



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO
SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

LORENA CARNIELLI

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Fusarium guttiforme*,
AGENTE ETIOLÓGICO DA FUSARIOSE DO
ABACAXIZEIRO**

Vitória – ES
2014

LORENA CARNIELLI

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Fusarium guttiforme*,
AGENTE ETIOLÓGICO DA FUSARIOSE DO
ABACAXIZEIRO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo sob a orientação do Prof. Dr. José Aires Ventura como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Vitória – ES
2014

LORENA CARNIELLI

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Fusarium guttiforme*,
AGENTE ETIOLÓGICO DA FUSARIOSE DO
ABACAXIZEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 11 de abril de 2014.

Prof. Dr. José Aires Ventura
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Adalberto Corrêa Café Filho
Universidade de Brasília

Dr. Hélcio Costa
Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência
Técnica e Extensão Rural

Vitória – ES
2014

Aos meus pais, Nelson e Marta,
e ao meu amor, Ricardo,
com muito carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e a Nossa Senhora, por me conduzir diariamente.

Agradeço, com carinho, ao Prof. Dr. José Aires Ventura por sua orientação apaixonada, pelos constantes ensinamentos e pela confiança. Foi de fundamental importância para minha formação profissional.

À Prof.^a Dr.^a Patricia M.B. Fernandes e ao Prof. Dr. A. Alberto R. Fernandes pelo convívio, pelos conselhos e por serem exemplos de dedicação e empenho para o fortalecimento da Biotecnologia no país.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela atenção e ensinamentos.

Aos amigos que fazem e fizeram parte do Laboratório de Biotecnologia Aplicado ao Agronegócio, por contribuírem cientificamente para o desenvolvimento do meu trabalho, para minha formação profissional e, acima de tudo, tornarem o ambiente de trabalho mais descontraído.

A toda minha família, meus pais e minhas irmãs, pelo carinho e amizade.

Ao meu amor, Ricardo, pelo incentivo, torcida e espera. Foram dois anos de apoio e compreensão.

Ao INCAPER, que colaborou com a realização desta pesquisa.

E, as agências de fomento FINEP, CNPq, FAPES, CAPES pelo apoio financeiro e bolsa de estudo que viabilizou o desenvolvimento deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

A cultura do abacaxi tem grande destaque para o Brasil devido sua importância econômica. No entanto, doenças que atingem os abacaxizeiros têm causado elevados prejuízos e dentre elas, destaca-se a fusariose. O agente etiológico da fusariose é o fungo *Fusarium guttiforme*. A dificuldade com o diagnóstico convencional para a correta identificação tem levado à busca de novas metodologias. Nesse trabalho, utilizou-se a técnica de PCR em tempo real com o objetivo de desenvolver uma metodologia rápida, sensível e específica para o diagnóstico do *F. guttiforme*. Os isolados foram avaliados quanto às características morfológicas e também identificados por PCR multiplex (β -tubulina e fator de alongação 1- α) e pela patogenicidade. No diagnóstico realizado por PCR em Tempo Real usou-se o corante SYBRGreen e um par de *primer* específico para o gene fator de alongação 1- α (*tef1*). Os resultados obtidos na caracterização morfológica demonstraram que as estruturas micromorfológicas dos isolados avaliados estavam de acordo com os descritores para espécie e verificou-se variabilidade no crescimento dos isolados nas temperaturas de 25 °C e 30 °C. No teste de patogenicidade em mudas da cv. Pérola (suscetível) houve variação entre os isolados em relação à severidade de doença. A presença de dois pares de *primers* contribui para um menor número de falsos negativos, mas o teste teve uma especificidade muito baixa. Entretanto o diagnóstico por meio da PCR em tempo real teve uma excelente sensibilidade (90,5%), especificidade (100%) com nível de significância de $p < 0,0001$. A simplicidade do método, a especificidade e a sensibilidade, com a utilização do SYBRGreen, levam à recomendação do método como rápido, de reduzido risco de contaminação pós-amplificação e detecção de quantidades relativamente pequenas de DNA alvo. A facilidade de quantificação e a melhoria nos protocolos faz com que a tecnologia de PCR em tempo real seja referência para a detecção do *Fusarium guttiforme* em abacaxizeiro.

Palavras-chave: *Fusarium guttiforme*, PCR em tempo real, Diagnóstico, Fusariose

ABSTRACT

The pineapple crop has high significance in Brazil, due to its economic magnitude. However, diseases of the pineapple plant have caused major economic losses, and among those, the fusariosis is the most important. The etiological agent of the fusariosis is the fungus *Fusarium guttiforme*. The difficulty with the conventional diagnosis for correct identification has led to the search for new methods. In this study, the real time PCR method was tested with the goal of developing a rapid, specific and sensitive method for the diagnose of the *F. guttiforme*. The isolates were analyzed on its morphological characteristics and also identified by multiplex PCR (β -tubulin and factor 1- α gene) and by pathogenicity tests. In the diagnosis by real time PCR, SYBRGreen dye along with and a specific pair of primers for the elongation factor 1- α gene (*tef1*). The result obtained on the morphological characterization demonstrated that the micromorphological structures analyzed agreed with those described for the species and that there is variability in the growth of the isolates at 25°C and 30°C. In the pathogenicity test in seedlings of cv. Perola (susceptible) there was variation among isolates. The presence of two pairs of primers contributed to a low false number of negatives, but the test also had low specificity. However, the diagnostic by real time PCR showed good results, with high sensitivity (90,5%) and specificity (100%) with statistically significant p-value ($p < 0,0001$). The simplicity of the method, the specificity and the sensitivity using the SYBRGreen dye, indicates that de real time PCR technologies is recommended as fast, reduced risk of contamination and post-amplification detection of relatively low amount of target DNA. The ease of quantification and improving protocols makes real time PCR is a reference for the detection of *Fusarium guttiforme* in the pineapple plant.

Key words: *Fusarium guttiforme*, real time PCR, Diagnosis, Fusariosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição dos valores de crescimento radial dos isolados de <i>Fusarium</i> a 25°C e 30°C após 3 dias de incubação em meio BDA no escuro.	29
Figura 2: Valores de crescimento radial dos isolados de <i>Fusarium</i> em temperaturas de 25°C e 30°C..	29
Figura 3: Padrão de coloração obtido em meio de cultura BDA para os isolados de <i>Fusarium guttiforme</i>	30
Figura 4: Mudanças de abacaxizeiro da cv. Pérola inoculadas com <i>F. guttiforme</i>	31
Figura 5: Resultados representativos da PCR multiplex em gel de agarose 1,5% para alguns dos isolados analisados.....	34
Figura 6: Amplificação dos isolados de <i>Fusarium</i> e amostras de planta com os primers <i>tef1a/tef1b</i>	37
Figura 7: Amplificação das amostras de abacaxizeiros inoculadas com <i>Fusarium</i> por PCR em tempo real para gene <i>tef 1-α</i>	40
Figura 8: Curvas de Melting para as 25 amostras dos abacaxizeiros inoculados com <i>Fusarium</i>	41
Figura 9: Curvas de <i>Melting</i> para amostras do campo.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição das estruturas morfológicas das espécies <i>F. guttiforme</i> e <i>F. ananatum</i>	27
Tabela 2: Teste de patogenicidade dos isolados associados ao abacaxizeiro	32
Tabela 3: Eficiência relativa da amplificação da PCR em tempo real dos gene fator de alongação 1- α (<i>primers</i> tef1a/tef1b) e β -tubulina (<i>primers</i> bTa/bTb)	35
Tabela 4: Especificidade dos primers em valores cycle threshold (<i>Ct</i>) para os gene tef 1- α (<i>primers</i> tef1a/tef1b) e β -tubulina (<i>primers</i> bTa/bTb).....	36
Tabela 5: Valores de Cycle Threshold (<i>Ct</i>) das amostras de tecido vegetal obtido de plantas sadias e doentes, amplificadas para o gene fator de alongação 1- α , utilizando a técnica de PCR em tempo real.....	39
Tabela 6: Valores de Cycle <i>Threshold</i> (<i>Ct</i>) e da temperatura de <i>Melting</i> (<i>Tm</i>) das amostras do campo para o gene fator de alongação 1- α (tef1a/tef1b).....	42
Tabela 7: Comparação dos resultados de sintomatologia e PCR em tempo real para amostras do campo.....	43
Tabela 8: Comparação dos resultados obtidos no teste de patogenicidade, PCR <i>multiplex</i> e PCR em tempo real.....	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Fusariose do Abacaxizeiro.....	12
1.2	Diagnóstico Molecular	13
1.2.1	<i>Sensibilidade e especificidade de métodos moleculares</i>	16
1.2.2	<i>A PCR em tempo real</i>	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivo específico	19
3	METODOLOGIA.....	20
3.1	Obtenção dos Isolados.....	20
3.2	Cultura Monospórica	20
3.3	Caracterização Morfológica	21
3.4	Patogenicidade e virulência dos isolados	21
3.5	Extração de DNA.....	22
3.6	Identificação do <i>Fusarium guttiforme</i> por PCR Multiplex	23
3.7	Diagnóstico da Fusariose por PCR em Tempo Real.....	24
3.8	Análises estatísticas.....	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1	Caracterização morfológica	26
4.2	Avaliação da patogenicidade e virulência	31
4.3	Identificação dos isolados por PCR multiplex	33
4.4	Diagnóstico da fusariose por PCR em tempo real	35
4.4.1	<i>Eficiência da Amplificação</i>	35
4.4.2	<i>Especificidade relativa dos primers</i>	36
4.4.3	<i>Metodologia do diagnóstico da fusariose por PCR em Tempo Real</i> ...38	
5	CONCLUSÕES	46
6	REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

O abacaxi (*Ananas comosus* var. *comosus*) é uma planta monocotiledônea, herbácea, perene e pertencente à família Bromeliaceae, que tem como centro de origem a América Tropical de onde se disseminou pelo mundo (CRESTANI et al., 2010).

A cultura do abacaxi tem grande destaque para o Brasil que foi o 3º maior produtor mundial (2.478.178 toneladas) em 2012, cuja produção foi superada apenas pela Tailândia (2.650.000 toneladas) e Costa Rica (2.484.729 toneladas) (FAO, 2012). No entanto, o alto rendimento da produção tem nas doenças, um dos principais fatores de prejuízo.

A fusariose destaca-se como a doença, responsável pelas maiores perdas econômicas, uma vez que os prejuízos estimados com material de propagação vegetativa chegam a 20% e nos frutos podem chegar a 40% (VENTURA, 2009).

Outro fator importante é a fusariose ser uma doença quarentenária para vários países produtores de abacaxi, ou seja, se classifica dentro das doenças que necessitam de medidas de biossegurança para evitar sua disseminação, principalmente porque não apresentam sintomas em muitas fases de desenvolvimento da planta e, assim, são facilmente focos de contaminação para outras regiões dos países produtores. Isso se torna ainda mais grave quando ameaça países cuja principal fonte econômica é a abacaxicultura, como na América Central, África e Ásia. Entretanto, o cumprimento das regras e procedimentos padrão nem sempre é efetuado com eficiência, tornando muitos países vulneráveis à entrada de patógenos quarentenários e exigindo medidas de rápido diagnóstico que possam facilitar a logística da quarentena e evitar prejuízos econômicos (SCHAAD et al., 2003).

Dessa maneira, é válido ressaltar a necessidade da proteção sanitária vegetal, como o conjunto de medidas adotadas pela agricultura para evitar a propagação de pragas e doenças, especialmente as exóticas, em biomassa, plantações ou áreas livres em que os organismos hospedeiros não contam com defesas ou mecanismos naturais de controle biológico. Cada país estabelece regras para garantir a qualidade e segurança dos produtos comercializados. Entre os critérios mais comuns estão controle de pragas, resíduos e contaminantes e requisitos, como boas práticas agrícolas e de fabricação e padrões de higiene operacionais (BRASIL, 2014).

