



UFES

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

RAISSA DEBACKER MOURA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE *FUSARIUM GUTTIFORME* E *FUSARIUM*
ANANATUM PATÓGENOS DO ABACAXIZEIRO**

VITÓRIA, ES

2017

RAISSA DEBACKER MOURA

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE *FUSARIUM GUTTIFORME* E *FUSARIUM ANANATUM* PATÓGENOS 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.

Orientador: Prof. Dr. José Aires Ventura
Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Alberto Ribeiro Fernandes

VITÓRIA, ES

2017



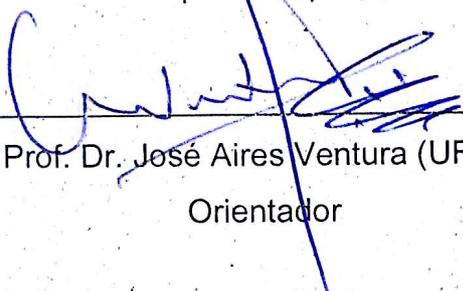
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

“Caracterização Fenotípica de *Fusarium guttiforme* e *Fusarium ananatum*
Patógenos do Abacaxizeiro”

Raíssa Debacker Moura

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia.

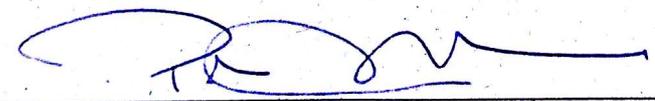
Aprovado por:



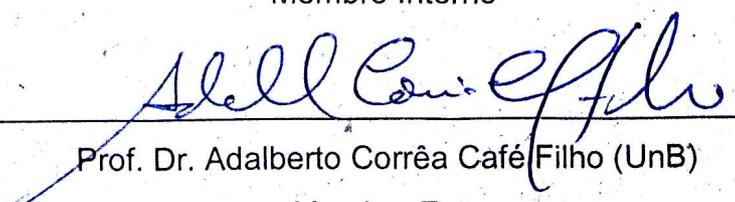
Prof. Dr. José Aires Ventura (UFES)
Orientador



Prof. Dr. Antonio Alberto Ribeiro Fernandes (UFES)
Coorientador



Profª. Drª. Patricia Machado Bueno Fernandes (UFES)
Membro Interno



Prof. Dr. Adalberto Corrêa Café Filho (UnB)
Membro Externo

Vitória-ES, 09 de Março de 2017.

Dedico esta dissertação inteiramente a Deus.

Digno é o Senhor, de Glória e Glória.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Espírito Santo.

Ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Ao Laboratório de Misturas Poliméricas e Compostos Condutores do Instituto de Macromolécula da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Ao Prof. Dr. José Aires Ventura, meu orientador, por ter me ajudado sempre e contribuído diretamente pro meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Alberto Fernandes e Profa. Dra. Patrícia Fernandes por todos os momentos de aprendizado.

Ao Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio da Universidade Federal do Espírito Santo.

Agradeço à Deus por ter me dado vida, sustento, paz e força durante todos os momentos. Teu amor me enche, me consome, me surpreende e me conquista sempre. Sou inteiramente Dele e devo tudo a Ele. Ao Senhor toda honra e glória.

Gostaria de agradecer aos meus pais, Luiz Manoel e Eliete, por toda alegria, apoio e amor proporcionados, e a minha avó, Myrthes, por todo amor, pureza, ensinamento e compaixão. À todos familiares pela compreensão, calma e momentos compartilhados.

Agradeço à Samira, Amanda, Mayara e Luiza que me acompanham de perto sempre, me proporcionando muita alegria, amparo, amor e confiança. Muito obrigada por nossa amizade, vocês são essenciais. Agradeço e peço à Deus pela vida de cada uma. Aos demais amigos, muito obrigada por todos os momentos felizes, de diversão e apoio.

À Lauanda, Ane e Joselyn por todos momentos compartilhados, e aos demais colegas do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio.

RESUMO

Fusarium ananatum e *Fusarium guttiforme* são, respectivamente, os agentes etiológicos da mancha negra e da fusariose, importantes doenças da cultura do abacaxi. As duas espécies de fungos são morfologicamente muito semelhantes mas distintas geneticamente. Este trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar marcadores fenotípicos que possam ser utilizados pelos serviços fitossanitários do Brasil e de outros países produtores de abacaxi, para identificação dos agentes etiológicos da fusariose e da mancha negra. Foram desenvolvidos estudos para caracterizar *in vitro* ambas as espécies em diferentes temperaturas e meios de cultura, além de caracterizar e identificar novos marcadores fenotípicos. A temperatura ideal para o desenvolvimento das espécies foi de 25°C, e, também, a maior produção de macroconídios foi no meio de cultura Meio Basal com Carboximetilcelulose (BM+CMC) que obteve a produção de $3,2 \times 10^5$ macroconídios/ml e $1,8 \times 10^5$ macroconídios/ml para *F. ananatum* e *F. guttiforme*, respectivamente. Por sua vez, para o desenvolvimento de microconídios, o meio de cultura Nutriente Sintético Ágar (SNA) foi o melhor, desenvolvendo $1,1 \times 10^7$ microconídios/ml e $0,7 \times 10^7$ microconídios/ml para *F. guttiforme* e *F. ananatum*, respectivamente. Utilizando a microscopia de fluorescência foi possível observar que 78,5% dos microconídios de *F. ananatum* apresentam 1 septo, e somente 8,5% dos microconídios de *F. guttiforme* apresentam esta característica, sendo uma nova recomendação para a taxonomia das espécies. Na microscopia de força atômica foram encontradas protuberâncias na parede celular de *F. guttiforme* e ausência das mesmas em *F. ananatum*, podendo ser caracterizado assim como um novo marcador morfológico importante para a taxonomia. Adicionalmente, o uso da citometria de fluxo possibilitou a caracterização da distribuição dos núcleos nas espécies, o qual estabelece microconídios uninucleados e macroconídios multinucleados. Sendo que a presença de vários núcleos nos macroconídios pode estar relacionada à quantidade de septos encontrada em sua estrutura. Os novos marcadores fenotípicos contribuem para a taxonomia dos patógenos e viabiliza novas estratégias na identificação dos agentes etiológicos destas doenças.

Palavras Chave: Taxonomia. Fungos. *Ananas comosus*. Microscopia. Citometria. Biotecnologia.

ABSTRACT

Fusarium ananatum and *Fusarium guttiforme* are respectively the etiological agents of the black spot and fusariosis, important diseases of the pineapple culture. The two species of fungi are morphologically very similar but genetically distinct. This work aimed to identify and characterize phenotypic markers that can be used by the phytosanitary services of Brazil and other pineapple producing countries to identify the etiological agents of fusariosis and black spot. Were developed studies to characterize *in vitro* both species at different temperatures and culture media, besides characterizing and identifying new phenotypic markers. The ideal temperature for the development of the species was 25°C, and also the highest production of macroconidia was in the culture medium Basal Medium with Carboxymethylcellulose (BM+CMC) that obtained the production of $3,2 \times 10^5$ macroconidia/ml and $1,8 \times 10^5$ macroconidia/ml for *F. ananatum* and *F. guttiforme*, respectively. For the development of microconidia, the Synthetic Nutrient Agar (SNA) culture medium produced a higher number of this structure, developing $1,1 \times 10^7$ microconidia/ml and $0,7 \times 10^7$ microconidia/ml for *F. guttiforme* and *F. ananatum*, respectively. Using fluorescence microscopy, it was possible to observe that 78.5% of *F. ananatum* microconidia exhibit 1 septum, and only 8.5% of the microconidia of *F. guttiforme* exhibit this characteristic, being a new recommendation for the taxonomy of the species. In atomic force microscopy, protuberances were found in the cell wall of *F. guttiforme* and absent in *F. ananatum*, and could be characterized as a new important morphological marker for taxonomy. In addition, the use of flow cytometry enabled the characterization of the distribution of core in the species, which establishes uninucleate microconidia and multinucleated macroconidia. The presence of several nuclei in macroconidia may be related to the amount of septa in its structure. The new phenotypic markers contribute to the taxonomy of pathogens and enable new strategies to identify the etiological agents of these diseases.

Keywords: Taxonomy. Fungi. *Ananas comosus*. Microscopy. Citometry. Biotechnology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem demonstrativa do funcionamento de um Microscópio de Força Atômica.	23
Figura 2 - Produção de macroconídios de <i>Fusarium guttiforme</i> e <i>Fusarium ananatum</i> em diferentes meios de cultura (1% Sacarose; BM+CMC: Meio Basal + Carboximetilcelulose; SNA: Nutriente Sintético Ágar; SDA: Ágar Dextrose Sabouraud) no intervalo de 14 dias.....	32
Figura 3 - Produção de microconídios de <i>Fusarium guttiforme</i> e <i>Fusarium ananatum</i> em diferentes meios de cultura (1% Sacarose; BM+CMC: Meio Basal + Carboximetilcelulose; SNA: Nutriente Sintético Ágar; SDA: Ágar Dextrose Sabouraud) o intervalo de 14 dias.....	33
Figura 4 - Análise das populações de macroconídios e microconídios de <i>Fusarium ananatum</i> e <i>Fusarium guttiforme</i> em meio de cultura BM+CMC, utilizando a Citometria de Fluxo.	38
Figura 5 - Análise das populações de macroconídios e microconídios de <i>Fusarium ananatum</i> e <i>Fusarium guttiforme</i> em meio de cultura 1% Sacarose, utilizando a Citometria de Fluxo.	38
Figura 6 - Análise das populações de macroconídios e microconídios de <i>Fusarium guttiforme</i> em diferentes meios de cultura (1% Sacarose e BM+CMC), utilizando a Citometria de Fluxo.	40
Figura 7 - Análise das populações de macroconídios e microconídios de <i>Fusarium ananatum</i> em diferentes meios de cultura (1% Sacarose e BM+CMC), utilizando a Citometria de Fluxo.	41
Figura 8 - Crescimento radial micelial (cm) de <i>Fusarium ananatum</i> e <i>Fusarium guttiforme</i> em diferentes temperaturas (°C) no meio de cultura BDA, ao final de 5 dias de incubação.	43
Figura 9 - Representação do crescimento radial micelial de <i>Fusarium guttiforme</i> e <i>Fusarium ananatum</i> em diferentes temperaturas.....	44
Figura 10 - Distribuição da septação em microconídios de <i>F. ananatum</i> e <i>F. guttiforme</i> em meio de cultura BM+CMC.	47
Figura 11 - Distribuição da septação em macroconídios de <i>F. ananatum</i> e <i>F. guttiforme</i> em meio de cultura BM+CMC.	47

Figura 12 - Características morfológicas de <i>Fusarium ananatum</i> , patógeno do abacaxizeiro. A-B: Cultura de <i>Fusarium ananatum</i> em BDA após 5 dias de crescimento, parte superior e do verso da cultura, respectivamente. C: Microconídios de <i>Fusarium ananatum</i> na objetiva de 100x, utilizando Calcofluor. D: Macroconídios de <i>Fusarium ananatum</i> na objetiva de 100x utilizando Calcofluor.	48
Figura 13 - Características morfológicas de <i>Fusarium guttiforme</i> , patógeno do abacaxizeiro. A-B: Cultura de <i>Fusarium guttiforme</i> em BDA após 5 dias de crescimento, parte superior e do verso da cultura, respectivamente. C: Microconídios de <i>Fusarium guttiforme</i> na objetiva de 100x, utilizando Calcofluor. D: Macroconídios de <i>Fusarium guttiforme</i> na objetiva de 100x utilizando Calcofluor.	48
Figura 14 - Variação em comprimento e largura de microconídios em <i>Fusarium ananatum</i> e <i>Fusarium guttiforme</i> . ●: representa os valores da mediana. *: representa os Outliers. ⊕: representa a média de cada estrutura.	49
Figura 15 - Variação em comprimento e largura de macroconídios em <i>Fusarium ananatum</i> e <i>Fusarium guttiforme</i> . ●: representa os valores da mediana. *: representa os Outliers. ⊕: representa a média de cada estrutura.	50
Figura 16 - Imagem bidimensional (A) e tridimensional (B) de conídios de <i>Fusarium ananatum</i>	52
Figura 17 - Imagem bidimensional (A) e tridimensional (B) de conídios de <i>Fusarium guttiforme</i>	53
Figura 18 - Imagens da parede celular de um conídio de <i>Fusarium guttiforme</i> . A: Imagem bidimensional. B: Imagem do Modo <i>Phase</i>	53
Figura 19 - Imagens da parede celular de um conídio de <i>Fusarium ananatum</i> . A: Imagem bidimensional. B: Imagem do Modo <i>Phase</i>	54
Figura 20 - Comparação de imagens tridimensionais das paredes celulares de conídios de <i>F. guttiforme</i> e <i>F. ananatum</i> , obtidas por microscopia de força atômica.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA - Batata Dextrose Ágar

BM+CMC - Meio Basal + Carboximetilcelulose (do inglês *Basal Medium + Carboxymethylcellulose*)

CMC - Carboximetilcelulose

E203 - *Fusarium guttiforme*

E680 - *Fusarium ananatum*

FFSC – Espécies do Complexo *Fusarium fujikuroi* (do inglês *Fusarium fujikuroi Species Complex*)

IMA - Instituto de Macromoléculas

INCAPER - Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural

MFA - Microscopia de Força Atômica

N/m - Newton por metro

PI - Iodeto de Propídio (do inglês *Propidium Iodide*)

RCF - Força Centrífuga Relativa (do inglês *Relative Centrifugal Force*)

SDA - Ágar Dextrose Sabouraud (do inglês *Sabouraud Dextrose Agar*)

SNA - Nutriente Sintético Ágar (do inglês *Synthetic Nutrient Agar*)

SPM - Microscópio de Varredura por Sonda (do inglês *Scanning Probe Microscope*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 AGRONEGÓCIO E FRUTICULTURA	14
1.1.1 A Cultura do Abacaxi	15
1.2 <i>FUSARIUM GUTTIFORME</i> E <i>FUSARIUM ANANATUM</i> , AGENTES ETIOLÓGICOS DE DOENÇAS DO ABACAXIZEIRO	16
1.2.1 Espécies do Complexo <i>Fusarium fujikuroi</i> (FFSC)	17
1.3 CONCEITOS DE ESPÉCIES NO GÊNERO <i>FUSARIUM</i>	19
1.3.1 Técnicas para caracterização e diferenciação de <i>Fusarium guttiforme</i> e <i>Fusarium ananatum</i>	21
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS	27
3.2 CULTURA MONOSPÓRICA	27
3.3 QUANTIFICAÇÃO DE MACROCONÍDIOS E MICROCONÍDIOS EM <i>FUSARIUM ANANATUM</i> E <i>FUSARIUM GUTTIFORME</i> EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA	27
3.4 CARACTERIZAÇÃO DE <i>FUSARIUM ANANATUM</i> E <i>FUSARIUM GUTTIFORME</i> POR CITOMETRIA DE FLUXO	28
3.5 CRESCIMENTO DE <i>FUSARIUM ANANATUM</i> E <i>FUSARIUM GUTTIFORME</i> EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	29
3.6 ANÁLISES POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA E MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 QUANTIFICAÇÃO DE MACROCONÍDIOS E MICROCONÍDIOS EM <i>FUSARIUM ANANATUM</i> E <i>FUSARIUM GUTTIFORME</i> EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA	31
4.2 CARACTERIZAÇÃO DE <i>FUSARIUM ANANATUM</i> E <i>FUSARIUM GUTTIFORME</i> POR CITOMETRIA DE FLUXO	37
4.3 CRESCIMENTO DE <i>FUSARIUM ANANATUM</i> E <i>FUSARIUM GUTTIFORME</i> EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	43

4.4 ANÁLISES MICROSCÓPICAS	46
4.4.1 Microscopia de Fluorescência	46
4.4.2 Microscopia de Força Atômica	52
5 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	
APÊNDICES	

1 INTRODUÇÃO

1.1 AGRONEGÓCIO E FRUTICULTURA

O agronegócio é fundamental para a economia do Brasil. O setor agrícola tem favorecido a melhoria no desempenho da balança comercial do país, e a fruticultura tem se destacado como uma das bases do agronegócio. O Brasil apresenta fatores que influenciam de maneira positiva na produção agrícola, como clima favorável, grande biodiversidade e disponibilidade de água e solo fértil. Sendo assim, tais fatores acarretam vantagens competitivas na produção, pois proporcionam plantio em áreas temperadas e tropicais (PERON, 2009).

A fruticultura tem elevado efeito multiplicador de renda e, portanto, possui força suficiente para dinamizar economias locais estagnadas e com poucas alternativas de desenvolvimento. Dentro deste setor, a abacaxicultura emprega um papel de grande importância, possuindo uma produção total de aproximadamente 25 milhões de toneladas no mundo no ano de 2013. Sendo que as regiões com maior produção foram a Ásia, com aproximadamente 11 milhões de toneladas, e a América do Sul, com aproximadamente 9 milhões de toneladas (FAO, 2016).

Em 2014 o Brasil foi caracterizado por ser o segundo maior produtor de abacaxi no mundo (2.646.243 toneladas), cuja produção foi superada somente pela Costa Rica (2.915.628 toneladas) (FAO, 2016). Sua produção é destinada tanto para consumo *in natura* como para industrialização, cuja comercialização abrange tanto o mercado nacional como o internacional. Sendo assim, a cultura tem extrema importância socioeconômica devido à sua alta produção e, conseqüentemente, grande fluxo financeiro. Além disso, o abacaxi fica em segundo lugar no ranking do mercado de frutas tropicais vendidos no exterior (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

Por sua vez, o estado do Espírito Santo está entre os dez maiores produtores de abacaxi do país, sendo um total aproximado de 50.000 frutos no ano de 2014. A evolução dessa atividade no estado é bastante expressiva e em cinco anos apresentou crescimento de 30% (IBGE, 2016). Desde 2003, o Governo do Estado atua em parceria com os municípios, a iniciativa privada, organizações sociais e principalmente os produtores, para potencializar a atividade e gerar emprego e renda. Dentro da fruticultura, o abacaxi está entre as frutas produzidas no país e

voltadas para o mercado internacional, principalmente a Europa, sendo que sua exportação em 2011 foi de aproximadamente 2,23 milhões de toneladas (FAO, 2016).

No entanto, a abacaxicultura enfrenta sérios problemas de ordem fitossanitária. O alto rendimento na produção de abacaxi vem sendo prejudicado por doenças nas lavouras, sendo assim um dos principais fatores limitantes e prejudiciais à mesma. As doenças podem estar relacionadas à presença de bactérias, nematoides, vírus e, principalmente, fungos fitopatogênicos. Dentre os fungos, as espécies *Fusarium guttiforme* e *Fusarium ananatum* são as mais importantes na infecção em diferentes cultivares de abacaxi, sendo os agentes causais de Fusariose e Mancha Negra, respectivamente (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

1.1.1 A Cultura do Abacaxi

O abacaxi (*Ananas comosus* var. *comosus*) é uma planta monocotiledônea, herbácea, perene e pertencente à família Bromeliaceae. Esta espécie é caracterizada por possuir caule grosso e curto, cujas folhas crescem ao seu redor, em forma de calhas. Além disso, outra característica predominante no gênero *Ananas*, e que o diferencia dos outros da família Bromeliaceae, é a presença de frutos do tipo sincarpo, formado pela coalescência de frutos individualmente soldados uns aos outros (REINHARD, 2000).

