



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

ANA CARLA DA SILVA SANTOS

**MORFOLOGIA, FILOGENIA MOLECULAR E CICLO SEXUAL DE ISOLADOS
ENTOMOPATOGÊNICOS DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *FUSARIUM*
*INCARNATUM-EQUISETI***

Recife
2019

ANA CARLA DA SILVA SANTOS

**MORFOLOGIA, FILOGENIA MOLECULAR E CICLO SEXUAL DE ISOLADOS
ENTOMOPATOGÊNICOS DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *FUSARIUM*
*INCARNATUM-EQUISETI***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do título de doutor em Biologia de Fungos.

Área de concentração: Micologia Aplicada.

Orientadora: Prof.^a Dra. Neiva Tinti de Oliveira

Co-orientadores: Prof.^a Dra. Patricia Vieira Tiago

Dr. Antonio Félix da Costa

Recife

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Santos, Ana Carla da Silva

Morfologia, filogenia molecular e ciclo sexual de isolados entomopatogênicos do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* / Ana Carla da Silva Santos- 2019.

68 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Neiva Tinti de Oliveira

Coorientadores: Patricia Vieira Tiago e Antonio Félix da Costa

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos. Recife, 2019.

Inclui referências

1. Fusarium 2. Compatibilidade sexual 3. Fungos associados a insetos I. Oliveira, Neiva Tinti de (orient.) II. Tiago, Patricia Vieira (coorient.) III. Costa, Antonio Félix da (coorient.) IV. Título

579.5677

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-349

ANA CARLA DA SILVA SANTOS

**MORFOLOGIA, FILOGENIA MOLECULAR E CICLO SEXUAL DE ISOLADOS
ENTOMOPATOGÊNICOS DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *FUSARIUM*
*INCARNATUM-EQUISETI***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do título de doutor em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 27 / 02 / 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Neiva Tinti de Oliveira (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Alexandre Reis Machado (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Cristina Maria de Souza Motta (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Delson Laranjeira (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^o. Dr. Roger Fagner Ribeiro Melo (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Ao povo do sertão, com quem aprendi a ser forte, e àqueles que acreditam no poder da educação e que, sobretudo, inspiram pessoas e lutam por um mundo mais justo.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela proteção, pelas pessoas boas que cruzaram o meu caminho, pelas oportunidades e força para a vida.

As minhas famílias (Inácio e Caboclo) pelo incentivo na busca por meus objetivos, especialmente a meus pais Carlos e Lúcia, minha fonte de força e sabedoria, e a minhas tias Katiuscia e Francisca, que exerceram um papel fundamental para essa jornada.

A Marlus Filipe, meu marido e melhor amigo, pelo companheirismo na vida e por ter prestado diversos auxílios necessários ao desenvolvimento desta pesquisa.

A Neiva Tinti de Oliveira, quem eu tive o prazer de ter tido como orientadora, agradeço pelos ensinamentos, respeito e confiança, e por contribuir para a minha formação e vibrar com os meus progressos e conquistas. Esses fatores tornaram o ambiente de trabalho mais prazeroso e construtivo.

A Patricia Vieira Tiago, também minha mãe científica, que desde antes do meu ingresso na pós-graduação desempenha um papel importante para a minha formação pessoal e profissional. A quem sou extremamente grata pelos ensinamentos, pelo suporte emocional prestado e por ter sido um exemplo de profissional ético, humano e criativo.

Aos membros do Laboratório de Fungos Fitopatogênicos e Biocontroladores (os queridos amigos: Amanda, Athaline, Daniel, Ewerton, Felipe, João, Marília, Nicole, Rafael, Renan, Roger e Vinícius), com quem compartilhei muitas risadas, preocupações e momentos de crescimento pessoal e profissional durante a pós-graduação.

Ao professor Cristiano Souza Lima, pelos valiosos ensinamentos sobre *Fusarium*, prestados com muita educação e solicitude.

Aos pesquisadores do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Antônio Félix da Costa, Luciana Gonçalves e Mariele Porto, pela amizade e apoio durante a minha formação.

A todos os professores que inspiram pessoas a transformarem suas realidades por meio da educação, especialmente aos bons professores que tive, que contribuíram para o desenvolvimento do meu senso crítico e de minhas vocações.

À Universidade Federal de Pernambuco, instituição que me permitiu crescer muito, na qual eu fui muito feliz durante os seis anos de pós-graduação e aprendizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“We shall not cease from exploration and the end of all our exploring will be to arrive where we started and know the place for the first time” (Eliot, 1943, p. 43).

RESUMO

O gênero *Fusarium*, conhecido principalmente por compreender importantes patógenos de plantas e produtores de micotoxinas, tem emergido como um grupo abundantemente associado a insetos. O complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) é um dos mais ricos em linhagens entomófilas e apresenta um dos níveis mais pronunciados de especiação críptica. Isolados do FIESC obtidos de insetos no Nordeste do Brasil foram investigados com os objetivos de determinar as espécies filogenéticas a que pertencem; descrever as características morfológicas dessas espécies; investigar a ocorrência de reprodução sexuada no FIESC e isolamento reprodutivo entre as espécies estudadas. Análises filogenéticas multi-locus baseadas em sequências de cinco *loci* resolveram os 33 isolados entomopatogênicos em três espécies filogenéticas do clado Incarnatum do FIESC – FIESC 16, FIESC 17 e FIESC 20. Desses, 20 (60,60%) apresentaram o idiomorfo *MAT1-1* e 13 (39, 40%) apresentaram o idiomorfo *MAT1-2*, sendo todos heterotáticos. Peritécios férteis foram produzidos em 6% dos cruzamentos intra-específicos após duas a três semanas. Cruzamentos interespecíficos não resultaram em peritécios férteis. Foi demonstrada a existência de um estágio sexual em espécies do clado Incarnatum pela primeira vez, sugerindo que ciclos sexuais anteriormente desconhecidos contribuem para a alta diversidade genética no grupo. Duas novas espécies foram descritas como *Fusarium caatingaense* e *Fusarium pernambucanum*. Essas espécies apresentaram características morfológicas em comum, como a produção de vários tipos de conídios aéreos formados em mono e polifiálides, e diferem entre si nas dimensões e morfologia de seus conídios esporoquiais. A progênie de duas gerações de cruzamentos a partir dos parentais mais férteis foi testada quanto à fertilidade feminina, a fim de selecionar testadores fêmeas férteis para o diagnóstico de espécies biológicas. Estes testadores poderão ser úteis na elucidação de limites de espécies no FIESC, contribuindo para o conhecimento das linhagens dentro deste complexo de importância clínica e agrônômica.

Palavras-chave: Compatibilidade sexual. Espécies crípticas. Fungos associados a insetos. FIESC. *Mating type*.

ABSTRACT

The genus *Fusarium*, well known for its important plant pathogens and mycotoxin producers, has emerged as a group abundantly associated with insects. The *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex (FIESC) is one of the richest in entomophilous strains within *Fusarium* and displays one of the most pronounced levels of cryptic speciation. FIESC isolates obtained from insects in the Northeast of Brazil were investigated aiming to determine, using phylogenetic molecular markers, the phylogenetic species to which they belong; to describe the morphological characteristics of these phylogenetic species; to investigate the occurrence of sexual reproduction in FIESC and reproductive isolation among the studied species. Multi-locus phylogenetic analyses based on sequences of five loci resolved these isolates in three phylogenetic species of the Incarnatum clade of the FIESC – FIESC 16, FIESC 17 and FIESC 20. Of the 33 isolates, 20 (60.60%) presented the idiomorph *MAT1-1* and 13 (39, 40%) the idiomorph *MAT1-2*, all of them heterothallic. Interspecific crosses did not result in fertile perithecia, which were produced in 6% of the intraspecific crosses. We demonstrate the existence of a sexual stage in species of the Incarnatum clade for the first time. These results suggest that previously unknown sexual cycles contribute to the high genetic diversity within FIESC. Two novel species were described as *Fusarium caatingaense* and *Fusarium pernambucanum*. These species displayed common morphological characteristics such as the production of various types of aerial conidia formed on monophialides and polyphialides, and differ from each other mainly in the dimensions and morphology of their sporodochial conidia. The progeny of two generations of crosses from more fertile parents was tested for female fertility in order to select fertile female testers for the diagnosis of biological species. These testers may be useful for the elucidation of species boundaries in FIESC, contributing to knowledge of the lineages within this complex of clinical and agronomic importance.

Key-words: Cryptic species. Insect-associated fungi. FIESC. Mating type. Sexual compatibility.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	09
1.1	OBJETIVOS	11
1.1.1	Objetivo Geral	11
1.1.2	Objetivos Específicos	11
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
2.1	O GÊNERO <i>FUSARIUM</i>	11
2.1.1	Importância	11
2.1.2	História taxonômica	13
2.2	CONCEITOS DE ESPÉCIE EM <i>FUSARIUM</i>	16
2.2.1	Marcadores morfofisiológicos	18
2.2.2	Marcadores moleculares filogenéticos	21
2.2.3	Marcadores biológicos e conceitos em biologia reprodutiva de fungos	23
2.2.3.1	Teleomorfos de <i>Fusarium</i>	26
2.3	COMPLEXOS DE ESPÉCIES EM <i>FUSARIUM</i>	26
2.3.1	Complexo de espécies <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (FIESC)	27
3	METODOLOGIA	31
3.1	ISOLADOS FÚNGICOS	31
3.2	EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DO DNA	32
3.3	ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE DNA E ANÁLISES FILOGENÉTICAS	32
3.4	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	33
3.5	IDENTIFICAÇÃO DO <i>MATING TYPE</i> POR PCR, CRUZAMENTOS SEXUAIS E VIABILIDADE DE ASCOSPOROS	33
3.6	DESENVOLVIMENTO DOS TESTADORES DE ESPÉCIE BIOLÓGICA E CLASSIFICAÇÃO DA FERTILIDADE FEMININA	34
4	ANÁLISE DOS RESULTADOS	35
4.1	FILOGENIA MOLECULAR	35
4.2	<i>MATING TYPES</i> E COMPATIBILIDADE SEXUAL	40
4.3	MORFOLOGIA	43
4.4.	<i>MATING TYPES</i> DA PROGÊNIE E CRUZAMENTOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE CEPAS TESTADORAS	51
5	CONCLUSÕES	55
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

Fusarium é um gênero com representantes amplamente distribuídos na natureza, encontrados no solo e em vários outros substratos, decompondo matéria orgânica ou em associações patogênicas ou não patogênicas com animais, plantas e outros organismos (Teetor-Barsch e Roberts, 1983; Summerell *et al.*, 2010; Walsh *et al.*, 2010; Coleman *et al.*, 2011; Summerell e Leslie, 2011; Aoki, O'Donnell e Geiser, 2014; Torbati *et al.*, 2018). Devido à importância destes fungos como agentes fitopatogênicos e como produtores de micotoxinas, a maioria dos estudos ao longo de mais de 200 anos de história concentrou-se em isolados obtidos de plantas doentes, economicamente importantes, em ambientes agrícolas comerciais (Summerell e Leslie, 2011).

Outros habitats e hospedeiros, incluindo ecossistemas naturais e agroecossistemas diversificados (Leslie *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2010; Leslie e Summerell, 2011; Laurence *et al.*, 2015; Moussa *et al.*, 2017), amostras clínicas e veterinárias (O'Donnell *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; van Diepeningen *et al.*, 2014; van Diepeningen e Hoog, 2016; O'Donnell *et al.*, 2016a) e insetos (O'Donnell *et al.*, 2012; Freeman *et al.*, 2013a; Freeman *et al.*, 2013b; Kasson *et al.*, 2013; O'Donnell *et al.*, 2014; Aoki *et al.*, 2018) têm sido mostrados como fontes importantes para a investigação de espécies de *Fusarium*. À medida que são estudados fungos encontrados em nichos ecológicos pouco pesquisados, lacunas filogenéticas existentes podem ser reduzidas e o conhecimento sobre a origem, distribuição e estratégias de sobrevivência desempenhadas por *Fusarium* nos ecossistemas pode ser ampliado (Summerell *et al.*, 2010; Leslie e Summerell, 2011; Laurence *et al.*, 2015).

Dentre os animais, os insetos são os membros com os quais as espécies de *Fusarium* são mais abundantemente associadas (Teetor-Barsch e Roberts, 1983). A pesquisa de *Fusarium* em insetos têm levado à descoberta de novas espécies (Freeman *et al.*, 2013b; Aoki *et al.*, 2018) e de várias interações interessantes (Geib *et al.*, 2012; Freeman *et al.*, 2013a; Kasson *et al.*, 2013; O'Donnell *et al.*, 2014; O'Donnell *et al.*, 2016b; Toki, Kawakita e Togashi, 2016). Entre essas associações, as patogênicas se destacam pelo crescente número de estudos demonstrando o potencial pouco conhecido e pouco explorado das espécies desse gênero como agentes de controle biológico de insetos (Majumbar *et al.*, 2008; Addario e Turchetti, 2011; Pelizza *et al.*, 2011; Anupam Sharma *et al.*, 2012; Batta, 2012; Lazo, 2012; Liu *et al.*, 2014; Tosi *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2016; Carneiro-Leão *et al.*, 2017).

O complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) é considerado um dos mais ricos em linhagens de *Fusarium* entomófilos (O'Donnell *et al.*, 2012), incluindo isolados

altamente virulentos, que se destacam pelo potencial para o controle de pragas agrícolas (Mohanty *et al.*, 2008; Addario e Turchetti 2011; Fan *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Carneiro-Leão *et al.*, 2017). No entanto, esforços para utilizar espécies de *Fusarium* para o controle biológico de insetos têm em parte sido limitados devido à preocupação de disseminar, inadvertidamente, fitopatógenos ou produtores de micotoxinas no ambiente (O'Donnell *et al.*, 2012). Essa preocupação é intensificada pelo fato de a identificação e delimitação das espécies de *Fusarium* serem difíceis, exigindo uma abordagem polifásica integrando marcadores morfológicos, biológicos e filogenéticos para uma identificação/caracterização acurada (Summerell e Leslie, 2011). Isso ocorre porque o reconhecimento de espécies morfológicas (MSR), historicamente usado para identificação de espécies de *Fusarium*, deu origem a esquemas taxonômicos que subestimam significativamente a diversidade de espécies dentro do gênero (Geiser *et al.*, 2004; Leslie e Summerell, 2006; O'Donnell *et al.*, 2010; Burgess, 2014).

Nas últimas duas décadas, o conhecimento da diversidade de espécies de *Fusarium* e de suas relações evolutivas aumentou significativamente devido à aplicação da filogenética molecular multilocus e do reconhecimento de espécies filogenéticas de concordância genealógica (Aoki, O'Donnell e Geiser, 2014). Atualmente, estima-se que *Fusarium* inclua mais de 300 espécies filogenéticas genealogicamente exclusivas, distribuídas em 16 (Gräfenhan *et al.*, 2011; Lombard *et al.*, 2015) a mais de 20 complexos de espécies, mais algumas linhagens monotípicas. Muitas dessas espécies não foram formalmente descritas e muitas delas são morfolologicamente crípticas (O'Donnell *et al.*, 2013; Aoki, O'Donnell e Geiser, 2014). Dentre esses complexos, FIESC é um dos que apresentam um nível de especiação críptica mais pronunciado (O'Donnell *et al.*, 2010).

Embora o FIESC venha emergindo como um grupo importante, de interesse agrônomo, clínico e veterinário, pouco se conhece sobre a diversidade morfológica e sobre a reprodução sexuada nesse grupo filogeneticamente diverso. Isolados do FIESC foram descobertos associados aos insetos *Dactylopius opuntiae* Cockerell (Hemiptera: Dactylopiidae) e *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Hemiptera: Aleyrodidae) no Nordeste do Brasil. Esses isolados foram caracterizados neste estudo, utilizando marcadores moleculares filogenéticos e morfológicos, e quanto ao sistema de acasalamento e compatibilidade sexual.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Determinar as espécies dos isolados de *Fusarium* obtidos de *D. opuntiae* e *A. woglumi* no Nordeste do Brasil; e contribuir para o conhecimento sobre a fase sexuada em espécies de ciclo sexual desconhecido.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar, por meio de análises filogenéticas, as espécies filogenéticas a que pertencem os isolados do FIESC obtidos de *D. opuntiae* e *A. woglumi*.
- b) Realizar descrição taxonômica detalhada dos materiais analisados, incluindo materiais tipo para táxons novos ou não descritos.
- c) Induzir à reprodução sexuada espécies cujo estágio sexual não é conhecido.
- d) Investigar o isolamento reprodutivo entre as espécies estudadas, empregando o critério de compatibilidade sexual.
- e) Desenvolver cepas testadoras fêmeas de espécies do FIESC para identificação de espécies biológicas e determinação de compatibilidade sexual em laboratório.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 O GÊNERO *FUSARIUM*

2.1.1 Importância

O Gênero *Fusarium* (Nectriaceae: Hypocreales, Sordariomycetes) compreende um grande grupo ascomicetos amplamente distribuído na natureza. Esses fungos podem ser encontrados no solo e em ampla gama de substratos, decompondo matéria vegetal e animal, bem como em associação patogênica ou não com plantas e animais. São encontrados em diversas condições climáticas, sendo predominantes em ambientes temperados e tropicais (Summerell *et al.*, 2010; Coleman *et al.*, 2011; Summerell e Leslie, 2011; Vitale *et al.*, 2011; Aoki, O'Donnell e Geiser, 2014; Sharma e Marques, 2018).

Fusarium é considerado um dos mais importantes gêneros de fungos em todo o mundo, sendo tal notoriedade devida principalmente às associações desses fungos com

plantas (Summerell e Leslie, 2011). Embora muitas espécies de *Fusarium* possam ser parasitas, endófitos ou patógenos de plantas hospedeiras saudáveis, dependendo do contexto ecológico (Aoki, O'Donnell e Geiser, 2014), são os patógenos que receberam maior atenção ao longo dos 200 anos de história do gênero (Summerell and Leslie, 2011). Isto porque em não menos que 80 % das espécies de plantas cultivadas pelo menos uma doença causada por uma espécie de *Fusarium* já foi relatada (Leslie e Summerell, 2006; Walsh *et al.*, 2010). Esses fungos podem causar diversos tipos de doenças, tais como apodrecimento do caule, da raiz e da coroa, cancrios, murchas vasculares e podridões de grãos, e estas não estão restritas a uma determinada região, afetando a produção em regiões temperadas bem como em regiões tropicais. Doenças como a giberela-do-trigo e mal-do-Panamá em bananeiras causaram impactos econômicos e sociais devastadores sobre os agricultores e comunidades que dependem dessas culturas (Summerell e Leslie, 2011).

A despeito do reconhecimento pelas habilidades como patógenos de plantas, e do fato de a maior parte dos estudos ter focado em isolados obtidos de plantas doentes economicamente importantes, uma alta diversidade de espécies tem sido revelada a partir da investigação de *Fusarium* em outras fontes (Summerell e Leslie, 2011). Estimativas a partir de trabalhos com plantas e solo de áreas com baixa perturbação sugerem que o número de espécies não associadas a doenças conhecidas pode superar em muito as patogênicas (Leslie *et al.*, 2004; Desjardins, 2006; Walsh *et al.*, 2010; Summerell e Leslie, 2011; Laurence *et al.*, 2015).

Espécies de *Fusarium* associadas a animais, como nematóides, aranhas, insetos, anfíbios, répteis e mamíferos têm sido relatadas (Teetor-Barsch e Roberts, 1983; Gardiano *et al.* 2009; Galindo, 2012; O'Donnell *et al.*, 2012; O'Donnell *et al.*, 2016). Os insetos são os animais mais frequentemente associados com *Fusarium*. O número de trabalhos relatando espécies de *Fusarium* como agentes no controle de insetos-praga de várias espécies está crescendo significativamente (Addario e Turchetti, 2011; Peliza *et al.*, 2011; Batta, 2012; Lazo, 2012; Liu *et al.*, 2014; Tosi *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2016; Carneiro-Leão *et al.*, 2017; Sharma e Marques, 2018). Algumas espécies também apresentam potencial biocontrolador de nematóides (Mendoza e Sikora, 2009) e de fungos (Torbaty *et al.*, 2018), incluindo fungos fitopatogênicos (Horinouchi *et al.*, 2007, 2008, 2011).