No Brasil, o Certificado Fitossanitário (CF) atesta a condição fitossanitária da partida de plantas, partes de vegetais, produtos de origem vegetal e outros artigos regulamentados, acordo com as normas de defesa sanitária vegetal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), exigidos na exportação. Quanto à importação, o país estabelece requisitos fitossanitários baseados na categorização de acordo com seu nível de risco, com base no grau de processamento e uso proposto (BRASIL, 2014). Adotando e cumprindo normas é possível evitar a propagação de pragas para países que são grandes importadores dos produtos agrícolas do Brasil, bem como a contaminação das culturas no país.

É necessário salientar, portanto, que todas as rígidas medidas de controle da contaminação da abacaxicultura e sua importância na economia de muitos países justificam a busca por uma metodologia de diagnóstico, rápida e eficiente, que contribua com a segurança das culturas, das importações e das exportações de abacaxi pelo mundo.

Outra maneira eficaz no controle de disseminação é a busca por cultivares resistentes. No entanto, o desenvolvimento de programas de melhoramento visando resistência genética a uma determinada doença, requer o conhecimento prévio da variabilidade genética do patógeno demonstrando, portanto, a extrema importância de estudos nessa área (SANTOS et al, 2002).

1.1 Fusariose do Abacaxizeiro

A fusariose é a principal doença do abacaxizeiro. Foi relatada pela primeira vez na Argentina, em 1954 (VENTURA et al., 1981; VENTURA; ZAMBOLIM, 2002). No Brasil, foi registrada dez anos depois, no estado de São Paulo, na cultivar Smooth Cayenne (KIMATI; TOKESHI, 1964, apud SANTOS et al, 2002), que favoreceu a disseminação do patógeno para todas as regiões produtoras por meio do material propagativo infectado (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

O agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro pertence ao gênero *Fusarium* e foi inicialmente identificado como *F. moniliforme* var. *subglutinans* e posteriormente como *Fusarium subglutinans* (NELSON et al., 1983). Porém, devido a sua especificidade ao abacaxi (*Ananas comosus* var. *comosus*) e à variação com outros isolados do fungo da mesma espécie, que não são patogênicos para o abacaxizeiro, uma nova *forma specialis* foi proposta, sendo denominado *F. subglutinans* f. sp. *anas* Ventura, Zambolin & Gilbertson (VENTURA, 1993). No entanto, Nirenberg e O'Donnell (1998), baseados na análise molecular dos fragmentos gênicos que codificam as subunidades 18S e menor subunidade mitocondrial (mtSSu) do DNA ribossômico, β -tubulina, fator de alongação 1- α e calmodulina, reclassificaram o agente etiológico da fusariose como uma nova espécie o *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell (NIRENBERG; O'DONNELL, 1998; O'DONNELL et al., 1998, 2000).

A fusariose ocorre em todas as partes da planta e em todos os estádios de desenvolvimento, sendo mais frequentemente relatada nos frutos. Os sintomas característicos são a exsudação de goma, curvatura no ápice do talo, encurtamento do talo, redução no desenvolvimento da planta, morte do meristema apical, clorose, murcha e morte da planta (PISSARRA et al., 1979). No entanto, nos estádios iniciais esses sintomas são quase imperceptíveis, levando utilização do material propagativo doente no plantio que, por sua vez, gerarão plantas que serão comercializadas, tornando a principal forma de disseminação do patógeno (PISSARRA et al., 1979; VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

A ocorrência de diferentes sintomas em frutos de abacaxi e a ausência da fusariose em outros países produtores de abacaxi levaram a uma reavaliação dos isolados de *Fusarium* associados à podridão dos frutos. Jacobs et al. (2010), analisaram morfologia e relações filogenéticas, com base nas sequências parciais dos genes codificantes do fator de alongação 1- α , histona H3 e β -tubulina, entre isolados obtidos de frutos de abacaxi do Brasil e da África do Sul e os resultados mostraram que os isolados africanos representam uma espécie distinta descrita como *Fusarium ananatum* que causa uma doença mais branda, associada à mancha negra (*Black spot*) atribuída anteriormente ao *Penicillium funiculosum* e ao *F. verticillioides*.

1.2 Diagnóstico Molecular

A capacidade de identificar organismos responsáveis por doenças que atingem as mais diferentes culturas é a base da fitopatologia. Sem essa habilidade não é possível compreender e, em muitos casos, controlar as doenças. Estudos de propagação de uma doença com a estimativa de perda de rendimento da produção e implementação de procedimentos para doenças quarentenárias, são alguns dos exemplos que requerem a identificação e o diagnóstico do agente etiológico (MCCARTNEY et al., 2003).

Historicamente, isolados de fungos tem sido identificados com base no exame microscópico para buscar diferenças entre suas culturas e identificar características morfológicas específicas tais como, tamanhos dos conídios, forma e estrutura das hifas (DEAN et al., 2005).

A primeira etapa na identificação de uma espécie, pelo diagnóstico convencional, é descrever claramente a doença, os sintomas observados na planta doente e notar as condições ambientais em que a doença ocorreu. Em seguida, fazer o isolamento

e a purificação do possível agente patogênico para ser avaliado quanto aos caracteres morfológicos. Essa caracterização é feita em diferentes meios de culturas para analisar a formação, que nas espécies de *Fusarium* inclui a presença e forma de micro e macroconídios, número de septos, padrão de coloração e crescimento da cultura, presença ou ausência de clamidósporos, levando pelo menos, 10 dias para avaliação completa das estruturas (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Destaca-se ainda que esses métodos, além de demorados, são subjetivos e muitas vezes levam à incorreta identificação das espécies (DEAN et al., 2005).

O *Fusarium guttiforme* faz parte do complexo *Gibberella fujikuroi* (CGF). Complexo este que tem uma taxonomia altamente controversa, reflexo dos divergentes conceitos de espécies morfológicas, baseada no tradicional esquema de classificação para o gênero (O'DONNELL; CIGELNIK; NIRENBERG, 1998). Essas condições fazem com que o desenvolvimento de novas metodologias para identificação de fungos de uma maneira mais rápida, altamente específica e sensível, seja extremamente importante (DEAN, et al., 2005). O diagnóstico molecular é considerado atualmente o método mais adequado para fins de diagnóstico complementando ou substituindo a identificação morfológica que nem sempre é possível pela proximidade das espécies e ausência de marcadores morfológicos consistentes.

Métodos moleculares estão sendo amplamente aplicados nos diagnósticos de agentes patogênicos de plantas e incluem testes imunológicos, sondas de DNA e RNA, reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento. Essas técnicas têm várias vantagens em relação ao método convencional por serem mais precisas, rápidas, confiáveis e não necessitarem de uma interpretação subjetiva (MCCARTNEY et al., 2003).

Técnicas imunológicas, baseadas no reconhecimento de anticorpos para antígenos específicos têm sido utilizadas para detectar e quantificar patógenos de forma simples e rápida. No entanto, pode ser muito difícil e caro produzir anticorpos que possuem o requerido grau de especificidade. Embora o desenvolvimento de anticorpos para vírus de plantas tenham sido geralmente bem sucedido, a abordagem não funciona tão bem para organismos mais complexos, tais como

fungos. Especificidade e precisão da detecção é vital para a maioria dos diagnósticos, isto pode limitar a utilização de métodos sorológicos para detecção de fungos fitopatogênicos (MCCARTNEY et al., 2003).

Ao longo dos últimos dez anos, muitos esforços foram feitos para o desenvolvimento de métodos de detecção e identificação com base nas sondas de DNA e RNA e amplificação de sequências por PCR. As maiores vantagens dessas técnicas são a alta especificidade, a distinção entre diferentes espécies e a possibilidade de determinar as propriedades genéticas particulares do agente patogênico tais como, a resistência a fungicidas e as características quanto a virulência (MCCARTNEY et al., 2003). A análise filogenética de genes provou ser bastante útil para delimitar com precisão espécies do gênero *Fusarium* e, sendo assim, o conceito de espécie filogenética revolucionou a taxonomia de fungos (O'DONNELL et al., 2010).

Atualmente, a PCR vem sendo amplamente utilizada para a detecção de patógenos vegetais com o objetivo, entre outros, de evitar sua disseminação via a introdução de material vegetal contaminado em outros países. Para que as plantas sejam introduzidas pela exportação, devem permanecer estocadas em câmara fria, de forma segura, até que se tenha o resultado do teste de sanidade. O tempo necessário para a obtenção dos resultados pelo método tradicional é longo, o que leva à perda de vigor das plantas enquanto estocadas, inviabilizando seu comércio. A necessidade de diminuir o tempo de estocagem das plantas em análise levou a busca por novas metodologias e o uso da PCR tem se tornado uma alternativa metodológica particularmente importante para o diagnóstico de fitopatógenos de difícil cultivo e/ou identificação (FUNGARO, 2000).

Muitos estudos moleculares envolvendo espécies do gênero *Fusarium*, nos últimos anos, têm sido relacionados à análise filogenética, um método molecular que permite estabelecer taxonomia por meio do arranjo de três ou mais genes que possuam sinal filogenético tais como, subunidade 28S e a menor subunidade mitocondrial (mtSSU) do DNA ribossômico, β -tubulina, histona h3, calmodulina e fator de alongação 1- α (KVAS et al, 2009; JACOBS et al, 2010; O'DONNELL et al, 1998). O gene que codifica o fator de alongação 1- α tornou-se uma boa escolha como marcador, por ser um gene de cópia única, altamente informativo entre

espécies estreitamente relacionadas (GEISER et al, 2004; KVAS et al, 2009). Os dados moleculares são frequentemente analisados utilizando máxima parcimônia na análise cladística.

1.2.1 Sensibilidade e especificidade de métodos moleculares

A detecção precoce de agentes patogênicos antes que culturas sejam infectadas ou desenvolvam sintomas, é essencial para a prevenção de doenças, disseminação do inóculo e perdas econômicas. Portanto, procedimentos de diagnóstico devem ser capazes de detectar a menor quantidade do patógeno presente, ou seja, ter alta sensibilidade.

A PCR em tempo real foi introduzida como diagnóstico molecular com intuito de aumentar a sensibilidade e evitar falsos negativos, permitindo a detecção de pequenas quantidades de DNA (YAO, 1991). É preciso, entretanto, ter cuidado com a alta sensibilidade do método, pois contaminações podem gerar resultados falsos positivos. Dessa maneira, rigorosos controles para evitar contaminações em todas as etapas do experimento são necessários (KWOK; HIGUCHI, 1989).

Uma das mais importantes vantagens que as técnicas de detecção baseadas nos ensaios moleculares têm, em relação aos métodos convencionais de diagnóstico, é o poder de, em princípio, distinguir organismos estreitamente relacionados, ou seja, sua especificidade. Espécies microbianas, por exemplo, quando estreitamente relacionadas, muitas vezes diferem em apenas uma base em um determinado gene conservado. No entanto, o elevado grau de especificidade dessas técnicas permite a detecção de sutis diferenças (LIEVENS; THOMMA, 2005).

Para aumentar a especificidade de um ensaio, uma combinação de múltiplas regiões pode ser explorada. Obviamente, a especificidade é determinada pelas sequências que são direcionadas. Uma estratégia é segmentação de genes conhecidos que

contém a variação da sequência que pode ser explorada. Uma grande quantidade de sequências está disponível em bancos de dados, que auxiliam a criação de um ensaio de diagnóstico. Estes dados permitem a comparação de sequências que, por sua vez, determinam regiões de diagnóstico alcançando a especificidade requerida (WHITE, 1990).

Muitos trabalhos estão usando as ferramentas de diagnóstico molecular para identificação de fitopatógenos. Dean e colaboradores (2005), estudando quatro espécies de fungos relevantes na contaminação ambiental, empregaram o uso da PCR multiplex como técnica de identificação e obtiveram um resultado onde o tempo realização do ensaio foi significativamente reduzido.