O centro de origem global da cultura do abacaxi está situado na América Tropical e Subtropical de onde se disseminou pelo mundo. O Brasil é um dos maiores centros de diversidade genética de abacaxi do mundo, podendo ser encontradas na forma silvestres ou cultivadas. As cultivares de abacaxi mais conhecidas são 'Smooth Cayenne', 'MD-2', 'Spanish', 'Queen', 'Pérola', 'Perolera' e 'Vitória'. No Brasil a principal cultivar plantada é a 'Pérola' e em seguida a 'Smooth Cayenne', sendo que ambas são suscetíveis as duas importantes doenças, Fusariose e a Mancha Negra (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

1.2 *FUSARIUM GUTTIFORME* E *FUSARIUM ANANATUM*, AGENTES ETIOLÓGICOS DE DOENÇAS DO ABACAXIZEIRO

O gênero *Fusarium* tem ampla distribuição geográfica, ocorrendo em praticamente todos os ambientes e é classificado na ordem Hypocreales e na família Nectriaceae. Este gênero é um dos mais importantes dos fungos, devido à sua diversidade genética e morfológica e suas relações com animais, humanos e plantas. É classificado por ser patogênico para um grande número de culturas com grande importância econômica e, portanto, a correta identificação das espécies é essencial para traçar as estratégias de controle fitossanitário (VENTURA, 2000).

Admite-se que mais de 1.000 espécies de *Fusarium* foram descritas, entretanto, apesar do grande número de estudos e trabalhos publicados, não existe hoje um único sistema completo que possibilite a identificação das suas espécies deste gênero (BURGESS et al., 1994; LESLIE; SUMMERELL, 2006; NELSON et al., 1983; VENTURA, 1999).

Dentre as principais espécies deste gênero, *Fusarium guttiforme* é reconhecido na literatura como o fungo fitopatogênico de maior importância relacionado à cultura do abacaxi. Esta espécie é o agente etiológico da Fusariose, uma doença considerada como um fator limitante no desenvolvimento da abacaxicultura, cujas perdas podem atingir a totalidade da produção, sendo também considerada uma praga quarentenária para vários países produtores onde a doença ainda não foi relatada (VENTURA; COSTA, 2006; VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

A doença afeta todas as partes da planta, sendo mais destrutiva quando ocorre no fruto. Seu principal sintoma é a exsudação da goma a partir dos tecidos infectados e, conseqüente, podridão dos mesmos. Entretanto, também podem ser observadas curvaturas no ápice do talo, encurtamento do talo, redução no desenvolvimento da planta, morte do meristema apical, clorose, como também formação de frutos anormais e folhas amareladas (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

Sendo a fusariose uma doença quarentenária para vários países produtores de abacaxi, torna-se importante o estabelecimento de medidas legislativas e fitossanitárias para evitar sua disseminação. Tal fato ocorre, principalmente, porque a fusariose não apresenta sintomas em algumas fases de desenvolvimento da planta, sendo assim, é caracterizada como uma doença de fácil disseminação para outros países produtores. Devido a isso, é fundamental a adoção de medidas de

mitigação de risco em países onde se encontra este patógeno, determinando assim a garantia da ausência da doença nos frutos para a exportação dos mesmos.

Além da fusariose, outra doença também ocorre na cultura do abacaxi, que é a mancha negra, causada por *Fusarium ananatum*, caracterizada por ser uma doença de pouca importância econômica e está presente na maioria das áreas de produção de abacaxi no mundo. Os sintomas nos frutos muitas vezes são semelhantes aos da fusariose, porém menos severos, como a podridão dos frutos limitada aos frutinhos e a formação de uma depressão em forma de “V” na parte externa do mesmo, se estendendo para os tecidos interiores como uma podridão (JACOBS et al., 2010). Sendo fungos do mesmo gênero, muitas vezes a identificação é confundida provocando amplas discussões entre os órgãos de fiscalização fitossanitária dos países produtores de abacaxi.

Portanto, é de extrema importância desenvolver ferramentas biotecnológicas para identificar adequadamente os fungos causadores de cada uma das doenças, facilitando assim o estudo da epidemiologia das doenças, seus hospedeiros alternativos e avaliar corretamente a resistência das novas cultivares lançadas pela pesquisa, bem como, apoiar os programas de melhoramento genético.

1.2.1 Espécies do Complexo *Fusarium fujikuroi* (FFSC)

O agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro era incluído na espécie *Fusarium subglutinans*, considerando as características morfológicas, fisiológicas e genéticas (NELSON et al., 1983). Posteriormente, em testes de inoculação cruzada de isolados de *Fusarium subglutinans sensu lato* do abacaxi e de outros hospedeiros, foi demonstrado que a população que causa a fusariose é específica do abacaxizeiro, o que resultou na proposição de uma *forma specialis*, *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* (VENTURA et al., 1993). Posteriormente com a comparação das sequências gênicas de genes específicos que codificam a subunidade 28S e a menor subunidade mitocondrial (mtSSU) do DNA ribossômico, β -tubulina, calmodulina e fator de alongação-1 α revelou-se que o fungo responsável pela fusariose do abacaxizeiro pertence a uma nova espécie que foi denominada por *Fusarium guttiforme* (NIRENBERG; O'DONNELL, 1998; VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

Posteriormente, Jacobs et al. (2010) descreveram uma nova espécie encontrada na África do Sul, denominada como *Fusarium ananatum*, também proveniente de *Fusarium subglutinans*. Esta espécie foi comparada com isolados de *Fusarium guttiforme* depositados em coleções internacionais e da Micoteca do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), comprovando-se que apesar de patogênica para o abacaxizeiro, causava outra doença, chamada de mancha negra.

Tanto *Fusarium guttiforme* como *Fusarium ananatum* inicialmente eram consideradas a mesma espécie, *F. subglutinans*, que hoje é reconhecida como um grupo polifilético, e pertencem ao complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC) que corresponde a um conjunto de espécies com características semelhantes. Atualmente, este complexo é composto por 32 espécies, sendo que aproximadamente 11 possuem teleomorfo descrito, entretanto, *F. guttiforme* e *F. ananatum* não possuem fase teleomórfica ainda observada. Além disso, tais espécies apresentam características morfológicas semelhantes que são utilizadas para a separação entre espécies dentro do complexo, como arranjo de conídios distribuídos em falsas cabeças, macroconídios com 2-3 septos, microconídio obovoide, ausência de clamidósporo, além da presença de monofiálides e polifiálides (Tabela 1) (JACOBS et al., 2010; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

A análise dos macroconídios e sua septação apresentam grande importância na taxonomia das espécies deste gênero, sendo uma das principais características observadas. A análise dessas estruturas é muito importante tanto para *F. guttiforme* como para *F. ananatum*, uma vez que o número de septos encontrados nos macroconídios de ambas as espécies pode estar associado à identificação dos mesmos. Entretanto, a produção desta estrutura em *F. guttiforme* é reduzida, sendo um fator limitante para sua identificação e o desenvolvimento de estudos (LESLIE; SUMMERELL, 2006; NIRENBERG; O'DONNELL, 1998; VENTURA, 2000).

Tabela 1 - Descrição das estruturas morfológicas das espécies de *F. guttiforme* e *F. ananatum*.
 Fonte: LESLIE; SUMMERELL, 2006.

Espécie	Micélio aéreo	Arranjo dos conídios	Macroconídios	Microconídios	Fiálides	Cor da cultura
<i>F. guttiforme</i>	Distribuído por toda superfície	Falsas cabeças	Paredes finas, delgados e retos a ligeiramente curvados (usualmente com 3 septos)	Obovóides (0-1 septo)	Mono e polifiálides	Creme a púrpura
<i>F. ananatum</i>	Círculos concêntricos no centro da colônia	Falsas cabeças	Paredes finas, delgados e retos a ligeiramente curvados (usualmente com 3 septos)	Obovóides (0-1 septo)	Mono e polifiálides	Alaranjada

Dentre as características analisadas, apenas a cor da cultura pode variar, mas este caracter não é consistente, já que pode ser alterado dependendo da composição do meio de cultura, levando à identificação incorreta. Portanto, é importante ressaltar que não existem marcadores morfológicos consistentes para a separação dessas duas espécies e, atualmente, a distinção das mesmas é realizada por sequenciamento e análises filogenéticas que são de custo elevado (KVAS et al., 2009). O desenvolvimento de novos métodos que possibilitem à caracterização e diferenciação de ambas as espécies é de grande importância, facilitando os serviços fitossanitários e de diagnóstico do Brasil e de outros países produtores de abacaxi no mundo.

1.3 CONCEITOS DE ESPÉCIES NO GÊNERO *FUSARIUM*

O gênero *Fusarium* constitui um grande grupo com centenas de espécies que, com exceção de algumas, produzem macroconídios multiseptados. O gênero inclui agentes patogênicos vegetais importantes, endófitos e saprófitos capazes de metabolizar substratos diversos e patógenos emergentes de importância clínica e também pode ser nocivo para seres humanos e animais, uma vez que muitos deles são toxigênicos. A análise filogenética molecular deste gênero revelou que ela possui pelo menos 20 clados ou "complexos de espécies" e que se originou no período Cretáceo, aproximadamente 91,3 milhões de anos atrás (O'DONNELL et al., 2013).

Atualmente, várias abordagens são utilizadas para a caracterização e diferenciação de fungos que são determinantes na taxonomia a nível específico, tais como: a utilização de métodos taxonômicos, o desenvolvimento de características ao longo do tempo e o emprego do conceito de espécies.

Dentre os principais conceitos de espécies utilizados para caracterizar e diferenciar espécies admite-se que a utilização do conceito de espécie biológica se refere estritamente ao processo de cruzamento entre as espécies. Este conceito determina que espécies são grupos de populações biologicamente compatíveis. Entretanto, este conceito não pode ser usado em todas as espécies no gênero *Fusarium*, pois algumas não possuem fase sexual descrita até o momento (LESLIE; SUMMERELL, 2006; VENTURA, 2000).

A identificação morfológica é uma abordagem principal para a classificação de *Fusarium* e complementa outros métodos utilizados. O conceito de espécie morfológica é baseado em diferenças nas características observáveis do fungo.

As espécies de *Fusarium* produzem três tipos de esporos: macroconídios, microconídios e clamidósporos. Os macroconídios podem ser produzidos em monofiálides e polifiálides no micélio aéreo, mas também em monofiálides curtas, e em estruturas especializadas chamadas esporodóquios. Sendo assim, em *Fusarium*, as características morfológicas primárias para a taxonomia do gênero, são a forma e o tamanho dos macroconídios, microconídios e clamidósporos, e o tipo e presença de células conidiogênicas (geralmente para os microconídios). Outros caracteres que são secundários, mas que também podem ser utilizados na taxonomia dos mesmos inclui a natureza das hifas em meio de cultura (por exemplo, morfologia circinada), pigmentos produzidos e secretados (usualmente em meio Batata Dextrose Ágar), odores detectáveis, taxa de crescimento e produção de metabólitos secundários (LESLIE; SUMMERELL, 2006; VENTURA, 2000).

Tradicionalmente, a maioria dos diagnósticos baseou-se fortemente nos caracteres morfológicos. Estas características juntamente com a genômica são ferramentas úteis para classificações iniciais na biodiversidade de fungos e outros microrganismos. Historicamente, as características morfológicas são utilizadas para distinguir espécies de *Fusarium*. Entretanto, o número de caracteres utilizados para este fim é limitado perante o número de espécies que precisam de distinção (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

A aplicação do conceito de espécie genética também tem sido utilizada para diferenciar espécies de fungos. Este conceito atribui diferenças entre espécies a partir de um subgrupo filogenético (clado) de indivíduos ou populações que possuem uma mesma característica, levando a uma grande diferenciação entre populações de fungos, que poderão ser consideradas espécies diferentes sem, no entanto, poder comprovar o conceito de espécie biológica. Atualmente, o uso de sequências específicas do DNA é muito útil para identificar clados e de acordo com a distância filogenética, delimitar espécies. Entretanto, este método não é completamente eficaz. Além disso, características morfológicas bem estabelecidas também são necessárias e utilizadas neste intuito (KVAS et al., 2009; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Sendo assim, a aplicação combinada dos conceitos de espécie morfológica, biológica e filogenética tem contribuído para a taxonomia do FFSC, assim como facilitou o reconhecimento e descrição das espécies inseridas nesse complexo. Essa abordagem conjunta se mostrou mais robusta e confiável, sendo que as espécies de *Fusarium* por muito tempo foram separadas apenas por características morfológicas e especificidade com hospedeiro (KVAS et al., 2009; LESLIE et al., 2001; NIRENBERG; O'DONNELL, 1998; VENTURA, 2000). No entanto, o uso de métodos morfológicos e microscópicos óticos para a identificação desses fungos carece de precisão, o que é um grande problema no estudo da sua taxonomia.

É importante ressaltar que a diferenciação e caracterização de espécies de fungos a partir de dados morfológicos, especialmente de *Fusarium guttiforme* e *Fusarium ananatum*, é precária. Torna-se, assim, necessário o desenvolvimento de novas ferramentas que possibilitem à identificação e diferenciação taxonômica de ambas as espécies.

1.3.1 Técnicas para caracterização e diferenciação de *Fusarium guttiforme* e *Fusarium ananatum*

O uso da microscopia óptica com o intuito de auxiliar na diferenciação e caracterização de estruturas de *Fusarium ananatum* e *Fusarium guttiforme* tem sido usado a partir da comparação entre as principais características determinantes nas espécies dos fungos, como os arranjos dos conídios, a presença ou ausência de monofiálides e polifiálides, conformação de micro- e macroconídios, clamidósporos,

como também a presença das estruturas da fase sexual. Entretanto, considerando os isolados de *Fusarium* em abacaxizeiro e a pouca informação disponível sobre a identificação das espécies de *Fusarium*, não é possível diferenciar as duas espécies até o momento utilizando apenas a microscopia ótica (JACOBS et al., 2010; LESLIE; SUMMERELL, 2006; VENTURA, 2000).

Outro processo que pode ser utilizada em estudos taxonômicos e morfológicos de fungos é a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Este método possui um grande poder de resolução, permitindo a observação de detalhes na superfície do espécime, complementando, assim, estudos efetuados no microscópio ótico. Entretanto, mesmo o MEV muitas vezes não é suficiente para a caracterização e diferenciação de espécies similares, uma vez que a quantidade de características disponíveis para a sua diferenciação é limitante. Além disso, o próprio ambiente em vácuo e a irradiação de elétrons nas amostras durante a leitura podem levar ao surgimento de condições desfavoráveis em amostras sensíveis, e conseqüentemente, possíveis alterações em sua conformação, impossibilitando a obtenção de resultados fidedignos (OLIVEIRA et al., 2011).

Portanto, na ausência de marcadores morfológicos precisos para separar as espécies é necessário o desenvolvimento de novas tecnologias que possam auxiliar na diferenciação e identificação das espécies, com destaque para o uso da microscopia de força atômica (MFA) considerada uma técnica de extrema importância para este fim.

A microscopia de força atômica e seus diversos modos de operação constituem uma nova classe de instrumentos pertencentes ao grupo de microscopias chamadas SPM (*Scanning Probe Microscopy*). SPMs não utilizam lentes para obtenção das imagens e não necessitam de uma fonte de luz, nem de um feixe de elétrons. Estas técnicas baseiam-se na varredura da superfície estudada por meio de sondas de dimensões muito reduzidas, a distâncias muito pequenas (da ordem de alguns nanômetros), proporcionando uma alta resolução espacial, tanto lateral como vertical, na visualização de superfícies em nível atômico de diferentes naturezas (metais, películas orgânicas, polímeros, amostras biológicas em sistemas condutores e isolantes) e em diversos meios (KALININ; GRUVERMAN, 2007).

O princípio de funcionamento do MFA baseia-se na varredura da superfície da amostra por uma ponta piramidal (ponteira) de alguns micra de comprimento (100 a 200 μm) e geralmente com menos de vinte nanômetros de diâmetro, integrada em

um *cantilever* flexível. É a partir da oscilação vertical da ponta por meio de forças de repulsão e interação entre a ponta e a amostra estudada, obtêm-se imagens topográficas das amostras fidedignas à sua conformação original (WEST, 2006) (Figura 1).

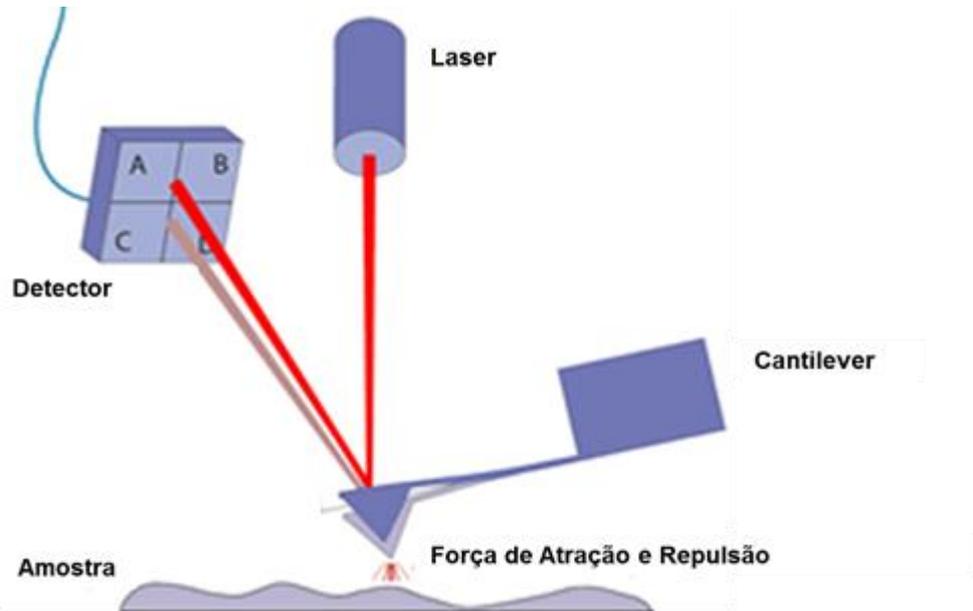


Figura 1 - Imagem demonstrativa do funcionamento de um Microscópio de Força Atômica.

O MFA pode atuar em diferentes modos de leituras. No modo contato o *cantilever*, ou sonda, é mantido a poucos ângstroms da superfície da amostra e a força entre a ponta e a amostra é repulsiva. Neste modo de operação, a ponta faz um leve “contato físico” com a amostra produzindo imagens topográficas com alta resolução, entretanto, pode acarretar danos à amostra. Já no modo de leitura denominado de dinâmico, não ocorre o contato da ponta com a amostra e a leitura é feita a partir de forças atrativas. Neste modo de leitura são formadas imagens topográficas com menor resolução quando comparadas ao modo contato, entretanto, este modo de leitura é extremamente seguro, pois não ocorrem danos ao material estudado (DUFRENE, 2012).

O método de leitura intermitente também é muito utilizado nas análises de microscopia de força atômica. Este modo opera a partir da oscilação do *cantilever* em relação à amostra, ou seja, alternadamente a ponta é colocada em contato com a superfície e, em seguida, a mesma é levantada para fora da superfície para evitar a fricção da ponta em toda a superfície da amostra, sendo que este ciclo possui uma

frequência de aproximadamente 50.000 até 500.000 oscilações por segundo. Esta técnica permite obter imagens de alta resolução de amostras frágeis, superando problemas relacionados ao atrito quando comparado ao modo contato (DUFRENE, 2012).

A microscopia de força atômica é uma técnica eficiente na análise da estrutura de uma superfície em nano escala. Usualmente, a análise utilizando este tipo de equipamento permite a obtenção de dois tipos de imagens: imagens topográficas ou morfológicas e *Phase Images*. As imagens topográficas revelam diferenças morfológicas e estruturais na superfície da amostra, enquanto as *Phase images* determinam informações sobre a superfície, como diferenças na composição química (GUSTAFSSON et al., 2003).

Além do uso da microscopia de força atômica, outros métodos também podem ser utilizados para contribuir na caracterização e diferenciação de macroconídios e microconídios de *F. guttiforme* e *F. ananatum*. O desenvolvimento de estudos comportamentais, analisando a resposta de ambas as espécies em ambientes diferentes (temperaturas e meios de culturas diferentes) é fundamental. A caracterização do comportamento dos fungos *in vitro* fornece importantes informações para seu adequado cultivo e para produção de inóculos viáveis, pois os isolados podem apresentar diferenças de comportamento e de inóculo quando expostos a ambientes com variações de substrato e temperatura. Além disso, o uso da microscopia de fluorescência e da citometria de fluxo também podem auxiliar diretamente neste estudo.