Representantes de *Fusarium* têm sido relatados como agentes patogênicos a humanos, especialmente àqueles que se encontram com o sistema imunológico debilitado (Kvas *et al.*, 2009; van Diepeningen *et al.*, 2014). As infecções causadas em humanos variam de superficiais, tais como queratite e onicomicoses, a infecções disseminadas que atingem

predominantemente pacientes gravemente imunocomprometidos, nos quais a mortalidade se aproxima de 100 % (Wang *et al.*, 2011). O número de registros dessas infecções tem aumentado devido a uma melhor detecção, mas também devido ao aumento do número de pessoas susceptíveis e imunocomprometidas (van Diepeningen e Hoog, 2016).

Fusarium é conhecido também por compreender produtores das micotoxinas toxicologicamente mais relevantes, como tricotecenos, desoxinivalenol, fumonisinas, moniliformina e zearalenona (Antonissen *et al.*, 2014; Nazari *et al.*, 2015; O'Donnell *et al.*, 2018) que, em larga escala, podem contaminar o meio ambiente com quantidades prejudiciais à saúde (Teetor-Barsch e Roberts, 1983; O'Donnell *et al.*, 2012). Esses metabólitos podem estar associados com doenças de plantas e ser tóxicos e/ou carcinogênicos para humanos e outros animais, podendo causar até a morte em caso de exposição prolongada (Leslie e Summerell, 2006; Kvas *et al.*, 2009; Summerell e Leslie, 2011).

O impacto econômico causado pelas doenças das plantas e pela produção de micotoxinas, somado à importância de *Fusarium* como organismo modelo para ampla gama de estudos, faz desse grupo de fungos um foco para estudos científicos básicos e aplicados, despertando o interesse de pesquisadores, agricultores e legisladores (Summerell e Leslie, 2011).

2.1.2 História taxonômica

O conceito genérico de *Fusarium* foi proposto por Link (1809) como *Fusisporium*, tendo como caracter distintivo principal a presença de conídios em forma de banana ou canoa (Summerell e Leslie, 2011). A partir desse momento, as diferenças na forma desses esporos tornaram-se centrais para a identificação das espécies do Gênero. Porém, a produção de conídios falcados não é exclusiva de *Fusarium*, de modo que se esses esporos fossem o único critério utilizado na identificação, vários outros fungos poderiam ser identificados como pertencentes ao Gênero erroneamente (Leslie, Zeller e Summerell, 2001; Leslie e Summerell, 2006).

A ausência de critérios acurados para a delimitação de espécies, somada à não padronização das condições e dos meios de cultura tornou a identificação de *Fusarium* inconsistente. Além disso, grande parte da pesquisa inicial sobre o Gênero se concentrou no diagnóstico e identificação de isolados causadores de doenças de plantas, sendo que muitas vezes a mesma espécie ganhava outra denominação sempre que associada a um novo hospedeiro, de modo que em um período de tempo relativamente curto, mais de 1000 espécies

foram descritas ou atribuídas a vários surtos de doenças (Leslie e Summerell, 2006, 2011). Esse estado de confusão persistiu até meados da década de 1930, quando Wollenweber e Reinking (1935) publicaram o trabalho considerado até hoje a base da taxonomia de *Fusarium*.

Wollenweber e Reinking (1935) forneceram diretrizes independentes do hospedeiro vegetal para identificação, e sim baseadas nos caracteres das linhagens envolvidas (Leslie, Zeller e Summerell, 2001; Leslie e Summerell, 2006). Propuseram também a divisão do gênero em 16 seções baseada em critérios como a presença de microconídios, forma dos macro e microconídios e da célula basal dos macroconídios, presença de clamidósporos e sua localização (intercalar ou terminal); e em 65 espécies e 77 variedades e formas, com base na cor dos estromas, presença ou ausência de esclerócios, número de septos e largura e comprimento dos macroconídios (Nelson, 1991). Atualmente, é reconhecido que o sistema de seções estabelecido não é natural e as espécies dentro de uma seção não são necessariamente monofiléticas (O'Donnell *et al.*, 2013).

Embora Wollenweber e Reinking (1935) tenham contribuído significativamente para a organização taxonômica de *Fusarium*, o sistema de identificação continuou a apresentar instabilidade, devido a fatores como a variação das características morfológicas em função do meio de cultura e das condições de cultivo, a caracterização não ser feita a partir de culturas originadas de um único esporo e o não reconhecimento da variação intra-específica e dos processos de mutação (Nelson, 1991).

Nas décadas de 1940 e 1950, Snyder e Hansen (1940, 1941, 1945, 1954) publicaram trabalhos demonstrando a importância da utilização de culturas monospóricas e de condições padronizadas de cultivo (substrato e ambiente) para uma identificação confiável de espécies de *Fusarium*. Isso porque uma grande variabilidade pode ser encontrada no comprimento, largura e septação dos esporos e na pigmentação produzida por um mesmo isolado em função das condições de cultivo e de substrato. A presença de esporodóquios e esclerócios também é influenciada por essas condições.

O sistema de classificação proposto por Snyder e Hansen (1940, 1941, 1945) reduzia o número de espécies dentro do gênero para nove – *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen, *F. solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend. Snyder & Hansen, *F. moniliforme* Sheldon, *F. roseum* Link, *F. lateritium* Nees, *F. tricinctum* (Corda) Sacc., *F. nivale* Ces. ex Berl. & Voglino, *F. rigidiuscula* Berk. & Broome e *F. episphaeria* (Tode) W.C. Snyder & H.N. Hansen. Devido à sua praticidade, foi bem aceito por pesquisadores, mas levou a muitas perdas em informações (Leslie, Zeller e Summerell, 2006;

Leslie e Summerell, 2006). Algumas das espécies definidas pelos autores permaneceram em uso por muitos anos, mas atualmente são reconhecidas como complexos de espécies, a exemplo de *F. oxysporum* (Laurence *et al.*, 2014; Lombard *et al.*, 2018) e *F. solani* (Chang *et al.* 2006; O'Donnell, 2000; Schroers *et al.*, 2016; Sandoval-Denis e Crous, 2018).

Outros pesquisadores também desenvolveram trabalhos que reforçaram a importância de padronizar as condições de cultivo e utilizar culturas monospóricas (Gordon, 1960; Raillo, 1935), introduziram o estudo dos teleomorfos na taxonomia de *Fusarium* (Gordon, 1961; Booth, 1971; Matuo e Snyder 1973; Hsieh, Smith e Snyder, 1977; Klittich e Leslie, 1988) e propuseram sistemas taxonômicos ou incrementos/alterações em sistemas prévios (Raillo, 1950; Messiaen, 1959; Gordon, 1960; Bilai, 1970; Matuo, 1972).

Influenciado pela abordagem de Wollenweber e Reinking (1935), Booth (1971) publicou a monografia “The Genus *Fusarium*”. Neste importante trabalho, foram apresentadas chaves para identificação das seções e espécies de *Fusarium*, e a morfologia das células conidiogênicas, especialmente aquelas que produzem conídios do micélio aéreo, passou a ser considerada de valor diagnóstico para espécies (Leslie e Summerell, 2006). O autor reconheceu 44 espécies e forneceu desenhos destas, destacando os caracteres morfológicos que poderiam ser usados para diferenciá-las (Summerell e Leslie, 2011).

Os próximos grandes avanços na taxonomia de *Fusarium* ocorreriam dentro do intervalo de um ano. Gerlach e Nirenberg (1982) publicaram um atlas ilustrado para *Fusarium* no qual mais de 90 espécies foram reconhecidas, enquanto Nelson, Toussoun e Marasas (1983) publicaram um manual de identificação com 41 espécies reconhecidas, com outras 16 espécies que consideravam insuficientemente documentadas. O primeiro destes trabalhos sofreu críticas significativas pelos autores do segundo trabalho, principalmente pelo pequeno número de isolados examinados para cada espécie e pela diferenciação de espécies com base em caracteres morfológicos menores, aparentemente. No entanto, apesar de haver algum antagonismo entre os proponentes dos dois grupos, em retrospecto há mais semelhanças do que diferenças entre as publicações. Alguns dos principais desentendimentos relacionaram-se a conceitos de espécies, particularmente em relação a *F. oxysporum* e *F. solani*, e a questões nomenclaturais (por exemplo, *F. verticillioides* vs. *F. moniliforme*) (Leslie e Summerell, 2006; Summerell e Leslie, 2011).

Esses dois trabalhos definiram uma série de hipóteses que agora estão sendo testadas com dados genéticos e moleculares. O trabalho de Gerlach e Nirenberg (1982) foi um passo significativo para a compreensão da taxonomia de *Fusarium*, e muitas das espécies propostas resistiram por muito tempo. O manual de identificação de Nelson, Toussoun e Marasas

(1983), por sua vez, combinou informações úteis sobre o isolamento e cultivo, bem como fotografias em cores para distinguir variação de pigmento, e excelentes fotomicrografias de muitas espécies (Leslie e Summerell, 2006).

Inspirados nos *Workshops* de laboratório, tradicionais na comunidade de pesquisa em *Fusarium*, Leslie e Summerell (2006) contribuíram de maneira expressiva para difusão do conhecimento em *Fusarium* com a publicação do “*The Fusarium Laboratory Manual*”. Além de proporcionar o embasamento teórico e detalhar os procedimentos sobre isolamento, identificação e manutenção de isolados de *Fusarium*, taxonomia, patologia, ecologia, genética e estágio sexual, o trabalho apresenta descrições e fotografias das características de 70 espécies morfológicas.

Com a implementação de estudos moleculares e o reconhecimento de sistemas baseados em filogenia molecular, a taxonomia de *Fusarium* está passando por um redimensionamento. Atualmente, estima-se que o gênero compreende pelo menos 300 espécies filogenéticas genealogicamente exclusivas, das quais muitas carecem de descrição formal (Aoki, O'Donnell e Geiser, 2014). Considerando a estimativa de que apenas 3 a 8 % das espécies fúngicas existentes sejam conhecidas (Hawksworth e Lücking, 2017), e que a maior parte das espécies de *Fusarium* estudadas são associadas a plantas de importância agrônômica (ou seja, <1% de todas as plantas vasculares), é razoável sugerir que o número de espécies de *Fusarium* na natureza pode exceder a estimativa atual por uma ordem de grandeza (O'Donnell *et al.*, 2015).

O sucesso ou fracasso do novo modelo da taxonomia de *Fusarium* dependerá da integração bem sucedida de caracteres morfológicos, de fertilidade cruzada e dados de sequências de DNA em um conceito de espécie baseado em muitos aspectos do fungo (Leslie e Summerell, 2006).

2.2 CONCEITOS DE ESPÉCIE EM *FUSARIUM*

Fusarium é um gênero complexo e diverso, cuja história taxonômica é marcada por mudanças muitas vezes relacionadas à interpretação do que seria uma espécie, o que influencia diretamente o número de espécies reconhecidas, o qual variou de mais de 1000 para apenas nove (Summerell, Salleh e Leslie, 2003). As estimativas atuais variam de 100 a 500 (Leslie e Summerell, 2006; Kirk *et al.*, 2008), dependendo do conceito de espécie aplicado (Laurence *et al.*, 2015).

Características morfológicas são essenciais para a identificação e designação de espécies fúngicas. *Fusarium* não é uma exceção. O Gênero e suas primeiras espécies foram definidos com base no conceito morfológico de espécie, que permanece importante para o grupo, embora não seja necessariamente definitivo para as circunscrições específicas atuais (Leslie e Bowden, 2008). Isto se deve a vários fatores, tais como o número limitado de caracteres morfológicos diagnósticos ou a ausência de características morfológicas claras separando espécies, sobretudo as mais próximas (Geiser *et al.*, 2004; Dhoro, 2010), além da alta variabilidade morfológica e fisiológica observada em *Fusarium*, em função da capacidade de variar em resposta às condições ambientais e da grande plasticidade genética atribuída a esses fungos (Leslie, Zeller e Summerell, 2001; Dhoro, 2010). Portanto, embora a caracterização morfológica seja uma parte integrante de todas as descrições de espécies de *Fusarium*, sua aplicação deve ser integrada a outras abordagens (Kvas *et al.*, 2009).

Com o aumento da utilização de métodos baseados em biologia molecular, principalmente métodos de filogenia multilocus, tornou-se claro que as classificações utilizando apenas morfologia subestimaram muito a diversidade no gênero *Fusarium* (Geiser *et al.*, 2004). Hoje é amplamente aceito que taxóons previamente propostos como espécies são complexos de espécies, que consistem em numerosos taxóons distintos (O'Donnell, 2000; O'Donnell *et al.*, 2000, 2004, 2008; Lombard *et al.*, 2018).

Utilizando-se a biologia molecular como ferramenta para o reconhecimento de táxons, novas espécies estão sendo validadas, muitas vezes partindo daquelas intimamente relacionadas, para as quais faltava evidência morfológica clara de diferença em nível de espécie (Geiser *et al.*, 2004). Em alguns casos, diferenças sutis podem ser encontradas quando os isolados são reexaminados levando em consideração agrupamentos moleculares (Crous, Hawksworth e Wingfield, 2015). Dessa forma, a aplicação de abordagens baseadas em sequências de DNA e o reconhecimento de espécies filogenéticas têm revolucionado a taxonomia de *Fusarium* (Aoki, O'Donnell e Geiser, 2014; O'Donnell *et al.*, 2015).

A compreensão a respeito dos sistemas reprodutivos fúngicos também avançou substancialmente, e conceitos biológicos tornaram-se muito importantes (Crous, Hawksworth e Wingfield, 2015). O conceito biológico de espécie a define como uma população natural de indivíduos isolados reprodutivamente de outras populações e com capacidade potencial ou efetiva de cruzamento (Mayr, 1942). Metodologias têm permitido testar as hipóteses de isolamento reprodutivo (Klittich e Leslie, 1988; Leslie e Klein, 1996; Covert *et al.*, 1999; Kerényi *et al.*, 1999; Steenkamp *et al.*, 2000; Kerényi *et al.*, 2004), considerado como fronteira das espécies no conceito biológico (Crous, Hawksworth e Wingfield, 2015).

À medida que diferentes espécies são reconhecidas com base na compatibilidade e fertilidade sexual e/ou nas similaridades das sequências de DNA, e isolados são atribuídos a elas, muitas vezes, padrões associados a características morfológicas podem ser então discernidos. Essas características morfológicas servem de base para descrições desses táxons, atendendo às regras do Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas, mas não são necessariamente aplicadas facilmente em uma rotina de diagnóstico (Summerell, Salleh e Leslie, 2003).

Fusarium é um importante modelo para o teste e desenvolvimento de conceitos de espécie em fungos. Abordagens que aplicam os conceitos morfológico, biológico e filogenético de espécie são consolidadas na taxonomia do Gênero. No entanto, cada uma dessas abordagens pode apresentar limitações. O reconhecimento de espécies morfológicas pode ser inconsistente devido a mutações genéticas que alteram características morfológicas críticas; as definições de espécies filogenéticas podem falhar se a hibridação entre espécies ocorre frequentemente em uma escala de tempo evolutiva (Leslie e Summerell, 2006); e as espécies biológicas só podem ser reconhecidas para fungos com estágio sexual, além de que, para fungos homotáticos, é necessário utilizar marcadores genéticos para determinar se a progênie foi gerada por dois genitores e não de apenas um (Taylor *et al.*, 2000).

É possível que, em alguns casos, os conceitos de espécies se contradigam (Leslie e Bowden, 2008; Amata *et al.*, 2010). Em geral, as espécies morfológicas de *Fusarium* são mais suscetíveis de conter múltiplas espécies biológicas e/ou filogenéticas do que o contrário (Taylor *et al.*, 2000). Quando os conceitos de espécie biológica e filogenética são inconsistentes em relação a um grupo de isolados, é possível que este grupo represente uma entidade que está em processo de evolução e se prepara para a separação em grupos distintos. Porém, muitas vezes os conceitos de espécie biológica e filogenética identificam os mesmos grupos quando é possível aplicar ambas as definições (Leslie e Summerell, 2011).

Os conceitos morfológico (ou tipológico), biológico e filogenético de espécie têm contribuído muito para o conhecimento em *Fusarium*, e a combinação entre estas três abordagens é recomendável sempre que possível, por permitir uma circunscrição de espécies mais acurada (Leslie e Summerell, 2006).

2.2.1 Marcadores morfofisiológicos

Durante séculos, a sistemática foi baseada, sobretudo, em características morfológicas (van Diepeningen *et al.*, 2014). Com base neste sistema de reconhecimento, as espécies de

Fusarium são identificadas utilizando caracteres em meio de cultura artificial, principalmente a forma e o tamanho de conídios produzidos em esporodóquios ou em micélio aéreo, arranjo aéreo dos conídios de micélio aéreo, morfologia das células conidiogênicas e a presença ou ausência de clamidósporos (Leslie e Summerell, 2006; Moretti, 2009; Dariva, 2011).

Espécies de *Fusarium* podem produzir um ou todos os seguintes esporos assexuais: (i) conídios curvos, transversalmente septados (“macroconídios”) produzidos a partir de esporodóquios ou pionotes, (ii) conídios geralmente menores de várias formas e septação (“microconídios” e / ou “mesoconídios”) produzidos em células conidiogênicas com uma (monofialídica) ou mais (polifialídica) aberturas, e (iii) talosporos geralmente globosos (clamidosporos) produzidos em hifas ou conídios, isoladamente ou em cadeias ou cachos (Geiser *et al.*, 2013).

Devido à amplitude de tamanhos observada nos conídios produzidos por *Fusarium*, os termos macro e microconídios tornaram-se usuais na taxonomia do gênero (Leslie e Summerell, 2006), referindo-se, na maioria das vezes, aos conídios produzidos em esporodóquios e em micélio aéreo, respectivamente (Geiser *et al.*, 2013). Além de um terceiro termo menos usual, proposto por Pascoe (1990) como mesoconídio para classificar os conídios fusoides que carecem de célula basal em formato de pé ou entalhada, produzidos a partir de polifialídes no micélio aéreo e nunca em esporodóquios, que não são considerados nem macro nem microconídios devido ao tamanho intermediário (Leslie e Summerell, 2006). Porém, como macroconídios são produzidos tanto em esporodóquios quanto no micélio aéreo (Moretti, 2009), e como algumas espécies apresentam conídios esporodoquiaais de tamanho pequeno, alguns autores se abstêm de utilizar os termos macro, meso e microconídios nas descrições de espécies, dando preferência ao uso dos termos conídios aéreos para se referir aos conídios produzidos em mono e polifialídes no micélio aéreo, e conídios esporodoquiaais para aqueles produzidos em monofialídes curtas em esporodóquio (Aoki e Nirenberg, 1999; Aoki, O'Donnell e Ichikakawa, 2001; Aoki *et al.*, 2003; Aoki, O'Donnell e Scandiani, 2005).

A forma de canoa/banana ou fusiforme dos conídios esporodoquiaais é a característica mais típica do gênero *Fusarium*, embora nem sempre estejam presentes (van Diepeningen *et al.*, 2014). Os caracteres chave desses conídios são a forma, tamanho e número de septos e a forma das células apicais e basais. A célula apical pode ser arredondada ou apresentar extremidade afilada, papilada ou curvada em forma de gancho, enquanto a célula basal pode ser pouco entalhada ou assemelhar-se a um pé (Summerell, Salleh e Leslie, 2003; Leslie e Summerell, 2006). Os conídios do micélio aéreo podem variar de forma e tamanho, e são encontrados sobre fialídes isoladamente, ou em aglomerados denominados "falsas cabeças",

ou em cadeias curtas ou longas. Os clamidosporos, que consistem em estruturas de resistência com paredes espessadas e elevado teor de lípidos, podem formar-se em conídios, no meio das hifas ou em suas extremidades e podem ocorrer isoladamente, em pares, grupos ou cadeias (Leslie e Summerell, 2006; Moretti, 2009). São mais comuns em culturas velhas do que jovens e ocorrem mais abundantemente em meios como o *Synthetic Nutrient Agar* (SNA) e *Carnation Leaf Agar* (CLA) SNA e CLA (Summerell, Salleh e Leslie, 2003).