Lievens e colaboradores (2006) conduziram um estudo para detectar e quantificar por PCR em tempo real, patógenos que causam doenças em tomateiros, a partir de amostras de planta e solo, e obtiveram uma quantificação precisa mesmo partindo de amostras de solo que naturalmente contém uma imensa variedade de micro-organismos. Strausbaugh e colaboradores (2005) por sua vez, fizeram um ensaio para identificar e quantificar fungos do gênero *Fusarium* que causam doenças nas raízes de plantas de trigo e cevada e os resultados gerados mostraram-se úteis para seleção de cereais resistentes ao *F. culmorum* e ao *F. pseudograminearum*.

É, portanto, importante ressaltar que, a boa sensibilidade e especificidade dos ensaios com PCR vêm contribuindo para a evolução da técnica e agilidade no diagnóstico de doenças de plantas favorecendo, principalmente, as doenças quarentenárias que exigem rígidos controles e rápidos resultados, evitando perdas econômicas.

1.2.2 A PCR em tempo real

Na biologia molecular, a PCR em tempo real quantitativa (*real time* PCR ou qPCR) é uma técnica laboratorial baseada na PCR para amplificar ácidos nucleicos. A qPCR

combina a metodologia de PCR convencional com um mecanismo de detecção e quantificação através da emissão de fluorescência, permitindo o monitoramento da reação em tempo real. A qPCR permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA sejam realizados em uma única etapa, agilizando a obtenção de resultados, diminuindo o risco de contaminação da amostra e garantindo maior precisão (KUBISTA et al., 2006).

A PCR em tempo real permite quantificar de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é o *cycle threshold* (*Ct*). Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência. A emissão de compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto de PCR. A detecção da amplificação na qPCR é realizada com o uso de sondas fluorescentes específicas para uma região da molécula que será amplificada, ou também com o uso de reagentes fluorescentes que se intercalam na molécula de DNA (PIRES-ALVES; NOVAIS, 2004).

Nestas reações, também é gerada uma curva, a curva de *melting*, obtida pela temperatura de dissociação (*Tm*). A *Tm* é a temperatura na qual metade das fitas de DNA está na forma de fitas simples e a outra metade na forma de dupla hélice. Assim, a *Tm* é dependente da composição do DNA, de modo que, por exemplo, um aumento do conteúdo de G+C no DNA gera um incremento na *Tm* ocasionado pelo seu maior número de ligações de ponte de Hidrogênio em relação a A+T. A análise desses resultados possibilita a identificação do fragmento do microrganismo amplificado através de uma temperatura específica (temperatura de *melting*), podendo também distinguir sequências de composições semelhantes com bases na diferença de suas temperaturas de dissociação (KUBISTA et al., 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia rápida, sensível e específica para o diagnóstico do *Fusarium guttiforme*, agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar características morfológicas dos isolados desse estudo comparando ao *Fusarium guttiforme*;
- Realizar o teste de patogenicidade dos isolados;
- Identificar os isolados de *Fusarium* por PCR multiplex e comparar os resultados com os obtidos no teste de patogenicidade;
- Validar a metodologia de diagnóstico por PCR em tempo real, para o diagnóstico de amostras naturalmente infectadas por *F. guttiforme*.

3 METODOLOGIA

3.1 Obtenção dos Isolados

Foram utilizados neste estudo 40 isolados de *Fusarium* associados ao abacaxizeiro, obtidos da micoteca do Laboratório de Fitopatologia do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), localizado no município de Domingos Martins no estado do Espírito Santo. Além dos isolados de referência da espécie *Fusarium guttiforme* (E-203) (NRRL 25624) e *Fusarium ananatum* (E-680) (CBS 118518). Todos os isolados, após a cultura monospórica, foram preservados em microtubos e armazenados a 4°C, no escuro.

3.2 Cultura Monospórica

Inicialmente, cada isolado foi semeado em tudo de ensaio inclinado contendo meio batata dextrose ágar (BDA). Depois de 7 dias de crescimento fez-se a suspensão fúngica, seguida de diluição seriada e semeadura em placa de Petri contendo ágar água. Após 24 horas observou-se o brotamento dos conídios que foram removidos com auxílio de uma agulha e inoculados em novas placas de Petri contendo ágar água para crescimento. Após 7 dias o ágar, contendo o micélio, foi cortado em discos, com auxílio de um tubo cilíndrico de metal de ~4 mm de diâmetro, colocado em microtubos esterilizados e armazenados a 4°C, no escuro.

3.3 Caracterização Morfológica

A caracterização morfológica dos isolados foi realizada com plaqueamento em *synthetic low nutrient agar* (SNA) contendo folha de cravo esterilizada (CLA). As culturas foram incubadas a 20°C, sob fotoperíodo de 12 horas. Após 10-14 dias fez-se a análise do tamanho, do formato e da septação dos conídios produzidos no micélio aéreo e da formação de polifiálides e monofiálides. Para avaliação da taxa de crescimento, os isolados foram crescidos em BDA e incubados a 25°C e a 30°C, em câmara de crescimento tipo BOD, no escuro. Após três dias da incubação, as culturas distribuídas em um delineamento experimental de blocos casualizados, com três repetições, tiveram o seu crescimento radial medido (NIRENBERG; O'DONNELL, 1998).

3.4 Patogenicidade e virulência dos isolados

O experimento para determinar a patogenicidade de 38 isolados de *Fusarium*, previamente selecionados, foi realizado no delineamento inteiramente casualizado, com duas repetições, com mudas do tipo filhote, da cultivar Pérola (suscetível) em que na base destas foi realizado um ferimento com 4 mm de diâmetro e aproximadamente 2 mm de profundidade, no qual foi depositado um disco do fungo cultivado em meio de cultura BDA. As mudas inoculadas foram incubadas em câmara úmida, em condições de laboratório com 25 °C (± 2 °C).

O isolado E-203 de *F. guttiforme* foi utilizado como referência para a patogenicidade e, como testemunha absoluta, as mudas foram inoculadas apenas com meio de cultura BDA autoclavado.

No final do período de incubação (30 dias), foi medido o comprimento das lesões no ponto da inoculação. Os valores de severidade da doença foram obtidos por meio de uma escala que variou de 1 a 9, sendo: (1) ausência de tecidos necróticos; (2-3) lesões limitadas ao local da inoculação; (4) lesões abrangendo extensão de 3 a 5 mm; (5) lesões com 6 a 7 mm; (6) lesões com 8 a 10 mm; (7) lesões com 11 a 12 mm; (8) lesões com 13 a 15 mm; (9) lesões maiores que 15 mm e a muda morta.

3.5 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada usando o protocolo de Raeder & Broda (1985), adaptado pelo Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio da Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes), utilizando tampão SDS. Os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo BDA, a temperatura ambiente, por 7 dias. Discos de micélio foram transferidos para microtubos de 1,5 mL com nitrogênio líquido, posterior agitação e adição de tampão SDS 0,5% e mantidos em banho-maria, a 65°C, por 20 minutos. Foram, então, adicionados 470 µL de fenol e 230 µL de clorofórmio à mistura, homogeneizada e centrifugada. A fase aquosa foi recuperada e a ela foram adicionados 300 µL de clorofórmio, para nova centrifugação. Recuperou-se a fase aquosa e adicionou o equivalente a 60% da mesma de isopropanol. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (*pellet*) foi lavado com 500 µL de etanol 70%. Deixou-se o pellet para secar e em seguida, o DNA foi ressuscitado com tampão TE 1X e RNase A, mantidos em banho-maria, a 65°C, por 30 minutos (RAEDER; BRODA, 1985).

3.6 Identificação do *Fusarium guttiforme* por PCR Multiplex

Foram selecionados 38 isolados de *Fusarium* associados ao abacaxizeiro para identificação por amplificação do gene β -tubulina (*tub2*) (O'DONNELL; CIGELNIK, 1997) e do gene fator de alongação 1- α (*tef1*) (O'DONNELL; CIGELNIK; NIRENBERG, 1998). Além de um isolado de *F. ananatum* (E-680) como controle negativo da reação. Ambos os genes foram analisados simultaneamente por PCR multiplex.

Para a amplificação do fragmento do gene *tef1*, de 640pb, foram utilizados os *primers* Ef-1 (forward; 5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') e Ef-2 (reverse; 5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') (O'DONNELL et al., 1998). Para amplificação do gene *tub2*, de 540pb, os *primers* utilizados foram T1 (forward; 5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3') e T2 (reverse; 5'-TAGTGACCCTTGGCCCAGTTG-3') (O'DONNELL; CIGELNIK, 1997).

As reações de PCR foram realizadas no termociclador Veriti® (Applied Biosystems). As condições de ciclo foram de acordo com os seguintes passos: (1) desnaturação, a 94°C, por 3 minutos; (2) seguidos por 35 ciclos de desnaturação, a 94°C, por 45 segundos; (3) anelamento, a 57°C, por 30 segundos; (4) extensão, a 72°C, por 1,5 minutos e (6) extensão final, a 72°C, por 10 minutos.

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio. Os fragmentos foram revelados sob luz ultravioleta e fotografados.

3.7 Diagnóstico da Fusariose por PCR em Tempo Real

Para diagnosticar a presença de *F. guttiforme* em mudas abacaxizeiros, foi realizada análise de PCR em tempo real. Os genes escolhidos para análise foram o fator de alongação 1- α (*tef1*) e β -tubulina.

Para realização dos experimentos foram utilizadas 25 mudas de abacaxizeiro, da cv. Pérola, inoculadas em laboratório com *Fusarium*. Além de abacaxizeiros provenientes da Fazenda Experimental do Incaper em Sooretama, ES, sendo 6 mudas e um fruto da cv. Pérola e uma muda e 2 frutos da cv. Smooth Cayenne. Todas as amostras foram avaliadas visualmente quanto aos sintomas da doença e classificadas como sintomáticas e assintomáticas. Um controle sadio, um isolado de *F.guttiforme* (E-203) como controle positivo e um isolado de *F. ananatum* (E-680) como controle negativo, foram utilizados para verificação dos ensaios.

As mudas de abacaxizeiros foram submetidas a um processo de desinfestação superficial com posterior extração de DNA seguindo protocolo descrito no item 3.4. O DNA das amostras controle foi extraído utilizando DNeasy[®] Plant Mini Kit, QIAGEN[®]. Por fim, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop, ND-2000 Spectrophotometer, Delaware, EUA) e armazenadas em freezer a -20°C até serem processadas.

Os *primers* foram desenhados utilizando a ferramenta Primer3Plus (UNTERGASSER, 2007) baseando-se nas sequências, DQ282170 e DQ 282177, números de acesso do GenBank, que representam os genes *tef* 1- α e β -tubulina, respectivamente. Dos iniciadores gerados, escolheu-se para amplificação do fragmento do gene *tef1*, *tef*-1a (forward; 5'GGTATCGACAAGCGAACCAT3') e *tef*-1b (reverse: 5'CACGTTTCGAGTCGTATGGA3') e para amplificação do gene da β -tubulina, bTa (forward; 5'GATGGCTGCTTCAGACTTCC3') e bTb (reverse; 5'TCCTCGACCTCCTTCATAGC3').

Para a reação do PCR em tempo real utilizou-se o equipamento Applied Biosystems Fast 7500[™] Real-Time PCR (ABI 6.200, Applied Biosystems, Califórnia, EUA). O

volume total de reação foi de 20 µl contendo: 1,0 µl de DNA, 10,0 µl do kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), 1,0 µl de cada *primer* a uma concentração de 10 µM. As amostras foram submetidas a um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos, seguido por um ciclo de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, finalizando-se por um ciclo de 95°C por 15 segundos. Um controle negativo da reação (contendo todos os reagentes, com exceção de DNA que foi substituído por água) foi adicionado em todas as corridas.

A eficiência relativa de cada par de *primer* foi avaliada pelo método de diluição seriada usando um mix de DNA como padrão. O valor de eficiência foi calculado pela seguinte fórmula: $E = [(10^{-1/a} - 1) \times 100]$, onde *a* é o *slope* entre cada concentração conhecida de DNA utilizada na curva padrão (*primers* com eficiência de 100% apresentam *slope* de -3,32). Valores de eficiência relativa entre 90 e 110% foram considerados.

