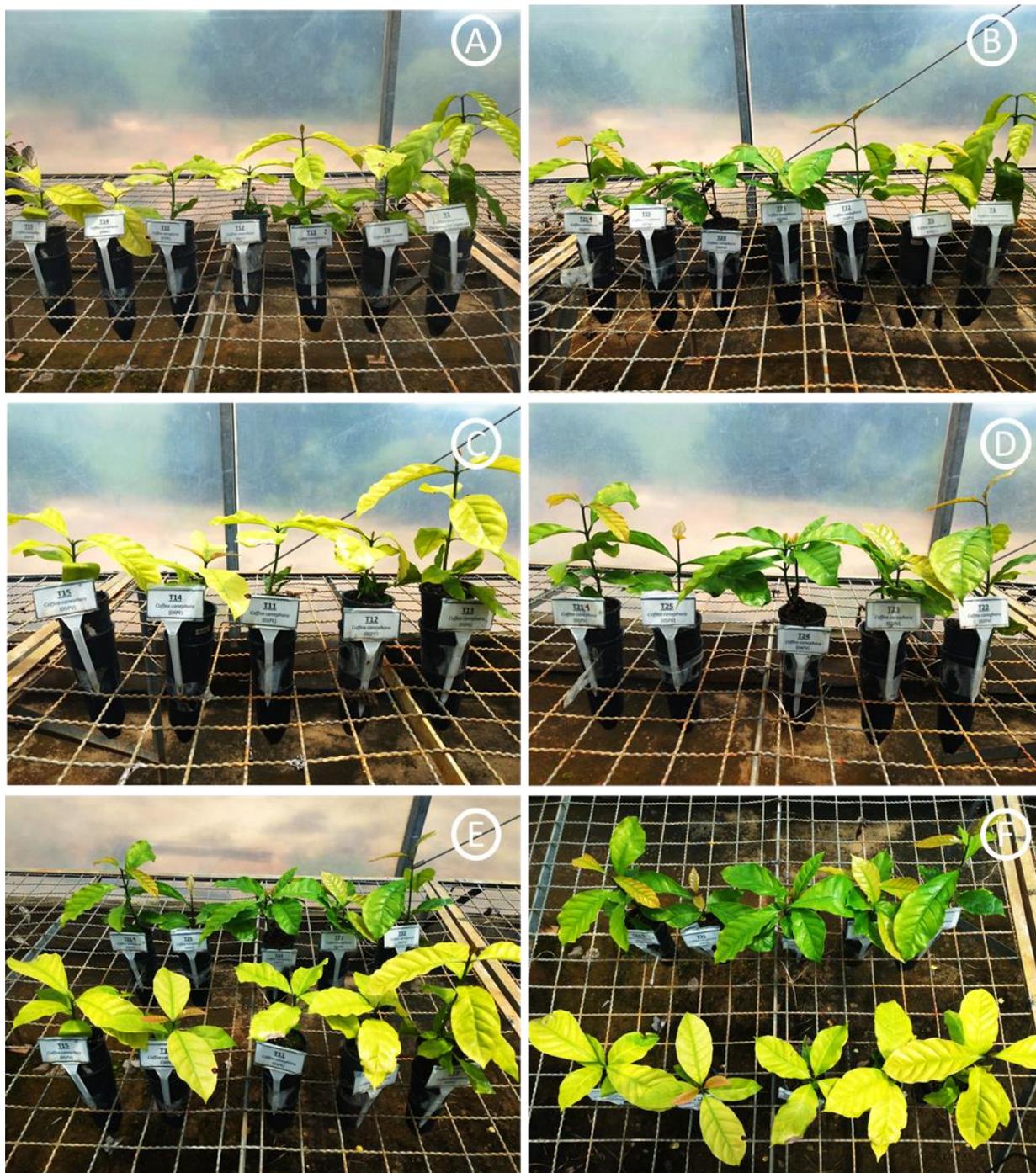
Tratamentos de *Carica papaya* (Cv. Aliança) inoculados com seus respectivos agentes causais da fusariose duas semanas após a inoculação, apresentando lesões necróticas na região do caule (A) um mês após a inoculação (B, C e D), inoculados com os isolados 01CP (B e E.1) e 02CP (E.2) e o tratamento de testemunha negativa (C.1). Tratamentos de *Coffea canephora* inoculados com 01CP (F) e 02CP (G), manifestando sintomas de amarelecimento.