Quando a fase sexual da espécie é conhecida, caracteres como textura da parede, formato, dimensões e coloração e reação dos peritécios em ácido láctico e hidróxido de potássio (KOH) são considerados, bem como o formato e dimensões dos ascos, e arranjo nos ascos, formato e septação dos ascosporos (Sumuels, Nirenberg e Seifert, 2003; Leslie e Summerell, 2006).

Caracteres fisiológicos e de importância secundária também são utilizados na caracterização de espécies de *Fusarium*. O mais proeminente destes caracteres secundários é a pigmentação das colônias, que pode ser influenciada por fatores como o meio e condições de cultivo. A taxa de crescimento em diferentes temperaturas e a produção e os perfis de metabólitos secundários como as micotoxinas também são utilizados (Nelson *et al.*, 1983; Leslie e Summerell, 2006).

Devido à alta variabilidade genética e grande variação em resposta ao ambiente, é essencial que os procedimentos e as condições de cultivo de isolados de *Fusarium* sejam padronizadas (Dhoro, 2010). Para identificar as espécies, taxonomistas sugerem o uso de culturas derivadas de um único esporo (Moretti, 2009). Com relação aos meios de cultura, aqueles ricos em açúcar devem ser evitados, por promoverem degeneração das culturas e características microscópicas mais variáveis. O meio Batata, Dextrose, Agar (BDA), por exemplo, deve ser utilizado apenas para avaliar a pigmentação, o crescimento e as características da colônia e não para cultivos sucessivos. Para avaliar caracteres microscópicos, meios como CLA e SNA são preferíveis por induzirem a formação dos caracteres-chave mais prontamente e com maior uniformidade (Summerell, Salleh e Leslie, 2003; Leslie e Summerell, 2006).

Embora as características morfológicas sejam informativas para a identificação de espécies de *Fusarium*, é comumente aceito que os membros do gênero são de difícil identificação se utilizadas apenas características morfológicas (Vitale *et al.*, 2011).

2.2.2 Marcadores moleculares filogenéticos

Na década de 1990, os avanços na tecnologia tornaram o uso de ferramentas de biologia molecular para fins de classificação mais acessível. Uma série de métodos utilizando sequências de DNA foi então aplicada para caracterizar as espécies de *Fusarium* (Kvas *et al.*, 2009). Estes incluem técnicas de DNA *fingerprint*, tais como DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD) (Ingle e Rai, 2011; Pradeep *et al.*, 2014; Dariva *et al.*, 2015), polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) (Abdel-Satar *et al.*, 2003; Zaccardelli *et al.*, 2006; Qu *et al.*, 2007), polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) (Bogale *et al.*, 2007; Hawa, Salleh e Latiffah, 2010) e *inter-simple-sequence repeat* (ISSR) (Mishra *et al.*, 2006; Dinolfo *et al.*, 2010; Vitale *et al.*, 2011; Thangavelu *et al.*, 2012; Tiago *et al.*, 2016).

As ferramentas moleculares permitem estudar a variação entre os fungos e, portanto, fornecem informações importantes sobre relações genéticas, taxonomia, estrutura populacional e epidemiologia (Dhoro, 2010). Contudo, embora várias técnicas moleculares tenham sido usadas na tentativa de determinar fronteiras de espécies, foi o advento da inferência filogenética com base em análises de dados de sequências de DNA que modificou radicalmente a taxonomia de fungos (Crous, Hawksworth e Wingfield, 2015).

A aplicação de métodos baseados em DNA e análises filogenéticas de várias regiões genômicas têm resultado na delimitação de várias novas espécies de *Fusarium*, muitas vezes separando espécies intimamente relacionadas, para as quais faltava evidência morfológica clara de uma diferença específica (Geiser *et al.*, 2004; Leslie e Summerell, 2006). Esses métodos também revelaram a natureza não-monofilética de muitas das seções de *Fusarium* (O'Donnell *et al.*, 1998, 2000b), sendo hoje amplamente aceito que táxons previamente pensados para representar seções individuais ou espécies são, na verdade, complexos de espécies que contém numerosos táxons distintos (O'Donnell, 2000; O'Donnell *et al.*, 2000, 2004, 2008).

Nos últimos anos, o reconhecimento de espécies filogenéticas por concordância genealógica (GCPSR), que é uma adaptação do conceito filogenético de espécies, tornou-se um método comumente empregado por micologistas para distinguir espécies. O GCPSR usa a concordância filogenética de genes não vinculados para indicar a falta de troca genética e, portanto, a independência evolutiva das linhagens (Crous, Hawksworth e Wingfield, 2015).

O GCPSR é particularmente relevante para *Fusarium*, pois em combinação com a tipagem multilocus de sequências de DNA (MLST), que incorpora a análise de sequências de

DNA de vários *loci* gênicos, resultou em um grande aumento do número de espécies, a maioria ainda sem nome e muitas morfologicamente crípticas. No caso destas espécies sem binômios, adotou-se um sistema de nomenclatura para designá-las de acordo com o genótipo e haplótipo, para permitir uma comunicação precisa sobre essas linhagens sem binômios latinos (Wang *et al.*, 2011; O'Donnell *et al.*, 2015).

Várias regiões genômicas têm sido avaliadas como marcadores taxonômicos. A região da sequência transcrita interna (ITS) do DNA ribossomal foi adotada como o marcador código de barras para fungos (Schoch *et al.*, 2012). No entanto, para *Fusarium* spp., essa região é muito conservada e, portanto, limitada para distinguir os complexos de espécies e as espécies do gênero (van Diepeningen *et al.*, 2014). Além disso, cópias divergentes e não ortólogas de ITS2 já foram constatadas em espécies de *Fusarium* (O'Donnell e Cigelnik, 1997; O'Donnell *et al.*, 1998a), o que pode levar a inferências filogenéticas incorretas (Geiser *et al.*, 2004).

Isto posto, outros *loci* gênicos têm sido utilizados em estudos filogenéticos (O'Donnell *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2006; O'Donnell *et al.*, 2008; O'Donnell *et al.*, 2009), sendo que três demonstraram boa capacidade discriminatória em nível de espécie, serem ortólogos em todo o gênero *Fusarium*, e aplicáveis a toda a amplitude filogenética do mesmo – o fator de alongamento 1- α (*EF-1 α*) e a primeira e segunda maior subunidade da RNA-polimerase (*RPB1* e *RPB2*). O gene *EF-1 α* mostra o nível mais elevado de polimorfismo de sequências entre espécies intimamente relacionadas. Por estas razões, tornou-se o marcador de escolha como uma ferramenta de identificação de um único locus em *Fusarium* (Geiser *et al.*, 2004). Em contrapartida, devido aos íntrons altamente variáveis, a região *EF-1 α* só pode ser alinhada de forma confiável entre membros de um complexo de espécies, ou vários relacionados intimamente, enquanto as porções *RPB1* e *RPB2* são mais facilmente alinhadas em *Fusarium* (O'Donnell *et al.*, 2015).

Com dados de sequência de pelo menos um desses *loci* é possível obter uma colocação razoavelmente precisa de um isolado desconhecido dentro de um complexo de espécies, realizando uma consulta BLAST de nucleotídeos nos bancos de dados *Fusarium* MLST (<http://www.westerdijkinstitute.nl/Fusarium/>) e *Fusarium*-ID (<http://isolate.fusariumdb.org>). Esses bancos de dados compreendem sequências de isolados de *Fusarium* depositados em coleções de cultura de referência mundial, e amplamente amostrados filogeneticamente. O banco de dados GenBank-NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), por sua vez, apresenta muitas sequências mal identificadas e registros desatualizados quanto às descobertas proporcionadas pelo sistema GCPSR (O'Donnell *et al.*, 2015), no entanto a sua

utilização não deve ser descartada, apenas exige maior cautela para a seleção de sequências confiáveis.

2.2.3 Marcadores biológicos e conceitos em biologia reprodutiva de fungos

O conceito biológico de espécie estabelece que dois fungos pertencem à mesma espécie se eles são sexualmente compatíveis e ao entrarem na fase teleomórfica produzem estruturas sexuais portadoras de progênie fértil (Taylor *et al.*, 2000).

Com relação às estratégias reprodutivas sexuais, dois modos de reprodução são observados nos fungos – homotalismo e heterotalismo (Ni *et al.*, 2011). Fungos homotáticos são aqueles capazes de iniciar e completar a reprodução sexuada a partir de uma única célula, ou seja, o acasalamento é possível entre os descendentes mitóticos do mesmo genótipo haplóide que pode ser, portanto, auto-fértil (Idnurm *et al.*, 2015; Sun e Heitman, 2015). Dentre os fungos homotáticos existem dois grupos, os homotáticos verdadeiros e os pseudohomotáticos. Os primeiros podem completar o ciclo de vida com culturas iniciadas a partir de um esporo ou fragmento micelial que contém um único núcleo, enquanto os últimos também podem completar o ciclo de vida a partir de uma cultura originada de um único esporo, mas que continha, na verdade, dois núcleos geneticamente distintos. Isto porque fungos pseudohomotáticos crescem somaticamente como um heterocário, mantendo uma ou mais cópias de núcleos distintos em cada célula, e têm, portanto, todos os mecanismos e controles genéticos para funcionar como heterotáticos (Leslie e Summerell, 2006).

As espécies heterotáticas, por sua vez, requerem uma interação entre duas linhagens geralmente morfollogicamente indistinguíveis, mas fisiologicamente distintas provenientes de diferentes células para que a reprodução sexual ocorra (Leslie e Summerell, 2006). A diferença fisiológica requerida para a compatibilidade sexual entre cepas heterotáticas é denominada tipo de acasalamento ou *mating type* e é determinada pelas regiões cromossômicas denominadas *locus* MAT (Idnurm *et al.*, 2015). Em *Fusarium*, apenas os sistemas de reprodução heterotático e homotático são conhecidos, sendo o primeiro o mais comum. Porém, é possível que, em muitos casos, os estudos não tenham sido realizados com detalhamento suficiente para distinguir os padrões homotáticos e pseudohomotáticos (Leslie e Summerell, 2006).

O *locus* MAT codifica fatores de transcrição que regulam a expressão de feromônios e receptores de feromônios, bem como genes envolvidos na compatibilidade pós-acasalamento (Idnurm *et al.*, 2015). É essa região que difere em sequência de DNA entre células de *mating*

types opostos e assim coordena o ciclo sexual (Fraser e Heitman, 2003). A comunicação por feromônios atua no reconhecimento e atração entre indivíduos de *mating types* opostos e em eventos pós-fertilização, tais como o reconhecimento internuclear (Hornok, Waalwijk e Leslie, 2007). Como em outros ascomicetos, a reprodução sexual em *Fusarium* é controlada por um único *locus MAT* com dois alelos idiomórficos, referidos como *MAT-1* e *MAT-2* (Kerényi *et al.*, 2004). Os alelos são idiomórficos porque ocorrem na mesma posição relativa em um cromossomo, mas não têm similaridade de sequência entre si, podendo até diferir em tamanho e no número de proteínas codificadas (Leslie e Summerell, 2006). Protocolos de cruzamentos são utilizados para definir espécies biológicas. Utilizando técnicas moleculares é possível determinar o *mating type* dos isolados fúngicos antes dos cruzamentos e reduzir o número de combinações de cruzamentos pela metade (Leslie e Summerell, 2006). *Primers* diagnósticos para a identificação do *mating type* por meio de PCR estão disponíveis para uma ampla gama de espécies de *Fusarium* (Kerényi *et al.*, 1999; Steenkamp *et al.*, 2000; Kerényi *et al.*, 2004).

Diferentemente de alguns fungos, como leveduras e a maioria dos basidiomicetos, nos quais o *mating type* é o único critério para os cruzamentos, em *Fusarium*, estruturas especializadas femininas também são requeridas para que a reprodução sexuada ocorra. A estrutura feminina, chamada protoperitécio, é resultante de um alto grau de especialização celular. Permanece imatura até que seja fertilizada por um núcleo de *mating type* oposto. As estruturas masculinas não são especializadas e ascósporos, macroconídios, microconídios ou fragmentos de hifas podem servir como núcleo masculino. A capacidade de doar o núcleo é tomada como análoga à função masculina e a capacidade de receber núcleos como análoga à função feminina. Um indivíduo que pode servir tanto como doador quanto como receptor de núcleos é chamado de fungo monóico. A capacidade de um isolado funcionar como parental masculino ou feminino não está relacionada com o *mating type* que carrega (Leslie e Klein, 1996; Leslie e Summerell, 2006).

As funções masculinas ou femininas podem ser perdidas de forma independente uma da outra, e de acordo com a história da população e da estabilidade ambiental (Leslie e Klein, 1996), de modo que a capacidade de um isolado de campo servir como parental masculino ou feminino em um cruzamento sexual realizado em laboratório não deve ser assumida sem que estes papéis sejam testados (Leslie e Summerell, 2006).

Para induzir a fase sexuada em laboratório, o protocolo de cruzamento mais utilizado para *Fusarium* é o descrito por Klittich e Leslie (1988), em que o parental feminino é inoculado em placa de Petri de 60 mm de diâmetro contendo o meio cenoura-água e o parental

masculino, de *mating type* oposto, em tubo de ensaio contendo meio completo. Após sete dias de crescimento de ambos, uma suspensão de esporos do parental masculino é preparada em solução Tween a 2,5% e espalhada sobre a superfície da colônia do parental feminino utilizando alça de Drigalski até umedecer o micélio. As placas são incubadas em condições de temperatura e luminosidade adequadas e são observadas até o aparecimento de peritécios e a liberação de ascosporos. Se o cruzamento for fértil, os isolados envolvidos pertencem à mesma espécie biológica (Leslie e Summerell, 2006).

Para tornar o reconhecimento de espécie biológica mais facilmente aplicável em uma rotina de diagnóstico, cepas hermafroditas ou férteis como fêmeas, de ambos os *mating types*, devem ser selecionadas para as espécies biológicas reconhecidas. Essas cepas são denominadas testadores e sua seleção e desenvolvimento pode ser laboriosa (Leslie, Zeller e Summerell, 2001; Leslie e Summerell, 2006).

Se uma cepa de campo altamente fértil é identificada, um cruzamento entre essa cepa e outra com algum grau de fertilidade feminina é realizado e a progênie coletada e testada quanto ao *mating type* e fertilidade feminina. Se uma cepa suficientemente fértil como fêmea é identificada entre a progênie, então ela é indicada como o testador. Se nenhuma estirpe adequada for identificada após a primeira geração de cruzamentos, a cepa da progênie com o maior nível de fertilidade feminina é cruzada novamente com um isolado de campo altamente fértil e a análise da progênie continua até ser identificada uma cepa de *mating type* oposto apropriadamente fértil. A progênie mais altamente fértil de cada *mating type* é selecionada. (Leslie e Summerell, 2006).

Para diagnosticar a espécie biológica de um isolado, este deve ser testado como o parental masculino em cruzamento utilizando uma cepa testadora fértil feminina. Se o *mating type* do isolado a ser identificado não for conhecido, cruzamentos devem ser feitos com testadores dos dois tipos de *mating*, esperando que apenas um dos cruzamentos seja fértil. Caso o *mating type* tenha sido previamente determinado, os cruzamentos devem ser feitos somente com a cepa testadora de *mating type* oposto. Se o objetivo do estudo também é determinar a fertilidade feminina do isolado e não apenas identificar sua espécie biológica, os papéis masculino/feminino são invertidos, passando o isolado a ser testado como parental feminino (Leslie e Summerell, 2006).

2.2.3.1 Teleomorfos de *Fusarium*

Vários gêneros teleomorfos, a maioria pertencente à Ordem Hypocreales, foram associados a espécies de *Fusarium*. Gradualmente, a maioria das espécies mais divergentes foi removida de *Fusarium*, como *Microdochium nivale* e *Plectosporium tabacinum* (Leslie e Summerell, 2006), deixando as associações com um número teleomorfos que varia de acordo com a delimitação de *Fusarium* adotada (Geiser *et al.*, 2013; Lombard *et al.*, 2015), sendo *Gibberella* Sacc. a mais comum, ligada à maioria das espécies de *Fusarium* e também às espécies tipo do gênero *Fusarium* (Rossman *et al.*, 1999; Sumuells, Nirenberg e Seifert, 2001; Leslie e Summerell, 2006).

Os peritécios de *Giberella* são de coloração roxo escura, aparentando-se pretos com o reflexo da luz, e tornam-se vermelhos em KOH 3% e amarelos em ácido láctico. Apresentam forma ovoide a subglobosa e superfície verrugosa/áspera em maior ou menor grau. Na natureza, os peritécios são pouco conspícuos; e embora não sejam estromáticos, são difíceis de remover do substrato e podem ser formados em um estroma fracamente desenvolvido. Os ascos são relativamente estreitos e clavados, de paredes finas, e geralmente não possuem um mecanismo de descarga apical. Os ascosporos, inicialmente hialinos, tornam-se castanhos claros após a liberação do peritécio, muitas vezes como parte de um cirro de esporos. São fusoides, retos ou ligeiramente curvados, apresentando 1–3 septos quando maduros (Sumuells, Nirenberg e Seifert, 2001; Leslie e Summerell, 2006).

2.3 COMPLEXOS DE ESPÉCIES EM *FUSARIUM*

Nas duas últimas décadas, o conhecimento da diversidade de espécies de *Fusarium* e de suas relações evolutivas aumentou consideravelmente com a aplicação de abordagens baseadas na tipagem multilocus de sequências de DNA (MLST), como o reconhecimento de espécies filogenéticas de concordância genealógica (GCPSR) (Aoki, O'Donnell e Geiser, 2014). A partir de um estudo filogenético abrangente, baseado em dados de sequências parciais das regiões *RPB1* e *RPB2* do DNA, as espécies de *Fusarium* foram distribuídas em complexos de espécies mais algumas linhagens monotípicas (O'Donnell *et al.* 2013). O número de complexos varia de 16 a 23 (Laurence *et al.*, 2011; O'Donnell *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2016; Sandoval-Denis *et al.*, 2018), de acordo com o critério de diferentes autores para definir os limites do gênero, os quais podem ser mais restritivos, baseados em filogenia e características morfológicas das fases sexuais (Gräfenhan *et al.*, 2011; Lombard *et al.*, 2015),

ou mais amplos, com o objetivo de manter no gênero espécies de importância agrônômica ou clínica, tais como aquelas do Complexo *Fusarium solani* (FSSC) (Geiser et al., 2013). Pelo menos 300 espécies filogeneticamente distintas, resolvidas como linhagens genealogicamente exclusivas, são compreendidas nesses complexos, no entanto, muitas dessas espécies não apresentam binômio latino e podem ser morfologicamente crípticas (Aoki, O'Donnell e Geiser, 2014; O'Donnell et al., 2015).

A incapacidade de identificar espécies crípticas de maneira precisa pode implicar em várias consequências negativas, tais como dificultar o diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças e a implementação de estratégias de controle, uma vez que espécies diferentes podem responder às medidas de tratamento e de controle de forma diferente (Bickford et al., 2007). Considerando a importância de *Fusarium* como produtor de micotoxinas, patógeno de plantas, de humanos e de outros animais, por exemplo, o reconhecimento de espécies crípticas é bastante relevante.