O limiar de fluorescência (*threshold*) foi ajustado para cada experimento. O *threshold* deve estar acima do Baseline, que é definido como sinal fluorescente de fundo emitido nos primeiros ciclos da PCR antes da detecção da amplificação, mas suficientemente baixo para se encontrar dentro da região de crescimento exponencial.

O número de ciclos no qual a fluorescência gerada por cada amostra atinge o *threshold* é referido como *Cycle threshold (Ct)*, sendo registrado (BUSTIN et al., 2009). Para evitar falsos positivos, um valor de *Ct* < 35 foi determinado como ponto de corte, além de limitar outros valores que não poderiam ser considerados como positivo (KOKKINOS; CLARK, 2006; SARLIN et al., 2006; BLUHM, 2004).

A especificidade analítica foi avaliada pela comparação com *F. ananatum*, uma outra espécie de *Fusarium* obtida de abacaxizeiro.

3.8 Análises estatísticas

Para análise dos dados foi utilizado o tratamento da estatística descritiva (média e desvio padrão).

A diferenciação do tamanho dos diâmetros entre os isolados agrupados de acordo com as condições de crescimento estabelecidas, 25°C e 30°C, foi determinada pelo teste estatístico bicaudal Wilcoxon “matched-pairs signed rank test” assumindo significância estatística de $\alpha < 0,05$ (GraphPad Prism versão 6.04).

Para a avaliação do desempenho dos métodos frente à técnica padrão de diagnóstico fez-se o teste de contigência, qui quadrado (X^2), analisando a sensibilidade e especificidade com significância de $\alpha < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica foi realizada com 40 isolados. Como referência, foi utilizado o isolado E-203, da coleção de fungos do Laboratório de Fitopatologia do Incaper, localizado em Domingos Martins, ES.

Dos isolados analisados, 36 apresentaram polifíalides com duas aberturas conidiogênicas, tanto prostradas quanto eretas. Os microconídios mensurados apresentaram, em sua maioria, formato obovoide sem septo. Alguns raros

apresentavam 1 a 2 septos. O tamanho variou de 8 μm a 18 μm de comprimento com largura variando de 2 μm a 4 μm .

Os esporodóquios de coloração laranja foram raros. Os macroconídios apresentaram formato quase reto, com célula apical cônica e célula pé, exibiram de 3 a 5 septos e mediram de 35 a 71 μm , com largura de 3 a 4 μm . Não se visualizou a produção de clamidósporos.

Todos os caracteres micromorfológicos presentes nos isolados desse estudo estavam de acordo com os descritos por Nirenberg e O'Donnell (1998) e Leslie e Summerell (2006) para *F. guttiforme*.

Jacobs et al. (2010) fizeram um estudo completo com isolados obtidos de frutos de abacaxi do Brasil e da África do Sul. Eles analisaram, entre outras, as características morfológicas dos isolados e conseguiram demonstrar diferenças morfológicas que fundamentaram com a descrição de uma nova espécie patogênica ao abacaxi, o *F. ananatum* (Tabela 1).

Tabela 1: Descrição das estruturas morfológicas das espécies *F. guttiforme* e *F. ananatum*

Espécie	Micélio Aéreo	Arranjo dos conídios	Macroconídio	Microconídio	Fiálides	Cor da Cultura
<i>F. guttiforme</i>	Distribuído por toda superfície	Falsas Cabeças	Paredes finas, delgado e reto a ligeiramente curvado (usualmente com 3 septos)	Obovóide (0-1 septos)	Mono e polifiálides	Creme a púrpura
<i>F. ananatum</i>	Círculos concêntricos no centro da colônia	Falsas Cabeças	Paredes finas, delgado e reto a ligeiramente curvado (usualmente com 3 septos)	Obovóide	Mono e polifiálides	Alaranjada

Os caracteres macromorfológicos são considerados para avaliações secundárias (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Aqui, avaliou-se o diâmetro das culturas e o padrão de coloração do micélio aéreo e do verso das culturas em BDA.

O diâmetro radial médio das culturas dos 40 isolados deste estudo, mensurados após três dias de incubação no escuro, a 25°C, em BDA, variou de 1,6 a 4,2 cm, com valor médio de 2,7 cm e desvio padrão de 0,45. Os isolados de referências, E-203 e E-680, tiveram média de crescimento de 3,0 cm e 1,6 respectivamente. Dentre os isolados, 3 apresentaram crescimento maior que 3,2 cm e 5 apresentaram valores inferiores a 2,3 cm. O crescimento radial das culturas incubadas a 30°C variou de 1,1 a 3,55 cm, com valor médio de 2,2 cm e desvio padrão de 0,51. Os isolados de referências, E-203 e E-680, tiveram média de crescimento de 2,0 cm e 1,1 respectivamente. Dentre os isolados, 4 tiveram crescimento maior que 2,7 cm e 5 com crescimento menor que 1,7 cm.

De acordo com análise estatística, obteve-se um nível de significância $p < 0,0001$, que representa diferença significativa entre os grupos analisados. Foi possível, portanto, observar diferenças nas medidas de crescimento quando comparadas as duas temperaturas, demonstrando que os isolados tiveram um melhor crescimento a 25°C (Figura 1) (Figura 2). O *F. guttiforme* apresenta um crescimento mais lento em relação a algumas outras espécies de *Fusarium* (STEPIEN, 2013). Porém, na maioria dos casos, as diferenças são sutis e nem sempre claras o que faz com que a leitura da taxa de crescimento não seja um bom marcador para diferenciação de espécies (LESLIE; SUMMERELL, 2006), no entanto, o *F. ananatum*, E-680, apresentou um crescimento abaixo da média, o que pode caracterizar um marcador morfológico da espécie necessitando assim de mais estudos são necessários.

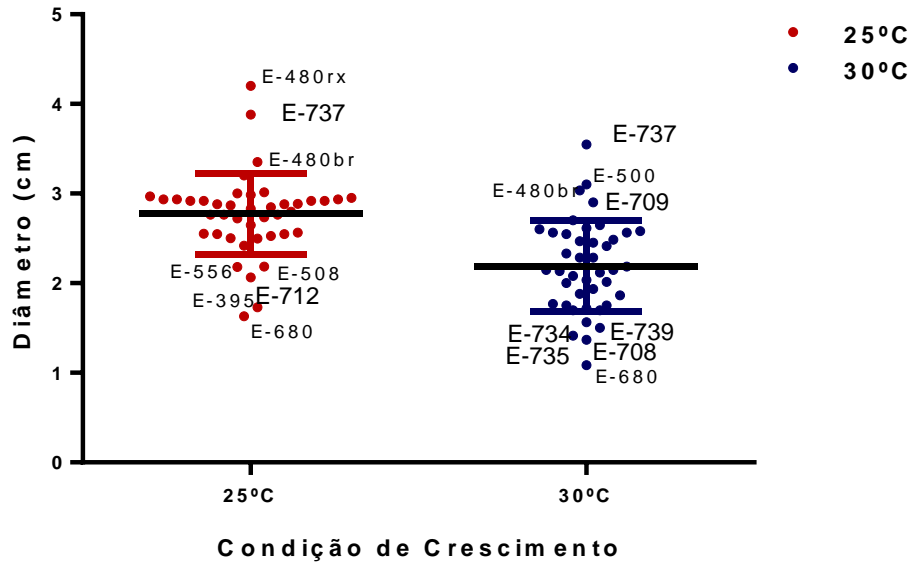


Figura 1: Distribuição dos valores de crescimento radial dos isolados de Fusarium a 25°C e 30°C após 3 dias de incubação em meio BDA no escuro.

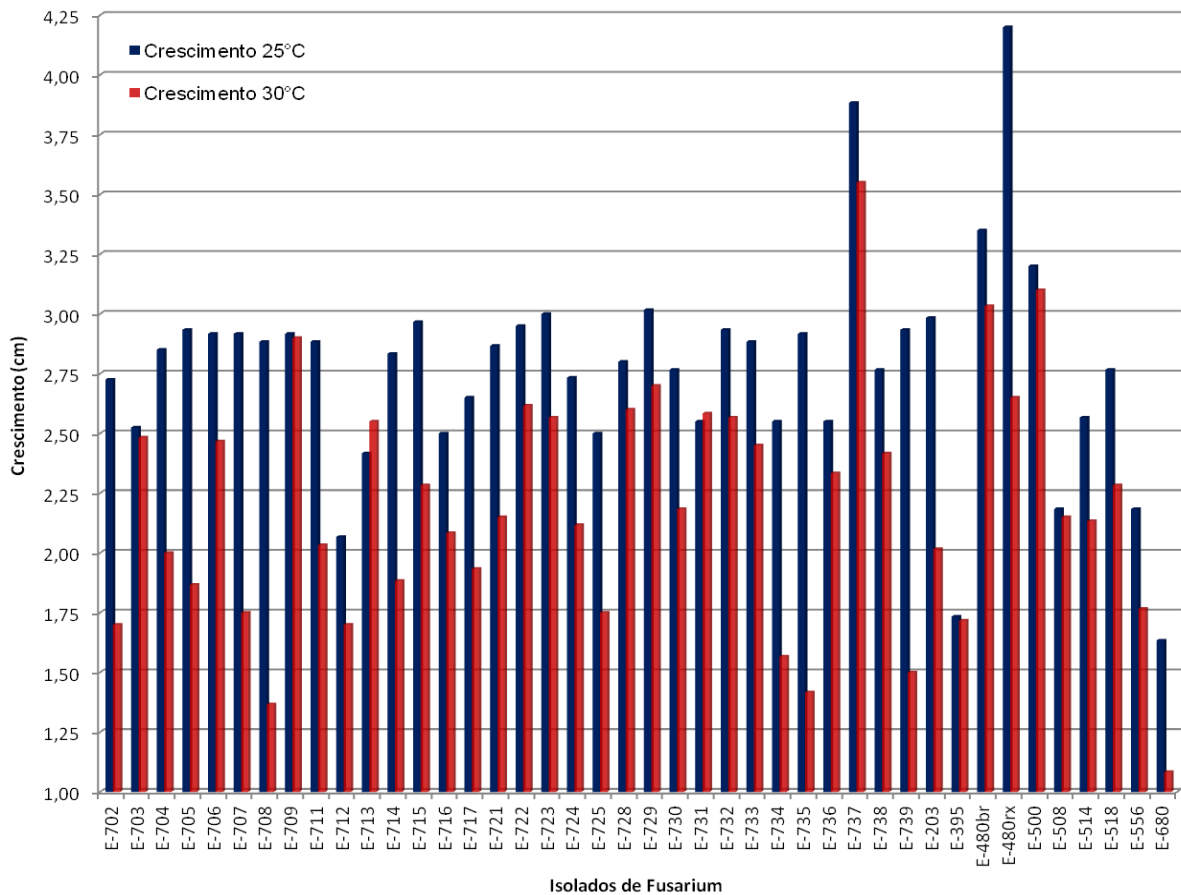


Figura 2: Valores de crescimento radial dos isolados de Fusarium em temperaturas de 25°C e 30°C. As barras em azul representam o crescimento a 25°C. As barras em vermelho representam o crescimento a 30°C.

O padrão de coloração da parte superior e inferior das culturas foi avaliado nos 40 isolados. Todos os isolados analisados bem como o isolado de referência (E-203), apresentaram coloração branca, tanto na superfície superior das culturas quanto do micélio aéreo.

A coloração do verso culturas variou de creme a púrpura (Figura 3). O isolado de referência (E-203) apresentou coloração creme assim como 25 isolados do estudo. Dos demais, 7 apresentaram tonalidade bronzeada ("tan"), 3 com coloração rosa claro e 5 com coloração vermelho amarronzado.

Entretanto, durante esse estudo, foi possível perceber algumas alterações no padrão de cor de um mesmo isolado. Isso faz com que a coloração não seja um marcador consistente a ser utilizado na caracterização dos isolados.