A microscopia de fluorescência baseia-se no uso de corantes fluorescentes ou fluorocromos para visualização do espécime ou estrutura desejada. Quando utilizado em fungos, estes fluorocromos, muitas vezes, se ligam aos componentes específicos da parede celular e sob excitação ultravioleta emitem radiação com comprimento de onda superior à radiação incidente, proporcionando uma melhor visualização dessas estruturas (LI, 2013). Portanto, esta técnica possui grande potencial para possibilitar uma melhor diferenciação e caracterização das espécies, uma vez que gera imagens com maior nitidez e contraste. Além disso, possibilita a visualização de estruturas específicas que podem influenciar de maneira positiva no estudo.

Adicionalmente, a citometria de fluxo é outra técnica que também pode ser utilizada para a identificação e caracterização de macroconídios e microconídios de

ambas as espécies. Esta metodologia é utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo, permitindo assim a análise de vários parâmetros simultaneamente. Realizada através de um aparelho de detecção óptico-eletrônico, são possíveis análises de características físicas e/ou químicas de uma simples célula (VOGT et al., 2013). Sendo assim, seu uso possibilita a complementação de dados que podem levar a uma melhor caracterização e possível diferenciação das duas espécies.

A microscopia de força atômica, de fluorescência e a citometria de fluxo são tecnologias promissoras para a caracterização mais detalhada e possível diferenciação entre as espécies, com potencial para proporcionar a identificação e caracterização de novos marcadores fenotípicos. Tais marcadores poderão auxiliar de forma direta na identificação das duas espécies de *Fusarium* e contribuir para o aprimoramento dos serviços fitossanitários no Brasil e em outros países produtores de abacaxi, bem como dar o suporte para apoiar os programas de melhoramento do abacaxizeiro para resistência à fusariose e mancha negra, além de contribuir para os estudos de epidemiologia e definição de novas estratégias de manejo das doenças.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar marcadores fenotípicos que possam ser utilizados pelos serviços fitossanitários do Brasil e de outros países produtores de abacaxi, para identificação dos agentes etiológicos da fusariose e da mancha negra.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar um protocolo de microscopia de força atômica e microscopia de fluorescência, para reconhecer marcadores fenotípicos em macroconídios e microconídios de *Fusarium ananatum* e *Fusarium guttiforme*;
- Comparar as características presentes na parede celular de *Fusarium guttiforme* e *Fusarium ananatum*, utilizando a microscopia de força atômica;
- Avaliar possíveis diferenças entre os isolados de *Fusarium guttiforme* e *Fusarium ananatum* utilizando a citometria de fluxo;
- Identificar um meio de cultura para obtenção de macroconídios em *Fusarium guttiforme*;
- Analisar as diferenças no desenvolvimento *in vitro* de ambas as espécies em temperaturas e meios de cultura diferentes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS

Foram utilizados neste estudo isolados de *Fusarium guttiforme* e *Fusarium ananatum*, obtidos da Micoteca do Laboratório de Fitopatologia do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper). Os isolados estudados são de referência das espécies *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 tubo de ensaio inclinado contendo meio batata dextrose ágar (BDA). Após 7 dias de crescimento, a 25°C e 12 horas de fotoperíodo, foi feita a suspensão conidial, seguida de diluição seriada e semeadura em placa de Petri contendo ágar e água. Após 24 horas, os conídios foram removidos com auxílio de uma agulha e inoculados em novas placas de Petri contendo meio ágar-água para crescimento. Após 7 dias de crescimento em 25°C e 12 horas de fotoperíodo, o ágar com o micélio foi cortado em discos, com auxílio de um tubo cilíndrico de metal de aproximadamente 4 mm de diâmetro, colocado em microtubos esterilizados e armazenados a 4°C, no escuro.

3.3 QUANTIFICAÇÃO DE MACROCONÍDIOS E MICROCONÍDIOS EM *FUSARIUM ANANATUM* E *FUSARIUM GUTTIFORME* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Foram utilizados 4 meios de cultura líquidos diferentes para o desenvolvimento deste experimento, sendo estes: SDA (Ágar Dextrose Sabouraud: 40g/L glicose, 10g/L peptona, pH 5,6), 1% Sacarose, SNA com folhas de cravo (Nutriente Sintético Ágar: 0,5g/L MgSO₄.7H₂O, 1g/L de KH₂PO₄, 1g/L de KNO₃, 0,5g/L KCl, 0,2 g/L Glicose, 0,2 g/L Sacarose) e BM+CMC (Meio Basal + Carboximetilcelulose: 0,5g/L MgSO₄.7H₂O, 1g/L de KH₂PO₄, 1 g/L NH₄NO₃, 1 g/L Extrato de Levedura, 1g/L Carboximetilcelulose).

Foram feitas 4 repetições para cada meio de cultura para a quantificação de macro- e microconídios de *F. ananatum* como também para a análise em *F. guttiforme*, totalizando assim 32 amostras. Ambas as espécies foram cultivadas em 25°C, com 12h de fotoperíodo, 230 rotações por minuto (rpm) durante 14 dias.

As análises foram feitas em 3, 7, 10 e 14 dias de crescimento, nas quais foi utilizada a Câmara de Neubauer para contagem de macro- e microconídios, utilizando 2 repetições de contagem para cada amostra. Foram retirados um total de 10 µl de cada amostra para cada leitura e foi utilizado um contador manual para a contagem de cada estrutura.

Os resultados deste experimento foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo Teste de Turkey a 5% de probabilidade, utilizando o programa de análises estatísticas Assistat 7.7 (SILVA, 2016).

3.4 CARACTERIZAÇÃO DE *FUSARIUM ANANATUM* E *FUSARIUM GUTTIFORME* POR CITOMETRIA DE FLUXO

As análises de citometria de fluxo foram realizadas no equipamento Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio/UFES. Este citômetro é equipado com dois lasers de excitação, um na faixa do azul de 20 mW (488 nm) e um na faixa do violeta de 50 mW (405 nm), ambos com três canais de detecção.

Para o preparo das amostras, *F. guttiforme* e *F. ananatum* foram cultivadas em 1% Sacarose durante 3 dias e BM+CMC durante 7 dias nas mesmas condições de desenvolvimento, 25°C, 230 rpm e fotoperíodo de 12h. Posteriormente, foi obtida uma solução de conídios de até 1×10^6 células/ml, os quais foram fixados em etanol absoluto e ressuspensos em PBS 1%. As amostras foram, então, centrifugadas a 0,3 rcf durante 2 minutos a 4°C e então o sobrenadante foi descartado. Sendo assim, foi adicionado a solução de RNase (50mM TrisHCl pH 8, 15mM NaCl e 10mg/ml de RNase) nas amostras, e posteriormente incubadas no *Eppendorf Thermomixer R* a 37°C durante 2 horas. Após este processo, as amostras foram centrifugadas e 1 ml de PBS foi adicionado juntamente com 2µl de PI (iodeto de propídio), o qual é classificado como um corante fluorescente que cora ácidos nucleicos, penetrando apenas em células com a membrana danificada. Após a

adição do corante, a amostra foi envolvida em papel alumínio e incubada a 37°C por 15 min.

Após estes processos, as amostras foram levadas para análise no citômetro de fluxo. No equipamento, a amostra contendo a suspensão de conídios é aspirada, e então esta suspensão é conduzida por um fluxo contínuo de solução salina até a interceptação do feixe luminoso do laser, sendo que nesta etapa os conídios são interceptados um a um. Após a seleção da população de interesse, o equipamento foi configurado para coletar a fluorescência das amostras através dos detectores BL2 (575nm/24nm).

3.5 CRESCIMENTO DE *FUSARIUM ANANATUM* E *FUSARIUM GUTTIFORME* EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Os fungos *F. ananatum* e *F. guttiforme* foram repicados para placas contendo BDA (Batata Dextrose Ágar) para a comparação das suas taxas de crescimento em 6 diferentes temperaturas (10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C e 35°C). Foram feitas 4 repetições por espécie e todas as amostras foram cultivadas em fotoperíodo de 12h.

As análises foram feitas aos 5 dias de crescimento, utilizando uma régua graduada em milímetros para medições do crescimento da cultura.

Para a análise estatística dos resultados obtidos foi feito um Teste de Regressão, no intuito de modelar a relação existente entre as variáveis e o seu grau de dependência estatística. Tais análises foram feitas a partir do Assistat 7.7 (SILVA, 2016).

3.6 ANÁLISES POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA E MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

As análises foram realizadas em dois microscópios de força atômica (MFA) diferentes, sendo eles: AFM5500M Hitachi, utilizando pontas com frequência de ressonância de 235 kHz e constante de força de 12 N/m [Laboratório de Misturas Poliméricas e Compósitos Condutores no Instituto de Macromolécula da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IMA/UFRJ)]; e o SPM9600 Shimadzu, utilizando pontas com frequência de ressonância de 204 - 497 kHz e constante de força de 10 – 130 N/m.

As análises dos conídios de *F. ananatum* e *F. guttiforme* foram feitas a partir do modo de leitura intermitente, obtendo assim imagens topográficas de alta resolução e *Phase images*.

Ambas as espécies cresceram em placas contendo SDA durante 7 dias com fotoperíodo de 12h a 25°C. Posteriormente, foi feita uma suspensão dos conídios em água destilada ultra pura. A partir desta suspensão, os conídios foram centrifugados a 0,3 rcf durante 2 minutos à 4°C e lavados três vezes em água destilada ultra pura. Sendo assim, as amostras foram incubadas no *Eppendorf Thermomixer R* a 300 rpm, 25°C, *overnight*. Após estas etapas, foram depositados 2 µl da suspensão de conídios em discos de mica (*Highest Grade V1 15mm*), os quais foram levados para análise no MFA após secagem das amostras.

As análises a partir da microscopia de fluorescência dos macroconídios e microconídios dos isolados foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio/UFES, utilizando o equipamento NIKON Eclipse Ti-S. As imagens foram realizadas com a objetiva de 100x, utilizando óleo de imersão, e a análise de dados foi feita utilizando o programa NIS-Elements.

Foi realizada a caracterização morfológica de *F. ananatum* e *F. guttiforme* de acordo com Leslie e Summerell (2006) e Jacobs et al. (2010), analisando o formato e septação de macro e microconídios, como também o tamanho (largura e comprimento) destas estruturas. Para a realização deste estudo, *F. guttiforme* e *F. ananatum* cresceram em meio de cultura líquido BM+CMC durante 7 dias, 25°C, 230 rpm e fotoperíodo de 12h. Sendo assim, foram feitas suspensões de conídios de cada espécie em Tris Base, em uma concentração de 1×10^6 células/ml, após lavagens em tampão fosfato salino (PBS) 1%. Posteriormente, foram realizadas análises de 200 macro- e microconídios de ambas as espécies corados com o corante *Calcofluor White Stain (SIGMA-ALDRICH)*, na proporção de 1:1 em relação à suspensão de conídios. Uma vez que as estruturas foram coradas, lâminas foram preparadas para visualização.

Além das análises de características morfológicas dos macro e microconídios de ambas as espécies utilizando a microscopia de fluorescência, também foram feitas médias do comprimento e largura dessas estruturas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 QUANTIFICAÇÃO DE MACROCONÍDIOS E MICROCONÍDIOS EM *FUSARIUM ANANATUM* E *FUSARIUM GUTTIFORME* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

A quantificação de macroconídios e microconídios de *F. ananatum* e *F. guttiforme* foi realizada em 4 meios de cultura diferentes durante 14 dias, onde verificou-se o comportamento de ambas as espécies comparando a produção de macroconídios e microconídios das mesmas.

Constatou-se que nos intervalos de 7 e 10 dias não houve diferença estatística significativa nas avaliações de produções de macroconídios em *F. ananatum* e *F. guttiforme*. Além disso, no desenvolvimento de microconídios em ambas as espécies também não houve diferença estatística no intervalo de 3 dias. Entretanto, as produções destas estruturas em meios de culturas diferentes nos demais intervalos apresentaram diferenças significativas quando comparadas e, portanto, distinguiram estatisticamente ($P < 0,05$) (Apêndice A).

A produção de macroconídios em *F. guttiforme* e *F. ananatum* nos intervalos de 3, 7, 10 e 14 dias podem ser observadas na Figura 2. Em todos os períodos *F. ananatum* apresentou uma alta produção destas estruturas utilizando os meios de cultura SNA, SDA e BM+CMC e uma baixa produção das mesmas quando foi utilizado 1% Sacarose.

O meio de cultura BM+CMC pode ser considerado o meio de cultura mais favorável ao desenvolvimento destas estruturas em todos os intervalos. Utilizando este meio de cultura foi possível obter 28×10^4 macroconídios/ml no intervalo de 3 dias, 32×10^4 macroconídios/ml no intervalo de 7 dias, como também 27×10^4 macroconídios/ml e 30×10^4 macroconídios/ml nos intervalos de 10 e 14 dias, respectivamente. Entretanto, utilizando o meio de cultura 1% Sacarose constatou-se uma baixa produção destas estruturas, desenvolvendo 1×10^4 macroconídios/ml em todos os períodos analisados (Figura 2).

Adicionalmente, realizando a mesma análise em *F. guttiforme*, observa-se uma baixa produção de macroconídios utilizando os meios de cultura SNA, SDA e 1% Sacarose em todos os períodos, sendo que nos intervalos de 3 e 14 dias houve ausência na produção de macroconídios utilizando 1% Sacarose. Entretanto, a partir do uso do meio BM+CMC foi possível observar uma alta produção de macroconídios

em todos os períodos para esta espécie, destacando mais uma vez a sua importância. Utilizando este meio de cultura, *F. guttiforme* desenvolveu 7×10^4 macroconídios/ml no intervalo de 3 dias, e 18×10^4 macroconídios/ml, 16×10^4 macroconídios/ml e 18×10^4 macroconídios/ml nos intervalos de 7, 10 e 14 dias, respectivamente. Por sua vez utilizando o meio de cultura 1% Sacarose, houve ausência na produção de macroconídios nos intervalos de 3 e 14 dias, e uma produção de 1×10^4 macroconídios/ml nos períodos de 7 e 10 dias (Figura 2).

Portanto, comparando a produção de macroconídios tanto para *F. ananatum* como para *F. guttiforme*, observou-se que o meio de cultura BM+CMC é de extrema importância para o seu desenvolvimento, e que 1% Sacarose é um meio de cultura limitante para o desenvolvimento destas estruturas em ambas as espécies.

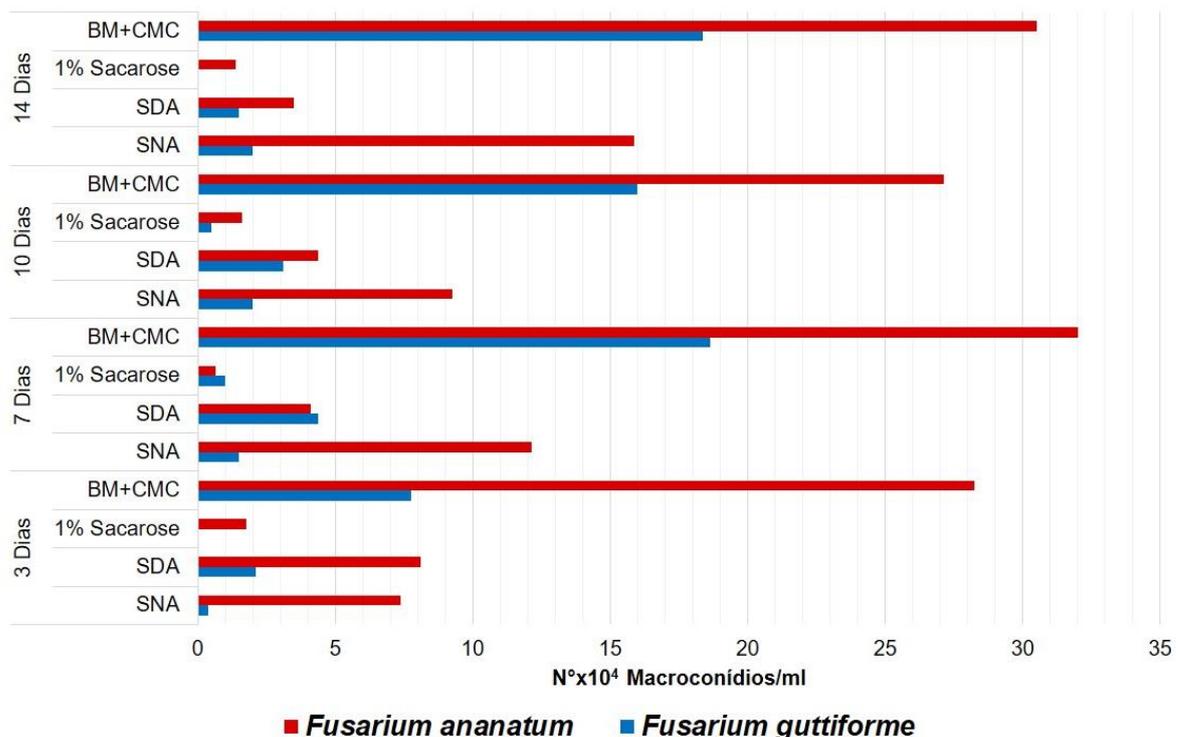


Figura 2 - Produção de macroconídios de *Fusarium guttiforme* e *Fusarium ananatum* em diferentes meios de cultura (1% Sacarose; BM+CMC: Meio Basal + Carboximetilcelulose; SNA: Nutriente Sintético Ágar; SDA: Ágar Dextrose Sabouraud) no intervalo de 14 dias.

A respeito da produção de microconídios em *F. ananatum* e *F. guttiforme* é possível observar que SNA é o meio de cultura que mais favorece ao desenvolvimento desta estrutura, sendo classificado como o meio de cultura com maior taxa de microconídios (Figura 3).

Em todos os intervalos analisados, *F. guttiforme* apresentou uma baixa produção de microconídios nos meios de cultura SDA e 1% Sacarose quando comparados com SNA e BM+CMC. A partir da análise da produção de microconídios utilizando SNA e BM+CMC, observa-se que o meio de cultura SNA apresenta a maior produção, desenvolvendo 599×10^4 microconídios/ml no intervalo de 3 dias, e 1124×10^4 microconídios/ml, 1110×10^4 microconídios/ml e 955×10^4 microconídios/ml nos intervalos de 7, 10 e 14 dias, respectivamente. Todavia, utilizando o meio de cultura BM+CMC houve a produção de 563×10^4 microconídios/ml, 697×10^4 microconídios/ml, 858×10^4 microconídios/ml e 850×10^4 microconídios/ml nos períodos de 3, 7, 10 e 14 dias, respectivamente. Além disso, SDA é caracterizado por ser o meio de cultura com menor desenvolvimento de microconídios em todos os intervalos, sendo que no período de 14 dias houve a menor produção, 66×10^4 microconídios/ml (Figura 3).