Visando proporcionar a comunicação precisa dentro da comunidade científica a respeito dessas espécies e também o reconhecimento da diversidade genética dentro dos complexos crípticos, um sistema de nomenclatura informal foi desenvolvido (O'Donnell et al., 2015). Esse sistema, baseado em MLST, permite classificar as espécies dentro de um complexo de espécies de acordo com o genótipo e haplótipo, sendo as espécies filogenéticas representadas por números arábicos e os haplótipos por letras romanas minúsculas (O'Donnell, 2000; O'Donnell et al., 2004; Zhang et al., 2006; O'Donnell et al., 2007; O'Donnell et al., 2008; O'Donnell et al., 2009; Schroers et al., 2009; O'Donnell et al., 2010).

Em *Fusarium*, cinco complexos de espécie adotam esse esquema de designação de espécies crípticas – complexo de espécies *F. dimerum* (FDSC) (O'Donnell et al., 2007; Schroers et al., 2009), complexo de espécies *F. chlamydosporum* (FCSC), complexo de espécies *F. incarnatum-equiseti* (FIESC) (O'Donnell et al., 2009), complexo de espécies *F. tricinctum* (FTSC) (O'Donnell et al., 2010) e complexo de espécies *F. solani* (FSSC) (Chang et al., 2006; O'Donnell et al., 2008). Esse sistema permite distinguir espécies crípticas, de interesse clínico e agrônômico, até que elas sejam devidamente estudadas e descritas (O'Donnell et al., 2015).

2.3.1 Complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC)

Dentre os complexos de espécies em *Fusarium*, o complexo *F. incarnatum-equiseti* (FIESC) é um dos que apresentam nível de especiação críptica mais pronunciado (O'Donnell

et al., 2010). Este complexo foi definido em 2009, baseado em esquema de tipagem multilocus de sequências de DNA (MLST) e no reconhecimento de espécies filogenéticas de concordância genealógica (GCPSR), que revelaram um grande número de espécies filogenéticas distintas (O'Donnell *et al.*, 2009).

Atualmente, o FIESC compreende 31 espécies filogenéticas distribuídas em dois grandes clados denominados Incarnatum e Equiseti (O'Donnell *et al.*, 2009; O'Donnell *et al.*, 2012; Villani *et al.*, 2016), que incluem algumas espécies previamente classificadas nas seções morfológicas polifiléticas *Arthrosporiella* e *Gibbosum* (Wollenweber e Reinking, 1935; Gerlach e Nirenberg, 1982). Das 31 espécies filogenéticas conhecidas no FIESC, apenas três apresentam nomes – *F. equiseti* (FIESC 14), *F. lacertarum* (FIESC 4) e *F. scirpi* (FIESC 9), todas pertencentes ao clado Equiseti (O'Donnell *et al.*, 2009). Outros três nomes de espécies sinonimizadas (*F. semitectum*, *F. incarnatum* e *F. pallidoroseum*) estão vinculados ao FIESC, no entanto dois fatores limitam a aplicação destes nomes: a questão pendente de conectar esses nomes às espécies filogenéticas atualmente conhecidas, uma vez que os espécimes tipo, quando conhecidos, são muito antigos para a tipagem de DNA usando o esquema MLST (O'Donnell *et al.*, 2009) e porque esses nomes têm uma história de discordâncias taxonômicas e nomenclaturais (Booth e Sutton, 1984; Khoa, Hatai e Aoki, 2004).

Esses problemas são exacerbados pelo alto nível de especiação críptica e alta homoplasia morfológica observada no FIESC (Castellá e Cabañes, 2014), de modo que apenas os esquemas MLST permitem a identificação destes fungos com confiança e relatá-los com precisão na literatura científica para facilitar a comunicação de dados epidemiologicamente relevantes para a saúde pública, fitopatologia e para comunidades de pesquisa de micotoxinas (O'Donnell *et al.*, 2009). Portanto, estudos que relacionem caracteres morfológicos, biológicos e ecológicos com espécies filogenéticas no FIESC são necessários.

A patogenicidade a plantas, epidemiologia de doenças e perfis de produção de micotoxinas de membros do FIESC são pobremente compreendidos (Villani *et al.*, 2016). As cepas nesse grupo são muitas vezes recuperadas como patógenos fracos ou invasores secundários em plantas doentes, com associações de doenças primárias relativamente escassas e muitas vezes difíceis de provar (Leslie e Summerell, 2011). Em muitos casos, esses fungos são relatados como agentes causais de doenças com base na obtenção dessas espécies de material doente, sem que o postulado de Koch tenha sido completado com os isolados fúngicos. O relato frequente de espécies como *F. equiseti* e *F. semitectum* como agentes patogênicos para uma ampla gama de espécies de plantas reforça a hipótese de espécies do

FIESC como invasores secundários de plantas, o que significa que os relatos sobre a patogenicidade dessas espécies devem ser vistos com cautela, a menos que sejam suportados com dados que vão além de sua recuperação de material vegetal doente (Summerell, Salleh e Leslie, 2003).

Representantes do FIESC têm sido associados a doenças como podridão em raízes de morango no Irã (Ayoubi e Soleimani, 2016) e de ginseng na Coreia (Song, Yun e Kim, 2014) e podridão de sementes de *Allium cepa* L. na Sérvia (Ignjatov *et al.*, 2015), murcha de berinjela (*Solanum* spp.) (Waniki *et al.*, 2011) e cancro de noz na Argentina (Seta, Gonzalez e Lori, 2004). Isolados do FIESC também foram reportados na Índia causando a mancha foliar em *Cucumis trigonus* Roxb. (Mali *et al.*, 2015) e em *Angiopteris evecta* (G. Forst.) Hoffm. (Mali *et al.*, 2016), e associados a infecções de sementes e vagens de soja (Roy e Ratnayake, 1997), em sementes de *Albizia lebbbeck* (Linn.) Benth (Gupta, Dubey e Singh, 2016) e em sementes de arroz e de milho no Egito (Madbouly *et al.*, 2012), em arroz na África do Sul (Hossain *et al.*, 2015) e em cereais (Villani *et al.*, 2016). Esses fungos também estão envolvidos na etiologia de doenças em plantas do genero *Anigozanthos* (Satou *et al.*, 2001), doença do fruto de pimentão em Trinidad (Ramdial, Hosein e Rampersad, 2016) e declínio de *Spartina alterniflora* em pântanos salteados do Atlântico (Elmer e Marra, 2011). Em alguns desses casos, FIESC faz parte de um complexo de fungos causando a doença, ou causa sintomas moderados em concentrações baixas de inóculo, porém em outras ele tem sido reportado como um agente causal importante, com potencial de causar prejuízos econômicos.

Isolados do FIESC também têm sido relatados causando doenças em humanos. Eles estão associados a infecções humanas superficiais, tais como onicomicoses e queratites que afetam olho e pele, e a infecções profundas localizadas e disseminadas, especialmente em pacientes com leucemia. Essas infecções parecem ser mais comuns em regiões tropicais e em áreas com população agrária relativamente grande. No entanto, os dados de prevalência ainda são aproximados (Azor *et al.*, 2009; O'Donnell *et al.*, 2009; O'Donnell *et al.*, 2010; van Diepeningen *et al.*, 2014). FIESC também está sendo reportado como um clado de relevância veterinária dentro de *Fusarium* (O'Donnell *et al.*, 2016).

Entre os complexos de espécies em *Fusarium*, o FIESC é considerado um dos mais ricos em linhagens associadas a insetos. Pelo menos 15 de suas espécies filogenéticas conhecidas já foram recuperadas de insetos (O'Donnell *et al.*, 2012). A quantidade de trabalhos demonstrando a patogenicidade de isolados do FIESC contra insetos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Cepas das espécies filogenéticas FIESC 3 e FIESC 25, isoladas da vespa da castanha *Dryocosmus kuriphilus* (Yasumatsu) (Hymenoptera: Cynipidae)

causaram altas taxas de mortalidade sobre o inseto (até 70 e 60%, respectivamente) em testes de patogenicidade, e apresentaram ação rápida (apenas sete dias) e abundante esporulação, características promissoras para o controle de insetos (Addario e Turchetti, 2011). Semelhantemente, um isolado FIESC foi altamente eficiente contra *Matsucoccus matsumurae* (Kuwana) (Hemiptera: Coccoidea: Matsucoccidae), inseto-praga a pinheiros chineses, levando 83 % das fêmeas adultas à morte, após oito dias da inoculação (Liu *et al.*, 2014). Isolados da espécie filogenética FIESC 20 apresentaram taxas de mortalidade confirmada contra adultos de *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera: Dactylopiidae) que variaram de 12 a 86,66% (Santos *et al.*, 2016) e de 8 a 66,66% em diferentes bioensaios (Carneiro-Leão *et al.*, 2017). Uma cepa FIESC foi reportada infectando *Coccus hesperidum* L. (Hemiptera: Coccidae) naturalmente, e quando testada em laboratório provocou até 91,33 % de mortalidade (Fan *et al.*, 2013). Isolados de *F. semitectum*, obtidos de amostras de solo, apresentaram índices de mortalidade contra larvas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) que variaram de 10 a 63%, após 12 dias de inoculação (Ameen, 2012). *F. pallidoroseum*, isolado de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae), provocou a morte de 100% das fêmeas do inseto após quatro dias da exposição durante quatro horas a uma concentração de $1,11 \times 10^{10}$ conídios por m² do fungo (Mohanty *et al.*, 2008). *Fusarium incarnatum* (Roberge) Saccardo foi relatado como patógeno de *Aphis craccivora* Koch (Hareendrath *et al.*, 1987), e contra ninfas de *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) provocou uma mortalidade baixa após 72h da inoculação, em relação a outras espécies de *Fusarium* testadas, atingindo, no entanto, 100% de mortalidade após 144h da inoculação (Anwar *et al.*, 2017).

Esses trabalhos revelam altas taxas de mortalidade provocadas contra organismos que são pragas agrícolas e que isolados FIESC podem ser promissores como agentes de biocontrole. No entanto, os esforços para utilizar espécies de *Fusarium* no controle biológico têm sido limitados pela preocupação de liberar inadvertidamente fitopatógenos e produtores de micotoxinas no meio ambiente, que em larga escala podem contaminar o ambiente em quantidades prejudiciais à saúde (Teetor-Barsch e Roberts, 1983; O'Donnell *et al.*, 2012). Portanto, considerando-se a possibilidade de utilização de *Fusarium* para o controle de insetos, testes de patogenicidade que forneçam um indicativo quanto à especificidade dos isolados ao seu hospedeiro devem ser conduzidos, assim como testes de efeitos colaterais e de segurança com insetos não-alvo, mamíferos e células humanas, como é realizado para outros fungos a serem utilizados no controle biológico; além de testes para a detecção da produção de metabólitos secundários indesejáveis (Teetor-Barsch e Roberts, 1983).

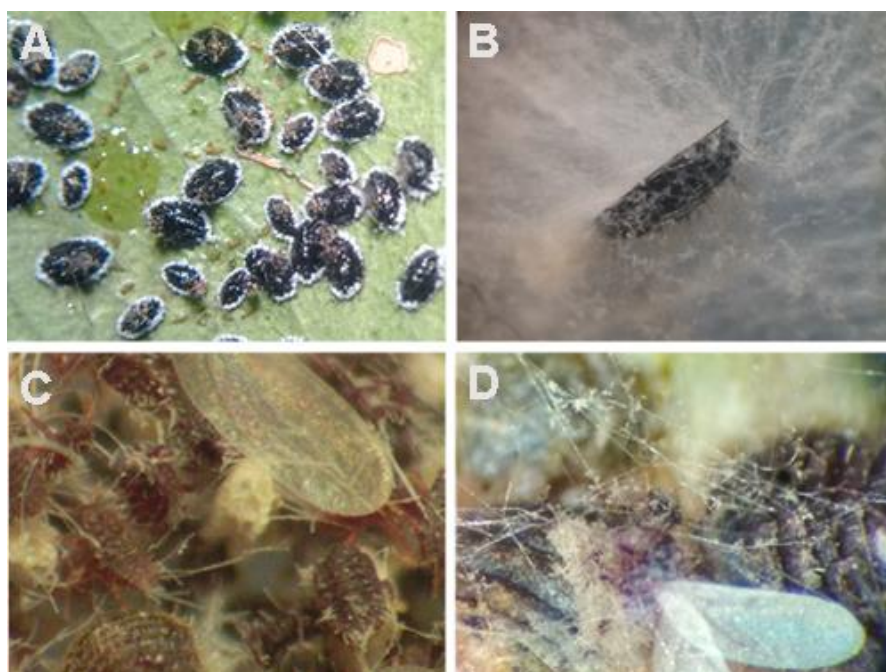
Estudos indicam que os isolados de *Fusarium* que provocam alta mortalidade a insetos também apresentam alta especificidade ao seu hospedeiro e nenhum dano às culturas de plantas, uma vez que a habilidade para parasitar requer adaptações específicas ao hospedeiro (Kuruvilla e Jacob 1980; Teetor-Barsch; Roberts, 1983; Martins, 2005). Com relação ao FIESC há alguns trabalhos indicando que isolados entomopatogênicos foram específicos ao seu hospedeiro e seguros a espécies de plantas (Mikunthan e Manjunatha, 2006; Fan *et al.*, 2013). Portanto esses fungos devem ser melhor estudados, visando um melhor aproveitamento desses micro-organismos de interesse agrônômico.

3 METODOLOGIA

3.1 ISOLADOS FÚNGICOS

Foram estudados 33 isolados de *Fusarium* entomopatogênicos, oito provenientes de adultos de *Aleurocanthus woglumi* (Hemiptera: Aleyrodidae) coletados de limoeiros infestados na região da Zona da Mata em Pernambuco, Brasil, e 25 de adultos de *Dactylopus opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) coletados de cactos em região semi-árida do mesmo estado, Brasil (Figura 1). Esses fungos estão depositados na Coleção de Culturas Micoteca URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. Os códigos de acesso dos isolados na coleção podem ser consultados na Tabela 1.

Figura 1 – A. Ninfas de *Aleurocanthus woglumi* sobre folhas de *Citrus*. B. Ninfa de *A. woglumi* com crescimento fúngico. C. Fêmeas e machos de *Dactylopius opuntiae*. D. Adultos de *D. opuntiae* com crescimento fúngico.



3.2 EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DO DNA

O DNA genômico de culturas crescidas por cinco dias a 28 °C foi extraído utilizando o *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Os dados de sequências de DNA foram obtidos de fragmentos de amplificação de cinco *loci*: o fator de alongamento de cadeia 1 alfa (*EF-1α*) usando os *primers* EF1α e EF2 (O'Donnell *et al.*, 1998), a maior subunidade da RNA polimerase II (*RPB1*), com os *primers* F5 e G2R (O'Donnell *et al.*, 2010), a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*RPB2*) partições 1 (*RPB2* 597) e 2 (*RPB2* 7911) usando dois conjuntos de *primers* 5F2 e 7cR e 7cf e 11ar (O'Donnell *et al.*, 2008), os espaços internos transcritos (ITS), utilizando os *primers* ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990) e o domínio D1/D2 da maior subunidade (LSU) do rDNA com *primers* NL1 e NL4 (Kurtzman e Robnett, 1997). As reações de PCR foram realizadas utilizando tampão 1×, MgCl₂ a 1,5 mM, 0,3 mM de dNTP, 0,3 μM de cada primer, 0,04 U / μL Taq DNA polymerase (Invitrogen) e 25 ng de DNA genômico. As condições de ciclagem foram de 8 min a 95 °C, seguidos de 35 ciclos de 15 s a 95 °C, 20 s a 53 °C, 1 min a 72 °C e extensão final de 72 °C durante 5 min para *EF-1α*; 96 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos consistindo de 95 °C durante 45 s, 55 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min e um ciclo final de 72 °C durante 8 min para *RPB1* e *RPB2*; e 3 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 56,5 °C, 1 min a 72 °C e um ciclo de 3 min a 72 °C para ITS e LSU. Os produtos de PCR foram purificados usando PureLink - Kit de Purificação de PCR - Invitrogen e sequenciados com os mesmos *primers* pela Plataforma Multi-Usuária de Sequenciamento e Expressão Gênica da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE.

3.3 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE DNA E ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Os cromatogramas foram editados com o programa *Sequencher* 4.7 (Gene Codes Corp., Ann Arbor, Michigan). As sequências geradas foram alinhadas com sequências de isolados do FIESC obtidas no banco de dados *Fusarium* MLST, utilizando a ferramenta de alinhamento *Muscle* (Edgar 2004) no MEGA v. 7 (Kumar, Stecher e Tamura, 2015). O alinhamento foi ajustado manualmente. *Fusarium concolor* foi selecionado como *outgroup* com base em análises filogenéticas prévias (O'Donnell *et al.*, 2009).

As regiões gênicas *EF-1α*, *RPB1*, *RPB2*, ITS e LSU foram analisadas separadamente e posteriormente combinadas. Reconstruções filogenéticas utilizando a análise de máxima verossimilhança (ML) foram realizadas no portal CIPRES Science Gateway (Miller *et al.*,

2012) usando o RAxML-HPC2 on XSEDE (8.2.10) (Stamatakis, 2014) e 1000 repetições de *bootstrap*. MrBayes v. 3.2.6 (Heulsenbeck e Ronquist, 2001; Ronquist e Huelsenbeck, 2003) foi utilizado para gerar filogenias baseadas na inferência bayesiana (BI) com 10000000 de gerações. Os modelos de substituição nucleotídica melhor ajustados aos conjuntos de alinhamento foram indicados por jModelTest2 v. 2.1.10 (Guindon e Gascuel, 2003; Darriba *et al.*, 2012), implementando o critério de informação Bayesiano (BIC). Árvores filogenéticas foram plotadas usando o FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2016).

3.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

A caracterização morfológica baseou-se em culturas originadas de um único conídio. Para determinar a taxa de crescimento micelial (em mm/por dia) e a cor das colônias, blocos de ágar de 5 mm de diâmetro foram transferidos de culturas de seis dias de crescimento para o centro de placas de Petri contendo Batata Dextrose Ágar (BDA). Cada isolado foi cultivado em três placas, incubadas a 25 °C e a 30 °C no escuro. Os diâmetros das colônias foram medidos diariamente até o quarto dia. Após sete dias de incubação, as cores das colônias foram classificadas de acordo com um catálogo micológico de cores (Rayner, 1970). Para caracterizar conídios do micélio aéreo, conidióforos e clamidosporos, os isolados fúngicos foram cultivados durante 12 dias sob fotoperíodo de 12 horas em meio *Synthetic Nutrient Agar* (SNA) (Nirenberg, 1976). Para a observação dos conídios formados em esporodóquios, os fungos foram cultivados em meio de cultura *Carnation Leaf Agar* (CLA) (Snyder e Hansen, 1947; Fisher *et al.*, 1982). Os peritécios, ascos e ascosporos foram caracterizados a partir de cruzamentos realizados em meio de cultura *Carrot Agar* (CA) (Klittich e Leslie, 1988). Lâminas foram montadas em hidróxido de potássio (KOH) a 3% e em ácido láctico a 90% para a observação da reação e coloração dos peritécios (Rossman *et al.*, 1999).

3.5 IDENTIFICAÇÃO DO *MATING TYPE* POR PCR, CRUZAMENTOS SEXUAIS E VIABILIDADE DE ASCOSPOROS

Para a amplificação dos idiomorfos *MAT-1* e *MAT-2* referentes aos tipos sexuais, foram utilizados os primers fusALPHAfor e fusALPHArev, e fusHMGfor e fusHMGrev, respectivamente (Kerényi *et al.* 2004). As amplificações foram realizadas com tampão de PCR a 1x, MgCl₂ a 1.5 mM, dNTP a 0.25 mM, 0.2 µM de cada primer, 0,04U da Taq polimerase (Invitrogen), e 20 ng de DNA. A desnaturação inicial foi realizada a 95 °C durante 2 min, seguida de 35 ciclos consistindo em 30s a 94 °C, 30s a 58 °C, e 45s a 72°C, e extensão

final a 72 °C durante 10 min. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% e os *mating types* determinados com base no comprimento dos fragmentos amplificados (Kerényi *et al.* 2004), estimado por comparação com um marcador de tamanho de fragmentos 100 pb.