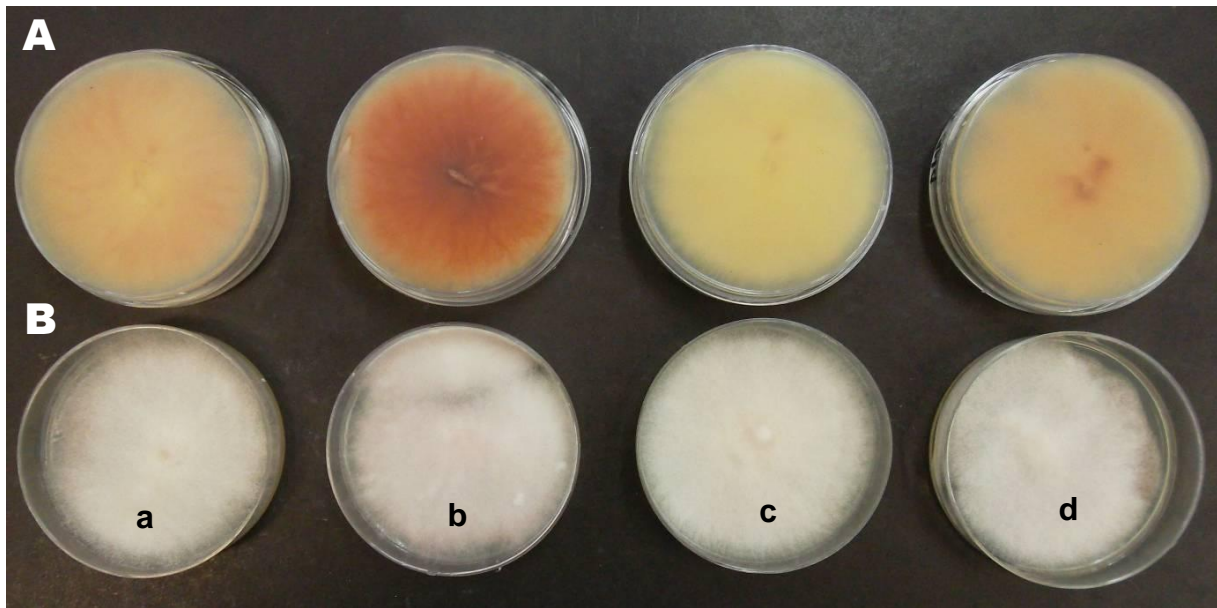


Figura 3: Padrão de coloração obtido em meio de cultura BDA para os isolados de *Fusarium guttiforme*. A) Verso da cultura: a) Rosa claro b) Vermelho amarronzado c) Creme d) Bronzeada B) Micélio aéreo: Coloração branca para todas as amostras.

4.2 Avaliação da patogenicidade e virulência

Foram selecionados 38 isolados para avaliação quanto à patogenicidade. Para confirmar a virulência dos isolados, as mudas inoculadas e incubadas em câmara úmida, foram avaliadas após 30 dias quanto a presença de sinais e sintomas da doença. O isolado E-203, referência dos sintomas induzidos por *F. guttiforme*, quando inoculado em mudas, incitou sintomas típicos da doença e o tamanho médio das lesões foi de 7,0 mm (Tabela 2). A testemunha permaneceu assintomática.

O tamanho das lesões variou desde as limitadas ao ponto de inoculação até necrose com mais de 15 mm de extensão. Dos 38 isolados, 7 (18,42%) não desenvolveram sintomas de fusariose (Figura 4A) e 13 (34,21%) incitaram necrose superior a 15 mm, com alto grau de severidade (Figura 4C). Os demais (18 amostras) (47,37%) tiveram lesões variando entre os diferentes graus de severidade, desde lesão restrita ao local de inoculação (Figura 4B) a lesões mais severas (Tabela 2).

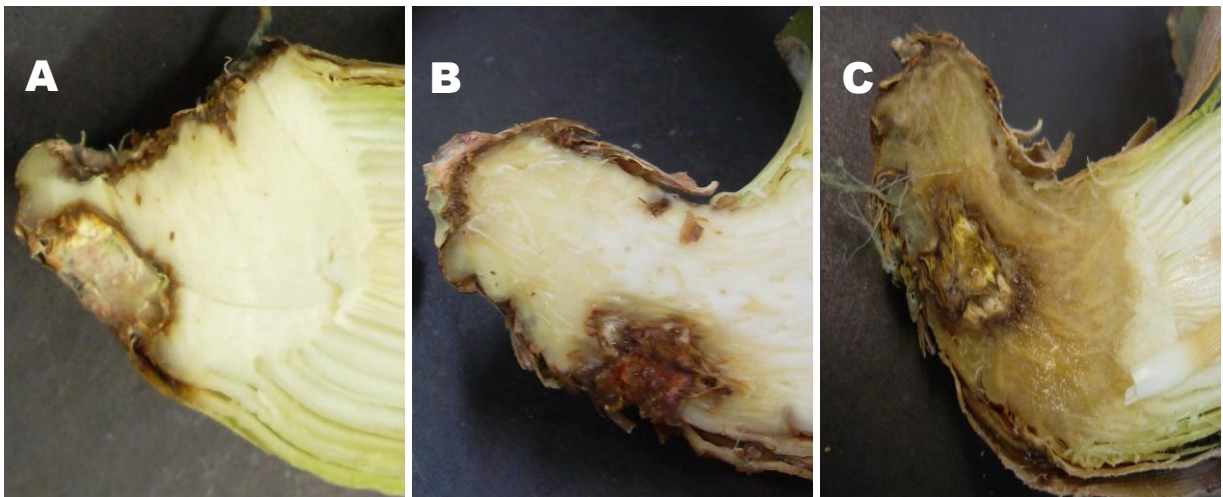


Figura 4: Mudanças de abacaxizeiro da cv. Pérola inoculadas com *F. guttiforme*. A: sem sintomas da doença, com a lesão restrita ao ponto de inoculação; B: sintomas leves; C: sintomas severos em que a lesão foi superior a 15 mm de extensão nos tecidos da muda.

Tabela 2: Teste de patogenicidade dos isolados associados ao abacaxizeiro

Acesso¹	Média das Lesões (mm)	Desvio Padrão	Severidade²
Testemunha	0,00	0,00	1
E-203 (NRRL 25624)	7,25	2,63	5
E-680 (CBS 118518)	0,00	0,00	1
E-703	1,25	1,50	2
E-704	17,25	2,22	9
E-705	13,50	2,38	8
E-706	8,00	6,48	6
E-707	12,25	1,26	7
E-708	15,25	4,11	8
E-709	2,25	0,50	2
E-710	11,00	5,23	7
E-711	20,50	1,91	9
E-712	14,25	8,10	8
E-713	4,50	1,73	4
E-714	11,25	2,99	7
E-715	16,00	0,82	9
E-716	15,00	2,16	8
E-717	7,50	5,20	6
E-721	12,25	4,50	7
E-722	20,25	1,71	9
E-723	20,50	1,29	9
E-724	2,75	0,96	2
E-725	0,00	0,00	1
E-727	0,00	0,00	1
E-728	16,25	15,88	9
E-729	0,00	0,00	1
E-730	0,00	0,00	1
E-731	0,00	0,00	1
E-732	27,00	2,16	9
E-733	28,75	10,44	9
E-734	19,75	0,50	9
E-735	10,00	11,55	6
E-736	30,00	0,82	9
E-737	0,00	0,00	1
E-738	9,75	4,03	6
E-739	22,50	8,70	9
E-395	17,00	2,45	9
E-480rx	3,75	2,75	4
E-480Br	0,00	0,00	1
E-514	18,75	11,93	9
E-524	10,50	5,20	7

¹E=Micoteca do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural-Incaper; NRRL= ARS Culture Collection.

²Escala de notas variando de 1 a 9 em que 1 = Ausência de lesão; 2-3 = Lesão limitada ao local da inoculação; 4 = Lesão 3-5mm; 5 = Lesão 6-7mm; 6 = Lesão 8-10mm; 7 = Lesão 11-12mm; 8 = Lesão 13-15mm; 9 = Lesão >15mm.

4.3 Identificação dos isolados por PCR multiplex

Foram selecionados 38 isolados de *Fusarium* associados ao abacaxizeiro para identificação por PCR multiplex e um isolado de *F. ananatum* (E-680) como controle negativo. Os genes β -tubulina (*tub2*) e fator de alongação 1- α (*tef1*) foram escolhidos por serem amplamente utilizados na filogenia e identificação das espécies de *Fusarium*. A escolha pela PCR multiplex fez-se devido ao grande número de isolados, com o objetivo de diminuir o tempo e o custo da identificação. A presença de dois *primers* também contribui para um menor número de falsos negativos já que se tem, em uma reação, dois alvos para a mesma espécie.

Dos 38 isolados analisados, 31 tiveram resultados positivos e 7 tiveram resultados negativos, assim como o controle (E-680). Os fragmentos gerados tiveram um tamanho de ~540pb para o gene *tub2* e ~640pb para o gene *tef1* (Figura 5).

As amostras testadas que tiveram resultados negativos foram avaliadas quanto as características micromorfológicas e todas apresentaram caracteres típicos do *F.guttiforme*. O teste de patogenicidade também não confirmou os resultados negativos. Todas as amostras causaram lesão necrótica em diferentes níveis de severidade, o que leva a mais um indicativo da espécie, já que a mesma tem relação de exclusividade com o hospedeiro.

Quando comparado os demais resultados da PCR multiplex aos obtidos pelo teste de patogenicidade, 6 amostras com resultados positivos, não causaram lesão na muda.

A discussão inicial desses resultados se dá em relação ao *primers* utilizados. Por serem amplamente utilizados nas pesquisas filogenéticas (O'DONNELL; CINGELNIK, 1997; JACOBS, et al., 2010) e muitas vezes utilizados como *screening* de seleção do gênero *Fusarium*, não era esperado obter resultados negativos em amostras causadoras de lesão na muda. O que leva a questionar a presença de contaminação no procedimento de PCR, ou a completa degradação do DNA durante o processamento das amostras.

As amostras negativas foram então, repetidas e os resultados se mantiveram, levando ao questionamento quanto à sensibilidade da PCR convencional. Kokkinos e Clark (2006) encontraram diferenças significativas entre resultados obtidos na PCR convencional quando comparado aos obtidos pela PCR em tempo real. Estudos mostram avanços nas metodologias que envolvem PCR, visando minimizar falsos negativos e positivos (LIEVENS; THOMMA, 2005; MCCARTNEY et al., 2003; SCHAAD et al., 2003).