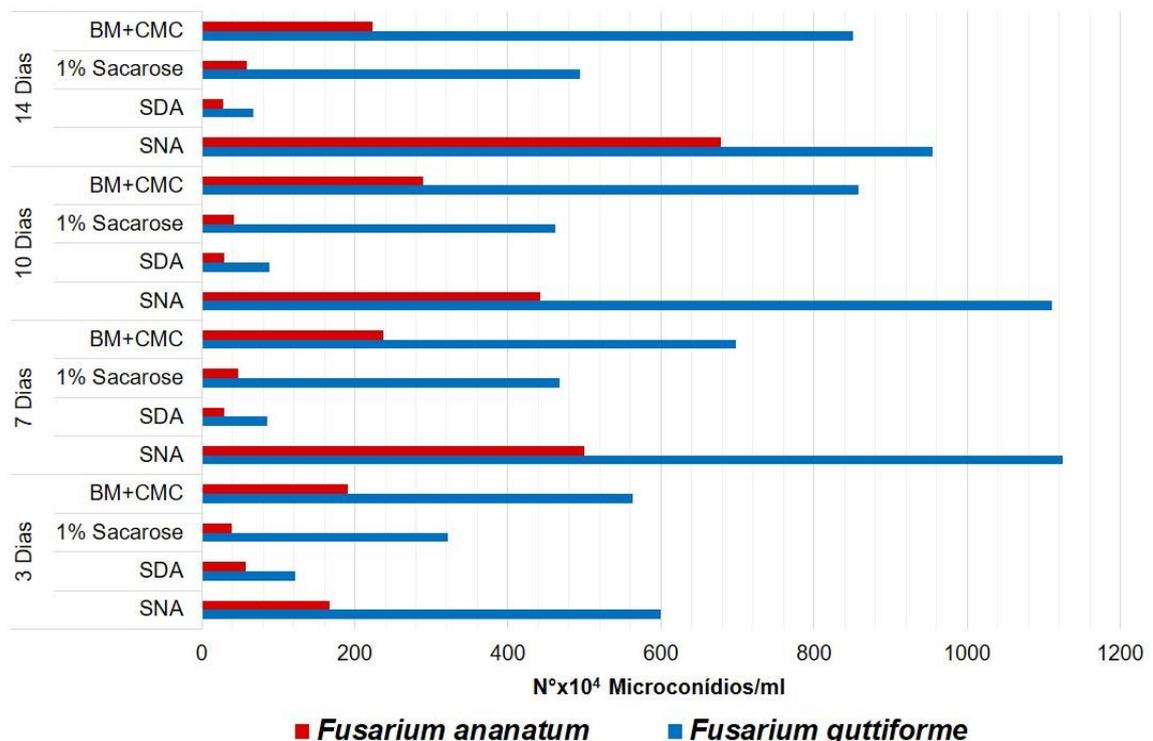


Figura 3 - Produção de microconídios de *Fusarium guttiforme* e *Fusarium ananatum* em diferentes meios de cultura (1% Sacarose; BM+CMC: Meio Basal + Carboximetilcelulose; SNA: Nutriente Sintético Ágar; SDA: Ágar Dextrose Sabouraud) o intervalo de 14 dias.

Neste contexto, também houve uma maior produção de microconídios em *F. ananatum* utilizando o meio de cultura SNA nos períodos de 7, 10 e 14 dias, sendo que somente no intervalo de 3 dias o meio BM+CMC foi o maior produtor. Além disso, houve uma baixa produção desta estrutura utilizando 1% Sacarose e SDA em todos os intervalos (Figura 3).

Nos intervalos de 3, 7, 10 e 14 dias é possível observar, respectivamente, uma produção de 167×10^4 microconídios/ml, 499×10^4 microconídios/ml, 442×10^4 microconídios/ml e 675×10^4 microconídios/ml utilizando o meio de cultura SNA, entretanto, na produção de microconídios utilizando o meio de cultura BM+CMC, foi observado 190×10^4 microconídios/ml, 236×10^4 microconídios/ml, 288×10^4 microconídios/ml e 222×10^4 microconídios/ml nos intervalos de 3, 7, 10 e 14 dias, respectivamente. Apesar de BM+CMC possuir uma maior produção de microconídios no período de 3 dias, o meio SNA ainda é o mais vantajoso devido a totalidade das análises. Adicionalmente, a menor produção de microconídios em *F. ananatum* foi observado no período de 7 dias utilizando o meio de cultura SDA, onde foi encontrado 26×10^4 microconídios/ml (Figura 3).

Além disso, é importante ressaltar que tanto a produção de macroconídios como a de microconídios em *F. ananatum* e *F. guttiforme* apresentaram grande relevância no intervalo de 7 dias de crescimento. Utilizando o meio de cultura BM+CMC foi possível observar a maior produção de macroconídios, tendo uma concentração média de 32×10^4 macroconídios/ml para *F. ananatum* e 18×10^4 macroconídios/ml para *F. guttiforme*. Na produção de microconídios, *F. guttiforme* apresentou a maior produção utilizando SNA, possuindo uma concentração média de 1124×10^4 microconídios/ml. Além disso, *F. ananatum* também apresentou uma grande produção da mesma estrutura, com uma concentração média de 499×10^4 /ml microconídios. Sendo assim, este intervalo pode ser caracterizado como um período ímpar para produção de inóculos ou outros tipos de estudos, relacionados à *F. ananatum* e *F. guttiforme*, que dependem de uma alta concentração dessas estruturas (Figura 2 e 3).

Portanto, conclui-se neste experimento que BM+CMC é o meio de cultura mais favorável para uma alta produção de macroconídios em ambas as espécies após 7 dias de crescimento (Figura 2). A obtenção de um meio de cultura eficiente que proporcione o desenvolvimento desta estrutura em *F. guttiforme* é inédita, sendo assim, possui um grande potencial para a geração de um produto biotecnológico,

possibilitando assim o desenvolvimento de uma formulação comercial patenteável para o mercado, no intuito de auxiliar em estudos de taxonomia e de patogenicidade desta espécie.

Além disso, o meio de cultura SNA é o mais favorável ao desenvolvimento de microconídios em ambas as espécies. Entretanto, para que ocorra a máxima produção de microconídios em *F. guttiforme* é necessário um prazo de 7 dias de crescimento e para *F. ananatum* 14 dias (Figura 3).

Mansour et al., (2012) avaliaram a produção de macroconídios em *Fusarium graminearum* em diferentes meios de cultura durante um período de 14 dias. Os resultados obtidos no nosso trabalho foram semelhantes uma vez que o meio de cultura BM+CMC também influenciou positivamente na produção de macroconídios *F. graminearum*.

A análise do comportamento *in vitro* da produção de macroconídios e microconídios em *F. guttiforme* e *F. ananatum* em diferentes meios de cultura é fundamental para o desenvolvimento de estudos relacionados a estas espécies. Além disso, estudos sobre o comportamento dessas duas espécies de modo geral, como também a respeito da produção de macroconídios e microconídios, são escassos. Portanto, tais pesquisas são de extrema valia, pois se tratam de estruturas importantes para vários estudos como os taxonômicos e o desenvolvimento de inóculos viáveis, que podem ser empregados em estudos de melhoramento genético do abacaxi.

Além disso, o desenvolvimento de um meio de cultura que favoreça o surgimento dessas estruturas é fundamental. Segundo Leslie e Summerell (2006), *F. guttiforme* apresenta uma baixa produção de macroconídios em laboratório, dificultando assim estudos relacionados a esta espécie. Portanto, uma vez que essas estruturas são desenvolvidas e se apresentam em grande quantidade é possível compará-las e, conseqüentemente, utilizá-las em metodologias para a identificação e diferenciação de *F. ananatum* e *F. guttiforme* como também em outras espécies do gênero. Logo, a análise comportamental *in vitro* em meios de cultura diferentes, como também a escolha de um meio de cultura específico que possa desenvolver macro- e microconídios em grande escala para ambas as espécies é fundamental para a elaboração de estudos variados.

É importante ressaltar que a condição nutricional do meio de cultura influencia diretamente na esporulação dos fungos, ou seja, no desenvolvimento de conídios. E

isso varia em cada espécie de acordo com o meio de cultura que a mesma é desenvolvida. No gênero *Fusarium* a produção de grande quantidade de macroconídios acontece, muitas vezes, quando o meio de cultura possui CMC (Carboximetilcelulose), uma vez que a esporulação é estimulada por compostos celulósicos. Portanto, o uso de CMC nos meios de cultura pode ser um diferencial no processo de esporulação (MANSOUR et al., 2012; OHARA et al., 2004).

Adicionalmente, a baixa produção de macroconídios em *F. guttiforme* utilizando o meio de cultura SNA pode ter ocorrido devido ao uso de KCl (Cloreto de Potássio) neste meio de cultura. Segundo Leslie e Summerell (2006), esta substância aumenta a produção de microconídios, porém pode resultar na completa ausência de macroconídios, podendo ser visto como um fator limitante no desenvolvimento de macroconídios nesta espécie.

Sendo assim, a produção de conídios não pode ser usada como uma característica taxonômica no gênero *Fusarium*, por ser inconsistente, levando a classificação errada das espécies. A esporulação dos fungos está diretamente relacionada ao meio de cultura em que o mesmo está inserido. O mesmo acontece com a cor da cultura, uma vez que a mesma difere de acordo com o meio de cultura utilizado, não podendo, assim, ser utilizada como uma característica taxonômica (LESLIE; SUMMERELL, 2006; KVAS et al., 2009).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DE *FUSARIUM ANANATUM* E *FUSARIUM GUTTIFORME* POR CITOMETRIA DE FLUXO

Utilizando a citometria de fluxo constatou-se que tanto *F. ananatum* quanto *F. guttiforme* apresentam microconídios uninucleados e macroconídios multinucleados. Utilizando o meio de cultura BM+CMC, a quantidade de eventos encontrados em *F. ananatum* foi separada em macroconídios e microconídios, e foi observada a presença de um pico de fluorescência de menor intensidade com maior quantidade de eventos referente aos microconídios e 3 picos de fluorescência com maior intensidade e menor número de eventos, relacionados aos macroconídios. Adicionalmente, em *F. guttiforme* também foi achado um padrão de fluorescência similar, porém com uma intensidade de fluorescência menor para os macroconídios (Figura 17).

Todavia, utilizando o meio de cultura 1% Sacarose, *F. ananatum* e *F. guttiforme* apresentaram um pico de fluorescência com uma grande quantidade de eventos, sendo que este pico é referente aos microconídios. Entretanto, somente *F. ananatum* apresentou outro pico de menor intensidade quando comparado com *F. guttiforme*, referente a uma pequena quantidade de macroconídios que foram produzidos neste meio de cultura (Figura 18). Tais resultados já foram observados neste trabalho, onde o meio 1% Sacarose não proporciona o desenvolvimento de macroconídios em *F. guttiforme*, entretanto, *F. ananatum* produz uma pequena quantidade desta estrutura quando comparado aos outros meios de culturas analisados.

Portanto, devido ao perfil de fluorescência encontrado em cada espécie sob o mesmo meio de cultura é possível diferenciar *F. ananatum* de *F. guttiforme*. Sendo assim, constata-se que a citometria de fluxo pode ser considerada uma nova ferramenta biotecnológica para a taxonomia de ambas as espécies.

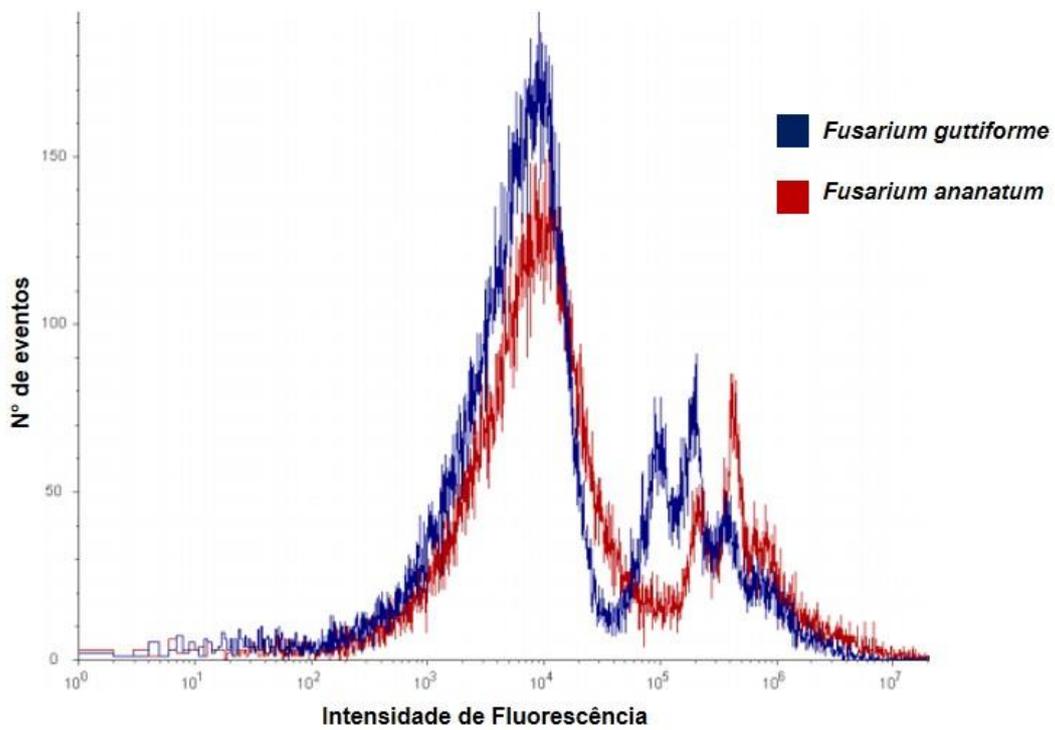


Figura 4 - Análise das populações de macroconídios e microconídios de *Fusarium ananatum* e *Fusarium guttiforme* em meio de cultura BM+CMC, utilizando a Citometria de Fluxo.

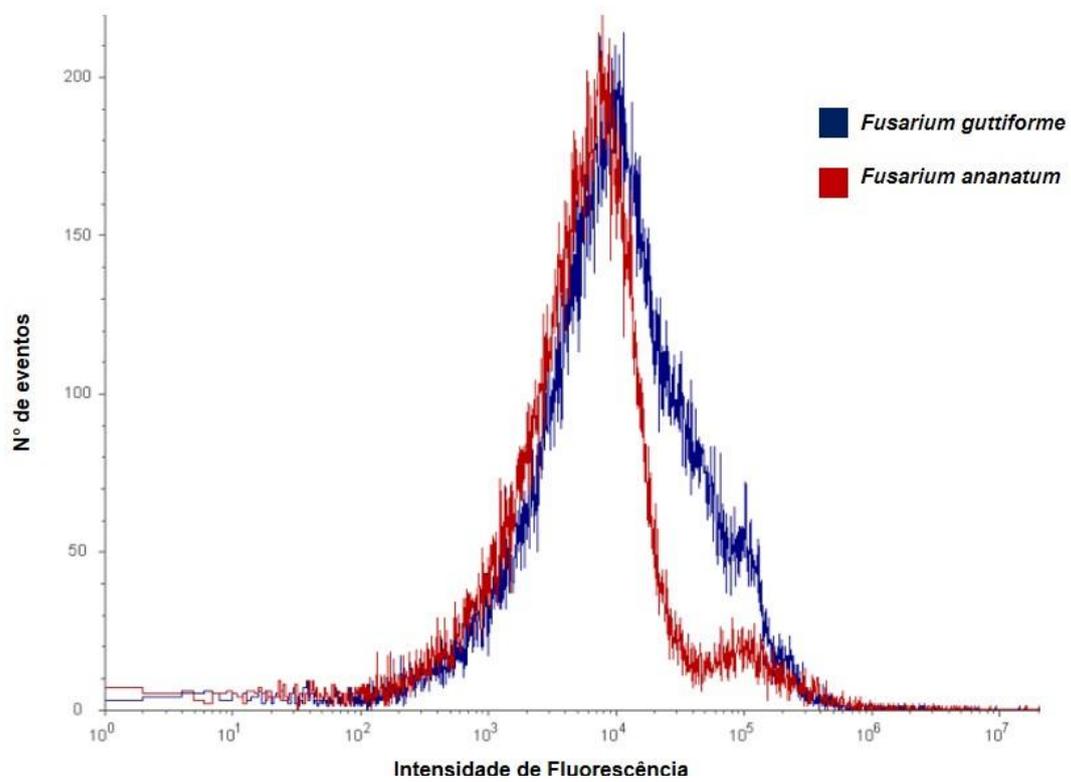


Figura 5 - Análise das populações de macroconídios e microconídios de *Fusarium ananatum* e *Fusarium guttiforme* em meio de cultura 1% Sacarose, utilizando a Citometria de Fluxo.

Uma vez que o corante usado neste trabalho cora ácido nucleico (PI - Iodeto de Propídio), a intensidade da fluorescência está diretamente relacionada ao conteúdo nuclear localizado na amostra, portanto, quanto maior a intensidade de fluorescência, maior a quantidade de núcleos encontrados.

A quantidade e distribuição de picos diferentes encontrados nos macroconídios de ambas as espécies pode estar relacionada à septação desta estrutura, possuindo assim um núcleo por septo e, conseqüentemente, quanto mais septos maior quantidade de núcleos seriam encontrados (Figura 17). Tal resultado é inédito e ainda não foi descrito na literatura para estas espécies. Estudos nessa área para o gênero *Fusarium* ainda são escassos, sendo necessária a ampliação desta área de conhecimento para se conhecer melhor as espécies presentes.

O fato de *F. guttiforme* apresentar uma intensidade de fluorescência menor em relação aos macroconídios quando comparado a *F. ananatum*, pode estar relacionado ao fato desta espécie possuir uma menor quantidade de núcleos e, conseqüentemente, um menor número de septação nesta estrutura (Figura 17). Segundos Leslie e Summerell (2006), o padrão de septação encontrado para as duas espécies utilizando técnicas de microscopia óptica é de 2-3 septos por macroconídios, o que também foi encontrado neste trabalho utilizando a Microscopia de Fluorescência. Entretanto, a citometria de fluxo é um equipamento que proporciona uma análise com maior quantidade de amostras como também a obtenção de resultados mais refinados, sendo assim, utilizando esta técnica pode-se chegar à conclusão que os macroconídios de *F. ananatum* apresentam uma maior quantidade de septação quando comparado a *F. guttiforme*. Entretanto, não é possível estabelecer a quantidade exata de septos encontrados, sendo necessários novos estudos para comprovar a quantidade exata de septos em cada espécie e, posteriormente, esta característica pode ser utilizada como um marcador para a espécie.

Outro fator importante que corrobora com os resultados apresentados neste experimento como também no experimento anterior (item 4.1) é a comparação de meios de cultura diferentes, como 1% Sacarose e BM+CMC. Utilizando 1% Sacarose, ocorre a formação de um único pico de fluorescência para *F. guttiforme*, referente aos microconídios uninucleados, sendo que este possui uma baixa intensidade de fluorescência e um alto número de eventos. Entretanto, para *F. ananatum* foi encontrado dois picos de fluorescência, onde um apresenta uma

grande quantidade de eventos e uma baixa fluorescência, referente aos microconídios, e outro pico menor com maior intensidade de fluorescência, o qual está de acordo com os macroconídios. O meio de cultura 1% Sacarose é caracterizado por ter uma baixa ou nula produção de macroconídios em *F. ananatum* e *F. guttiforme*, como já descrito neste trabalho. Entretanto quando BM+CMC é utilizado, ocorre outro padrão de picos devido à alta produção de macroconídios multinucleados nas duas espécies. Tais picos apresentam maior intensidade de fluorescência e menor quantidade de eventos (Figura 19 e 20).