Para induzir a fase sexuada em laboratório, foi utilizado o protocolo de cruzamento descrito por Klittich e Leslie (1988). Todos os isolados foram testados como parental masculino e feminino em cruzamentos intra e interespecíficos com todos os isolados que apresentaram *mating type* oposto. Testes de homotalismo também foram realizados, utilizando solução Tween 80 (0,01%) em vez de uma suspensão de esporos do isolado parental masculino, visando a confirmação dos resultados das PCRs. Para determinar a viabilidade dos ascospores, cirros de ascospores foram coletados de peritécios obtidos, suspensos em água destilada esterilizada e espalhados na superfície de placas de Petri contendo Ágar-Água a 2%. Após o período de incubação a 25 °C por 14 h, a germinação dos ascospores foi avaliada em microscópio óptico (Lima *et al.*, 2012).

3.6 DESENVOLVIMENTO DOS TESTADORES DE ESPÉCIE BIOLÓGICA E CLASSIFICAÇÃO DA FERTILIDADE FEMININA

Foram realizados cruzamentos intra-específicos utilizando isolados de FIESC 17 e FIESC 20 previamente demonstrados férteis, com o objetivo de gerar linhagens com a fertilidade feminina aumentada para serem usadas como testadores de espécie biológica. Desses cruzamentos, para cada espécie filogenética, cirros de ascospores foram selecionados aleatoriamente, coletados com agulha flambada e suspensos em 500 µl de solução Tween 80 (0,01%). As suspensões foram espalhadas na superfície de placas de Petri contendo Ágar-Água a 2%, utilizando alça de Drigalski, e após incubação a 25 °C por 14 h, ascospores individuais em processo de germinação foram excisados das placas contendo Ágar-Água e transferidos para CLA (Bentley, Summerell e Burgess, 2008). Posteriormente, esses isolados foram cultivados em meio líquido por mais 6 d para a extração de DNA e determinação do *mating type*, como descrito anteriormente.

Após a identificação do *mating type* por PCR, esses isolados foram retrocruzados como fêmeas com cepas parentais de *mating type* oposto, e então investigados em relação ao aumento dos níveis de fertilidade feminina. Algumas linhagens da progênie foram testadas em cruzamentos com isolados da mesma geração, quando não foi possível selecionar os testadores dos retrocruzamentos (Bentley, Summerell e Burgess, 2008). A fertilidade dos

cruzamentos foi classificada de acordo com o número de peritécios com exsudação de ascosporos visível, formados em um placa de Petri de 6 mm de diâmetro contendo cenoura-ágar. A fertilidade foi considerada baixa quando foram observados até dez peritécios férteis; moderada entre 10 e 29 peritécios férteis; e alta acima de 30 peritécios férteis.

4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.1 FILOGENIA MOLECULAR

Foram obtidas sequências parciais das regiões *EF-1 α* , *RPB1*, *RPB2*, ITS e LSU do DNA para oito isolados de *Fusarium* de *A. woglumi* e para 25 isolados de *D. opuntiae*. As sequências dos isolados descritos como espécies novas foram depositadas no *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, sob os números de acesso listados na Tabela 1.

As sequências geradas de *EF-1 α* , *RPB2*, ITS e LSU foram alinhadas com sequências de isolados representantes de todas as espécies filogenéticas conhecidas no FIESC, exceto para a espécie filogenética FIESC 31, que pertence ao clado Equiseti (Villani *et al.*, 2016). Essa exclusão foi feita porque para essa espécie não há sequências da maioria dos *loci* avaliados neste estudo. As sequências de *RPB1* foram alinhadas com sequências de isolados representando 24 das 31 espécies filogenéticas do FIESC. Para as demais espécies, não existem sequências de *RPB1* disponíveis nas bases de dados até o momento.

Incluindo os *gaps* de alinhamento, os conjuntos de dados compreenderam 704 caracteres, com 245 (34,80%) sítios variáveis para *EF-1 α* , 1452 caracteres com 326 (22,45%) sítios variáveis para *RPB1* e 1766 caracteres com 418 (23,67%) sítios variáveis para *RPB2*. Dos 505 e 500 sítios incluídos no alinhamento para ITS e LSU, apenas 20 (3,96%) e 24 (4,80%) foram variáveis, respectivamente. O marcador *EF-1 α* foi o mais rico em sítios variáveis dos cinco. Este gene mostra alto nível de polimorfismo de sequência em *Fusarium*, mesmo entre espécies intimamente relacionadas, e ser ortólogo no gênero. Por essas razões, *EF-1 α* é considerado o marcador de escolha como ferramenta de identificação de um único locus em *Fusarium* (Geiser *et al.*, 2004), seguido por *RPB1* e *RPB2*, que também provaram ter boa capacidade discriminatória em nível de espécie ou próximo, e ser ortólogos em todo o gênero (O'Donnell *et al.*, 2015).

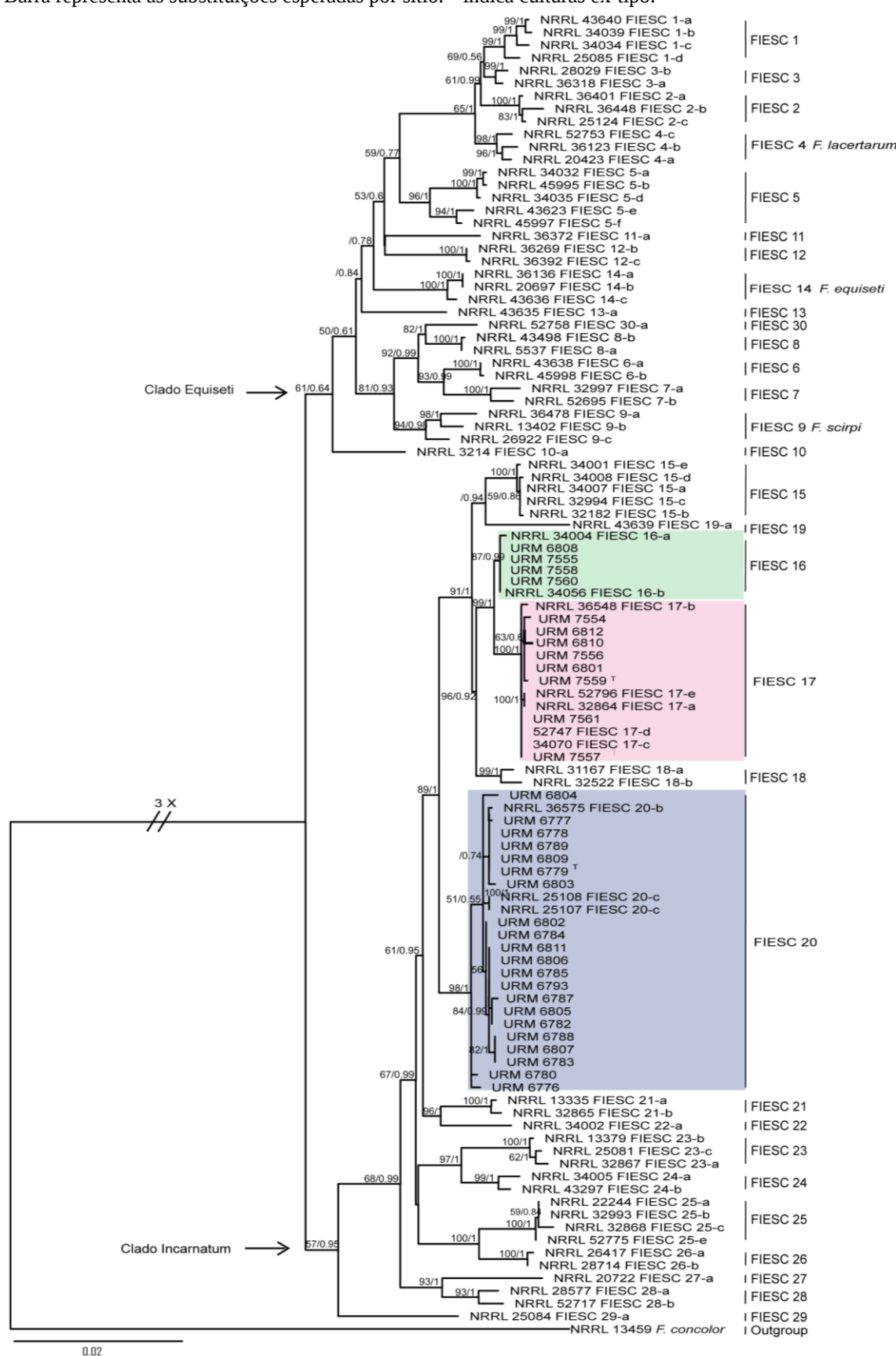
Tabela 1 - Origem, culturas e números de acesso no *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* das sequências de DNA dos isolados de *Fusarium* incluídos neste estudo

Hospedeiro	Código da Coleção ^a	Número de acesso das sequências				
		<i>EF-1α</i>	<i>RPB1</i>	<i>RPB2</i>	ITS	LSU
<i>Dactylopius opuntiae</i>	URM 6776	LS398463	MH668842	LS398492	MH668813	MH307666
	URM 6777	LS398464	MH668843	LS398493	MH668814	MH307667
	URM 6778	LS398465	MH668844	LS398494	MH668815	MH307668
	URM 6779	LS398466	MH668845	LS398495	MH668816	MH307669
	URM 6780	LS398467	MH668846	LS398496	MH668817	MH307670
	URM 6782	LS398468	MH668847	LS398497	MH668818	MH307671
	URM 6783	LS398469	MH668848	LS398498	MH668819	MH307672
	URM 6784	LS398470	MH668849	LS398499	MH668820	MH307673
	URM 6785	LS398471	MH668850	LS398500	MH668821	MH307674
	URM 6787	LS398472	MH668851	LS398501	MH668822	MH307675
	URM 6788	LS398491	MH668852	LS398502	MH668823	MH307676
	URM 6789	LS398473	MH668853	LS398503	MH668824	MH307677
	URM 6793	LS398474	MH668854	LS398504	MH668825	MH307678
	URM 6802	LS398475	MH668855	LS398505	MH668826	MH307679
	URM 6803	LS398476	MH668856	LS398506	MH668827	MH307680
	URM 6804	LS398477	MH668857	LS398507	MH668828	MH307681
	URM 6805	LS398478	MH668858	LS398508	MH668829	MH307682
	URM 6806	LS398479	MH668859	LS398509	MH668830	MH307683
	URM 6807	LS398480	MH668860	LS398510	MH668831	MH307684
	URM 6809	LS398481	MH668861	LS398511	MH668832	MH307685
	URM 6811	LS398482	MH668862	LS398512	MH668833	MH307686
	URM 6801	LS398483	MH668863	LS398513	MH668834	MH307687
	URM 6810	LS398485	MH668865	LS398515	MH668836	MH307689
	URM 6812	LS398484	MH668864	LS398514	MH668835	MH307688
<i>Aleurocanthus woglumi</i>	URM 7554	LS398486	MH668866	LS398516	MH668837	MH307690
	URM 7556	LS398487	MH668867	LS398517	MH668838	MH307691
	URM 7557	LS398488	MH668868	LS398518	MH668839	MH307692
	URM 7559	LS398489	MH668869	LS398519	MH668840	MH307693
	URM 7561	LS398490	MH668870	LS398520	MH668841	MH307694

^a Abreviatura da coleção de culturas: URM = Universidade do Recife Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Os modelos de substituição nucleotídica mais adequados às análises por inferência Bayesiana foram SYM+G para *EF-1 α* e *RPB2*, SYM+I+G para *RPB1*, JC+I para ITS e K80 para LSU. A análise de máxima verossimilhança (ML) foi realizada com o modelo de substituição GTR+I+G. As árvores de ML e BI apresentaram topologias similares. Análises filogenéticas multilocus resolveram os 33 isolados de *Fusarium* entomopatogênicos em três espécies filogenéticas de FIESC previamente determinadas usando uma abordagem filogenética multilocus (O'Donnell *et al.*, 2009). As filogenias baseadas no conjunto de dados de cinco genes combinados (Figura 2) suportaram fortemente quatro isolados na espécie filogenética FIESC 16, oito isolados na espécie filogenética FIESC 17, e 21 isolados na espécie filogenética FIESC 20, três espécies do clado Incarnatum.

Figura 2 – Árvore de Máxima Verossimilhança (ML) baseada em dados combinados das sequências *EF-1α*, *RPB1*, *RBP2*, ITS e LSU. Uma topologia similar foi gerada usando Inferência Bayesiana (BI). Valores de suporte de bootstrap (> 50%) e de probabilidade posterior (>0,5) são indicados nos internódios na ordem ML / BI. Barra representa as substituições esperadas por sítio. ^T indica culturas ex-tipo.

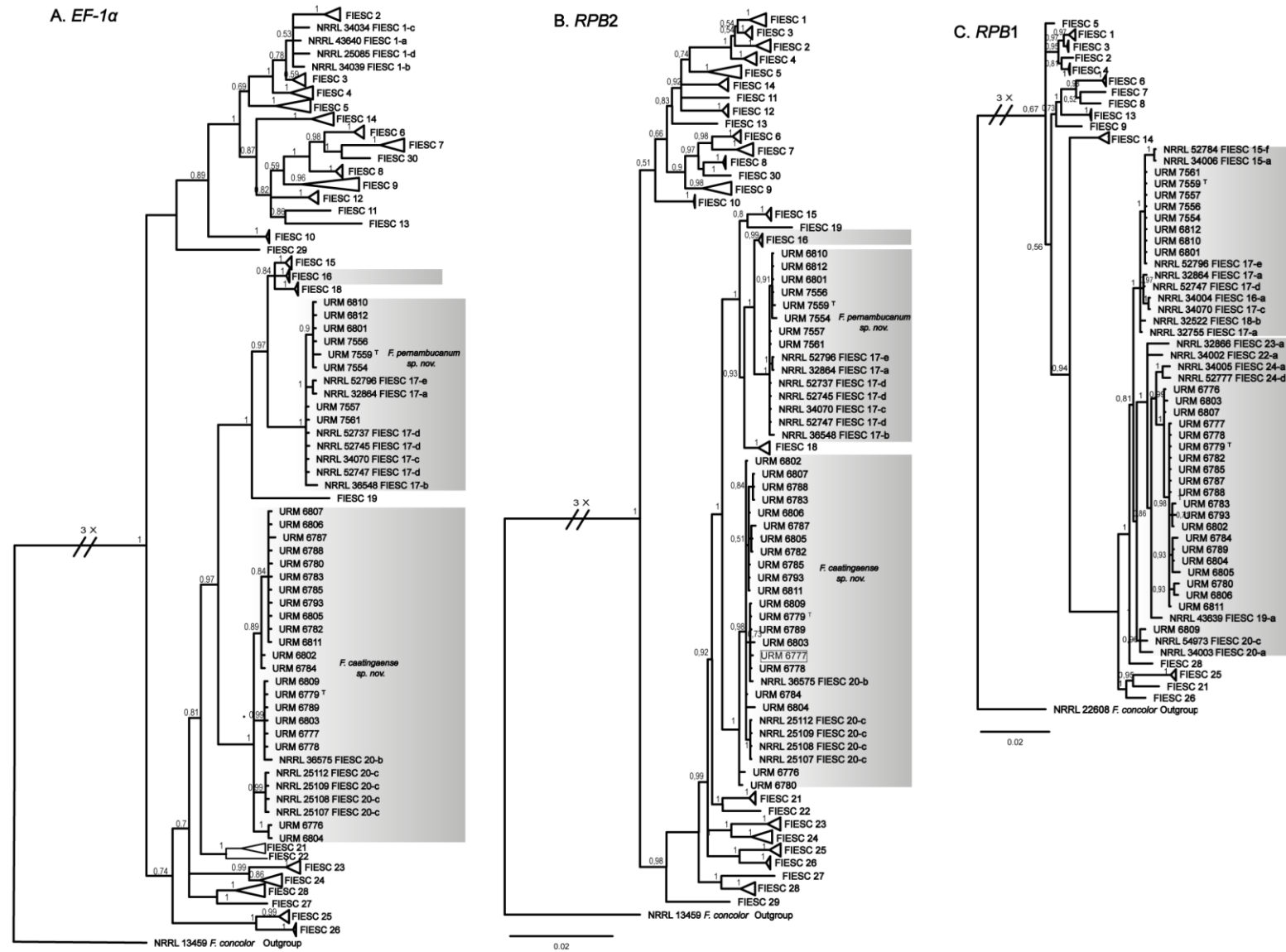


Topologias muito semelhantes foram produzidas por análises filogenéticas baseadas nos conjuntos de dados individuais de *EF-1 α* e *RPB2* (FIG. 3. A e B). Na genealogia de *RPB1* (Figura 3. C), as espécies filogenéticas FIESC 16, FIESC 17 e FIESC 20 não formaram grupos monofiléticos. Sequências de FIESC 16 e FIESC 17 formaram um clado monofilético com sequências de FIESC 15 e FIESC 18, enquanto sequências de FIESC 20 foram posicionadas em um clado irmão, formando um grupo monofilético com as espécies filogenéticas FIESC 19, FIESC 22, FIESC 23 e FIESC 24. Por esta razão, e com base em evidências morfológicas e nos resultados de compatibilidade sexual apresentados no tópico 4.2, foram designados nomes para duas das três espécies filogenéticas estudadas, descritas como *F. pernambucanum* e *F. caatingaense*.

As sequências de ITS e LSU não foram suficientemente variáveis para separar as espécies do FIESC ou resolver os isolados nos clados Equiseti e Incarnatum (dados não apresentados), mostrando-se altamente conservadas em FIESC. Sequências dessas regiões do DNA já foram incluídas em esquemas MLST dos complexos de espécies *F. solani* (O'Donnell *et al.*, 2008), *F. dimerum* (Schroers *et al.*, 2009), *F. chlamydosporum* e *F. incarnatum-equiseti* (O'Donnell *et al.*, 2009), mas em todos esses estudos esses marcadores provaram ser os *loci* menos informativos entre os amostrados. Por esta razão, as regiões ITS e LSU podem ser marcadores mais indicados para alocar isolados de *Fusarium* dentro de um complexo de espécies, mas não para a identificação em nível de espécie (Balajee *et al.*, 2009; O'Donnell *et al.*, 2015). Apesar dessa limitação, a região ITS, enquanto *barcode* de DNA oficial para fungos (Schoch *et al.*, 2012), continua sendo importante em estudos taxonômicos de *Fusarium*.

Não foram observados grupos monofiléticos correlacionados com hospedeiros para isolados de *A. woglumi* e *D. opuntiae*. O complexo de espécies no qual os fungos estudados foram resolvidos é considerado o mais rico em linhagens associadas a insetos dentro de *Fusarium* (O'Donnell *et al.*, 2012). Muitas dessas linhagens têm sido relatadas como eficientes no controle de pragas agrícolas, causando altas taxas de mortalidade em insetos e ácaros, ação rápida e abundante esporulação, características promissoras para o controle microbiano de insetos (Mikunthan e Manjunatha, 2006a, 2006b, 2007; Mohanty *et al.*, 2008; Addario e Turchetti, 2011; Ameen, 2012; Fan *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2016; Anwar *et al.*, 2017; Carneiro-Leão *et al.*, 2017). Isolados do FIESC também foram relatados associados a infecções em animais de interesse veterinário (O'Donnell *et al.*, 2016) e em humanos (Azor *et al.*, 2009; O'Donnell *et al.*, 2009, 2010; van Diepeningen *et al.*, 2014).

Figura 3 – Árvores de Inferência Bayesiana (BI) baseadas nas sequências de A. *EF-1α*, B. *RBP2* e C. *RPB1*. Probabilidades posteriores (> 0,5) são indicadas nos entrenós.