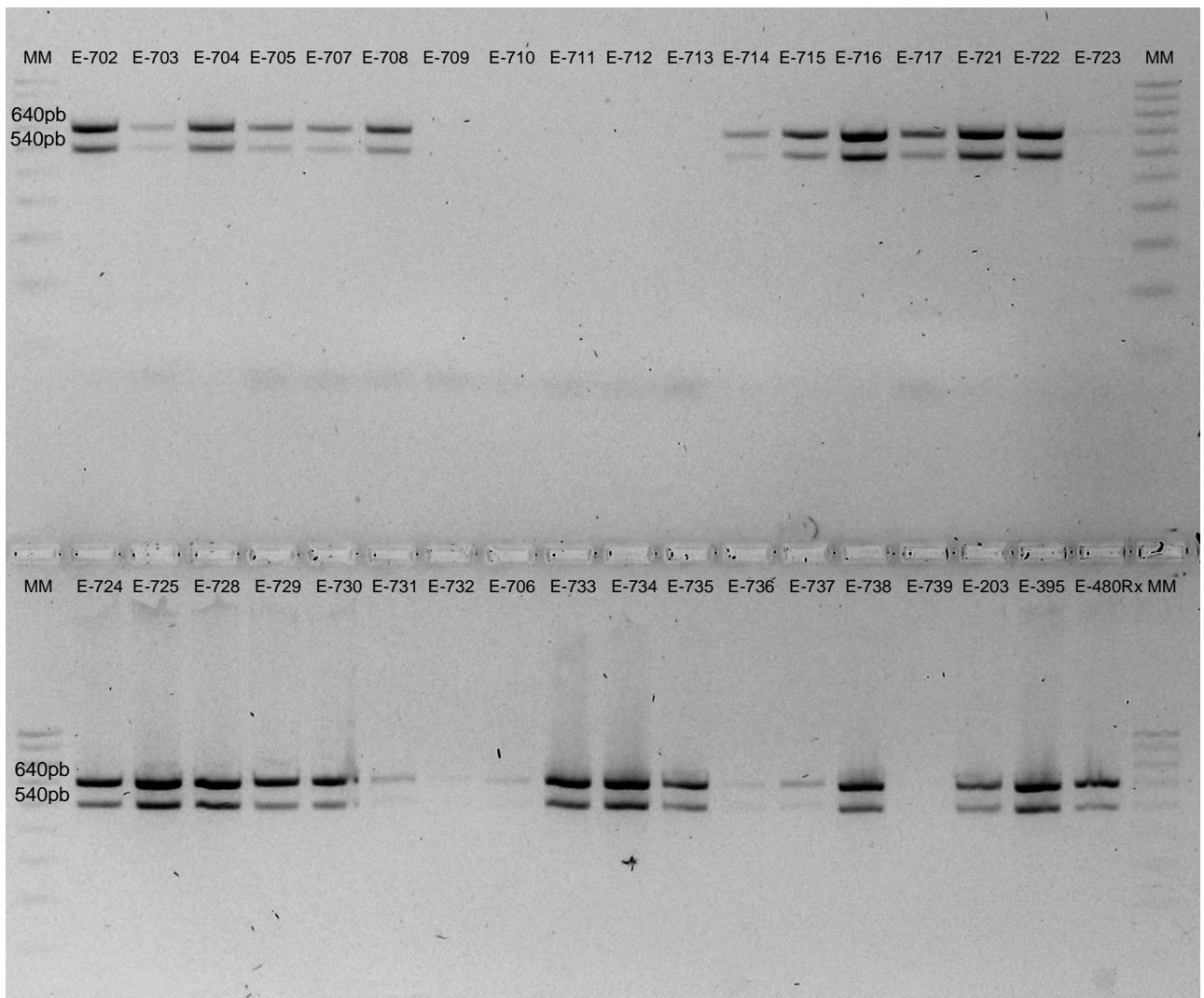


Figura 5: Resultados representativos da PCR multiplex em gel de agarose 1,5% para alguns dos isolados analisados. MM: padrão de tamanho molecular de 100 Kb. Banda inferior: gene tub2 de ~540pb. Banda superior: gene tef1 de ~640pb. *Resultados de E-480br, E-514 e E-680, negativo, positivo e negativo, respectivamente, não estão demonstrados.

4.4 Diagnóstico da fusariose por PCR em tempo real

4.4.1 Eficiência Relativa da Amplificação

A eficiência da amplificação na PCR em tempo real é representado pela taxa na qual um *amplicon* é gerado. Eficiências de 100% indicam que um *amplicon* dobra em quantidade durante a fase geométrica. Esses valores também podem ser representados pelo *slope*, sendo -3,32 o equivalente a eficiência de 100%. Os *slopes* mais negativos que -3,32 indicam reações pouco eficientes. Os *slopes* menos negativos podem indicar má qualidade da amostra ou problemas de pipetagem.

Para realizar a eficiência dos pares de *primers* dos genes *tef1* e *tub2* fez-se uma diluição seriada da amostra de DNA, na proporção de 1:4, a partir de uma concentração de 60ng/ μ L.

De acordo com os resultados mostrados na tabela 3, os *primers* geraram elevada eficiência de amplificação e foram utilizados no ensaio de especificidade desse estudo.

Tabela 3: Eficiência relativa da amplificação da PCR em tempo real dos gene fator de alongação 1- α (*primers* *tef1a/tef1b*) e β -tubulina (*primers* *bTa/bTb*)

<i>Primers</i>	<i>Slope</i>	Eficiência Relativa	R²
Tef1a/Tef1b	-3,38	97,4%	0,999
bTa/bTb	-3,29	101,1%	0,965

4.4.2 Especificidade dos primers

Para definir um diagnóstico por PCR em tempo real como metodologia é necessário que os *primers* utilizados tenham estreita especificidade para espécie avaliada, no caso, *F. guttiforme*. Para atender este requisito, neste estudo o *F. ananatum* foi escolhido como controle negativo da espécie. Decisão essa, baseada em função da sua recente identificação por Jacobs et al. (2010) e por ser causadora de doença no abacaxizeiro.

Além do *F. ananatum*, o ensaio analisou uma planta sadia, um isolado controle de *F. guttiforme* (E-203), cultivado em BDA, a 25°C, por 7 dias, e uma planta doente, como diagnóstico. Todos os testes contaram com um controle negativo contendo os reagentes e água, no lugar do DNA. No presente ensaio o limiar de fluorescência foi definido em 0,267579.

Os resultados da especificidade foram favoráveis para o par de *primer* do gene *tef1* que, de acordo com a tabela 4, não gerou amplificação da amostra de *F. ananatum*. No entanto, os *primers* do gene *tub2* não foram específicos, amplificando a amostra de *F. ananatum* tornando-o insuficiente para o diagnóstico por PCR em tempo real (Figura 6).

Tabela 4: Especificidade dos primers em valores cycle threshold (*Ct*) para os gene *tef 1- α* (*primers tef1a/tef1b*) e β -tubulina (*primers bTa/bTb*).

Amostra	Valores de <i>Ct</i>	
	<i>tef1a/tef1b</i>	<i>bTa/bTb</i>
Controle Negativo	Indeterminado	Indeterminado
Assintomática	Indeterminado	Indeterminado
Sintomática	22,7067	22,1807
<i>F.guttiforme</i> (E-203)	22,3087	21,1691
<i>F.ananatum</i> (E-680)	Indeterminado	30,3617

Atualmente, tem-se observado um crescente número de sequências anotadas em bancos de dados. É importante esclarecer que o uso inadequado de *primers*, desenhados para amplificar determinada espécie, sem um conhecimento do agente

que se estuda, pode levar a erros no diagnóstico. Isso favorece a identificação equivocada de muitos patógenos, gerando problemas relacionados a segurança e controle da disseminação de doenças em plantas de importância econômica. Por isso é importante o estudo da especificidade e, nesse caso, o desuso do *primer* desenvolvido para o gene *tub2*.

Em contrapartida, estudos filogenéticos com fungos do gênero *Fusarium* (O'DONNELL et al., 1998; SEIFERT; LÉVESQUE, 2004) demonstraram que o gene fator de alongação 1- α (*Tef1*) tem a variabilidade suficiente entre as espécies, sendo possível conceber ensaios específicos que permitam a detecção e quantificação de biomassa para um largo espectro de espécies de *Fusarium* (NICOLAISEN et al., 2009), corroborando com o nosso estudo.

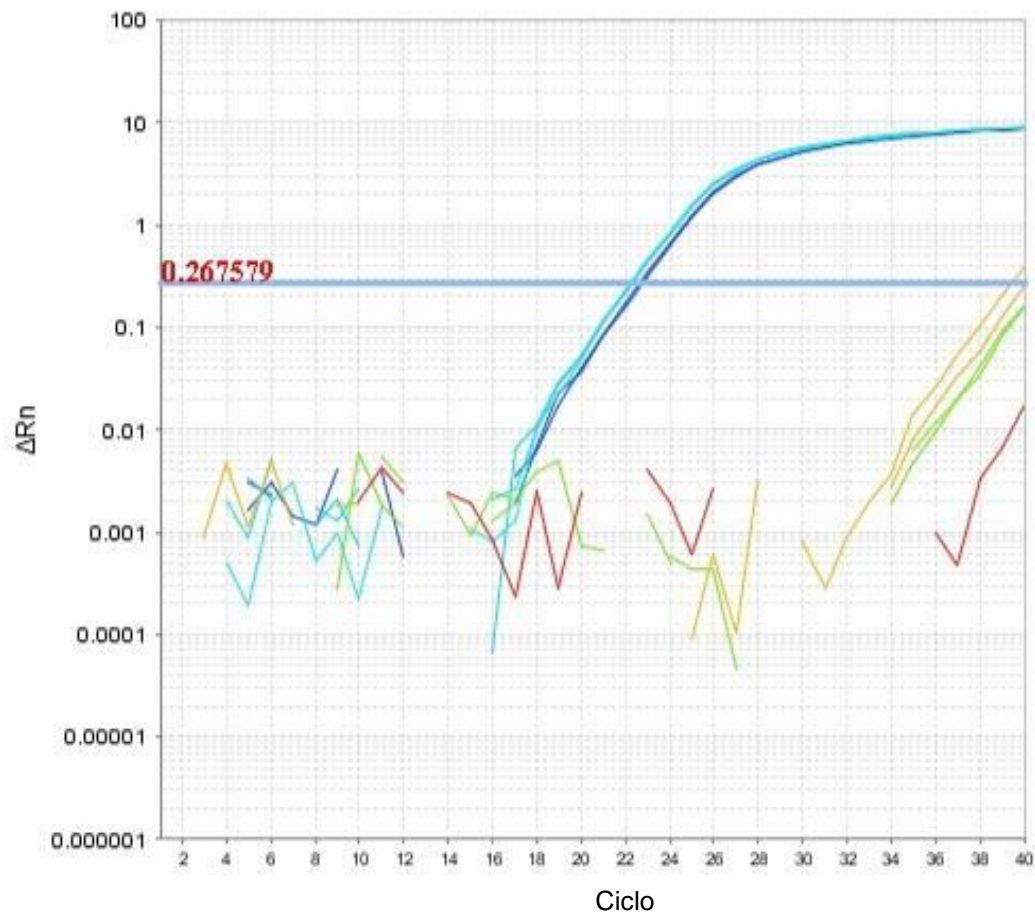


Figura 6: Amplificação dos isolados de *Fusarium* e amostras de planta com os *primers* *tef1a/tef1b*. As amostras em azul (claro e escuro) representam o *F. guttiforme* referência (E-203) e a planta doente. As amostras em amarelo, verde e vermelho representam *F. ananatum*, planta sadia e controle negativo, respectivamente. Eixo X: Número de ciclos de amplificação. Eixo Y: Valor de *Threshold*.

4.4.3 Validação da metodologia do diagnóstico da fusariose por PCR em Tempo Real

Em contraste com os procedimentos convencionais de PCR, uma grande vantagem da técnica de PCR em tempo real refere-se ao fato de que a detecção do *amplicon* pode ser visualizada e mensurada, passo a passo, de acordo com o progresso da reação de amplificação, o que elimina a necessidade de serem executadas etapas posteriores tratando-se, portanto, de um “sistema fechado”, o que evita o manuseio de brometo de etídeo, agente revelador do gel de agarose utilizado para separação eletroforética dos fragmentos amplificados, uma substância altamente carcinogênica, levando também a diminuição da contaminação do ambiente laboratorial.

Diversos tipos de marcadores têm sido descritos para a reação de PCR em tempo real, dentre eles encontram-se os que detectam sequências específicas através do uso de sondas de hibridização marcadas com fluorocromos (TaqMan, Molecular Beacons, LightCycler e Amplifluor). Há, também, outro marcador, o SYBR Green, que tem a propriedade de se ligar a qualquer cadeia de dupla fita de DNA, independentemente da sequência de nucleotídeos. Em nosso estudo, o SYBR Green foi escolhido devido ao custo mais reduzido em relação aos demais e por tornar desnecessária a construção de sondas de hibridização.

O experimento foi realizado com 25 mudas de abacaxizeiros inoculadas com *Fusarium* e classificadas como sintomáticas e assintomáticas para fusariose. Dessas amostras, 21 apresentavam o padrão e tamanho de lesão característicos da doença e 4 apresentavam-se assintomáticas. A análise por PCR em tempo real foi feita baseada nos valores de *Ct*, com *threshold* definido em 0,212044, e demonstrada de acordo com a tabela 5.

Tabela 5: Valores de Cycle Threshold (*Ct*) das amostras de tecido vegetal obtido de plantas saudáveis e doentes, amplificadas para o gene fator de alongação 1- α , utilizando a técnica de PCR em tempo real.