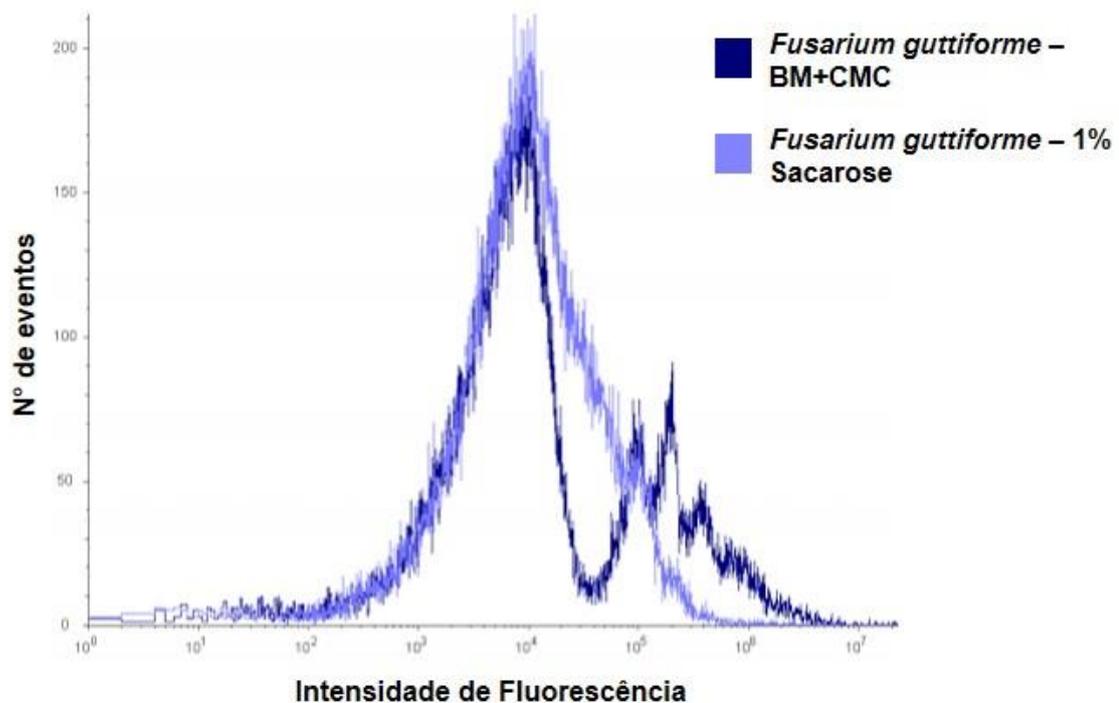


Figura 6 - Análise das populações de macroconídios e microconídios de *Fusarium guttiforme* em diferentes meios de cultura (1% Sacarose e BM+CMC), utilizando a Citometria de Fluxo.

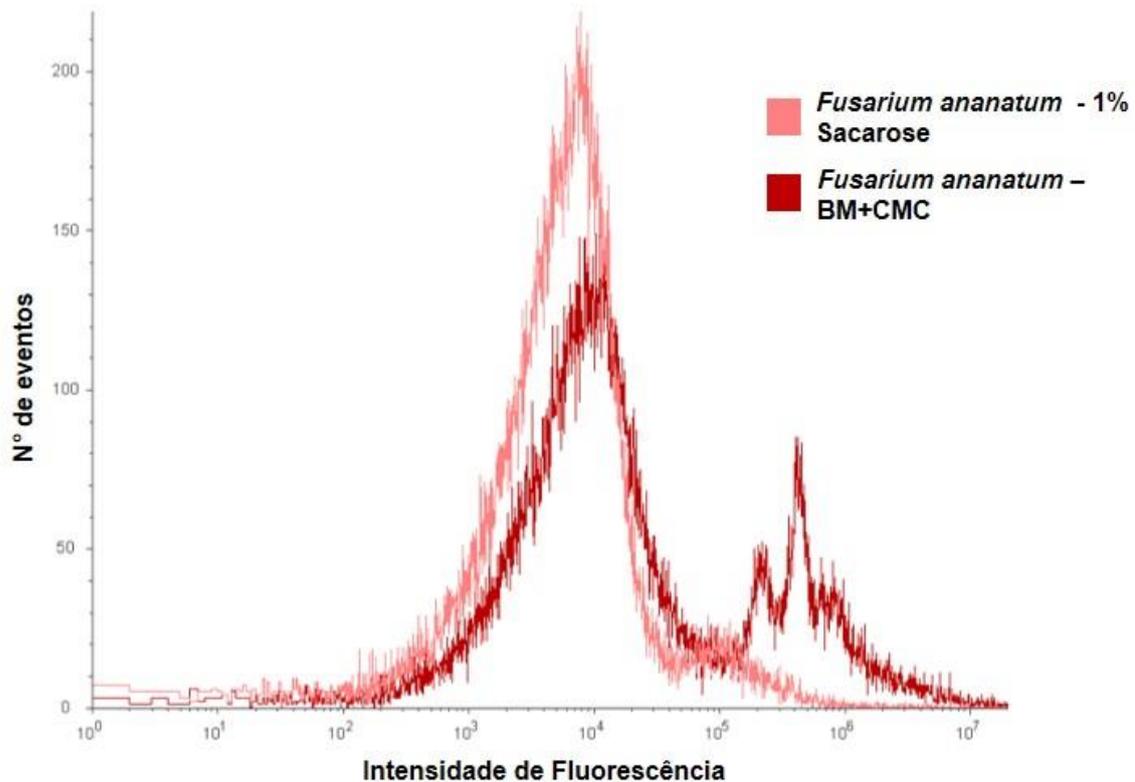


Figura 7 - Análise das populações de macroconídios e microconídios de *Fusarium ananatum* em diferentes meios de cultura (1% Sacarose e BM+CMC), utilizando a Citometria de Fluxo.

Em trabalhos desenvolvidos por Ruiz-Roldán et al. (2010) e Shahi et al. (2015), onde se estudou a dinâmica nuclear de *Fusarium oxysporum* durante a germinação e produção de conídios, também foi constatado que microconídios não septados são uninucleados e a quantidade de núcleos em estruturas septadas é diversificada, chegando até mesmo a 18 núcleos por septo em hifas. Além disso, também foi observado que o envelhecimento da cultura está estritamente relacionado à quantidade de núcleos nas estruturas, que em culturas mais novas o número de núcleos é menor quando comparado à cultura mais velha. Além disso, o meio de cultura para o crescimento do fungo também é essencial para o aparecimento de mais núcleos, uma vez que meios de cultura pobres em nutrientes, levam ao baixo desenvolvimento de hifas e conídios, e conseqüentemente, uma baixa quantidade de núcleos.

Em Seong et al. (2008), onde foram desenvolvidos estudos para compreender o processo de germinação dos conídios em *Fusarium graminearum*, também foi

observado que a distribuição dos núcleos em macro- e microconídios pode estar relacionado ao envelhecimento da cultura, levando a uma maior quantidade de núcleos em culturas mais velhas. Além disso, também foi encontrada a presença de um núcleo por septo em culturas novas, entretanto, em culturas mais velhas foi encontrada a presença de até dois núcleos por septo.

Estudos relacionados a condição nuclear de conídios são escassos no gênero *Fusarium*, embora este seja diretamente ligado a processos como germinação, produção de conídios e crescimento de hifas. Tais processos fazem parte do processo de infecção no hospedeiro, portanto, é extremamente importante o desenvolvimento de novos estudos nesta área (RUIZ-ROLDÁN et al., 2010; SHAHI et al., 2015).

4.3 CRESCIMENTO DE *FUSARIUM ANANATUM* E *FUSARIUM GUTTIFORME* EM DIFERENTES TEMPERATURAS

O resultados da análise de crescimento de *F. ananatum* e *F. guttiforme* sob influência de diferentes temperaturas no período de 5 dias está apresentado nas Figuras 4 e 5.

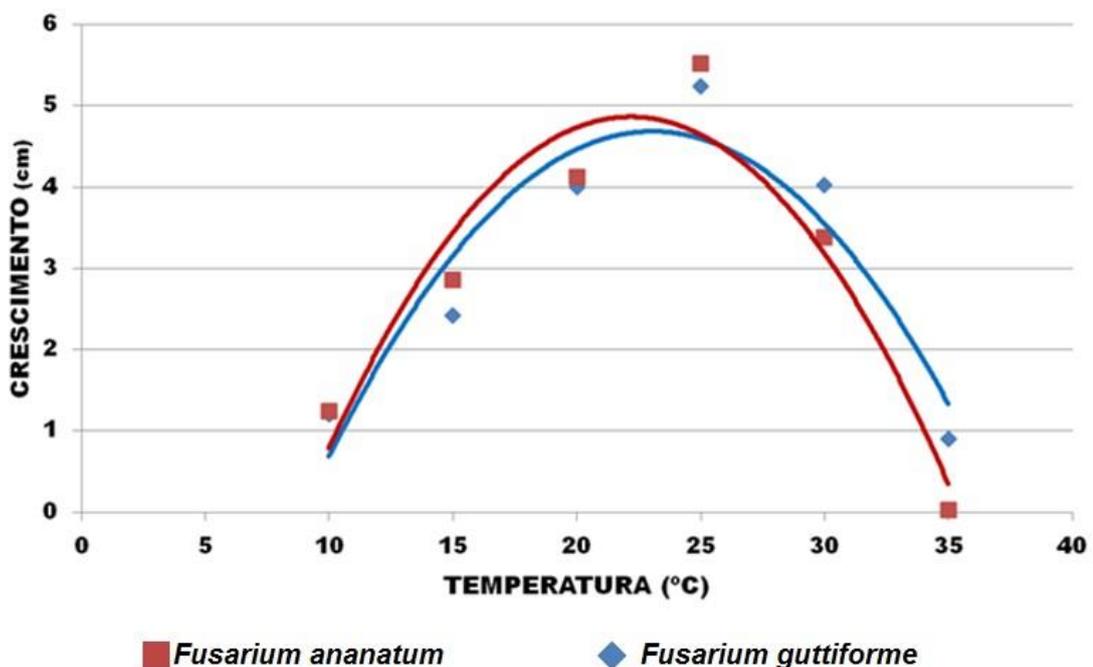


Figura 8 - Crescimento radial micelial (cm) de *Fusarium ananatum* e *Fusarium guttiforme* em diferentes temperaturas (°C) no meio de cultura BDA, ao final de 5 dias de incubação.

Houve um aumento no crescimento micelial de ambas as espécies até a temperatura de 25°C, e que após atingir esta temperatura ideal, as mesmas apresentaram um decréscimo na sua taxa de crescimento (Figura 4).

A espécie de *F. ananatum* apresentou um crescimento radial micelial similar quando comparado a *F. guttiforme* na temperatura de 10°C e 20°C. Sendo que, o crescimento radial micelial de *F. ananatum* e de *F. guttiforme* na temperatura de 10°C foi de 1,2 cm, e na temperatura de 20°C, ambas as espécies apresentaram um crescimento radial micelial de 4 cm (Figura 4).

Entretanto, na temperatura de 15°C e 25°C, *F. ananatum* obteve uma média de crescimento radial micelial maior quando comparado a *F. guttiforme*. Especificamente na temperatura de 15°C, *F. ananatum* apresentou um crescimento

radial micelial de 2,86 cm e *F. guttiforme* de 2,42 cm. E por sua vez, na temperatura de 25°C, *F. ananatum* obteve um crescimento radial médio de 5,51 cm, enquanto o de *F. guttiforme* foi de 5,23 cm. Entretanto, a partir da avaliação do crescimento radial micelial na temperatura de 30°C, *F. guttiforme* passou a apresentar uma média de crescimento maior quando comparado a *F. ananatum*, obtendo um valor médio de 4,02 cm, enquanto *F. ananatum* obteve 3,37 cm. Além disso, na temperatura de 35°C não houve desenvolvimento da cultura de *F. ananatum*, porém a cultura de *F. guttiforme* obteve um índice médio de crescimento radial micelial de 0,9 cm (Figura 4).

Portanto, *F. ananatum* apresenta melhor crescimento em temperaturas amenas, no entanto novos experimentos devem ser realizados com um maior número de isolados desta espécie. Segundo Jacobs et al. (2010), esta espécie foi descrita na África do Sul, um país de clima temperado, ou seja, com temperaturas mais baixas quando comparado aos trópicos. Portanto, é plausível que *F. ananatum* apresentasse tal comportamento em temperaturas mais baixas. Além disso, a ausência de crescimento do fungo a 35°C reforça esta característica.

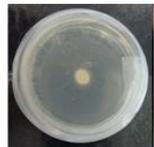
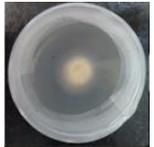
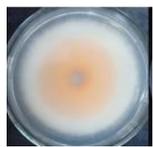
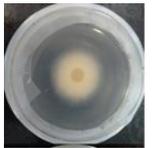
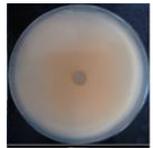
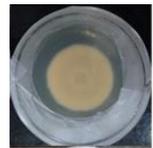
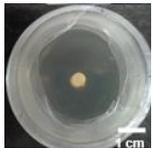
<i>F. guttiforme</i>						
<i>F. ananatum</i>						
Temp. (°C)	10	15	20	25	30	35

Figura 9 - Representação do crescimento radial micelial de *Fusarium guttiforme* e *Fusarium ananatum* em diferentes temperaturas.

Por sua vez, *F. guttiforme* teve um crescimento médio maior em temperatura mais quentes, 30°C, quando comparado com *F. ananatum*. Este fungo é encontrado somente na América do Sul, principalmente no Brasil, o qual é um país que possui um clima mais quente, sendo amplamente caracterizado como clima tropical e subtropical (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

Portanto, a partir da análise geral da influência da temperatura no desenvolvimento de *F. guttiforme* e *F. ananatum*, foi possível constatar que a temperatura ótima para o desenvolvimento de ambos os fungos é de 25°C, sendo esta utilizada como padrão para o crescimento de ambas as culturas. Segundo Andrade et al. (2010) a temperatura é um dos fatores que mais influenciam no crescimento micelial dos fungos.

Em um trabalho desenvolvido por Costa et al. (2009) e Garcia (2013), onde foi analisado o comportamento *in vitro* de *F. guttiforme* em diferentes temperaturas, também foi encontrado que a temperatura de 25°C é a ideal para o desenvolvimento deste fungo, corroborando assim com este trabalho.

Além disso, também é importante observar que tanto *F. ananatum* como *F. guttiforme* apresentaram um padrão similar de coloração do micélio utilizando o meio de cultura BDA (Figura 5). A cor da cultura já foi descrita como um indicador de espécie, entretanto, esta característica pode mudar de acordo com a composição do meio de cultura que é utilizado. Portanto, a utilização deste método para a caracterização de espécies deste gênero é inconsistente, levando a uma identificação incorreta.

4.4 ANÁLISES MICROSCÓPICAS

4.4.1 Microscopia de Fluorescência

A partir da análise morfológica de 200 macroconídios e 200 microconídios de *F. ananatum* e *F. guttiforme* utilizando a Microscopia de Fluorescência, foi possível observar as principais características taxonômicas utilizadas para a diferenciação e identificação de ambas as espécies.

A utilização do corante *Calcofluor White Stain* (SIGMA-ALDRICH) foi fundamental para uma melhor visualização da morfologia, forma e septação dos macro e microconídios, uma vez que ele cora a quitina, encontrada na parede celular de fungos, possibilitando que os macro- e microconídios estivessem com um maior destaque, nitidez e contraste. Portanto, foram feitas imagens de macro- e microconídios de *F. ananatum* e *F. guttiforme*, obtendo um padrão de características esperadas para cada uma e, conseqüentemente, este padrão foi utilizado para sua caracterização e diferenciação (Figuras 8 e 9).

A partir da avaliação das imagens de *F. ananatum* constatou-se que esta espécie apresentou uma maior quantidade de microconídios com 1 septo, quando comparado a *F. guttiforme*, podendo ser uma recomendação para as chaves taxonômicas de ambas as espécies. Foram encontrados 157 microconídios (78,5%) com 1 septo para *F. ananatum*, enquanto *F. guttiforme*, apresentou 17 microconídios com 1 septo (8,5%) (Figura 6). Entretanto, estas estruturas apresentaram o mesmo formato obovoide (Figura 8C e Figura 9C). Segundo Leslie e Summerell (2006) e Jacobs et al. (2010), ambas as espécies possuem microconídios no formato obovoide, que podem ter 1 septo ou não, o que foi confirmado com os resultados encontrados neste trabalho.

Em relação aos macroconídios, foi observado que tanto *F. ananatum* quanto *F. guttiforme* apresentaram similaridades, apresentando 2-3 septos e uma forma reta a ligeiramente curvada, como descrevem Nirenberg e O'Donnell (1998) e Jacobs et al. (2010) (Figura 8D e Figura 9D). Dentre os 200 macroconídios analisados em ambas as espécies, *F. ananatum* apresentou 56,5% de macroconídios com 3 septos e 43,5% com 2 septos, e *F. guttiforme* exibiu 53,5% de macroconídios com 3 septos e 46,5% com 2 septos (Figura 7).

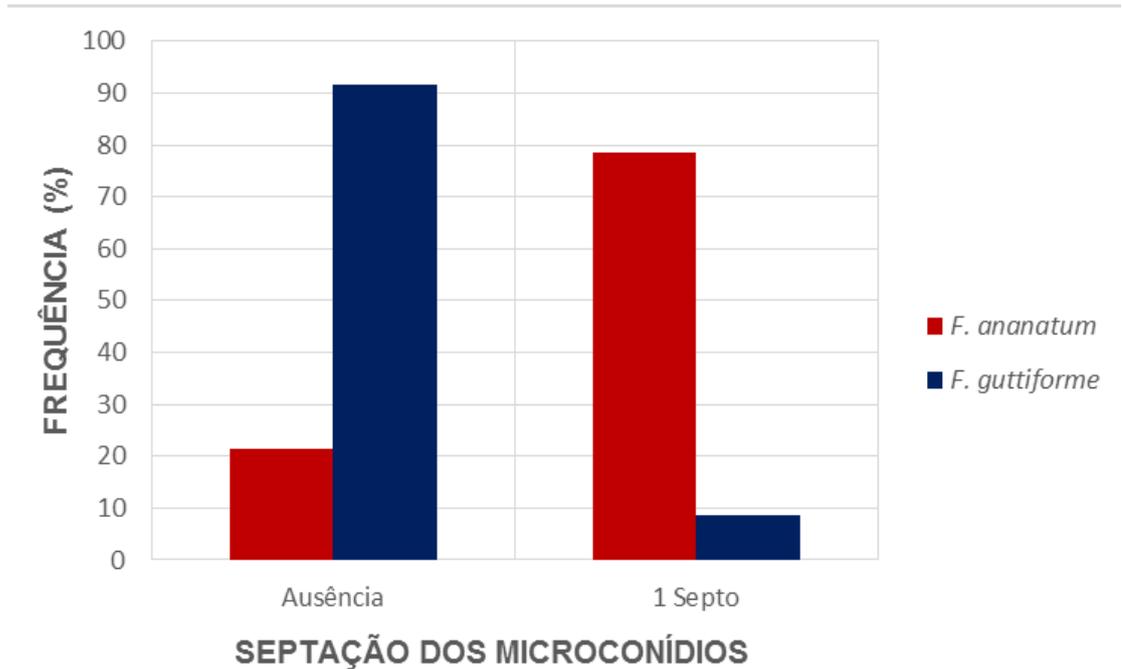


Figura 10 - Distribuição da septação em microconídios de *F. ananatum* e *F. guttiforme* em meio de cultura BM+CMC.

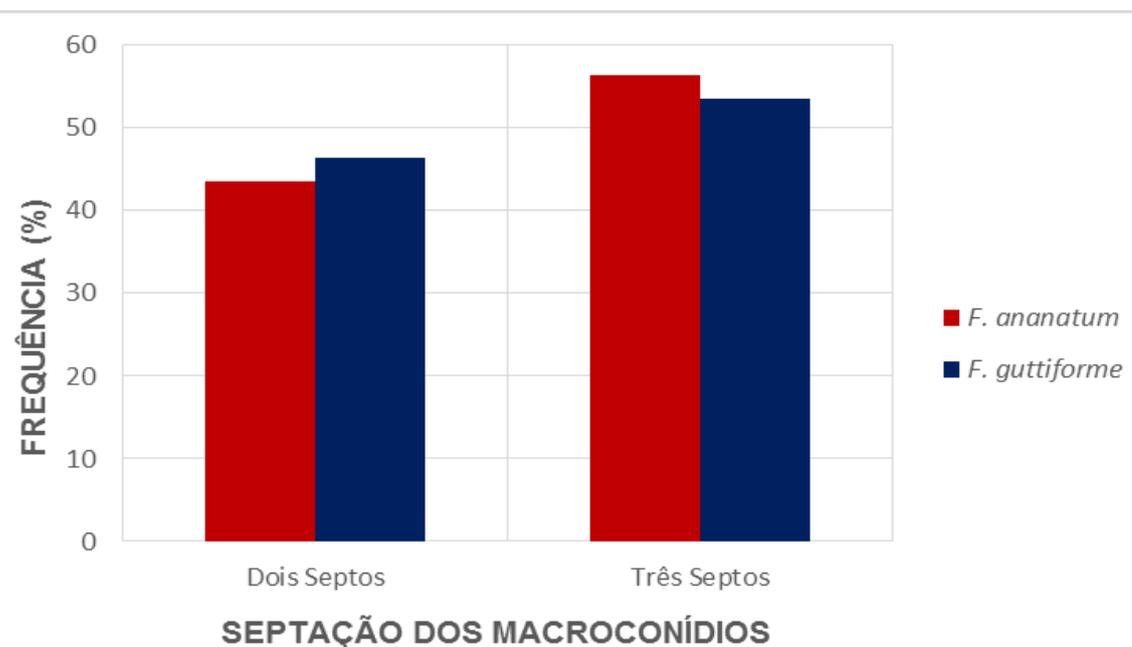


Figura 11 - Distribuição da septação em macroconídios de *F. ananatum* e *F. guttiforme* em meio de cultura BM+CMC.