## APÊNDICE H – FIGURA SUPLEMENTAR 6



Tratamentos de *Phaseolus vulgaris* 30 dias após a inoculação (A, B, C), assim como os tratamentos de *Coffea canephora* inoculados com os isolados obtidos do feijoeiro dois meses após inoculados (D.1). Tratamentos de *Coffea canephora* inoculados com isolados obtidos do maracujazeiro (D.2) seguem como comparativo quanto ao sintoma de amarelecimento.

## APÊNDICE I – FIGURA SUPLEMENTAR 7



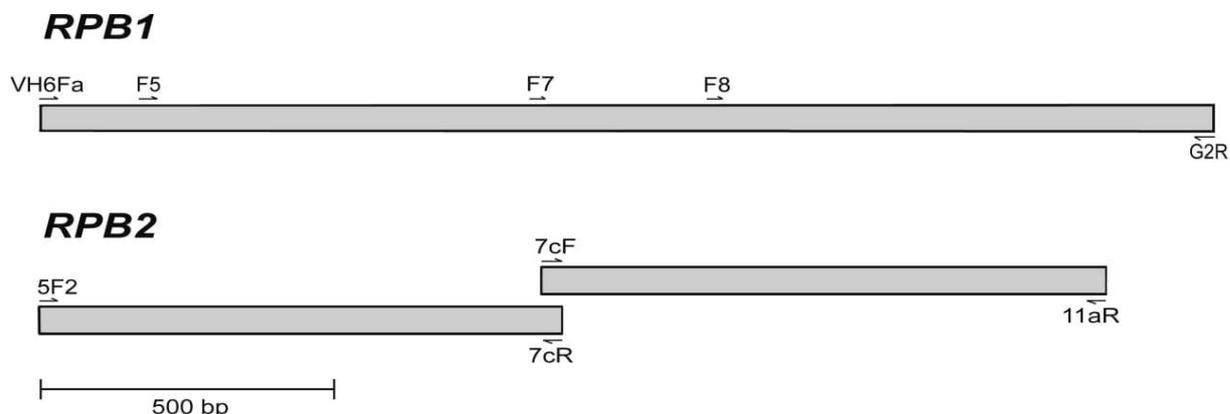
Tratamentos de *Coffea canephora* inoculados com isolados obtidos da cultura do *Passiflora edulis* (A e C) e *Phaseolus vulgaris* (B e D), evidenciando amarelecimento contrastante entre os tratamentos (E e F). Constata-se amarelecimento generalizado das plantas de *Coffea canephora* inoculados com os isolados obtidos de *Passiflora edulis* (E.1 e F.1) quando comparados aos tratamentos inoculados com isolados de *Phaseolus vulgaris* (E.2 E F.2).