Isolados	Sintomas	Valores de <i>Ct</i> tef1a/tef1b	Média das Lesões	Temperatura de <i>Melting</i>
E- 203	Sintomática	24,1537	23	78,6695
E- 395	Sintomática	29,2393	17	78,6695
E- 480rx	Sintomática	33,8062	4	78,8454
E- 514	Sintomática	22,771	19	79,1973
E- 703	Sintomática	23,4835	1	79,0213
E- 704	Sintomática	26,2518	17	78,6695
E- 705	Sintomática	33,671	14	79,3732
E- 707	Sintomática	25,8723	12	78,6695
E- 708	Sintomática	26,6231	15	79,0213
E- 709	Sintomática	34,229	2	79,0213
E- 711	Sintomática	34,1742	21	79,0213
E- 713	Sintomática	32,9226	5	78,8454
E- 715	Sintomática	26,779	16	78,8454
E- 716	Sintomática	Indeterminado	15	62,4834
E- 717	Sintomática	26,0113	8	78,8454
E- 724	Sintomática	25,525	3	79,0213
E- 729	Assintomática	Indeterminado	0	62,4834
E- 730	Assintomática	36,0217	0	62,4834
E- 731	Assintomática	Indeterminado	0	62,4834
E- 732	Sintomática	34,2111	27	79,0213
E- 734	Sintomática	35,6246	20	79,549/64,594
E- 735	Sintomática	34,6192	10	79,1973
E- 736	Sintomática	23,177	30	78,4935
E- 737	Assintomática	36,2539	0	79,0213
E- 738	Sintomática	26,7095	10	79,0213

Os resultados obtidos para as 4 amostras assintomáticas, *Ct* maiores de 35, confirmaram a ausência da doença. No entanto, das 21 amostras sintomáticas, 19 tiveram resultados esperados, com *Ct* abaixo de 35, mas duas apresentaram um valor discrepante, obtendo *Ct* maior que 35 ou indeterminado, caracterizando falsos negativos ou a possibilidade de infecção contendo outros patógenos associados aos tecidos da amostra (Figura 7).

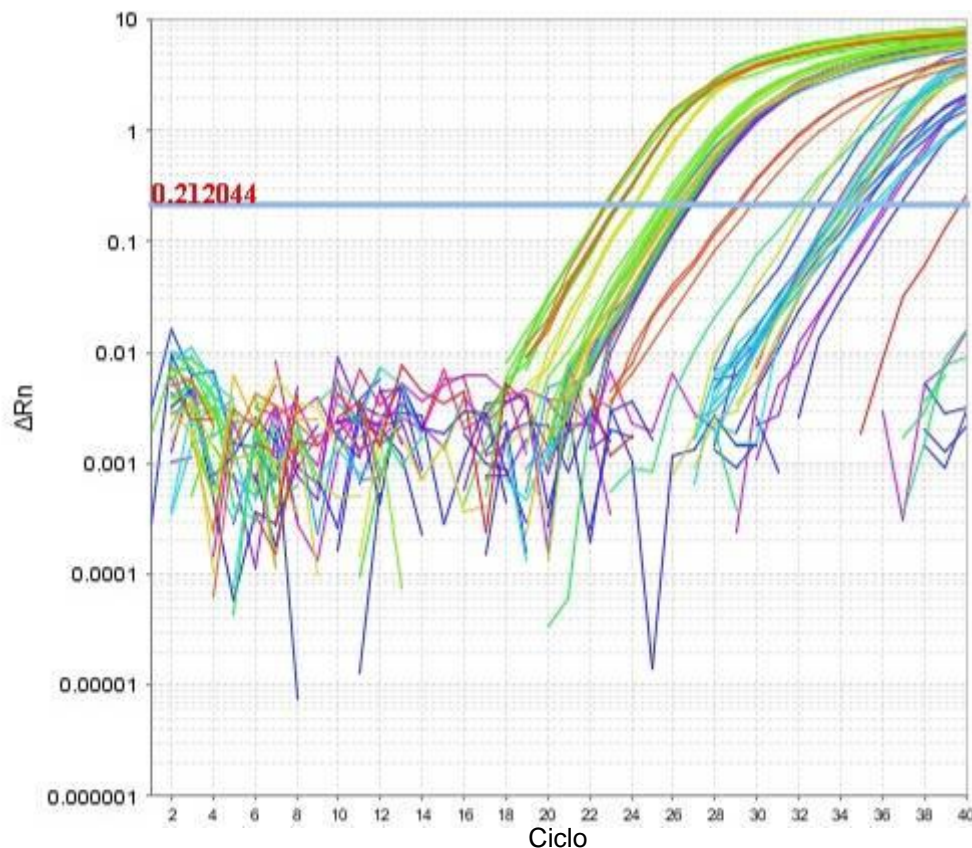


Figura 7: Amplificação das amostras de abacaxizeiros inoculadas com *Fusarium* por PCR em tempo real para gene *tef 1-α*. Eixo X: Número de ciclos de amplificação. Eixo Y: Valor de *Threshold*.

Avaliando a possibilidade de algum erro durante o ensaio fez-se a análise das temperaturas de *melting* (T_m). A amostra inoculada com o isolado E-734 apresentou mais de um valor de T_m , o que não ocorreu com as demais, indicando alguma amplificação indevida geralmente proveniente de problemas na preparação da amostra (Figura 8).

Embora as temperaturas de *melting* não possuam a capacidade de detalhar mínimas diferenças entre sequências de nucleotídeos de uma determinada região gênica, ou até mesmo formar uma árvore filogenética, tal qual se consegue fazer por sequenciamento, uma possível análise desses produtos poderão vir a constituir em uma metodologia para a diferenciação de isolados de *F. guttiforme*. Será possível com isso, formar grupos genéticos por semelhança nas temperaturas de dissociação dos produtos de uma dada região dos genes avaliados, de maneira muito mais simples e rápida que o sequenciamento.

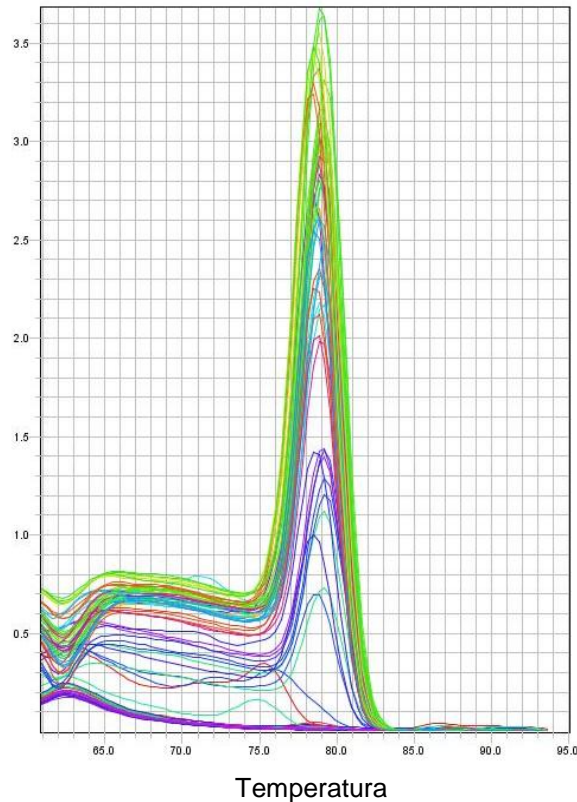


Figura 8: Curvas de Melting para as 25 amostras dos abacaxizeiros inoculados com *Fusarium*.

Relevando o possível erro experimental e considerando as duas amostras como falsos negativos para as análises estatísticas, o teste teve uma excelente sensibilidade (90,5%), especificidade (100%) e acurácia (92%).

Um segundo experimento foi então realizado com as 9 amostras provenientes do campo e visualmente classificadas como sintomáticas e assintomáticas para fusariose. Dessas amostras, 7 apresentavam o padrão característico da doença e duas se apresentavam assintomáticas. A análise por PCR em tempo real foi feita baseada nos valores de *Ct*, com *threshold* definido em 0,270955 e demonstrada de acordo com a tabela 6.

A análise da curva de melting mostrou que todas as amostras tiveram *Tm* semelhantes, confirmando a excelente especificidade do teste. Além da amostra controle negativo, do isolado de referência *F. ananatum* (E-680), ter obtido um *Tm* diferente, corroborando mais para a especificidade do ensaio (Figura 9).

Tabela 6: Valores de Cycle Threshold (C_t) e da temperatura de Melting (T_m) das amostras do campo para o gene fator de alongação 1- α (tef1a/tef1b).

Cultivar	Amostras	Sintomas	Resultado	Valores de C_t tef1a/tef1b	Temperatura de Melting
S. Cayenne	Muda (01)	Sintomática	+	29,81924438	78, 5408
Pérola	Muda (02)	Sintomática	+	28,87335777	79, 6561
Pérola	Muda (03)	Assintomática	-	Indeterminado	62,4470
Pérola	Muda (04)	Sintomática	+	28,54974556	78,9085
Pérola	Muda (05)	Assintomática	-	39,41382599	71,8283
Pérola	Muda (07)	Sintomática	+	32,69078064	78,9085
Pérola	Muda (08)	Sintomática	+	23,98377419	78,9085
Pérola	Fruto (10)	Sintomática	+	29,40078163	79,2625
S. Cayenne	Fruto (11)	Sintomática	+	28,47362328	79,4395
-	<i>F.guttiforme</i>	E-203	+	22,8103466	79,2625
-	CN	Contr. Negativo	-	Indeterminado	62,2700
-	<i>F.ananatum</i>	E-680	-	38,85785675	72,5363
-	PS	Planta Sadia	-	38,73550034	75,7224

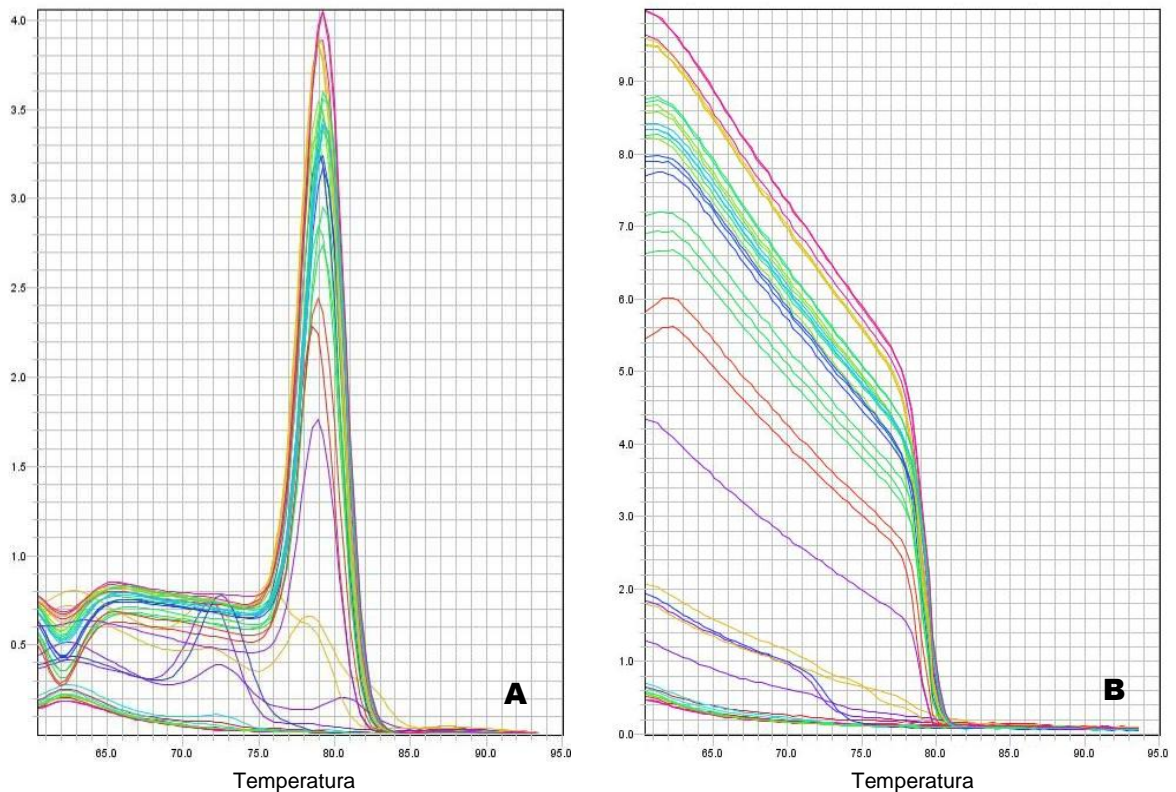


Figura 9: Curvas de Melting para amostras do campo. Observe a presença de um pico diferencial em azul entre as temperaturas 70° e 75°C, indicando o *F. ananatum*. A: Curva derivada B: Curva normalizada.