Como patógenos de plantas, as espécies do FIESC têm sido tradicionalmente consideradas patógenos fracos ou de importância secundária (Summerell *et al.*, 2003; Leslie e Summerell, 2011). No entanto, alguns estudos mais recentes apontam membros do FIESC como agentes causais importantes, com potencial para causar perdas econômicas (Mwaniki *et al.*, 2011; Madbouly *et al.*, 2012; Song, Yun e Kim, 2014; Hossain *et al.*, 2015; Ignjatov *et al.*, 2015; Mali *et al.*, 2015; Ayoubi e Soleimani, 2016; Ramdial *et al.*, 2016).

4.2 MATING TYPES E COMPATIBILIDADE SEXUAL

De acordo com os ensaios de PCR para a amplificação dos domínios α e HMG, FIESC 16, FIESC 17 e FIESC 20 possuem um sistema de acasalamento heterotático, com apenas um dos dois idiomorfos presentes em cada isolado testado, assim como os isolados de *F. equiseti*, *F. scirpi* e *F. semitectum* estudados por Kerényi *et al.* (2004). Dos 33 isolados, 20 (60,60%) apresentaram o idiomorfo *MAT1-1*, sendo três FIESC 16, cinco FIESC 17 e 12 FIESC 20, e 13 (39,40%) apresentaram o idiomorfo *MAT1-2*, dos quais um é do FIESC 16, três são FIESC 17 e nove FIESC 20 (Tabela 2).

Tabela 2 - *Mating type* dos isolados do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) obtidos de insetos

Espécie filogenética ^a	Isolados com idiomorfo <i>MAT1-1</i>	Isolados com idiomorfo <i>MAT1-2</i>
FIESC 16	URM 6808, URM 7555 e URM 7560	URM 7558
FIESC 17	URM 6810, URM 6812, URM 7556, URM 7557 e URM 7561	URM 6801, URM 7554 e URM 7559
FIESC 20	URM 6779, URM 6783, URM 6785, URM 6788, URM 6789, URM 6793, URM 6803, URM 6804, URM 6805, URM 6806, URM 6807 e URM 6811	URM 6776, URM 6777, URM 6778, URM 6780, URM 6782, URM 6784, URM 6787, URM 6802 e URM 6809

^a Espécie filogenética dentro do FIESC seguindo o sistema de nomenclatura para espécies crípticas baseado em esquema MLST por O'Donnell *et al.* (2009).

A presença e a transcrição dos *mating types*, indicando um sistema heterotático já haviam sido identificadas em *F. semitectum* (Kerényi *et al.*, 2004), embora o estágio sexual nunca tenha sido documentado para essa espécie. A transcrição de genes *MAT* em fungos sem estágio sexual conhecido não está completamente elucidada, mas estudos mostraram que os produtos *MAT* possuem múltiplos papéis reguladores ao longo do ciclo de vida dos fungos, incluindo o estágio assexuado (Hornok *et al.*, 2007; Ádám *et al.*, 2011; Böhm *et al.*, 2013) e que fungos presumidos assexuados podem possuir estágios sexuais crípticos, nunca observadas devido à raridade do acasalamento (Horn *et al.*, 2009a, 2009b; O'Gorman *et al.*,

2009; Seidl *et al.*, 2009; Böhm *et al.*, 2013), conforme mostrado neste estudo, no qual foi reportado o primeiro registro da fase sexuada em espécies do clado Incarnatum.

Cada isolado foi testado como parental masculino e parental feminino em cruzamentos intra e interespecíficos com todos os isolados do *mating type* oposto, totalizando 520 combinações (252 intra-específicas e 268 interespecíficas).

Dos quatro isolados de FIESC 16, oito isolados de FIESC 17 e 21 isolados de FIESC 20, 50%, 25% e 19% foram fêmeas férteis, respectivamente. Dois cruzamentos intra-específicos de FIESC 16 (33,33%), quatro cruzamentos intra-específicos de FIESC 17 (13,33%) e nove cruzamentos intra-específicos de FIESC 20 (4,16%) resultaram em peritécios férteis (Tabela 3). Os peritécios foram inicialmente observados uma ou duas semanas após a realização dos cruzamentos. A exsudação de ascospores foi observada aproximadamente duas a quatro semanas após os cruzamentos. As taxas de germinação dos ascospores dos cruzamentos férteis variaram de 95 a 100% após 14 horas de incubação em água ágar.

Tabela 3 - Cruzamentos que resultaram em peritécios ou protoperitécios

Espécies	♀ ^a	×	♂ ^b	Fertilidade ^c
FIESC 16	URM 7555	×	URM 7555	+
	URM 7560	×	URM 7555	+
FIESC 17	URM 7561	×	URM 6801	+
	URM 7561	×	URM 7554	+++
	URM 7561	×	URM 7559	+
	URM 7559	×	URM 7561	+
FIESC 20	URM 6776	×	URM 6811	+
	URM 6777	×	URM 6789	+
	URM 6779	×	URM 6777	+++
	URM 6779	×	URM 6778	++
	URM 6779	×	URM 6780	++
	URM 6779	×	URM 6784	+
	URM 6779	×	URM 6809	+
	URM 6811	×	URM 6777	+++
	URM 6811	×	URM 6780	++
Cruzamentos interespecíficos	URM 6779	×	URM 6801	-
	URM 6779	×	URM 7554	-
	URM 6779	×	URM 7559	-
	URM 6811	×	URM 6801	-
	URM 6811	×	URM 7554	-
	URM 7559	×	URM 6804	-
	URM 7559	×	URM 6811	-

^a Isolados utilizados como o parental feminino.

^b Isolados utilizados como o parental masculino.

^c (-) = protoperitécios ou peritécios estéreis; (+) = até dez peritécios férteis; (++) = de dez a 30 peritécios férteis; (+++) = acima de 30 peritécios férteis em uma placa de Petri de 60 mm contendo o meio cenoura-ágar.

Todos os isolados foram auto-estéreis, reforçando os resultados da PCR para a determinação do *mating type*, que indicou um sistema de acasalamento heterotático nas espécies estudadas. Nenhum dos cruzamentos interespecíficos produziu peritécios férteis; entretanto, em sete cruzamentos interespecíficos (Tabela 3) protoperitécios globosos ou peritécios estéreis foram formados, como resultado da fertilidade feminina dos isolados ou de uma compatibilidade sexual incompleta, como já observado entre outras espécies de *Fusarium* (Bowden *et al.*, 2006; Leslie e Bowden, 2008) e em outros gêneros (Harrington e McNewTurner, 1998; Jacobson e Taylor, 2010).

Em outros estudos, o sucesso na obtenção de peritécios maduros com ascósporos viáveis variou de 0% a 50% dos cruzamentos realizados (Leslie e Klein, 1996; Britz *et al.*, 1998; Aoki e O'Donnell, 1999; Covert *et al.*, 1999). O estágio sexual de *Fusarium* tem sido difícil de estabelecer em laboratório. Fatores ambientais, como temperatura, luz, umidade, concentração de CO₂ e O₂, pH e nutrientes, influenciam a reprodução sexual em ascomicetos e as condições ideais para a formação de peritécios ou exsudação de ascósporos podem variar amplamente entre as espécies e, portanto, são fatores críticos nos experimentos (Covert *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2009; Debuchy *et al.*, 2010; Manstretta e Rossi, 2016). Cruzamentos bem-sucedidos também dependem da fertilidade sexual dos isolados parentais, que pode ser afetada por diversos motivos, como subcultivos repetidos (Leslie *et al.*, 2005; Bentley *et al.*, 2008), degeneração cultural e funcionalidade dos genes *MAT* (Leslie e Summerell, 2006; Hornok *et al.*, 2007).

A esterilidade feminina contribui significativamente para a baixa frequência da reprodução sexual e parece ser comum em *Fusarium* devido a mutações em grande número de *loci* envolvidos na formação do peritécio. Isolados estéreis como fêmeas são favorecidos durante a reprodução assexuada porque concentram seus recursos metabólicos para a propagação vegetativa e não para a produção das estruturas femininas que são altamente elaboradas. Consequentemente, o sucesso de tais linhagens leva ao aumento gradual delas em uma população (Leslie e Klein, 1996; Hornok *et al.*, 2007). As porcentagens de fêmeas férteis observadas em FIESC 16, FIESC 17 e FIESC 20 neste estudo foram semelhantes às observadas em outras espécies de *Fusarium* (Leslie e Klein, 1996; Britz *et al.*, 1998; Covert *et al.*, 1999; Zeller *et al.*, 2003) e sugerem que a perda de funções femininas pode ser comum nessas espécies. Uma baixa frequência de fertilidade feminina indica que a frequência do sexo na natureza é rara (Leslie e Klein, 1996), o que justificaria o fato de os estágios sexuais não terem sido observados antes no clado *Incarnatum*.

4.3 MORFOLOGIA

Com base em dados filogenéticos, morfológicos e compatibilidade de cruzamentos sexuais, duas espécies do Complexo *Fusarium incarnatum-equiseti* foram descritas como *Fusarium pernambucanum* sp. nov. e *Fusarium caatingaense* sp. nov.

Fusarium caatingaense A.C.S. Santos, C.S. Lima, P.V. Tiago, N.T. Oliveira, sp. nov. Figura 4. MycoBank: MB826680.

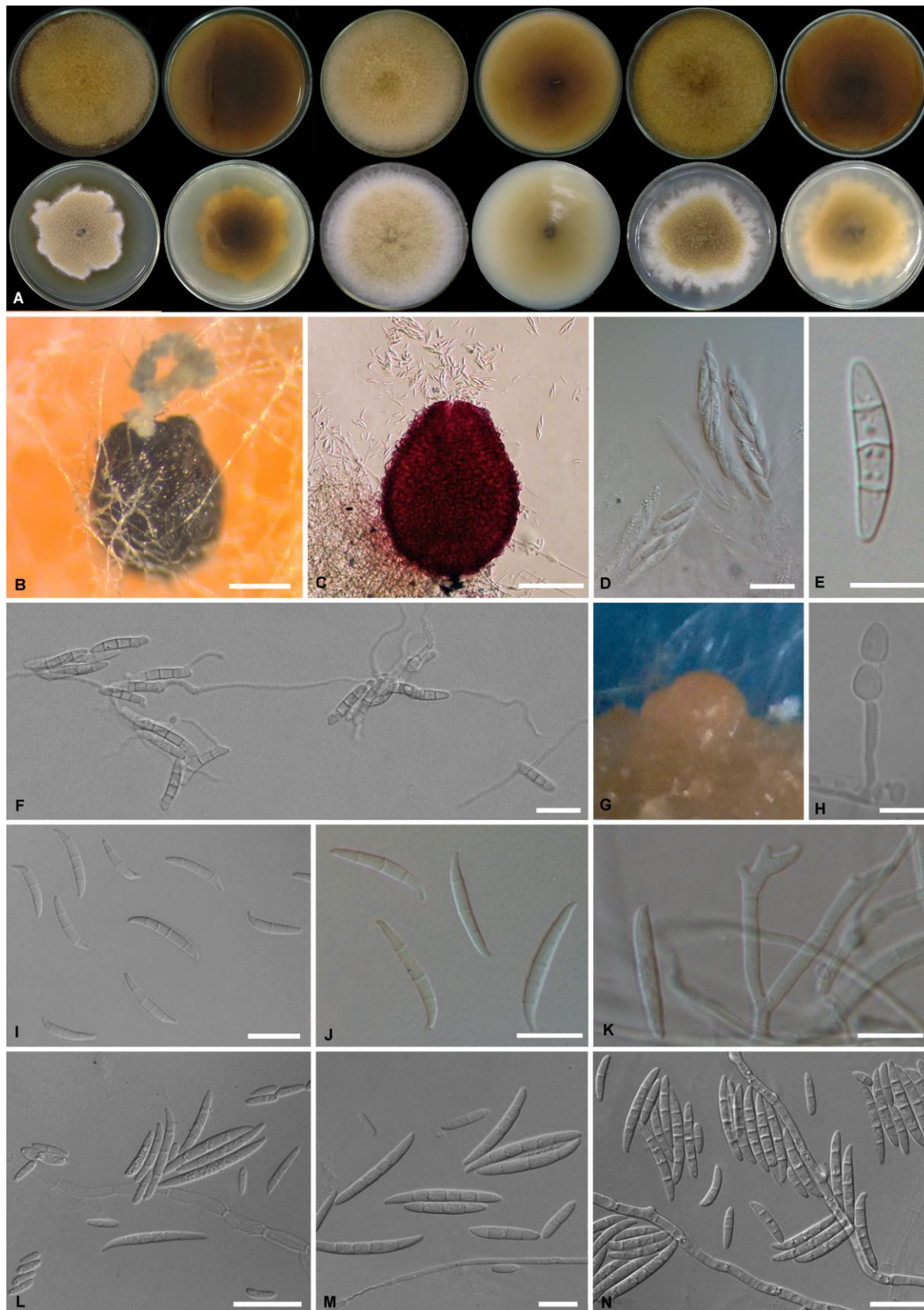
Tipificação: BRASIL. Pernambuco, Ibimirim, isolado de *Dactylopius opuntiae*, Julho 2011, P.V. Tiago (holótipo URM 91192). Cultura ex-tipo: MUM 1859 = URM 6779. GenBank: *EF-1α* = LS398466; ITS = MH668816; *RPB1* = MH668845; *RPB2* = LS398495; LSU = MH307669.

Etimologia: Em referência ao Bioma Caatinga, onde o espécime-tipo foi encontrado.

Descrição das características morfológicas: ESTROMA ausente. PERITÉCIOS solitários a agregados, superficiais, ocasionalmente imersos, ovóides a obpiriformes, (230–)250–400(–410) × (160–)180–260(–280) μm (= 313,7 ± 47 × 231,6 ± 37 μm), preto azulado em água, tornando-se mais claros em KOH 3%, vermelho purpúreo em ácido láctico não diluído (cerca de 90%). PERÍDIO formado por células angulares (*textura angularis*), maiores no ápice do ascoma. ASCOS com oito esporos, clavados, (49,2–)55–93(–110) × 11,2–16,3 μm ($\bar{x}$ = 76.9 ± 13.6 × 13.3 ± 1.3 μm). ASCOSPOROS fusóides a naviculares, retos a curvos, (16,2–)17,5–27,5(–28,7) × 3,7–6,3 μm ($\bar{x}$ = 23,8 ± 2,8 × 5,1 ± 0,4 μm), com extremidades arredondadas, levemente pigmentados, lisos a minuciosamente verrucosos, ligeiramente constrictos nos septos, geralmente com 3 septos. COLÔNIAS em BDA com taxa de crescimento micelial radial de 15,7 a 17,7 mm por dia a 25 °C e 13,5 a 16 mm por dia a 30 °C no escuro; margem inteira a ondulada. Cor da colônia *buff* a mel, branco a *rosy buff* na margem. Reverso *umbrina* a *sienna*, *buff* a mel a canela, ou salmão a âmbar. Micélio aéreo variando de esparsos a abundantes, denso, flocoso, ou um pouco pulverulento em culturas envelhecidas. CONIDIÓFOROS AÉREOS abundantes, simples, reduzidos às células conidiogênicas ou não, 6–70 μm de altura, ou com ramificação simpodial, isodictômica a anisodictômica ou, ocasionalmente, verticilado, 20–120 μm de altura. FIÁLIDES subuladas a subcilíndricas, com colarinhos curtos, ocasionalmente visíveis, sem espessamento periclinal observado; monofiálides em conidióforos aéreos 6–42,5

$\times 2-3,5 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 14,5 \pm 8,7 \times 2,8 \pm 0,5 \mu\text{m}$); polifiálides em conidióforos aéreos $10-30 \times 2,5-5(-6,5) \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 18,2 \pm 8 \times 4,2 \pm 0,8 \mu\text{m}$), 2-3(-5) aberturas conidiogênicas, geralmente se desenvolvendo em uma sequência simpodial. CONÍDIOS AÉREOS de diferentes tipos: (I) longos, retos a falcados, com linhas dorsal e ventral quase paralelas ou com o lado ventral ligeiramente mais reto, com célula apical cônica ou desgastada, as vezes curvada, e célula basal papilada ou quase entalhada, 3-6 septos: 3 septos: $20-43,5 \times 3,5-5 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 34,3 \pm 6,6 \times 3,7 \pm 0,5 \mu\text{m}$), 4 septos: $32-43,5 \times 3,5-5 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 38 \pm 4,2 \times 4,4 \pm 0,7 \mu\text{m}$), 5 septos: $28,5-49 \times 3,5-6 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 41,3 \pm 4,6 \times 4,4 \pm 0,8 \mu\text{m}$), 6 septos: $41-45 \times 4,5-6 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 42,9 \pm 0,7 \times 4,9 \pm 0,1 \mu\text{m}$); (II) fusoides, com ápices arredondados ou pontiagudos, 1-3 septos: 1 septo: $13-22,5 \times 2,5-4 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 17,3 \pm 3,3 \times 3 \pm 0 \mu\text{m}$), 2 septos: $17-23 \times 3-4 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 21,2 \pm 3,6 \times 3,4 \pm 0,5 \mu\text{m}$), 3 septos: $17,5-31,5 \times 3-5 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 24,2 \pm 3,8 \times 4,5 \pm 0,6 \mu\text{m}$); (III) clavados curtos, retos ou ligeiramente curvados, 0-2 septos: 0 septo: $10-16 \times 3-4 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 13,6 \pm 2,9 \times 3,7 \pm 0,1 \mu\text{m}$), 1 septos: $12,5-17,5 \times 3-4 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 15,2 \pm 2 \times 3,9 \pm 0,2 \mu\text{m}$), 2 septos: $15-18 \times 3,5-4 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 16,3 \pm 1,8 \times 3,8 \pm 0,4 \mu\text{m}$); (IV) e oval ou obovóide a piriforme, 0-1 septado: 0 septo: $6-12,5 \times 2,5-4 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 8,5 \pm 2,1 \times 3,1 \pm 0,5 \mu\text{m}$), 1 septo: $8,5-11,5 \times 2,5-4 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 10 \pm 3,1 \times 3,1 \pm 0,3 \mu\text{m}$). ESPORODÓQUIOS de coloração creme a laranja. CONIDIÓFOROS ESPORODOQUIAIS simples, geralmente reduzidos às células conidiogênicas, 5 a $18,5 \mu\text{m}$ de altura, ou às vezes verticilamente ramificados, 20 a $50 \mu\text{m}$ de altura, suportando 2 a 3 fiálides apicais e raramente fiálides laterais; FIÁLIDES esporodoquias subuladas, ampuliformes a subcilíndricas, $5-13(-18,5) \times 2-3 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 11,3 \pm 4,5 \times 2,7 \pm 0,5 \mu\text{m}$), às vezes mostrando um colarinho reduzido. CONÍDIOS ESPORODOQUIAIS falcados, com linhas dorsal e ventral geralmente quase paralelas na região medial do conídio, e às vezes gradualmente e ligeiramente mais largas em direção às extremidades; a maioria com 3 septos, frequentemente 4-5 septos, raramente 1-2 septos, medindo: 1 septo: $(15-17-18,5(-21) \times 2-3,5 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 17,8 \pm 2,2 \times 2,6 \pm 0,5 \mu\text{m}$); 2 septos: $16-24 \times 2-3,5 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 20,7 \pm 3,9 \times 2,8 \pm 0,8 \mu\text{m}$); 3 septos: $(18)21-27,5(-31,5) \times (2,5-3-4(-4,5) \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 25,3 \pm 2,8 \times 3,3 \pm 0,4 \mu\text{m}$); 4 septos: $(22-24-37(-40) \times 2,5-3 (-4) \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 30,4 \pm 5 \times 3,4 \pm 0,4 \mu\text{m}$); 5 septos: $(26)28-43(-50) \times 3-4,5(-5) \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 35,3 \pm 6,4 \times 3,7 \pm 0,7 \mu\text{m}$); células apicais em forma de gancho, papiladas ou entalhadas; células basais em forma de pé. CLAMIDOSPOROS produzidos ocasionalmente, formados principalmente em cadeias, esporadicamente em conídios ou em pares intercalares, de paredes lisas, às vezes verrucosas, $6-14 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 8,5 \pm 2,1 \mu\text{m}$) diam.