## APÊNDICE J – TABELA SUPLEMENTAR 1

Tratamento	Cultura	Isolado inoculado	Un. Amostrais	Tratamento	Cultura	Isolado inoculado	Un. amostrais
T1	<i>C. canephora</i>	-	10	T21	<i>C. canephora</i>	01PV	10
T2	<i>P. edulis</i>	-	10	T22	<i>C. canephora</i>	02PV	10
T3	<i>P. vulgaris</i>	-	10	T23	<i>C. canephora</i>	03PV	10
T4	<i>P. nigrum</i>	-	10	T24	<i>C. canephora</i>	04PV	10
T5	<i>C. Papaya</i>	-	10	T25	<i>C. canephora</i>	05PV	10
T6	<i>C. canephora</i>	03CC	10	T26	<i>P. vulgaris</i>	01PV	10
T7	<i>P. edulis</i>	03CC	10	T27	<i>P. vulgaris</i>	02PV	10
T8	<i>P. vulgaris</i>	03CC	10	T28	<i>P. vulgaris</i>	03PV	10
T9	<i>P. nigrum</i>	03CC	10	T29	<i>P. vulgaris</i>	04PV	10
T10	<i>C. Papaya</i>	03CC	10	T30	<i>P. vulgaris</i>	05PV	10
T11	<i>C. canephora</i>	01PE	10	T31	<i>C. canephora</i>	01PN	10
T12	<i>C. canephora</i>	02PE	10	T32	<i>C. canephora</i>	02PN	10
T13	<i>C. canephora</i>	03PE	10	T33	<i>C. canephora</i>	03PN	10
T14	<i>C. canephora</i>	04PE	10	T34	<i>P. nigrum</i>	01PN	10
T15	<i>C. canephora</i>	05PE	10	T35	<i>P. nigrum</i>	02PN	10
T16	<i>P. edulis</i>	01PE	10	T36	<i>P. nigrum</i>	03PN	10
T17	<i>P. edulis</i>	02PE	10	T37	<i>C. canephora</i>	01CP	10
T18	<i>P. edulis</i>	03PE	10	T38	<i>C. canephora</i>	02CP	10
T19	<i>P. edulis</i>	04PE	10	T39	<i>C. papaya</i>	01CP	10
T20	<i>P. edulis</i>	05PE	10	T40	<i>C. papaya</i>	02CP	10

Distribuição dos tratamentos do experimento de patogenicidade realizado em casa de vegetação para as culturas do cafeeiro conilon (*C. canephora*), maracujazeiro (*P. edulis*), feijoeiro (*P. vulgaris*), Pimenteira-do-reino (*P. nigrum*) e mamoeiro (*C. papaya*) com isolados de Fusarium. Os códigos referentes a cada isolado representam as culturas das quais foram obtidos. Onde: CC = *C. canephora*; PE = *P. edulis*; PV = *P. vulgaris*; PN = *P. nigrum* e CP = *C. papaya*.

## ANEXO A – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS REGIÕES *RPB1* E *RPB2* AMPLIFICADAS



Mapa dos *loci* da maior subunidade da RNA polimerase (*RPB1*) e a segunda maior subunidade (*RPB2*). A localização e a orientação dos *primers* são indicadas por meio de setas. Os iniciadores F7 e G2R (Tabela 2) amplificaram com sucesso um fragmento de 937 a 958 pb de comprimento em todos os isolados, com exceção do 01CC (*Fusarium lateritium*), mesmo que os *primers* pareçam estar conservados para esta região, corroborando com resultados de O'Donnell et al., (2010). Juntamente, os iniciadores 5f2 e 7cR amplificaram com sucesso um fragmento de 855 a 996 pb de comprimento para todos os isolados.