Os resultados obtidos confirmaram o que foi observado na sintomatologia da planta (Tabela 7). O teste teve, portanto, 100% de sensibilidade e especificidade.

Tabela 7: Comparação dos resultados de sintomatologia e PCR em tempo real para amostras do campo. Resultado do Campo: (+) Doente (-) Sadia. Ct >35: resultado negativo (-).

Cultivar	Amostras	Resultado do campo	Ct	Concordância
S. Cayenne	Muda (01)	+	+	S
Pérola	Muda (02)	+	+	S
Pérola	Muda (03)	-	-	S
Pérola	Muda (04)	+	+	S
Pérola	Muda (05)	-	-	S
Pérola	Muda (07)	+	+	S
Pérola	Muda (08)	+	+	S
Pérola	Fruto (10)	+	+	S
S. Cayenne	Fruto (11)	+	+	S

A PCR convencional leva, em média, 6 horas para ser realizada, desde o preparo das amostras até visualização em gel de agarose, enquanto que a PCR em tempo real, pode ser finalizada em até 2,5 horas. A simplicidade, especificidade, elevada sensibilidade no que se refere à utilização de uma sonda ou de um corante apropriado, rapidez, redução do risco de contaminação pós-amplificação, elevado potencial de produção, introdução contínua de novos químicos, detecção de quantidades relativamente pequenas de DNA alvo, facilidade de quantificação e uma melhoria nos protocolos tem feito com que a tecnologia de PCR em tempo real seja referência para a detecção de DNA (GACHON, 2004).

O alto custo dos equipamentos e reagentes que envolvem a realização das técnicas de biologia molecular aumenta consideravelmente a dificuldade na realização dos estudos nessa linha de pesquisa. Porém, a utilização da PCR em tempo real com SYBR Green pode reduzir consideravelmente esses custos e o tempo necessário para realizar esse procedimento. Assim, pode-se considerar para o diagnóstico da fusariose do abacaxizeiro causada por *F. guttiforme*, que a PCR em tempo real é um método com alta sensibilidade e especificidade (Tabela 8) e, ainda, de baixo custo quando comparado a outros procedimentos de diagnóstico molecular e mesmo em relação à técnica padrão de isolamento do patógeno dos tecidos das plantas

infectadas e, dessa forma, reveste-se de um grande potencial de aplicação em fitopatologia.

Tabela 8: Comparação dos resultados obtidos no teste de patogenicidade, PCR multiplex e PCR em tempo real

Acesso ¹	Média das Lesões (mm)	PCR Multiplex	PCR em tempo real
E-203 (NRRL 25624)	7,25	+	+
E-680 (CBS 118518)	0	-	-
E-702	NR	+	NR
E-703	1,25	+	+
E-704	17,25	+	+
E-705	13,5	+	+
E-706	8	NR	NR
E-707	12,25	+	+
E-708	15,25	+	+
E-709	2,25	-	+
E-710	11	-	NR
E-711	20,5	-	+
E-712	14,25	-	NR
E-713	4,5	-	+
E-714	11,25	+	NR
E-715	16	+	+
E-716	15	+	-
E-717	7,5	+	+
E-721	12,25	+	NR
E-722	20,25	+	NR
E-723	20,5	+	NR
E-724	2,75	+	+
E-725	0	+	NR
E-727	0	NR	NR
E-728	16,25	+	NR
E-729	0	+	-
E-730	0	+	NR
E-731	0	+	NR
E-732	27	+	+
E-733	28,75	+	NR
E-734	19,75	+	-
E-735	10	+	+
E-736	30	+	+
E-737	0	+	-
E-738	9,75	+	+
E-739	22,5	-	NR
E-395	17	+	+
E-480rx	3,75	+	+
E-480Br	0	-	NR
E-514	18,75	+	+

¹E=Micoteca do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural- Incaper; NRRL= ARS Culture Collection. NR: não realizado; (+): positivo; (-): negativo.

Portanto, estes métodos são muito convenientes e poderão ajudar pesquisadores na realização de estudos epidemiológicos da doença, bem como dar suporte nos trabalhos de melhoramento genético do abacaxizeiro visando o lançamento no mercado de novas variedades resistentes.

5 CONCLUSÕES

Foi desenvolvido um novo protocolo de PCR em tempo real para o diagnóstico rápido e específico para detectar e identificar o fungo *Fusarium guttiforme*, agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro.

O novo protocolo poderá ser utilizado para detectar *F. guttiforme* em lesões em tecidos de abacaxi com sintomas que podem também ter mistura de outros fungos, além de detectar de forma precoce a presença do patógeno em material propagativo, proporcionando uma melhor adoção das estratégias de controle evitando o estabelecimento da doença e sua disseminação em regiões produtoras de abacaxi.

A PCR em tempo real é uma metodologia possível de ser usada pelos laboratórios de micropropagação e produção de mudas, credenciados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), viabilizando a indexação do material propagativo de abacaxi comercializado no País, qualificando a emissão do Certificado Fitossanitário de Origem (CFO), bem como, para fins de defesa fitossanitária em países onde *F. guttiforme* é considerado como praga quarentenária.

6 REFERÊNCIAS

BLUHM, B.H.; COUSIN, M.A; WOLOSHUK, C.P. Multiplex real-time PCR detection of fumonisin-producing and trichothecene-producing groups of *Fusarium* species. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, p. 536-543, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Exigências Fitossanitárias**. On-line. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/mercado-interno/exigencias-fitossanitarias>. Acesso em 09 fev. 2014.

BUSTIN, S.A., et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative realtime PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 55, p. 611-622, 2009.

CRESTANI, M. et al. Das Américas para o Mundo: origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 6, p. 1473 - 1483, 2010.

DEAN, T. R., et al. A simple multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of four environmentally relevant fungal contaminants. **Journal of Microbiological Methods**, Philadelphia, v. 61, p. 9-16, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, **FAOSTAT**: Agricultural statistic database. Rome: World Agricultural Information Center, 2010. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em 01 fev. 2014.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 14, p. 12-15, 2000.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 55, p. 1445-1454, 2004.

GEISER, D. M. et al. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.110, n. 5/6, p. 473-479, 2004.

INNIS, M.A. et al. PCR protocols: a guide to methods and applications. In: WHITE, T.J. et al. (ed). **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. San Diego: Academy press, 1990. p. 315-322.

JACOBS, A. et al. *Fusarium ananatum* sp. nov. in the *Gibberella fujikuroi* species complex from pineapples with fruit rot in South Africa. **Fungal Biology**, Oxford, v. 114, n. 7, p. 515-527, July 2010.

- KIMATI, H.; TOKESHI H. Nota sobre a ocorrência de *Fusarium* sp. causando resinose fúngica em abacaxi. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, n. 39, n. 3, p.131-133, 1964.
- KVAS, M. et al. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 34, n. 1, p.1-21, Jan. 2009.
- KOKKINOS, C.D.; CLARK, C.A. Real-time PCR assays for detection and quantification of sweetpotato viruses. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 783–788, 2006.
- KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, Philadelphia, v. 27, p. 95-125, 2006.
- KWOK, S.; HIGUCH, R. Avoiding false positives with PCR. **Nature**, New York, v. 8, p. 339-490, 1989.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* Laboratory Manual**. Iowa: Blackwell, 2006.
- LIEVENS, B.; THOMMA, B. P. H. J. Recent developments in pathogen detection arrays: implications for fungal plant pathogens and use in practice. **Phytopatology**, Saint Paul, v. 95, p. 1374-1380, 2005.
- LIEVENS, B. et al. Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. **Plant Science**, Philadelphia, v. 171, p. 155-165, 2006.
- MATOS, A.P. Pathological aspects of the pineapple crop with emphasis on the fusariosis. **Revista de la Facultad de Agronomía**, Maracaibo, v. 21, n. 3/4, p. 179-197, 1995.
- MCCARTNEY, H. A. et al. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. **Pest Management Science**, Oxford, v. 59, p. 129–142, 2003.
- NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium* species: An Illustrated Manual For Identification**. University Park: Pennsylvania State, University Press, 1983.
- NICOLAISEN, M. et al. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. **Journal of Microbiological Methods**, Philadelphia, v. 7, p. 234-240, 2009.

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

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

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematic and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York, v. 90, n. 3, p. 433-458, 1998.

O'DONNELL, K. et al. A Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**, Tokyo, v. 41, n. 1, p. 61-78, 2000.

PIRES-ALVES, M.; NOVAIS, C.M. PCR em tempo real. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 33, p. 10-13, 2004.

PISSARA, T.B.; CHAVES, G.M.; VENTURA, J.A.; Sintomatologia da fusariose (*Fusarium moniliforme* Sheld. var. *subglutinans* Wr & Reg) do abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4, p. 255-263, 1979.

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

RAEDER U, BRODA P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.1, p. 17-20, 1985.

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

ROHRBACH, K. G. Fusariosis. In: PLOETZ, R. C. (ed.). **Compendium of Tropical Diseases**. Saint Paul: Amer Phytopathological Society, 1994. p. 45-56.

SANTOS, B. A. et al. Severidade de isolados de *Fusarium subglutinans f. sp. ananas* sensíveis e resistentes ao benomyl, em abacaxizeiro. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, 2002.

SARLIN, T. et al. Real-time PCR for quantification of toxigenic *Fusarium* species in barley and malt. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrech, v. 114, p. 371–380, 2006.

- SCHAAD, et al.; Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 305-324, 2003.
- SEIFERT, K. A.; LÉVESQUE C. A. Phylogeny and molecular diagnosis of mycotoxigenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrech, v. 110, p. 449–471, 2004.
- STEPIEŃ, L.; KOCZYK, G.; WAŚKIEWICZ, A. Diversity of *Fusarium* species and mycotoxins contaminating pineapple. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 54, p. 367–380, 2013.
- STRAUSBAUGH, C. A.; OVERTURF, K.; KOEHN, A. C. Pathogenicity and real-time PCR detection of *Fusarium* spp. in wheat and barley roots. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Burnaby, v. 27, p. 430-438, 2005.
- UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, p.71-74, 2007.
- VENTURA, J. A.; MAFFIA, L. A.; CHAVES, G. M. Field Induction of fusariosis in pineapple fruit with *Fusarium moniliforme* Sheld. var. *subglutinans* Wr & Reg. **Fruits**, Paris, v. 36, n.11, p. 707-710, 1981.
- VENTURA, J. A.; ZAMBOLIM, L.; GILBERTSON, R.L. Proposição de nova forma specialis em *Fusarium subglutinans* em abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 3, p.280, 1993.
- VENTURA, J. A.; ZAMBOLIM, L. Controle das doenças do abacaxizeiro. In: ZAMBOLIM, L. et al. (ed.). **Controle de doenças de plantas: fruteiras**. Viçosa: UFV, 2002. v. 1, p. 445-510.
- VENTURA, J. A. Vitoria: new pineapple cultivar resistant to fusariose. **Acta Horticulturae**, Hague, n. 882, p. 51-56, 2009.
- YAO, C. L. et al. Detection and identification of *Peronosclerospora sacchari* in maize by DNA hybridization. **Phytopatology**, Saint Paul, v. 81, p. 901-905, 1991.