Em Soares (2011), também foi observado o mesmo padrão de características em *F. guttiforme*, apresentando, assim, microconídios obovoides com 1 septo ou não, e macroconídios retos a ligeiramente curvados com 2-3 septos.

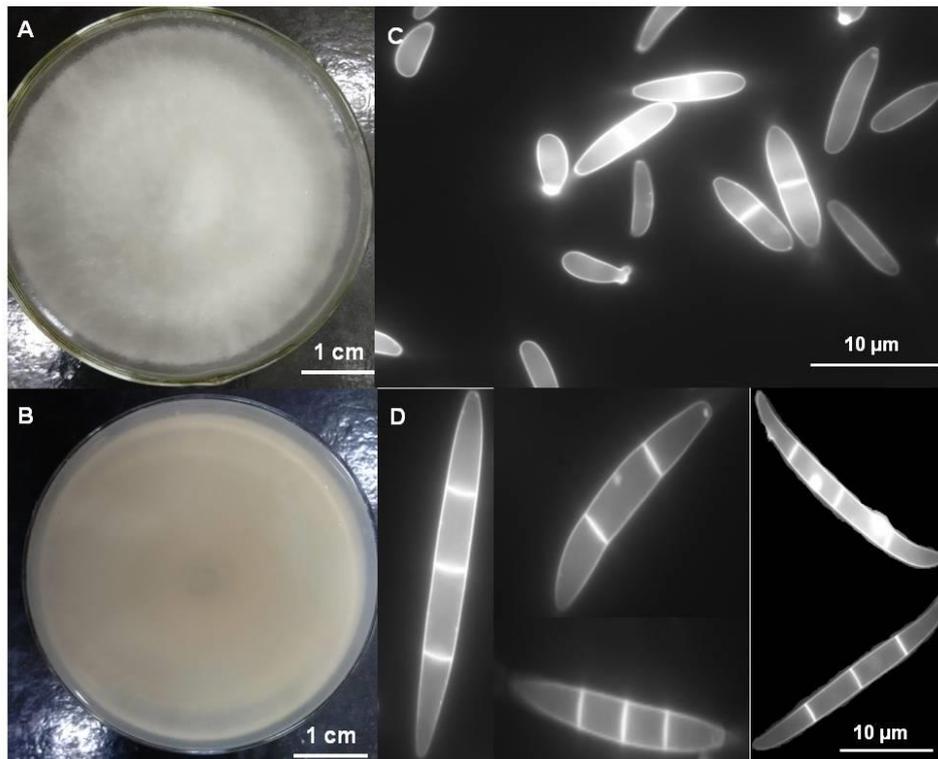


Figura 12 - Características morfológicas de *Fusarium ananatum*, patógeno do abacaxizeiro. A-B: Cultura de *Fusarium ananatum* em BDA após 5 dias de crescimento, parte superior e do verso da cultura, respectivamente. C: Microconídios de *Fusarium ananatum* na objetiva de 100x, utilizando Calcofluor. D: Macroconídios de *Fusarium ananatum* na objetiva de 100x utilizando Calcofluor.

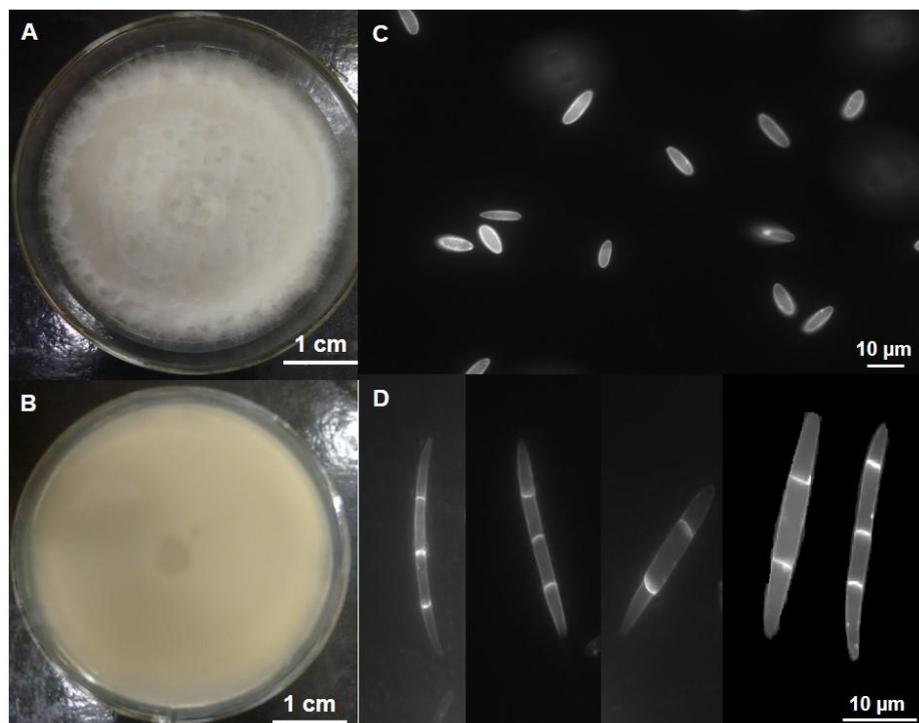


Figura 13 - Características morfológicas de *Fusarium guttiforme*, patógeno do abacaxizeiro. A-B: Cultura de *Fusarium guttiforme* em BDA após 5 dias de crescimento, parte superior e do verso da cultura, respectivamente. C: Microconídios de *Fusarium guttiforme* na objetiva de 100x, utilizando Calcofluor. D: Macroconídios de *Fusarium guttiforme* na objetiva de 100x utilizando Calcofluor.

O uso dessa ferramenta juntamente com corantes foi eficaz, pois possibilitou uma melhor visualização das estruturas utilizadas para a taxonomia das espécies estudadas. Entretanto, devido à falta de variação nas estruturas observadas de *F. ananatum* e *F. guttiforme* avaliadas, não foi possível realizar a distinção morfológica dessas duas espécies utilizando a microscopia de fluorescência.

O'Donnell et al. (2008), ao avaliarem marcadores morfológicos de espécies de *Fusarium* associadas ao milho, não conseguiram distinguir *Fusarium aethiopicum* de outras três espécies do complexo *F. graminearum* (*F. graminearum*, *F. vorosii* e *F. asiaticum*). Em espécies do gênero *Fusarium* não existem caracteres morfológicos suficientes para distinção da maioria das espécies. Portanto, é importante o desenvolvimento de novas metodologias para a caracterização e diferenciação de espécies deste gênero.

As observações morfométricas de 200 microconídios e 200 macroconídios de *F. ananatum* e *F. guttiforme* analisados, estão representados nas Figuras 10 e 11, respectivamente (Apêndice B).

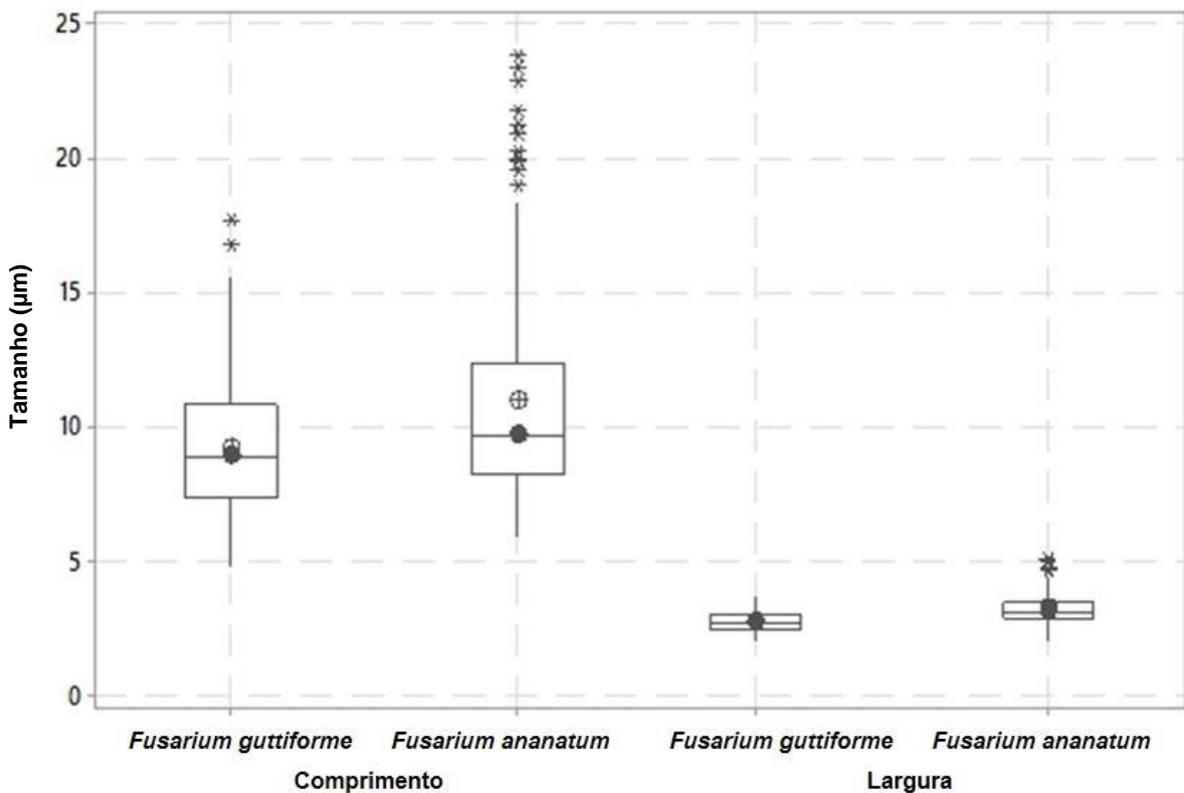


Figura 14 - Variação em comprimento e largura de microconídios em *Fusarium ananatum* e *Fusarium guttiforme*. ●: representa os valores da mediana. *: representa os Outliers. ⊕: representa a média de cada estrutura.

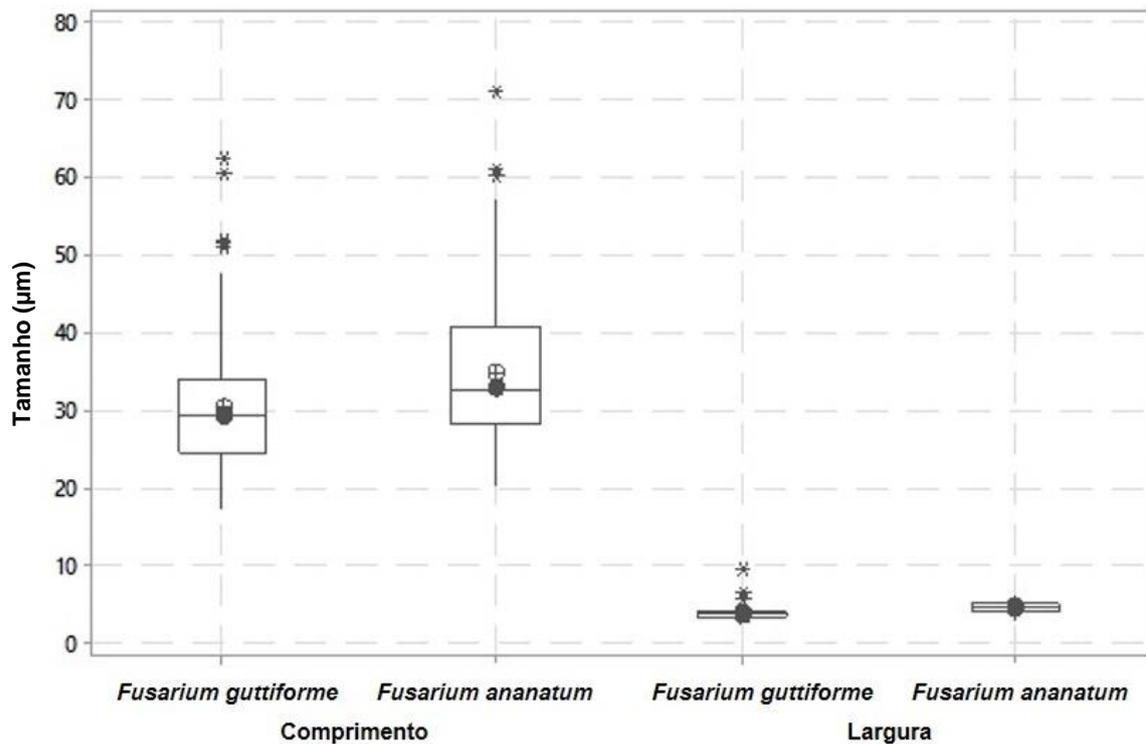


Figura 15 - Variação em comprimento e largura de macroconídios em *Fusarium ananatum* e *Fusarium guttiforme*. ●: representa os valores da mediana. *: representa os Outliers. ⊕: representa a média de cada estrutura.

Os microconídios de *F. ananatum* apresentaram um tamanho maior em relação ao comprimento e largura, quando comparado a *Fusarium guttiforme*. Na espécie de *F. ananatum*, os microconídios possuem uma média de comprimento e largura de 11,04 µm e 3,26 µm, respectivamente. Já *F. guttiforme*, apresenta uma média de comprimento de 9,27 µm e uma média de largura de 2,81 µm (Figura 10).

Além disso, os microconídios de *F. ananatum* apresentam um valor mediano de 9,74 µm em relação ao comprimento, e 3,19 µm em relação à largura. A partir desses dados é possível observar que estas estruturas possuem uma amplitude superior de 8,74 µm e uma amplitude inferior de 3,74 µm. Portanto, os microconídios desta espécie atingiram um valor máximo de comprimento de 18,47 µm e mínimo de 6 µm de comprimento. Em relação à largura destas estruturas nesta espécie foi constatado que a mesma apresenta um valor máximo de largura de 4,44 µm e mínimo de 2,08 µm, a partir de uma amplitude superior e inferior de 1,25 µm e 1,11 µm, respectivamente (Figura 10).

Os microconídios de *F. guttiforme* possuem um valor mediano de 8,97 µm e 2,78 µm em relação ao comprimento e largura, respectivamente. A análise da

largura destas estruturas demonstrou uma amplitude superior de 0,99 μm e inferior de 0,73 μm , obtendo então o valor máximo de largura de 3,77 μm e mínimo de 2,05 μm . Em relação ao comprimento, os mesmos apresentaram uma amplitude superior e inferior de, respectivamente, 6,67 μm e 4,12 μm . Portanto, os valores máximos e mínimos encontrados a respeito do comprimento de microconídios de *F. guttiforme* foram de 15,64 μm e 4,85 μm , respectivamente (Figura 10).

Nas observações dos macroconídios de ambas as espécies, observa-se que os macroconídios de *F. guttiforme* apresentam de forma geral uma média de tamanho menor quando comparado a *F. ananatum*. Os macroconídios de *F. ananatum* apresentam uma média 34,97 μm de comprimento e 4,68 μm de largura, enquanto *F. guttiforme* apresenta uma média de 30,42 μm de comprimento e 3,92 μm de largura (Figura 11).

Os macroconídios de *F. ananatum* apresentaram valores medianos de 32,93 μm de comprimento e 4,70 μm de largura. Portanto, os mesmos possuem valores máximos e mínimos de comprimento de 57,27 μm e 20,36 μm , respectivamente, referente a uma amplitude superior de 24,34 μm e inferior de 12,57 μm . A largura apresenta amplitudes inferiores e superiores de 1,55 μm e máximos de 1,75 μm , acarretando a valor máximo de 6,45 μm e mínimo de 3,15 μm (Figura 11).

Entretanto os macroconídios de *F. guttiforme* apresentam valores medianos de 29,35 μm de comprimento e 3,8 μm de largura. Sendo assim, os mesmos possuem amplitude superior e inferior de 18,59 μm e 11,97 μm , respectivamente, em relação ao comprimento, e de 1,63 μm e 1,26 μm em relação a largura, respectivamente. Conseqüentemente, o valor máximo de comprimento de macroconídios em *F. guttiforme* é de 47,94 μm e mínimo de 17,38 μm , e valor máximo de largura é de 5,43 μm e mínimo de 2,54 μm (Figura 11).

A partir das análises estatísticas dos microconídios de ambas as espécies, foi observada a formação de alguns *outliers*, ou seja, a existência de alguns valores discrepantes quando comparados com os padrões de respostas obtidos ou pontos fora dos limites encontrados. Foram observados *outliers* em relação ao comprimento dos microconídios de *F. guttiforme* e *F. ananatum*, como também na largura dos microconídios de *F. ananatum*. Todavia, na análise estatística de macroconídios de ambas as espécies, somente para a largura de macroconídios de *F. ananatum* não foram encontrados *outliers*.

O tamanho de conídios é uma das características que é avaliado na taxonomia de fungos. Esta metodologia é aplicada em diversos estudos e pode ser essencial na diferenciação de espécies semelhantes (LESLIE; SUMMERELL, 2006; WEIR et al., 2012). Neste contexto, a avaliação do tamanho dos macroconídios e microconídios de *F. ananatum* e *F. guttiforme* pode ser estabelecida como uma forma de distinguir as duas espécies, uma vez que comparado com o valor encontrado como padrão para *F. guttiforme*, *F. ananatum* apresentou macro- 14% maiores e microconídios 19% maiores. Sendo assim, este resultado pode ser uma recomendação para as chaves taxonômicas de *F. ananatum* e *F. guttiforme*, entretanto, mais isolados devem ser comparados para confirmar esta característica.

4.4.2 Microscopia de Força Atômica

Na busca de algum marcador morfológico que possibilite a diferenciação de *F. ananatum* de *F. guttiforme*, foram realizadas imagens da parede celular dos conídios de ambas as espécies. A partir das análises desenvolvidas na microscopia de força atômica, foi possível obter imagens topográficas, revelando diferenças morfológicas e estruturais na superfície da amostra, e *Phase images*, determinando informações sobre a superfície, como diferenças na composição química. Nas Figuras 12 e 13 observa-se imagens bidimensionais e tridimensionais representativas de conídios de *F. ananatum* e *F. guttiforme*, respectivamente.