Figura 4. *Fusarium caatingaense*. A. Colônias de três isolados (superfície e reverso) cultivados em BDA por 7 d a 25 °C (primeira linha) e a 30 °C (segunda linha). B. Peritécio em meio cenoura-água. C. Peritécio montado em ácido láctico 90%. D. Ascos. E. Ascosporo. F. Ascosporos em germinação. G. Esporodóquios produzidos em folha de cravo. H. Clamidosporos. I, J. Conídios esporodóquiais. K. Conídio e polifiálide aéreos. L, M, N. Conídios aéreos. Barras de escala: B, C = 100, D, F, I, J, L, N = 20, E, H, K, M = 10.



Outros espécimes analisados: BRASIL. Pernambuco, isolado de *Dactylopius opuntiae*, Jul 2011, P.V. Tiago: Sertânia, cultura URM 6777; Tuparetama, cultura URM 6778; Ibimirim, cultura URM 6779; Venturosa, cultura 6780; Tupanatinga, cultura URM 6784; Venturosa, cultura URM 6787; Arcoverde, cultura URM 6793; Manari, cultura URM 6805; Buíque, cultura URM 6806; Tabira, cultura URM 6807; Inajá, cultura URM 6809.

Notas: Uma variedade de formas conidiais foi encontrada em *F. caatingaense*. Esta espécie produz macroconídios esporodoquiais e aéreos, além de outros conídios menores produzidos em mono e polifiálides do micélio aéreo. *Fusarium semitectum*, *F. incarnatum*, *F. pallidoroseum* e *F. scirpi* também produzem macro e microconídios e mono- e polifiálides, enquanto *F. equiseti* produz apenas monofiálides e macroconídios. *Fusarium equiseti* e *F. scirpi* têm curvatura dorsiventral mais pronunciada que *F. caatingaense* e possuem célula apical e basal mais alongadas. Além disso, os conídios esporodoquiais de *F. caatingaense* apresentam em sua maioria 3 septos, frequentemente 4–5 septos, raramente 1–2 septos, medindo $15\text{--}50 \times 2\text{--}5 \mu\text{m}$, enquanto que os de *F. equiseti* principalmente 5 septos, raramente 3–4 septos, excepcionalmente 0–2 ou 6–12 septos, $20\text{--}83 \times 3\text{--}5,7 \mu\text{m}$ e *F. scirpi* em sua maioria 5 septos, raramente 3–4 septos, excepcionalmente 0–2 ou 6–7 septos, $25\text{--}55 \times 3,5 \text{ a } 6,5 \mu\text{m}$ (Wollenweber, 1931).

Fusarium pernambucanum A.C.S. Santos, C.S. Lima, P.V. Tiago e N.T. Oliveira, sp. nov.
Figura 5. MycoBank: MB825273.

Tipificação: BRASIL. Pernambuco, Paudalho, isolado de *Aleurocanthus woglumi*, junho 2016, A.C.S. Santos (holótipo URM 91193). Cultura ex-tipo MUM 1862 = URM 7559. GenBank: *EF-1 α* = LS398489; ITS = MH668840; *RPB1* = MH668869; *RPB2* = LS398519; LSU = MH307693.

Etimologia: Referindo-se a Pernambuco, o estado do nordeste brasileiro onde o espécime-tipo foi encontrado.

Descrição das características morfológicas: ESTROMA ausente. PERITÉCIOS solitários a agregados, principalmente superficiais, com a base fortemente aderida ao micélio, algumas vezes imersa no substrato, ovóide a obpiriforme, $(240\text{--})260\text{--}300(\text{--}315) \times 170\text{--}235 \mu\text{m}$ ($x^- = 287,2 \pm 19,5 \times 209,2 \pm 16,4 \mu\text{m}$), preto azulados na água, tornando-se mais claros em KOH

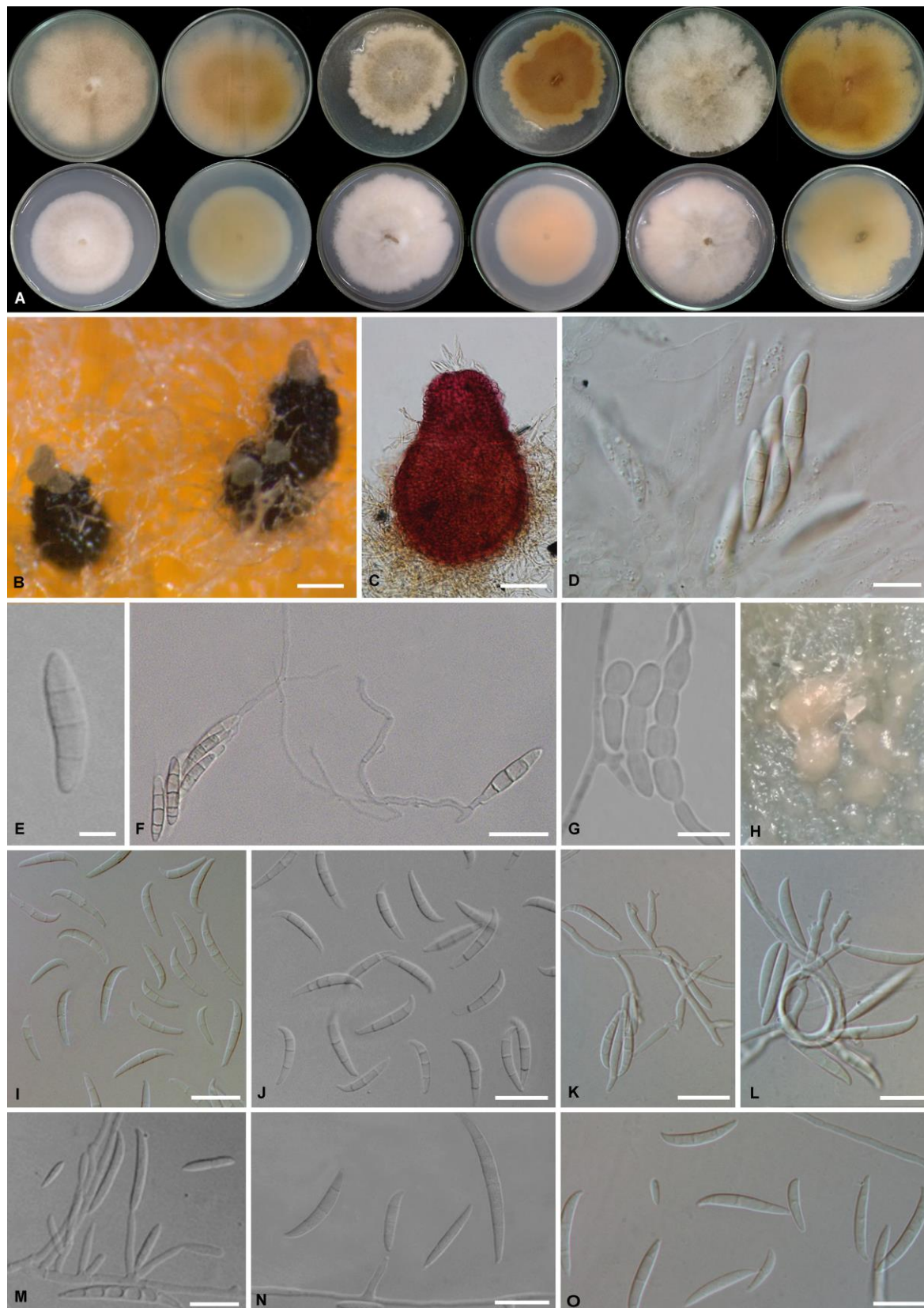
3% e avermelhados em ácido láctico não diluído (cerca de 90%). PERÍDIO formado por células angulares (*textura angularis*) na superfície ascomatal, com as maiores células no ápice do ascomata. ASCOS com oito esporos, clavados, $(48-62-68,5(-76,5) \times 10-12,5 \mu\text{m})$ ($\bar{x} = 64,4 \pm 9,4 \times 11,1 \pm 1,1 \mu\text{m}$). ASCOSPOROS fusoides ou naviculares, retos ou ligeiramente curvos, $(17,5-18,8-23,8(-25) \times (4-5(-6,3) \mu\text{m})$ ($\bar{x} = 20,9 \pm 2,1 \times 5,1 \pm 0,4 \mu\text{m}$), com ambas as extremidades arredondadas, levemente pigmentados, suavemente verrucosos, levemente contraídos nos septos, geralmente 3 septos. COLÔNIAS em BDA com taxas de crescimento micelial radial de 7,5 a 12 mm por dia a 25 °C e 9 a 12,5 mm por dia a 30 °C no escuro. Margem de colônia inteira a ondulada. Cor da colônia *rosy buff* ou *buff* para avelã com margem branca para *buff*. Reverso mel para *rosy buff*, borda *buff* para salmão. Micélio aéreo esparso a denso abundante, flocoso. CONIDIÓFOROS AÉREOS simples, reduzidos a células conidiogênicas ou não, 2–62,5 μm de altura, ou com ramificação simpodial, isodicotômica a anisodicotômica ou, ocasionalmente, verticiladamente, 20–160 μm de altura. FIÁLIDES subuladas a subcilíndricas, com pequenos colarinhos ocasionalmente visíveis, e sem espessamento periclinal observado. Monofiálides de conidióforos aéreos: 2–46(–62,5) $\times$ 1–3 μm ($\bar{x} = 18,1 \pm 13 \times 2,5 \pm 0,8 \mu\text{m}$). Polifiálides de conidióforos aéreos: 8–20 $\times$ 2–5(–6) μm ($\bar{x} = 14 \pm 4,2 \times 4,4 \pm 1,5 \mu\text{m}$), 2–3(–5) aberturas conidiogênicas geralmente se desenvolvendo em uma sequência simpodial. CONÍDIOS produzidos em micélio aéreo, em sua maioria (I) longos, falcados, ocasionalmente retos, lado dorsal mais curvo que o ventral, com uma célula apical curvada, romba ou cônica, e a célula basal papilada ou entalhada ou em forma de pé, 3–6(–7) septos: 3 septos: $(17,5-21-37(-43,5) \times 2,5-3,5 \mu\text{m})$ ($\bar{x} = 28,8 \pm 4 \times 3,7 \pm 0,7 \mu\text{m}$), 4 septos: $25-41 \times 3-5 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 34,9 \pm 4,6 \times 4,4 \pm 0,7 \mu\text{m}$), 5 septadas: $27,5-43 \times 3,5-5 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 36 \pm 3,9 \times 4,6 \pm 0,9 \mu\text{m}$), 6 septos: $36-55 \times 3,5-5 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 43,8 \pm 7 \times 4,7 \pm 0,5 \mu\text{m}$), 7 septos: $49-57 \times 4,5-5 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 52,8 \pm 3,2 \times 4,9 \pm 0,2 \mu\text{m}$); (II) fusóide com ápices arredondados ou pontiagudos, 1–3 septos: 1 septo: $12,5-16,5 \times 2,5-3,5 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 14,3 \pm 1,7 \times 2,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$), 2 septos: $16,5-20 \times 2,5-3,5 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 18,5 \pm 1,7 \times 3,1 \pm 0,4 \mu\text{m}$), 3 septos: $17,5-21,5(-27,5) \times 2,5-4 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 21,9 \pm 4,6 \times 3,5 \pm 0,4 \mu\text{m}$); (III) clavados curtos, ligeiramente curvados, 0–2 septos: 0 septo: $11-16 \times 2,5-3 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 13,1 \pm 2,2 \times 2,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$), 1 septo: $11-17,5 \times 2,5-4,5 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 13,1 \pm 2,6 \times 3,2 \pm 0,7 \mu\text{m}$), 2 septos: $12,5-17,5 \times 2,5-4,5 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 16,2 \pm 2,1 \times 3 \pm 0,5$); (IV) e obovóides a piriformes, 0–1 septo: 0 septo: $5-13,5 \times 2-4 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 7,8 \pm 1,9 \times 2,7 \pm 0,6 \mu\text{m}$), 1 septo: $7-15 \times 2,5-5 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 10,8 \pm 3 \times 3,1 \pm 1 \mu\text{m}$) são menos frequentes. ESPORODÓQUIOS laranja pálido a laranja. CONIDIÓFOROS ESPORODOQUIAIS simples, reduzidos às células conidiogênicas, 7,5 a 14 μm de altura, ou verticilamente ramificados, 15 a 35 μm de altura, suportando de 3 a 5 monofiálides apicais e

as vezes monofiálides laterais; FIÁLIDES esporodoquiais ampuliformes, subuladas a lageniformes, $6\text{--}14.5 \times 2.5\text{--}4 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 9.6 \pm 3 \times 3 \pm 0.4 \mu\text{m}$), às vezes mostrando um colarete reduzido. CONÍDIOS ESPORODOQUIAIS falcados, com linhas dorsais e ventrais, muitas vezes gradualmente mais largas em direção ao ápice, célula apical curva e células basais em forma de pé, apresentando principalmente 3 septos, frequentemente 4–5 septos, raramente 1–2 septos, mensurando: 1 septo: $(11\text{--})15\text{--}17(\text{--}21.5) \times 2\text{--}4 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 15.9 \pm 2.9 \times 3 \pm 0.6 \mu\text{m}$); 2 septos: $12\text{--}22(\text{--}25) \times 2\text{--}3.5(\text{--}4) \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 16.7 \pm 4.6 \times 2.9 \pm 0.7 \mu\text{m}$); 3 septos: $(16\text{--})18\text{--}27.5(\text{--}28.5) \times 2.5\text{--}4(\text{--}5) \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 22.9 \pm 2.9 \times 3.2 \pm 0.7 \mu\text{m}$); 4 septos: $(25\text{--})26.5\text{--}35 \times 2.5\text{--}5 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 29.2 \pm 3.1 \times 3.7 \pm 0.9 \mu\text{m}$); 5 septos: $(26.5\text{--})28\text{--}33.5(\text{--}36.5) \times 3\text{--}5 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 32.5 \pm 2.8 \times 4 \pm 0.8 \mu\text{m}$). CLAMIDOSPOROS produzidos esporadicamente, formados principalmente em cadeias, eventualmente em conídios, ocasionalmente simples ou em pares intercalares, de paredes lisas, $5\text{--}8 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 6.1 \pm 1 \mu\text{m}$) de diâmetro.

Outros espécimes examinados: Brasil. Pernambuco, isolado de *Dactylopius opuntiae*, Julho 2011, P.V. Tiago: Flores, cultura URM 6801; Afogados da Ingazeira, cultura URM 6810; Águas Belas, cultura URM 6812; isolado de *Aleurocanthus woglumi*, junho de 2016, A.C.S. Santos: Paudalho, cultura URM 7554; Paudalho, cultura URM 7556; Paudalho, cultura URM 7557; Paudalho, cultura URM 7561.

Notas: *Fusarium pernambucanum* apresenta características morfológicas em comum com *F. caatingaense*, diferindo pelo comprimento e morfologia de seus conídios esporodoquiais formados em CLA, que são mais longos em *F. caatingaense* e com células apicais de curvatura menos pronunciada em relação àquelas produzidas por *F. pernambucanum*. Além disso, enquanto em *F. pernambucanum* a célula basal é distintamente em forma de pé, em *F. caatingaense* a célula basal pode ser papilada, entalhada ou em forma de pé. Essas espécies também podem ser distinguidas pela taxa de crescimento em BDA, que é mais lenta em *F. pernambucanum*.

Figura 5. *Fusarium pernambucanum*. A. Colônias de três isolados (superfície e reverso) cultivados em BDA a 25 °C (primeira fileira) e a 30 °C (segunda fileira). B. Peritécios em meio cenoura-água. C. Peritécio em ácido láctico 90%. D. Ascos. E. Ascosporo. F. Ascosporos em germinação. G. Clamidosporos. H. Esporodóquios em folha de cravo. I, J. Conídios esporodoquiais. K, L. Conídios aéreos e polifiálides. M, N. Conídios aéreos e monofiálides. O. Conídios aéreos. Barras de escala: B= 150, C= 70, D, G, L, M, N, O = 10, E = 5, F, I, J, K = 20.



As espécies *F. semitectum*, *F. incarnatum* e *F. pallidoroseum* são ligadas ao clado Incarnatum. No entanto, existem problemas taxonômicos e nomenclaturais associados a esses nomes. O epíteto "incarnatum" é o mais antigo dos três (Saccardo, 1886), enquanto *Fusarium semitectum* foi o nome mais usado na literatura, incluindo as variedades *semitectum* e *majus*, distinguidas com base na septação e tamanho dos conídios (Gerlach e Nirenberg, 1982). Subramanian (1971) indicou que *F. semitectum* var. *majus* corresponde a *F. incarnatum*. Apesar disso, Booth e Sutton (1984) verificaram que o espécime tipo de *F. semitectum* é idêntico a *Colletotrichum musae*, e sinonimizou *F. semitectum* com *Fusarium pallidoroseum*, indicando este nome como o correto para a espécie, e rejeitou a separação das espécies em variedades. Gams e Nirenberg (1989) aceitaram essa mudança de nome no ranking de espécies, mas ainda assim reconheceram *F. pallidoroseum* var. *majus* no grau de variedade.

Dessa forma, se as variedades morfológicas *majus* e *semitectum* pudessem ser separadas como dois táxons diferentes na classificação de espécies, var. *majus* seria chamado *F. incarnatum* e var. *semitectum* como *F. pallidoroseum*. Entretanto, se fossem resolvidas em um único táxon, ambos os nomes deveriam ser sinonimizados sob *F. incarnatum*, que representa o epíteto mais antigo, como apontado por Nirenberg (1990). Devido à falta de consenso sobre o uso desses nomes, e ao fato de a conexão deles com as espécies filogenéticas do FIESC estar pendente, esses nomes não tem sido aplicados (O'Donnell *et al.*, 2009).

Apesar da alta diversidade filogenética no FIESC e da diferença filogenética entre *F. caatingaense* e *F. pernambucanum*, estas espécies são morfológicamente semelhantes e apresentam características morfológicas que em geral concordam com as descrições originais de *F. semitectum*, *F. incarnatum* e *F. pallidoroseum*, como esperado devido aos altos níveis de especiação críptica e homoplasia morfológica no FIESC (Castellá e Cabañes, 2014). No entanto, *F. caatingaense* e *F. pernambucanum* diferiram em algumas características morfológicas, especialmente nas dimensões e morfologia dos conídios esporodoquiais formados no CLA. No entanto, essas diferenças não são suficientemente robustas para realizar uma identificação em nível de espécie usando apenas caracteres morfológicos, uma vez que o número de características morfológicas diagnósticas entre espécies de *Fusarium* é limitado (Castellá e Cabañes, 2014) e, muitas vezes, espécies filogeneticamente distantes podem ser muito semelhantes morfológicamente (Moussa *et al.*, 2017). Portanto, abordagens polifásicas, integrando marcadores biológicos e moleculares filogenéticos aos morfológicos fornecem uma identificação mais confiável (Leslie e Summerell, 2006).

As razões pelas quais as alterações morfológicas não estão alinhadas com a especiação no FIESC podem estar correlacionadas com uma seleção estabilizadora da morfologia, na qual as alterações morfológicas não acompanham a diversificação de novas espécies, enquanto mecanismos como diferenciação de feromônios ou comportamentais estão atuando em uma especiação críptica. Outra suposição comum sobre espécies crípticas é que muitas delas resultaram de uma especiação recente na qual características morfológicas ou características diagnósticas ainda não evoluíram (Bickford *et al.*, 2007), já que a divergência fisiológica e biológica frequentemente precede a divergência morfológica na evolução de espécies fúngicas (Hawksworth e Lucking, 2017). Estes dados destacam a importância do uso de abordagens polifásicas para a circunscrição de espécies de *Fusarium*.