## ANEXO B – TABELA SUPLEMENTAR 2

Equivalente # <sup>b</sup>	Espécie	Origem geográfica	Hospedeiro/substrato	GenBank	
				RPB1	RPB2
ATCC 24631	<i>F. sporotrichioides</i>	WI-USA	Cereal	JX171444.1	JX171558.1
CBS 158.31 = IMI 113883	<i>Cylindrocarpon</i> sp.	Netherlands	-	JX171445.1	JX171559.1
ATCC 36781	<i>F. armeniacum</i>	MO-USA	-	JX171446.1	JX171560.1
FRC R-2181	<i>F. nelsonii</i>	Australia	Solo	JX171447.1	JX171561.1
FRC R-4421	<i>F. longipes-1</i>	Australia	Solo	JX171448.1	JX171562.1
CBS 796.70 = DSM 62165	<i>F. buharicum</i>	Iran	<i>Hibiscus cannabinus</i>	JX171449.1	JX171563.1
FRC R-5128	<i>F. longipes-2</i>	New Guinea	Soil	JX171450.1	JX171564.1
BBA 62431=CBS 189.34	<i>F. sublunatum</i>	Costa Rica	Plantação de banana (solo)	JX171451.1	JX171565.1
FRC R-6363	<i>F. sciripi</i>	NSW, Australia	Pine nursery soil	JX171452.1	JX171566.1
FRC Rd-34	<i>F. decemcellulare</i>	Dominican Republic	Cafeeiros	JX171453.1	JX171567.1
FRC T-550	<i>F. atrovinosum</i>	Australia	Plantação de milho (solo)	JX171454.1	JX171568.1
FRC M-2405 = CBS 961.87	<i>F. concolor</i>	Transvaal, South Africa	Restos culturais	JX171455.1	X171569.1
ATCC 38941	<i>F. fujikuroi</i>	Taiwan	Arroz	JX171456.1	JX171570.1
FRC L-55	<i>F. lateritium</i>	LA-USA	Arvore do Olmo	JX171457.1	JX171571.1
FRC T-503 = MRC 2181	<i>F. poae</i>	Manatoba, Canada	Trigo hibernado	JX171458.1	JX171572.1
CBS 110257 = FRC R-5469	<i>F. asiaticum</i>	Japan	<i>Hordeum vulgare</i>	JX171459.1	JX171573.1
FRC R-6784 = MRC 2568	<i>F. cf. compactum</i>	Japan	Sedimento de rio	JX171460.1	JX171574.1
CBS 830.85 = BBA 64246	<i>F. ventricosum-1</i>	Germany	Tubérculo de batata	JX171461.1	JX171575.1
CBS 310.34	<i>M. coccophila</i>	Italy	<i>Laurus nobilis</i>	JX171462.1	X171576.1
CBS 172.31	<i>F. cavispermum</i>	Norway	<i>Pinus sylvestris</i>	JX171465.1	JX171579.1
CBS 297.78	<i>S.aureonitens</i>	NY-USA	Polypore	JX171464.1	JX171578.1
CBS 223.76 = BBA 63340	<i>F. sacchari</i>	India	<i>Saccharum officinarum</i>	JX171466.1	JX171580.1
CBS 130185 = IMI 300797	<i>F. lacertarum</i>	India	Pele de lagarto	JX171467.1	JX171581.1
ATCC 15662 = Gordon 4843	<i>F. stilbioides</i>	Nyasaland	Casca de café	JX171468.1	JX171582.1
CBS 716.74 = BBA 63203	<i>F. inflexum</i>	Germany	<i>Vicia faba</i>	JX171469.1	JX171583.1
IMI 296597	<i>F. ambrosium</i>	India	<i>Euwallacea fornicatus</i>	JX171470.1	JX171584.1