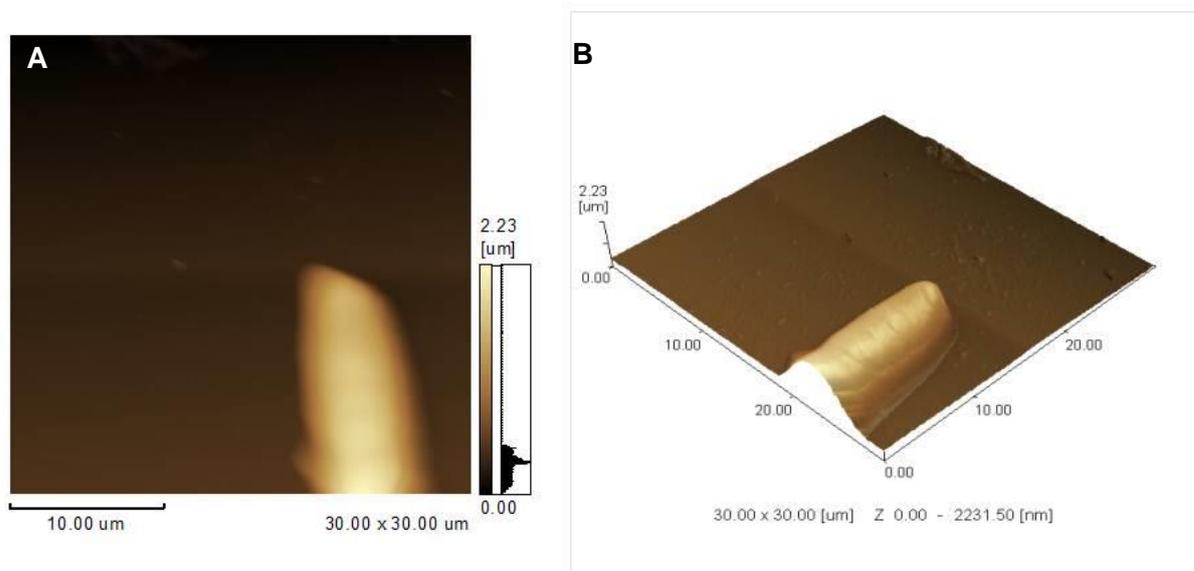


Figura 16 - Imagem bidimensional (A) e tridimensional (B) de conídios de *Fusarium ananatum*.

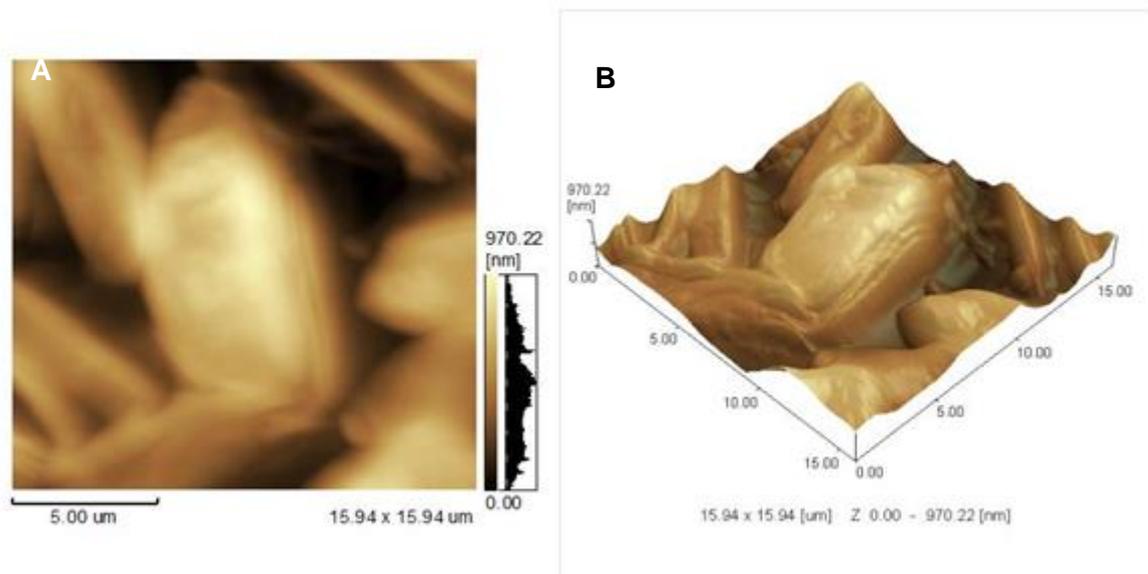


Figura 17 - Imagem bidimensional (A) e tridimensional (B) de conídios de *Fusarium guttiforme*.

As imagens topográficas bidimensionais e tridimensionais possibilitam observar com alta resolução a conformação dessas estruturas, possuindo assim um grande potencial para a diferenciação das duas espécies. Nesta análise foram encontradas a formação de protuberâncias em 42,85% dos conídios analisados de *F. guttiforme* (Figura 14A e 16), corroborando com os resultados encontrados em Aquije (2010), e ausência desta estrutura em *F. anatum* (Figura 15A e 16).

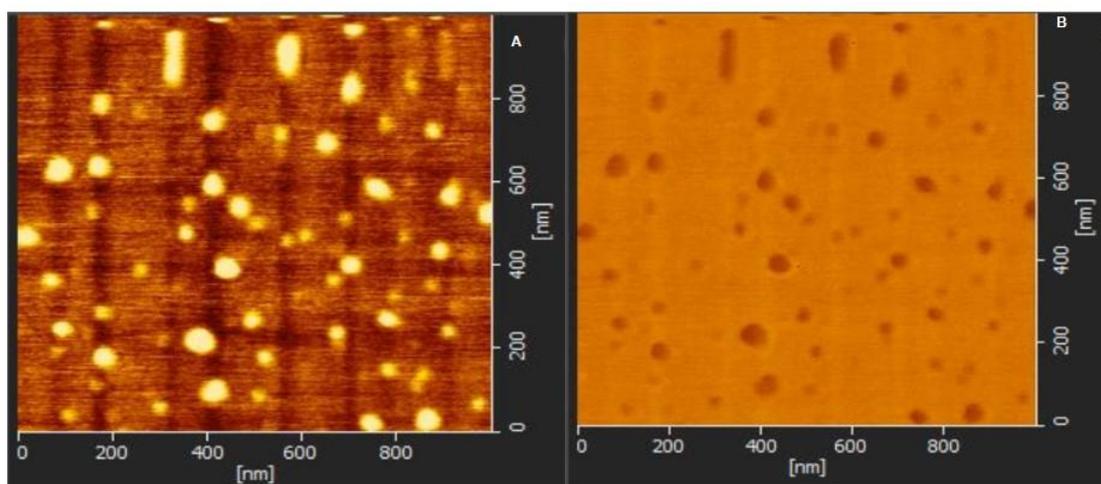


Figura 18 - Imagens da parede celular de um conídio de *Fusarium guttiforme*. A: Imagem bidimensional. B: Imagem do Modo Phase.

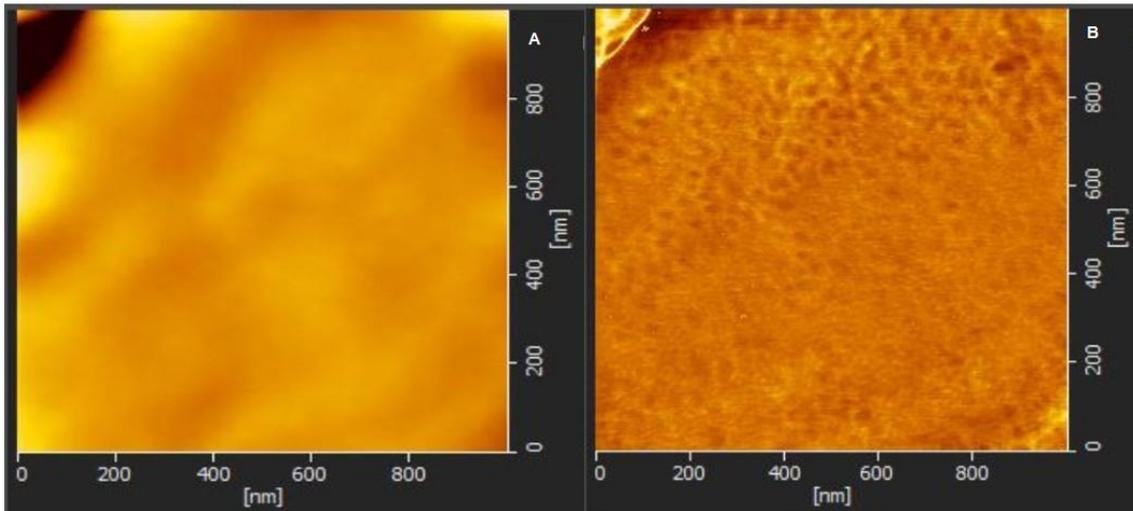
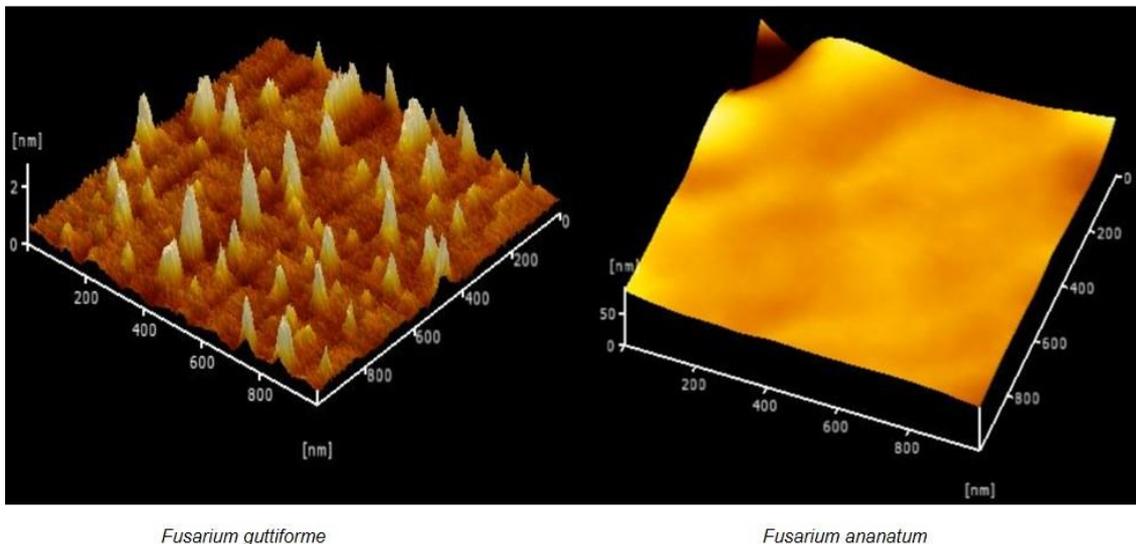


Figura 19 - Imagens da parede celular de um conídio de *Fusarium ananatum*. A: Imagem bidimensional. B: Imagem do Modo *Phase*.



Fusarium guttiforme

Fusarium ananatum

Figura 20 - Comparação de imagens tridimensionais das paredes celulares de conídios de *F. guttiforme* e *F. ananatum*, obtidas por microscopia de força atômica.

Esta estrutura encontrada na parede celular de conídios de *F. guttiforme* ainda não foi descrita na literatura, no entanto, pode ser classificada como um marcador morfológico para a espécie quando comparado a *F. ananatum*. Este fato é de grande importância para a taxonomia deste fungo, pois irá auxiliar diretamente na sua identificação e classificação, uma vez que a quantidade de marcadores morfológicos é escassa.

É necessário o desenvolvimento de novas ferramentas que possibilitem a identificação e diferenciação taxonômica fidedigna de ambas às espécies. A utilização da microscopia de força atômica em estudos taxonômicos ainda é recente e poucos trabalhos são encontrados na literatura. Entretanto, o uso dessa

ferramenta com intuito biotecnológico, mostrou ser promissora, uma vez que foi possível encontrar estruturas em nano escala na parede celular de *F. guttiforme*, podendo, então, ser utilizada na taxonomia desta espécie e futuramente no gênero para diferenciar as espécies dos diferentes complexos. A descoberta de novos marcadores morfológicos em *F. guttiforme*, abre novas perspectivas na taxonomia de patógenos contribuindo para o estabelecimento de estratégias de manejo das doenças e facilitando os serviços fitossanitários do Brasil e de outros países produtores de abacaxi no mundo.

Segundo Gustafsson et al. (2003), substâncias hidrofóbicas e hidrofílicas apresentam diferentes tonalidades nas imagens do modo *Phase Images*. Geralmente substâncias que são caracterizadas por serem hidrofílicas apresentam uma tonalidade escura, devido a uma menor força de adesão entre a ponta do MFA e a amostra, e substâncias hidrofóbicas uma tonalidade mais clara, pois apresentam uma maior força de adesão (HUANG et al., 2012). De acordo com as *Phase imagens* obtidas de *F. guttiforme* (Figura 15B), é observado que as protuberâncias formadas em sua parede celular apresentam uma tonalidade mais escura quando comparado ao restante da amostra, e, portanto, pode ser caracterizada por ser uma estrutura hidrofílica. Já em *F. ananatum* (Figura 16B) tais protuberâncias não são encontradas.

Dentre as principais substâncias constituintes na parede celular de fungos, os carboidratos são classificados como hidrofílicos e podem ser encontrados na forma de quitina e outros. Portanto, supõe-se que tais protuberâncias encontradas em *F. guttiforme* podem ser aglomerados de carboidratos, os quais não foram localizados em *F. ananatum*. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para identificar qual substância seria essa.

5 CONCLUSÕES

Constatou-se que as espécies de *F. ananatum* e *F. guttiforme* apresentaram características diferentes *in situ* quando crescidos em meios de cultura diferentes. O meio de cultura BM+CMC é o mais indicado para a produção de macroconídios nas duas espécies, e para a produção de microconídios o meio de cultura SNA foi o mais eficiente. Os meios de cultura selecionados apresentam potencial para a patente de um produto biotecnológico com aplicação no mercado da microbiologia.

O uso da microscopia de fluorescência para a caracterização e diferenciação de *F. ananatum* e *F. guttiforme*, mostrou-se efetiva e de grande auxílio em trabalhos taxonômicos. Comparando os tamanhos de macro- e microconídios de *F. ananatum* e *F. guttiforme*, constatou-se que *F. ananatum* possui macro- e microconídios maiores, além disso, também foi observado que *F. ananatum* produz uma maior quantidade de microconídios septados quando comparada com *F. guttiforme*. Tais fatos podem ser utilizados como uma recomendação para as chaves taxonômicas de ambas as espécies

Na otimização de um protocolo de análise de conídios por microscopia de força atômica, foi possível encontrar novos marcadores morfológicos (protuberâncias), localizados na parede celular dos conídios e que, possivelmente, podem ser utilizados para a taxonomia da espécie de *F. guttiforme*.

A citometria de fluxo evidenciou diferenças na distribuição de núcleos em microconídios e macroconídios das espécies de *F. guttiforme* e *F. ananatum*, podendo vir a ser uma ferramenta biotecnológica essencial para a caracterização e taxonomia das duas espécies.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. C. M; CHAVARI, J. L; MINHONI, M. T. A; ZIED, D.C. Crescimento micelial in vitro de cinco linhagens de *Agaricus bisporus* submetidas a diferentes condições de temperatura. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá. v. 32. p. 69-72. 2010.
- AQUIJE, G. M. F. Cell wall alterations in the leaves of fusariosis-resistant and susceptible pineapple cultivars. **Plant Cell Rep**. v. 29 p. 1109–1117. 2010.
- BURGESS, L.W.; SUMMERELL, B.A.; BULLOCK, S.; GOTT, K.P.; BACKHOUSE, D. **Laboratory Manual for *Fusarium* Research**, Sydney, University of Sydney. 1994.
- COSTA, N.F.P.; FERREIRA, I.C.P.V.; AQUINO, C.F.; ARAÚJO, A.V.; SALES, N.L. P. Crescimento micelial de *Fusarium subglutinans* f sp. *ananas* em diferentes temperaturas. Instituto de Ciências agrárias/UFMG, Montes Claros/MG. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 42. Pelotas, RS. **Resumos**. Pelotas, RS.2009.
- DUFRENE, Y. Life at the Nanoscale: Atomic Force Microscopy of Live Cells. **Contemporary Physics**. Singapore. v. 53. p. 1-45. 2012.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.**FAOSTAT**: agricultural statistic database. Rome: World Agricultural Information Centre, 2016. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em 16 de maio de 2016.
- GARCIA, W. M. **Comportamento in vitro, métodos de inoculação e fontes de resistência à *Fusarium guttiforme* em abacaxizeiro**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade do Estado de Mato Grosso, 2013.
- GUSTAFSSON, J. et al., Surface characteristics of thermomechanical pulps; the influence of defibration temperature and refining. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**. v. 225. p. 95-104. 2003.
- HUANG, C.X. et al. AFM surface analysis of fungal modified CTMP fibers. **Cellulose chemistry and technology**. v. 46. p.605-610. 2012.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Dados de safra de abacaxi no Brasil 2014**. On-line. Disponível em: www.sidra.ibge.gov.br. Acesso em 04 de maio de 2016.
- JACOBS, A. et al. *Fusarium ananatum* sp. nov. in the *Gibberella fujikuroi* species complex from pineapples with fruit rot in South Africa. **Fungal Biology**, Oxford, v. 114, n. 7, p. 515-527. 2010.
- KALININ, S.; GRUVERMAN, A. Scanning Probe Microscopy: Electrical and Electromechanical Phenomena at the Nanoscale. **Springer Science, Business**, New York, 2007.

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. 2009.

LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; SUMMERELL, B. A. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, n. 3, p. 107-117, 2001.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Ames: Blackwell Publishing, 2006.

LI, W. Microscopic Methods for Analytical Studies of Fungi. In: GUPTA V.K., TUOHY M.G., AYYACHAMY M., TURNER K.M. AND O'DONOVAN A. (eds). **Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology**. Springer, p. 151–160. 2013.

MANSOUR, M.A. et al. Rapid macroconidia production in *Fusarium graminearum* 3- and 15-acetyl deoxyniva lenol (ADON) chemotypes using sucrose-water medium. **Ann Microbiol.** v.62. p.965–971. 2012.

NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F.O. ***Fusarium* species an illustrated manual for identification**. University Park: The Pennsylvania State University Press. 1983.

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

O'DONNELL, K. et al. 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**. v. 52. p. 20–31. 2013.

O'DONNELL, K. et al. Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 45, n. 11. p. 1514-1522, Nov. 2008.

OHARA T, INOUE L, NAMIKI F, KUNOH H, TSUGE T. REN1 is required for development of microconidia and macroconidia, but not of chlamydospores, in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. **Genetics**. v.166. p. 113–124. 2004.

OLIVEIRA, C. M. G.; INOMOTO, M. M.; BESSI, R.; TOMAZINI, M. D.; BLOK, V. C. Técnicas moleculares e taxonomia clássica na diagnose de nematoides parasitos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 19. p. 3-23. 2011.

PERON, F. N. **Diagnóstico Molecular e Imunoenzimático de Pineapple Mealybug Wilt-Associated Vírus (PMWaV) em Diferentes Genótipos de Abacaxizeiro**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória. 2009.

REINHARDT, D. H. A planta e o seu ciclo. In: REINHARDT, D. H.; SOUZA, L. F. S.; CABRAL, J. R. S. **Abacaxi**. Produção: aspectos técnicos. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura — Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. p. 77. 2000.