ATCC 44544	<i>F. albosuccineum</i>	Venezuela	Arvore	JX171471.1	JX171585.1
CBS 745.79 = BBA 63714	<i>F. sarcochroum</i>	Switzerland	<i>Viscum album</i>	JX171472.1	JX171586.1
CBS 738.79 = BBA 62239	<i>M. larvarum</i>	Iran	<i>Quadraspidiotus perniciosus</i>	JX171473.1	JX171587.1
CBS 734.79 = BBA 63669	<i>F. aquaeductuum</i>	Germany	Água	JX171476.1	JX171590.1
CBS 176.31	<i>F. nectrioides</i>	Honduras	Humus	JX171477.1	JX171591.1
CBS 489.81	<i>F. dimerum</i>	Romania	Soap	JX171478.1	JX171592.1
CBS 720.79 = PD 79/878	<i>F. heterosporum</i>	Netherlands	<i>Claviceps purpurea</i>	JX171481.1	JX171595.1
IMI 265540	<i>F. longipes-3</i>	England	Desconhecido	JX171483.1	JX171596.1
CBS 748.79 = BBA 62452	<i>F. ventricosum-3</i>	Germany	Solo de campo de trigo	JX171484.1	JX171597.1
CBS 123670 = FRC M-3125	<i>F. verticillioides</i>	CA-USA	<i>Zea mays</i> (milho)	JX171485.1	JX171598.1
CBS 747.97 = FRC M-3693	<i>F. subglutinans</i>	IL-USA	<i>Zea mays</i> (milho)	JX171486.1	JX171599.1
CBS 733.97 = MRC-6002	<i>F. thapsinum</i>	Natal, South Africa	<i>Sorghum bicolor</i>	JX171487.1	JX171600.1
BBA 67606 = GJS 82-98	<i>F. illudens</i>	New Zealand	<i>Beilschmiedia tawa</i>	JX171488.1	JX171601.1
IMI 301162	<i>F. ciliatum</i>	Denmark	<i>Hordeum vulgare</i>	JX171489.1	JX171602.1
IMI 279297	<i>F. rusci</i>	England	<i>Ruscus aculeatus</i>	JX171490.1	JX171603.1
IMI 297027	<i>Fusicolla</i> sp.	India	Waste water and sludge	JX171491.1	JX171604.1
ATCC 44543	<i>F. albidum</i>	Jamaica	Woody stem bark	JX171492.1	JX171605.1
BBA 64226	<i>F. sambucinum</i>	England	<i>Solanum lycopersicum</i>	JX171493.1	JX171606.1
BBA 65031	<i>F. venenatum</i>	Germany	<i>Zea mays</i> (Corn)	JX171494.1	JX171607.1
ATCC 38466	<i>F. phaseoli</i>	USA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	JX171495.1	JX171608.1
GJS 92-125	<i>F. staphyleae</i>	NJ-USA	<i>Staphylea trifolia</i>	JX171496.1	JX171609.1
CBS 325.54 = ATCC 16238	<i>F. neocosmosporiellum</i>	South Africa	Solo	JX171497.1	JX171610.1
GJS 86-509	<i>F. zealandicum</i>	New Zealand	Casca de árvore dicotiledônea	JX171498.1	JX171611.1
DOAM	<i>C. cylindroides</i>	BC, Canada	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	JX171499.1	JX171612.1
GJS 84-426 = BBA 64532	<i>F. verrucosum</i>	Venezuela	Colmo de bambu	JX171500.1	JX171613.1
GJS 83-146 = BBA 68511	<i>F. plagianthi</i>	New Zealand	<i>Hoheria glabrata</i>	JX171501.1	JX171614.1
BBA 64990	<i>F. torulosum</i>	Netherlands	<i>Buxus</i> sp. tree	JX171502.1	JX171615.1
CBS 743.97 = IMI 375334	<i>F. redolens</i>	BC, Canada	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	JX171503.1	JX171616.1
CBS 217.76 = BBA 63624	<i>F. proliferatum</i>	Germany	<i>Cymbidium</i> sp.	JX171504.1	JX171617.1
CBS 184.29 = IMI 375350	<i>F. guttiforme</i>	England	<i>Ananas comosus</i>	JX171505.1	JX171618.1