- RUIZ-ROLDAN, M.C. et al. Nuclear Dynamics during germination, conidiation, and hyphal fusion of *Fusarium oxysporum*. **Eukaryotic Cell**. Vol. 9, No. 8. p. 1216–1224. 2010.
- SEONG, et al. Conidial germination in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*. **Fungal Genetics and Biology**. v. 45 p. 389–399. 2008.
- SILVA F. A. S., AZEVEDO C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **Afr. J. Agric. Res.** v. 11(39), p. 3733-3740. 2016.
- SHAHI, S. et al. Dynamics of the establishment of multinucleate compartments in *Fusarium oxysporum*. **Eukaryotic Cell**. v. 14 n. 1. p. 78 – 85. 2015.
- VENTURA, J.A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados. I- História, meios e procedimentos de cultivo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas** v.7: 271 - 298. 1999.
- VENTURA, J.A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados. Parte II: Chaves para identificação. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Porto Alegre-RS, v. 8, p. 303-338, 2000.
- VENTURA, J. A.; COSTA, H. Controle Cultural. In: OLIVEIRA, S. M. A. de; TERAÓ, D.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. de H. (Org.). **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, p. 145-169. 2006.
- VENTURA, J. A.; ZAMBOLIM, L. Controle das doenças do abacaxizeiro. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. do; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: fruteiras**. Viçosa, MG: UFV. v. 1, p. 445-510. 2002.
- VENTURA, J. A.; ZAMBOLIM, L.; GILBERTSON, R. L. Proposição de nova *forma specialis* em *Fusarium subglutinans* no abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n.3, p. 280, 1993.
- VOGT, J.; STAHL, F.; SCHEPER, T.; MÜLLER, S. Isolation of Intact RNA from Sorted *S. cerevisiae* Cells for Differential Gene Expression Analysis. In: GUPTA V.K., TUOHY M.G., AYYACHAMY M., TURNER K.M. AND O'DONOVAN A. (eds). **Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology**. Springer, pp. 151–160. 2013.
- WEIR B.S., JOHNSON, P.R., DAMM U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**. v.73. p.115–180. 2012.
- WEST, P. **Introduction to Atomic Force Microscopy: Theory, Practice, Applications**. p. 159. 2006.

APÊNDICES

Apêndice A: Produção de macroconídios e microconídios de *F. guttiforme* e *F. ananatum* em diferentes meios de cultura (SNA: Nutriente Sintético Ágar; SDA: Ágar *Dextrose Sabourad*; BM+CMC: Meio Basal + Carboximetilcelulose; Sacarose (1%)) durante 14 dias.

Período de incubação (dias)	Meios de Cultura	Macroconídios (N°x10 ⁴ /ml)		Microconídios (N°x10 ⁴ /ml)	
		<i>Fusarium ananatum</i>	<i>Fusarium guttiforme</i>	<i>Fusarium ananatum</i>	<i>Fusarium guttiforme</i>
3	SNA	7 bA ¹	1 Bb	167 ^{N.S.}	599 ^{N.S.}
	SDA	8 Ba	2 bB	57	121
	BM+CMC	28 aA	7 aB	190	563
	1% Sacarose	1 cA	0 bA	39	321
7	SNA	12 ^{N.S.}	1 ^{N.S.}	499Ab	1124 aA
	SDA	4	4	26 bA	85 cA
	BM+CMC	32	18	236 abB	697 bA
	1% Sacarose	1	1	47 bB	468 bA
10	SNA	9 ^{N.S.}	2 ^{N.S.}	442 aB	1110 aA
	SDA	4	3	28 bA	88 cA
	BM+CMC	27	16	288 abB	858 aA
	1% Sacarose	1	1	41 bB	461 bA
14	SNA	15 bA	2 bB	675 aB	955 aA
	SDA	3 cA	1 bA	27 bA	66 cA
	BM+CMC	30 aA	18 aB	222 bB	850 aA
	1% Sacarose	1 cA	0 bA	58 bB	493 bA

¹Médias de quatro repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna ou maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05) para cada período de incubação.

^{N.S.}Diferença não significativa entre os meios de cultura no período de incubação.

Apêndice B: Comprimento e largura de 200 macroconídios e 200 microconídios de *F. ananatum* e *F. guttiforme*.

Nº	<i>Fusarium guttiforme</i>				<i>Fusarium ananatum</i>			
	Microconídios (µm)		Macroconídios (µm)		Microconídios (µm)		Macroconídios (µm)	
	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura
1	8,97	2,87	31,12	3,33	19,59	5,04	23,33	5,58
2	10,52	2,85	29,44	3,73	11,75	4,42	30,10	4,69
3	12,28	3,08	19,19	3,98	14,22	4,00	29,45	4,88
4	9,06	2,56	26,13	3,75	14,31	3,66	26,17	3,43
5	8,11	2,87	26,88	3,84	19,98	3,61	24,62	3,35
6	8,09	2,72	30,68	4,82	14,02	3,09	23,07	3,22
7	7,56	2,10	35,30	3,51	17,86	3,13	25,17	4,02
8	8,98	2,73	25,84	3,81	14,60	3,86	21,13	3,15
9	7,25	2,40	22,86	3,76	19,93	3,64	43,88	3,73
10	9,31	3,40	26,02	4,13	8,36	3,53	21,24	5,98
11	11,07	3,23	23,20	3,81	14,47	3,35	40,47	4,05
12	14,15	3,75	26,72	4,32	13,71	4,06	30,70	3,84
13	7,21	2,71	37,06	3,61	20,24	3,87	39,15	3,86
14	10,30	3,48	19,70	3,37	17,65	3,54	41,17	4,21
15	6,86	2,96	39,76	3,43	15,62	2,58	52,12	3,93
16	10,82	3,34	24,53	4,27	18,47	3,60	27,61	4,92
17	8,68	3,30	30,06	4,85	17,56	3,57	35,75	3,83
18	9,37	3,13	22,55	4,00	12,47	3,29	35,97	3,69
19	17,69	3,53	28,82	4,72	20,02	2,72	49,53	3,72
20	11,99	2,62	40,78	3,45	17,90	3,40	28,44	4,05
21	6,13	2,77	21,96	3,88	12,31	3,72	27,53	4,70
22	9,80	2,86	42,47	3,87	15,57	2,96	39,48	5,15
23	7,60	2,35	24,20	3,82	16,14	3,25	32,80	3,86
24	10,18	3,48	24,76	3,64	14,55	3,06	32,21	4,75
25	12,38	3,60	28,18	3,58	21,82	3,47	41,33	3,43
26	9,02	2,53	25,36	4,63	14,53	3,71	31,87	4,10
27	7,61	2,91	19,87	4,05	21,31	2,84	24,00	5,17
28	8,35	2,36	20,41	3,34	17,23	3,01	49,74	3,83
29	7,12	2,78	19,95	3,43	12,23	2,87	41,84	4,74
30	10,46	2,79	39,50	3,16	13,10	3,50	39,56	3,91
31	5,84	2,78	40,49	4,38	17,06	3,33	33,30	5,22
32	8,82	2,82	26,84	4,31	14,21	4,09	43,55	4,43
33	5,55	2,33	19,09	3,22	9,62	2,96	41,37	3,85
34	9,62	3,49	30,54	4,70	7,48	3,48	41,16	3,64
35	6,52	2,88	31,87	4,25	18,32	4,03	42,21	4,50
36	6,08	2,58	26,69	4,81	12,24	3,73	49,60	4,83
37	12,21	3,56	35,04	3,49	23,83	3,86	44,86	4,41
38	14,39	3,09	21,18	3,29	23,39	3,59	60,12	4,50
39	7,69	2,60	21,78	4,61	8,04	2,83	29,88	4,74
40	7,02	2,43	43,24	4,09	13,70	3,68	27,76	4,57
41	4,87	2,95	26,37	5,06	14,40	3,21	24,82	3,67
42	8,53	3,31	60,39	3,99	15,61	4,12	32,76	4,88
43	8,90	2,71	33,79	2,99	17,41	3,82	46,78	4,98
44	7,56	2,31	30,64	2,73	13,47	3,62	35,08	4,31

45	6,85	2,28	29,30	2,97	20,91	4,39	23,45	5,11
46	6,97	2,33	28,49	3,27	15,61	2,81	54,43	4,06
47	6,43	2,27	31,28	3,52	11,68	3,87	26,61	4,89
48	11,04	2,89	34,08	2,99	10,67	2,98	25,54	3,94
49	8,92	2,61	32,45	3,49	14,23	4,65	35,15	3,76
50	7,85	2,10	28,50	3,83	15,02	3,41	26,50	5,28
51	6,13	2,55	21,70	3,92	13,48	3,05	43,03	3,90
52	9,23	2,38	50,92	3,72	11,31	3,42	36,08	5,35
53	7,61	2,71	28,37	4,15	10,90	2,52	36,78	4,70
54	7,64	2,89	31,48	4,26	10,08	3,37	26,72	4,76
55	10,01	2,40	29,68	4,17	22,88	3,44	35,05	4,79
56	6,66	2,52	24,61	4,79	18,96	3,46	25,29	4,43
57	8,31	2,55	29,16	3,47	15,02	2,71	45,43	4,64
58	7,67	2,32	47,54	3,47	11,07	2,61	43,23	4,69
59	8,11	2,65	33,62	2,86	19,55	4,73	43,44	4,73
60	6,56	2,62	30,59	4,22	9,01	3,65	28,58	6,07
61	13,09	2,67	41,72	3,08	8,07	3,56	27,40	5,21
62	10,58	2,54	30,19	3,06	10,77	3,52	27,07	4,92
63	10,55	2,56	32,30	5,26	10,65	3,29	27,27	5,62
64	9,57	2,36	32,12	4,32	10,64	3,82	24,78	4,72
65	5,49	2,08	46,41	5,09	9,92	3,53	32,27	5,17
66	11,34	2,88	26,30	4,95	9,62	3,38	29,73	5,16
67	9,10	2,36	51,48	3,51	8,67	3,12	30,30	5,19
68	6,50	2,44	22,37	3,66	11,37	2,92	57,27	4,21
69	14,22	3,06	21,06	4,04	10,32	2,87	56,60	3,73
70	5,97	2,70	22,41	3,74	8,36	2,76	45,71	4,29
71	9,42	2,87	22,97	3,61	8,13	3,83	32,13	5,18
72	7,92	2,93	20,80	4,10	14,09	4,14	27,21	4,92
73	12,34	2,43	45,39	4,24	9,41	3,26	35,84	4,56
74	8,81	3,09	27,71	4,57	9,35	3,28	40,03	6,19
75	16,78	3,17	26,69	3,80	8,68	2,85	33,06	5,49
76	9,32	2,50	42,37	5,25	6,70	3,12	32,34	4,89
77	8,78	2,36	25,09	3,92	8,36	3,95	40,22	4,53
78	7,36	2,19	33,93	4,09	7,89	3,06	32,02	4,98
79	5,09	2,46	25,65	3,46	7,56	3,13	30,29	5,92
80	10,53	2,28	25,49	4,51	10,23	2,70	36,37	4,09
81	6,87	2,39	20,86	4,44	11,93	3,37	27,19	5,22
82	9,95	2,73	27,93	3,72	10,88	3,15	24,15	5,23
83	10,85	2,75	30,67	4,19	9,56	2,67	41,19	5,04
84	8,61	2,76	42,86	3,10	8,62	3,23	60,94	3,71
85	15,49	3,19	35,41	3,09	8,06	2,67	28,23	5,32
86	7,56	2,41	21,44	3,77	11,54	3,37	35,18	4,18
87	5,10	2,66	32,19	3,50	12,23	2,99	32,11	5,32
88	9,38	2,93	17,45	3,54	7,78	2,60	29,74	5,34
89	10,33	3,10	30,22	3,72	9,79	2,94	37,75	4,19
90	10,33	2,29	31,97	3,62	8,11	2,83	30,71	4,64
91	15,33	2,98	25,82	3,84	12,23	2,62	27,44	3,54
92	8,97	3,34	39,17	3,93	11,11	3,54	37,93	3,91
93	11,57	2,65	25,80	3,62	7,70	3,14	30,29	4,91
94	6,72	2,76	29,71	3,80	9,57	2,59	22,11	5,64
95	14,05	3,57	30,23	4,10	9,22	2,53	26,39	5,05
96	10,04	3,06	32,02	3,67	10,72	2,74	34,95	4,63

97	11,47	2,97	32,45	3,57	11,05	3,09	29,22	4,85
98	11,94	3,39	47,94	5,21	8,22	2,80	36,58	4,80
99	11,41	3,77	35,48	2,82	6,02	2,95	20,36	4,96
100	11,59	3,45	30,53	3,22	8,44	2,08	37,99	6,20
101	9,08	2,95	29,13	3,55	10,29	3,13	21,81	4,49
102	12,34	2,99	42,63	3,18	7,47	2,26	27,20	4,90
103	8,83	2,36	20,07	3,45	10,98	3,23	31,83	6,26
104	9,00	2,67	29,36	2,62	9,56	2,95	39,28	6,37
105	13,66	3,60	26,49	3,66	8,54	2,61	29,67	5,83
106	6,85	2,97	22,76	4,13	8,20	2,98	44,78	4,60
107	8,94	2,21	34,29	3,37	11,18	2,41	30,00	4,92
108	9,94	2,89	24,66	3,00	11,68	3,44	29,90	5,40
109	7,46	3,13	33,86	3,97	8,78	2,72	27,06	5,22
110	7,49	3,10	26,52	3,46	7,99	2,62	35,21	4,69
111	7,75	2,92	20,21	4,24	6,63	2,88	29,88	3,41
112	11,17	2,38	29,91	3,60	8,41	2,71	35,89	3,64
113	10,96	3,20	26,21	4,88	11,08	3,43	34,43	5,39
114	11,53	2,78	36,72	3,04	9,53	3,29	44,67	4,38
115	6,62	2,96	37,39	4,53	9,17	3,76	32,06	5,65
116	8,05	2,57	39,72	4,55	15,54	4,96	27,16	5,65
117	6,22	3,26	24,54	4,72	11,43	3,81	29,00	6,11
118	8,44	2,96	25,95	3,63	10,30	4,27	44,50	5,29
119	15,45	2,94	33,78	3,16	9,78	3,26	39,87	4,65
120	10,42	2,98	23,44	3,57	14,06	4,36	24,34	5,01
121	5,54	2,54	62,56	3,37	9,33	3,69	35,64	4,29
122	6,16	2,39	29,86	4,22	10,62	4,23	34,34	5,64
123	4,89	2,76	28,57	3,63	10,18	4,44	21,00	4,84
124	11,12	2,23	31,08	4,62	8,49	4,13	29,10	4,75
125	6,32	2,58	32,08	4,27	10,29	3,87	47,40	3,79
126	7,82	2,27	40,51	3,11	6,75	3,19	31,92	4,88
127	10,18	2,78	25,35	4,94	6,78	3,30	34,82	5,78
128	5,91	2,10	41,41	4,09	7,87	3,26	47,61	4,80
129	10,33	2,82	28,13	4,71	9,40	3,33	56,09	4,36
130	9,12	2,94	29,35	3,90	7,95	3,24	25,02	4,89
131	6,81	2,86	47,01	5,27	7,98	3,50	37,83	3,58
132	8,14	2,97	27,98	3,92	8,78	2,67	35,53	6,45
133	12,03	3,33	36,52	5,43	9,53	3,39	38,66	3,79
134	8,56	3,56	21,87	3,79	10,04	3,79	26,23	5,42
135	9,48	2,82	32,12	5,59	9,26	3,50	39,20	5,48
136	5,68	2,87	24,21	3,82	7,70	3,43	23,68	4,21
137	10,33	3,51	25,36	3,45	9,92	3,20	25,65	4,63
138	9,72	2,63	31,94	4,39	7,69	2,82	27,71	4,80
139	7,49	2,29	34,05	3,18	10,24	3,57	39,02	3,63
140	9,10	2,76	24,92	2,85	7,89	3,46	47,07	3,77
141	11,19	2,89	22,45	3,66	9,11	3,86	37,42	4,39
142	6,37	2,31	23,77	4,26	9,26	3,56	38,42	4,85
143	9,03	3,01	36,24	4,70	9,42	3,17	37,96	5,60
144	9,72	3,22	24,77	3,72	12,01	3,88	38,59	4,60
145	5,89	2,80	29,43	4,19	6,96	3,19	27,89	5,35
146	11,91	2,35	37,17	3,63	8,47	3,07	29,20	4,07
147	6,87	2,88	35,81	5,19	8,21	3,13	33,19	3,68
148	10,68	2,54	30,65	3,25	6,76	3,00	41,41	4,02

149	9,53	2,46	25,45	3,32	7,98	3,12	40,57	3,66
150	8,18	3,23	18,37	3,01	10,73	4,16	31,04	4,79
151	7,82	2,95	40,31	3,24	8,13	3,48	30,33	4,66
152	14,30	3,25	28,57	4,35	9,58	3,34	46,06	5,35
153	10,84	2,95	28,56	3,32	7,76	3,27	31,86	5,07
154	11,44	3,09	39,58	3,40	7,93	3,53	29,43	4,69
155	8,75	2,92	32,01	3,91	10,21	3,18	21,03	5,64
156	8,41	3,29	28,52	3,90	7,81	3,10	29,25	4,82
157	11,67	2,51	22,95	3,99	11,98	3,12	29,27	5,07
158	7,41	2,05	28,40	3,69	6,06	2,86	47,70	3,70
159	4,85	2,41	22,23	3,48	8,05	3,08	41,26	4,24
160	8,23	2,72	43,34	3,32	6,00	2,89	26,64	5,44
161	9,66	3,59	29,24	3,93	8,07	3,07	50,06	4,15
162	7,44	2,60	33,15	2,54	12,13	2,90	71,18	5,61
163	15,42	3,42	44,51	4,59	8,96	3,00	22,19	4,96
164	5,14	2,67	20,41	4,64	8,78	2,91	30,89	4,37
165	8,92	2,73	38,51	3,3	6,13	2,51	29,64	4,38
166	10,69	3,74	24,92	4,74	7,16	2,79	44,66	4,15
167	6,97	2,69	27,58	4,36	8,47	3,08	28,62	3,86
168	12,89	2,97	19,58	4,24	7,84	2,60	49,65	4,26
169	5,91	2,33	36,71	3,11	8,17	2,62	40,96	4,25
170	5,74	2,93	32,56	9,69	9,70	2,79	46,14	4,18
171	9,26	2,47	32,42	3,79	10,04	2,60	25,53	3,37
172	7,02	2,20	22,54	3,05	8,63	2,73	33,34	4,51
173	8,15	2,06	36,36	3,43	12,76	3,23	25,35	4,63
174	12,78	3,25	30,54	3,66	12,22	3,34	48,76	4,02
175	8,65	2,19	51,97	3,42	8,89	2,80	42,45	4,85
176	6,33	3,26	30,19	3,84	9,13	2,90	31,38	5,20
177	10,11	2,43	24,62	4,07	9,20	3,06	41,70	4,40
178	13,51	2,99	22,27	6,63	6,06	2,86	49,23	4,57
179	8,81	2,28	17,38	3,61	8,05	3,08	28,70	4,67
180	5,82	2,54	22,19	3,63	6,00	2,89	32,36	4,79
181	6,46	2,74	22,32	4,47	8,07	3,07	42,60	3,87
182	11,31	2,44	23,89	4,53	12,13	2,90	35,54	5,98
183	8,37	2,45	28,51	4,55	8,96	3,00	38,90	3,72
184	14,82	3,64	34,25	3,73	8,78	2,91	40,87	4,71
185	11,46	3,01	25,90	4,21	6,13	2,51	32,41	5,63
186	15,64	3,64	39,65	3,50	7,16	2,79	29,80	5,82
187	10,93	3,20	24,78	3,69	8,47	3,08	27,05	4,99
188	5,84	2,90	31,47	4,43	9,70	2,95	32,60	4,63
189	8,50	3,00	24,54	3,53	9,92	3,23	34,53	5,03
190	11,71	2,50	23,36	4,56	8,50	2,72	38,68	3,71
191	12,20	2,91	34,83	4,64	9,26	3,06	27,48	5,06
192	6,58	2,43	41,41	3,62	9,18	2,76	43,48	4,16
193	12,15	3,02	25,73	4,58	6,78	2,80	30,89	5,53
194	14,27	3,19	37,20	3,64	12,78	3,20	34,81	4,12
195	9,06	2,49	30,41	3,86	9,68	3,29	34,21	5,25
196	10,12	3,08	34,83	3,97	9,30	2,67	55,50	3,76
197	11,48	3,21	30,15	3,31	8,85	3,22	31,21	4,91
198	9,29	3,18	20,12	3,83	7,57	3,04	31,03	4,92
199	8,31	3,14	44,76	2,99	10,41	3,37	34,34	6,45
200	12,04	2,67	30,59	3,35	8,18	2,72	30,29	5,83