CBS 740.97 = BBA 65829	<i>F. beomiforme</i>	New Caledonia	Solo	JX171506.1	JX171619.1
CBS 742.97 = MAFF 237509	<i>F. nisikadoi</i>	Japan	<i>P. nigra</i> var. <i>henonis</i>	JX171507.1	JX171620.1
CBS 573.94 = BBA 65467	<i>Fusarium</i> sp.	Germany	Solo de turfa	JX171508.1	JX171621.1
IMI 375361 = BBA 69662	<i>F. mangifera</i>	India	<i>Mangifera indica</i>	JX171509.1	JX171622.1
CBS 405.97 = TRG SL-1	<i>F. circinatum</i>	CA-USA	<i>Pinus radiata</i>	JX171510.1	JX171623.1
FRC R-7361	<i>F. anguoides</i>	China	Bamboo grove soil	JX171511.1	JX171624.1
ATCC 26225	<i>F. oxysporum</i>	New Zealand	Humano	JX171512.1	JX171625.1
F10108	<i>F. aywerte</i>	N. Territory, Australia	Solo	JX171513.1	JX171626.1
CBS 831.85 = BBA 64346	<i>F. flocciferum</i>	Germany	<i>Triticum aestivum</i>	JX171514.1	JX171627.1
CBS 417.66 = FRC R-8504	<i>F. culmorum</i>	Denmark	<i>Hordeum vulgare</i>	JX171515.1	JX171628.1
CBS 393.93 = BBA 64485	<i>F. tricinctum</i>	Germany	Colmo de trigo de invierno	JX171516.1	JX171629.1
CBS 258.52	<i>F. xylarioides</i>	Ivory Coast	<i>Coffee</i> sp. trunk	JX171517.1	JX171630.1
ARSEF 3696	<i>Fusarium</i> sp.	MD-USA	<i>Lymantria dispar</i>	JX171518.1	JX171631.1
CBS 396.96 = F11165	<i>F. babinda</i>	Queensland, Australia	Solo da floresta tropical	JX171519.1	JX171632.1
CBS 430.91	<i>F. ventricosum-2</i>	Germany	<i>Robinia pseudo-acacia</i>	JX171520.1	JX171633.1
CBS 577.97	<i>F. miscanthi</i>	Denmark	<i>Miscanthus</i> sp.	JX171521.1	JX171634.1
CBS 544.96	<i>Fusarium</i> sp.	Cuba	Ninhada de folhas	JX171522.1	JX171635.1
JDL-1	<i>Microcera</i> sp.	MA-USA	<i>Parmelia rudecta</i>	JX171523.1	JX171636.1
CBS 109956 = MAFF 237835	<i>F. pseudograminearum</i>	NSW, Australia	<i>Hordeum vulgare</i>	JX171524.1	JX171637.1
PD 90/1377	<i>F. commune</i>	Netherlands	<i>Dianthus caryophyllus</i>	JX171525.1	JX171638.1
CBS 615.87	<i>Fusarium</i> sp.	Cuba	<i>Colocasia esculenta</i> leaf	JX171526.1	JX171639.1
FRC 0-2074	<i>F. hostae</i>	SC-USA	<i>Hosta</i> sp.	JX171527.1	JX171640.1
CBS 116517	<i>F. domesticum</i>	Switzerland	Swiss Raclette cheese	JX171528.1	JX171641.1
BBA 63772	<i>Fusarium</i> sp.	Australia	Solo	JX171529.1	JX171642.1
Li #95	<i>F. virguliforme</i>	IL-USA	<i>Glycine max</i> (Soybean)	JX171530.1	JX171643.1
PH1 = CBS 123657	<i>F. graminearum</i>	MI-USA	<i>Zea mays</i> (Corn)	JX171531.1	JX171644.1
MDA F10	<i>Fusarium</i> sp.	TX-USA	Humano	JX171532.1	JX171645.1
Di Pietro 4287 = CBS 123668	<i>F. oxysporum</i>	Spain	<i>Solanum lycopersicum</i>	JX171533.1	JX171646.1
CBS 632.76 = BBA 63199	<i>F. lunatum</i>	Germany	<i>Gymnocalcium damsii</i>	JX171536.1	JX171648.1
CBS 202.65 = DSM 62248	<i>F. melanochlorum</i>	Austria	<i>Fagus sylvatica</i> canker	JX171537.1	JX171649.1

CBS 392.96 = F11123	<i>F. nurragi</i>	Victoria, Australia	Solo de Heathland	JX171 <b>538</b> .1	JX171650.1
CBS 635.92 = GJS 88-12	<i>F. setosum</i>	French Guiana	Tree bark	JX171 <b>539</b> .1	JX171651.1
CBS 735.79 = BBA 61173	<i>M. diploa</i>	Iran	Scale insect on <i>Laurus nobilis</i>	JX171 <b>463</b> .1	JX171577.1
FRC O-1188	<i>F. foetens</i>	Chile	<i>Pinus radiata</i>	JX171 <b>540</b> .1	JX171652.1
CDC 2006743575	<i>F. falciforme</i>	FL-USA	Olho humano	JX171 <b>541</b> .1	JX171653.1
FRC M-8754	<i>F. gaditjirrii</i>	Australia	<i>Heteropogon triticeus</i>	JX171 <b>542</b> .1	JX171654.1
ARSEF 6460	<i>Fusarium</i> sp.	Columbia	<i>Mahanarva andigena</i>	JX171 <b>544</b> .1	JX171656.1
CBS 114050	<i>C. coccinea</i>	Germany	<i>Fagus sylvatica</i>	JX171 <b>545</b> .1	JX171657.1
CBS 121131	<i>Hypocrea</i> sp.	England	<i>Fagus sylvatica</i>	JX171 <b>547</b> .1	JX171659.1
JAS 5005-08	<i>F. torreyae</i>	FL-USA	<i>Torreya taxifolia</i>	JX171 <b>548</b> .1	JX171660.1
F19374 = CBS 125536	<i>F. lyarnte</i>	Australia	Endofítico	JX171 <b>549</b> .1	JX171661.1
CBS 748.69	<i>Cosmospora arxii</i>	Germany	<i>Hypoxylon</i> sp.	JX171 <b>554</b> .1	JX171665.1
CBS 762.69	<i>C. cymosa</i>	Germany	<i>Inonotus radiatus</i>	JX171 <b>555</b> .1	JX171666.1
CBS 100001	<i>M. leptosphaeriae</i>	Netherlands	<i>Leptosphaeria</i> sp.	JX171 <b>556</b> .1	JX171667.1
CBS 125496	<i>Macroconia</i> sp.	AZ-USA	<i>Quercus</i> sp.	JX171 <b>557</b> .1	JX171668.1
5001	<i>F. avenaceum</i>	Finland	<i>Hordeum vulgare</i>	JX171 <b>551</b> .1	JX171663.1
88E	<i>F. langsethiae</i>	Norway	<i>Avena sativa</i>	JX171 <b>550</b> .1	JX171662.1
NRRL 45880	<i>[Nectria] haematococca</i>	-	-	JX171 <b>543</b> .1	JX171655.1
NRRL 54563	<i>Macroconia</i> sp.	-	-	JX171 <b>557</b> .1	JX171669.1
NRRL 20693	<i>Fusarium heterosporum</i>	-	-	JX171 <b>480</b> .1	JX171594.1
NRRL 20487	<i>Neonectria galligena</i>	-	-	JX171 <b>475</b> .1	JX171589.1
NRRL 20485	<i>Neonectria coccinea</i>	-	-	JX171 <b>474</b> .1	JX171588.1
NRRL 36148	<i>Nectria desmazierii</i>	-	-	JX171 <b>534</b> .1	JX171647.1

Isolados utilizados no estudo da filogenia de espécies de *Fusarium* spp. de *Coffea canephora*, *Passiflora edulis*, *Phaseolus vulgaris*, *Pippier nigrum* e *Carica papaya* para as regiões RPB1 e RPB2 e seus respectivos códigos de acesso do GenBank (NCBI,2019) retirados do banco de dados fornecido por O'Donnell et al. (2013). A região realçada em cinza dos códigos de acesso das sequências de RPB1 indicam o número corresponde dos indivíduos nas filogenias do presente estudo (**Figura 2, Figura 3, APÊNDICE A e B**).