4.4. MATING TYPES DA PROGÊNIE E CRUZAMENTOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE CEPAS TESTADORAS

Para os experimentos visando o melhoramento da fertilidade feminina para a seleção de testadores de espécies biológicas, cinquenta e dois isolados foram selecionados aleatoriamente a partir da progênie de ascosporos viáveis obtidos de dez cruzamentos. Desses, 22 apresentaram o idiomorfo *MAT1-1* e 22 o idiomorfo *MAT1-2*. Não foi possível determinar o *mating type* de oito isolados, para os quais nenhuma das reações de PCR visando a amplificação dos idiomorfos *MAT* funcionou. Esses isolados de *mating type* desconhecido foram cruzados como fêmeas com isolados de ambos os *mating types*, sem êxito na obtenção dos peritécios, indicando a incapacidade desses isolados em atuarem como fêmeas (Tabela 4).

Dos 52 isolados, 24 foram da primeira geração (F1) dos cruzamentos intra-específicos de isolados de *Fusarium caatingaense* e *F. pernambucanum* demonstrados férteis neste estudo. Entre os isolados F1, 14 (58 %) foram aptos a produzir a estrutura feminina, e oito, quando cruzados com um isolado parental como macho, produziram peritécios férteis, sendo uma fertilidade baixa observada em quatro cruzamentos, fertilidade moderada em dois e fertilidade alta em dois cruzamentos. Entre os 28 isolados da geração F2, 17 (61 %) foram fêmeas e 15 cruzamentos produziram peritécios férteis, dos quais quatro apresentaram fertilidade baixa, nove apresentaram fertilidade moderada, e apenas dois apresentaram fertilidade alta (Tabela 4). A taxa de germinação dos ascosporos dos cruzamentos férteis variou de 47 a 95% após 14 horas de incubação em ágar-água.

O percentual de fêmeas entre as progênies F1 e F2 foi semelhante, mas quando comparado com os percentuais de fêmeas entre os isolados parentais, observou-se um

aumento nas gerações F1 e F2 para *F. caatingaense* e geração F2 para *F. pernambucanum*. Em *F. caatingaense* 19% dos isolados parentais foram fêmeas, enquanto 68 e 77% dos isolados das gerações F1 e F2 formaram estruturas femininas. Em *F. pernambucanum* observou-se 25, 25% e 60% de fêmeas entre os isolados parentais, da geração F1 e geração F2, respectivamente.

Tabela 4 – Isolados da progênie avaliados, *mating types* e cruzamentos para a seleção dos testadores

Espécie	Código do isolado ^a	Cruzamento que deu origem	Geração	Mating type	Cruzamentos	
					♂ ^b	Fertilidade ^e
<i>F. caatingaense</i>	ACS 5	URM 6811 x URM 6780	F1	<i>MAT1-1</i>	URM 6777	- ^c
					ACS 13	- ^c
	ACS 6	URM 6811 x URM 6780	F1	<i>MAT1-2</i>	URM 6779	-
	ACS 7	URM 6779 x URM 6777	F1	<i>MAT1-1</i>	URM 6777	-
	ACS 8	URM 6779 x URM 6777	F1	<i>MAT1-1</i>	URM 6777	-
	ACS 9	URM 6779 x URM 6777	F1	<i>MAT1-2</i>	URM 6779	-
	ACS 10	URM 6779 x URM 6777	F1	<i>MAT1-2</i>	URM 6779	- ^c
	ACS 11	URM 6779 x URM 6777	F1	<i>MAT1-2</i>	URM 6779	+ +
	ACS 12	URM 6779 x URM 6777	F1	<i>MAT1-1</i>	URM 6777	-
	ACS 13	URM 6779 x URM 6777	F1	<i>MAT1-2</i>	URM 6779	+ + +
					ACS 31	+ +
	ACS 14	URM 6779 x URM 6777	F1	<i>MAT1-1</i>	URM 6777	+
	ACS 15	URM 6779 x URM 6777	F1	<i>MAT1-1</i>	URM 6777	- ^c
	ACS 16	URM 6779 x URM 6777	F1	<i>MAT1-1</i>	URM 6777	-
	ACS 17	URM 6779 x URM 6777	F1	<i>MAT1-2</i>	URM 6779	+
	ACS 18	URM 6779 x URM 6777	F1	<i>MAT1-1</i>	URM 6777	- ^c
	ACS 19	URM 6779 x URM 6777	F1	<i>MAT1-1</i>	URM 6777	-
	ACS 20	URM 6779 x URM 6777	F1	<i>MAT1-1</i>	URM 6777	- ^c
	ACS 21	URM 6779 x URM 6777	F1	<i>MAT1-1</i>	URM 6777	+
	ACS 22	URM 6779 x URM 6777	F1	<i>MAT1-1</i>	URM 6777	+ + +
					ACS 35	-
	ACS 23	URM 6779 x URM 6777	F1	Não determinado	URM 6777	- ^c
					URM 6779	- ^c
	ACS 24	URM 6777 x URM 6789	F1	<i>MAT1-1</i>	URM 6777	- ^c
	ACS 25	ACS 13 x URM 6779	F2	Não determinado	URM 6777	-
					URM 6779	-
	ACS 26	ACS 13 x URM 6779	F2	<i>MAT1-2</i>	URM 6779	+
	ACS 27	ACS 13 x URM 6779	F2	<i>MAT1-2</i>	URM 6779	+ +
					ACS 31	-
	ACS 28	ACS 13 x URM 6779	F2	<i>MAT1-2</i>	URM 6779	+ +
					ACS 31	-
	ACS 29	ACS 13 x URM 6779	F2	Não determinado	URM 6777	-
					URM 6779	-

	ACS 30	ACS 13 x URM 6779	F2	Não determinado	URM 6777	-
					URM 6779	-
	ACS 31	ACS 13 x URM 6779	F2	<i>MAT1-1</i>	URM 6777	++
					ACS 35	+
	ACS 32	ACS 13 x URM 6779	F2	<i>MAT1-2</i>	URM 6779	++
	ACS 33	ACS 13 x URM 6779	F2	<i>MAT1-2</i>	URM 6779	- ^c
	ACS 34	ACS 13 x URM 6779	F2	<i>MAT1-2</i>	URM 6779	++
					ACS 31	+
	ACS 35	ACS 13 x URM 6779	F2	<i>MAT1-2</i>	URM 6779	+++
	ACS 36	ACS 13 x URM 6779	F2	<i>MAT1-2</i>	URM 6779	++
	ACS 37	ACS 13 x URM 6779	F2	<i>MAT1-2</i>	URM 6779	-
	ACS 38	ACS 13 x URM 6779	F2	<i>MAT1-2</i>	URM 6779	-
	ACS 39	ACS 13 x URM 6779	F2	<i>MAT1-2</i>	URM 6779	+++
					ACS 31	-
	ACS 40	ACS 13 x URM 6779	F2	<i>MAT1-2</i>	URM 6779	++
	ACS 41	ACS 21 x URM 6777	F2	Não determinado	URM 6777	-
					URM 6779	-
	ACS 42	ACS 21 x URM 6777	F2	<i>MAT1-1</i>	URM 6777	- ^c
	ACS 43	ACS 14 x URM 6777	F2	<i>MAT1-2</i>	URM 6779	-
	ACS 44	ACS 14 x URM 6777	F2	<i>MAT1-2</i>	URM 6779	-
	ACS 45	ACS 22 x URM 6777	F2	<i>MAT1-1</i>		-
	ACS 46	ACS 22 x URM 6777	F2	Não determinado	URM 6777	-
					URM 6779	-
	ACS 47	ACS 22 x URM 6777	F2	<i>MAT1-1</i>	URM 6777	- ^c
<i>F. pernambucanum</i>	ACS 1	URM 7561 x URM 7554	F1	<i>MAT1-1</i>	URM 7554	-
	ACS 2	URM 7561 x URM 7554	F1	<i>MAT1-1</i>	URM 7554	-
	ACS 3	URM 7561 x URM 7554	F1	<i>MAT1-2</i>	URM 7561	-
	ACS 4	URM 7561 x URM 7554	F1	<i>MAT1-2</i>	URM 7561	+
	ACS 48	URM 7561 x ACS 4	F2	<i>MAT1-1</i>	ACS 4	++
	ACS 49	URM 7561 x ACS 4	F2	<i>MAT1-1</i>	ACS 4	- ^c
	ACS 50	URM 7561 x ACS 4	F2	Não determinado	URM 7561	-
					ACS 4	-
	ACS 51	URM 7561 x ACS 4	F2	<i>MAT1-1</i>	ACS 4	+
	ACS 52	URM 7561 x ACS 4	F2	Não determinado	URM 7561	-
					ACS 4	-

(-) = sem peritécios férteis; (+) = até dez peritécios férteis; (++) = acima de 10 peritécios férteis, mas não preenchendo toda a placa de Petri; (+++) = peritécios férteis em toda a placa de Petri. ^a Isolado da progênie de ascospores de cruzamentos férteis, investigado quanto à fertilidade feminina. ^b Isolado utilizado como macho nos cruzamentos para a seleção dos testadores. ^c Isolado capaz de desempenhar o papel de fêmea porque produziu protoperitécios, mas o cruzamento não foi fértil.

Ainda que tenha sido observado um aumento do percentual de fêmeas entre as gerações, o aumento do grau de fertilidade dos cruzamentos não foi suficientemente satisfatório. Embora cepas testadoras de espécies biológicas tenham sido desenvolvidas por meio de retrocruzamentos para fixar a fertilidade feminina (Zeller *et al.*, 2003; Leslie *et al.*, 2005), tem sido observado que os níveis de fertilidade podem não ser estáveis ao longo de

múltiplos cruzamentos, ou melhorado utilizando os retrocruzamentos tradicionais (Bentley, Summerell e Burgess, 2008).

Como alternativa ao uso de retrocruzamentos para aumentar a fertilidade feminina em isolados de *Fusarium*, têm sido propostos cruzamentos entre isolados da mesma geração (Bentley, Summerell e Burgess, 2008). Neste estudo, isolados fêmeas das gerações F1 e F2 foram selecionados para cruzamentos envolvendo apenas isolados da progênie. No entanto nestes casos a fertilidade foi mais baixa, em relação aos retrocruzamentos utilizando as mesmas fêmeas (Tabela 4). Portanto, com base no grau de fertilidade dos cruzamentos, indicam-se os isolados ACS 13, ACS 22, ACS 35 e ACS 39 para os testes de validação como espécies biológicas de *F. caatingaense*, e, para a espécie *F. pernambucanum* novos cruzamentos para a coleta da progênie e futura seleção de cepas com potencial para testadores serão realizados.

5 CONCLUSÕES

- Os isolados de *Fusarium* obtidos de *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) e *Aleurocanthus woglumi* (Hemiptera: Aleyrodidae) no Nordeste do Brasil pertencem a três espécies filogenéticas do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) – FIESC 16, FIESC 17 e FIESC 20.

- Essas espécies fazem parte do clado Incarnatum do FIESC, que abriga algumas das espécies anteriormente classificadas na seção morfológica *Arthrosporiella*, para as quais ciclos sexuais não eram conhecidos, sendo este estudo o primeiro a demonstrar a existência de estágios sexuais em espécies do clado Incarnatum e a investigar o isolamento reprodutivo entre espécies do FIESC.

- As espécies estudadas apresentam sistema de acasalamento heterotático e são isoladas reprodutivamente, podendo apresentar, em alguns casos, compatibilidade sexual parcial.

- A descoberta desses ciclos sexuais fornecem *insights* sobre os mecanismos envolvidos na geração de diversidade genética no FIESC, biologia e epidemiologia deste grupo de importância clínica e agrônômica.

- Duas espécies foram descritas: *F. caatingaense* e *F. pernambucanum*.

- Características morfológicas podem ser distinguidas entre essas espécies, mas essas diferenças são insuficientemente robustas para identificação em nível de espécie usando apenas caracteres morfológicos, corroborando a hipótese de processos de especiação críptica em FIESC.

- As cepas testadoras femininas, quando disponíveis, podem ser utilizadas como ferramenta de diagnóstico para espécies e para a elucidação de limites de espécies no FIESC, beneficiando pesquisas futuras e contribuindo para o conhecimento das linhagens dentro deste complexo.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-SATAR, M.A., KHALIL, M.S., MOHMED, I.N., ABD-ELSALAM, K. A., VERREET, J.A. 2003. Molecular phylogeny of *Fusarium* species by AFLP fingerprint. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 51-55.
- ÁDÁM, A.L., GARCÍA-MARTÍNEZ, J., SZÚCS, E.P., AVALOS, J., HORNOK, L. 2011. The *MAT1-2-1* mating-type gene upregulates photo-inducible carotenoid biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 318, p. 76-83.
- ADDARIO, E., TURCHETTI, T. 2011. Parasitic fungi on *Dryocosmus kuriphilus* in *Castanea sativa* necrotic galls. **Bulletin of Insectology**, v. 64, n. 2, p. 269-273.
- AMATA R.L., BURGESS L.W., SUMMERELL, B.A., BULLOCK, S., LIEW E.C.Y., SMITH-WHITE J.L., 2010. An emended description of *Fusarium brevicatenulatum* and *F. pseudoanthophilum* based on isolates recovered from millet in Kenya. **Fungal Diversity**, v. 43, p. 11-25.
- AMEEN, M.K.M. 2012. Screening of *Fusarium* isolates pathogenicity in vitro by using the larvae of *Galleria mellonella* L. **Journal of Basrah Researches (Sciences)**, v. 38, n. 3, p. 19-28.
- ANWAR, W., HAIDER, M. S., SHAHID, A. A., MUSHTAQ, H., HAMEED, U., REHMAN, M. Z. U., IQBAL, M. J. 2017. Genetic diversity of *Fusarium* Isolated from Members of *Sternorrhyncha* (Hemiptera), p. Entomopathogens against *Bemisia tabaci*. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 49, n. 2.
- AOKI, T., NIRENBERG, H.I. 1999. *Fusarium globosum* from subtropical Japan and the effect of different light conditions on its conidiogenesis. **Mycoscience** 40, p. 1–9.
- AOKI, T., O'DONNELL, K., GEISER, D.M. 2014. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, p. 189-201.
- AOKI, T., O'DONNELL, K., HOMMA, Y., LATTANZI, A. R. 2003. Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex—*F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. **Mycologia**, v. 95, n. 4, p. 660-684.
- AOKI, T., O'DONNELL, K., ICHIKAWA, K. 2001. *Fusarium fractiflexum* sp. nov. and two other species within the *Gibberella fujikuroi* species complex recently discovered in Japan that from aerial conidia in false heads. **Mycoscience**, v. 42, p. 461-478.
- AOKI, T., O'DONNELL, K., SCANDIANI, M. M. 2005. Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. **Mycoscience**, v. 46, p. 162-183.
- AYOUBI N., SOLEIMANI, M.J. 2016. Morphological and molecular identification of pathogenic *Fusarium* spp. on strawberry in Iran. **Sydowia**, v. 68, p. 163-171.
- AZOR, M., GENÉ, J., CANO, J., MANIKANDAN, P., VENKATAPATHY, N., GUARRO, J. 2009. Less-frequent *Fusarium* species of clinical interest: correlation between morphological and molecular identification and antifungal susceptibility. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n 5, p. 1463-1468.
- BALAJEE, S.A., BORMAN, A.M., BRANDT, M.E., CANO J., CUENCA-ESTRELLA, M., DANNAOUI, E., GUARRO, J., HAASE, G., KIBBLER C.C., MEYER, W., O'DONNELL,

- K., PETTI C.A., RODRIGUEZ-TUDELA, J.L., SUTTON, D., VELEGRAKI, A., WICKES, B.L. 2009. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Mucorales* species in the clinical mycology laboratory: Where are we and where should we go from here? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 877-884.
- BARROS, G., ZANON, M.A., PALAZZINI, J.M., HAIDUKOWSKI, M., PASCALE, M., CHULZE, S. 2012. Trichothecenes and zearalenone production by *Fusarium equiseti* and *Fusarium semitectum* species isolated from Argentinean soybean. **Food Additives & Contaminants Part A**, v. 29, p. 1436–1442.
- BATTA, Y.A. 2012. The first report on entomopathogenic effect of *Fusarium avenaceum* (Fries) Saccardo (Hypocreales, Ascomycota) against rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.: Curculionidae, Coleoptera). **Journal of Entomological and Acarological Research**, v. 44, p. 11.
- BENTLEY, A.R., SUMMERELL, B.A., BURGESS, L.W. 2008. Sexual compatibility in *Fusarium pseudograminearum* (*Gibberella coronicola*). **Mycological Research**, v. 112, p. 1101-1106.
- BICKFORD, D., LOHMAN, D.J., SODHI, N.S., NG, P.K.L., MEIER, R., WINKER, K., INGRAM, K.K., DAS, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, p. 148-155.
- BILAI, V.I. 1970. Experimental morphogenesis in the fungi of the genus *Fusarium* and their taxonomy. *Annales Academiae Scientiarum Fennicae. A, IV Biologica*, v. 168, p. 7-18.
- BLACKWELL, M. 2011. THE FUNGI: 1, 2, 3 ... 5.1 MILLION SPECIES? **American Journal of Botany**, v. 98, p. 426-438.
- BOGALE, M., WINGFIELD, B.D., WINGFIELD, M.J., STEENKAMP, E.T. 2007 Species-specific primers for *Fusarium redolens* and a PCR-RFLP technique to distinguish among three clades of *Fusarium oxysporum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 271, p. 27-32.
- BOOTH, C. 1971. **The Genus Fusarium**. Common wealth Mycological Institute, Kew, Surrey, United Kingdom.
- BOOTH, C., SUTTON, B.C. 1984. *Fusarium pallidoroseum*, the correct name for *F. semitectum* auct. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 83, p. 702-704.
- BÖHM, J., HOFF, B., O’GORMAN, C.M., WOLFERS, S., KLIX, V., BINGER, D., ZADRAD, I., KÜRNSTEINERD, H., PÖGGELERC, S., DYERB, P.S., KÜCK, U. 2013. Sexual reproduction and mating-type-mediated strain development in the penicillin-producing fungus *Penicillium chrysogenum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, p. 1476-1481.
- BOWDEN, R.L., LESLIE, J.F., LEE, J., LEE, Y.W. **Cross fertility of lineages in *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*)**. In *The Global Fusarium Initiative for International Collaboration: A Strategic Planning Workshop*, CIMMYT: El Batan, Mexico, 2006, p. 54-60.
- BRITZ, H., WINGFIELD, M.J., COUTINHO, T.A., MARASAS, W.F.O., LESLIE, J.F. 1998. Female fertility and mating type distribution in a South African population of *Fusarium subglutinans* sp. *pini*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2094-2095.
- CARNEIRO-LEÃO, M.P., TIAGO, P.V., MEDEIROS, L.V., COSTA, A.F., OLIVEIRA, N.T. 2017. *Dactylopius opuntiae*: control by the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex and confirmation of mortality by DNA fingerprinting. **Journal of Pest Science**, v. 90, p. 925-933.

- CASTELLÁ, G., CABAÑES, F.J. 2014. Phylogenetic diversity of *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex isolated from Spanish wheat. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 2, p. 309-17.
- CHOI, H.W., KIM, J.M., HONG, S.K., KIM, W.G., CHUN, S.C., YU, S.H. 2009. Mating types and optimum culture conditions for sexual state formation of *Fusarium fujikuroi* isolates. **Mycobiology**, v. 37, p. 247-250.
- COLEMAN, J.J., MUHAMMED, M.; KASPERKOVITZ, P.V.; VYAS, J.M.; MYLONAKIS, E. 2011. *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. **Fungal Biology**, v. 115, p. 1279-289.
- COVERT, S. F., AOKI, T., O'DONNELL, K., STARKEY, D., HOLLIDAY, A., GEISER, D. M., Scandiani, M. 2007. Sexual reproduction in the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium tucumaniae*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, p. 799-807.
- COVERT, S.F., BRILEY, A., WALLACE, M.M., MCKINNEY, V.T. 1999. Partial MAT-2 gene structure and the influence of temperature on mating success in *Gibberella circinata*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 28, p. 43-54.
- CROUS, P. W., HAWKSWORTH, D. L., WINGFIELD, M. J. 2015. Identifying and naming plant-pathogenic fungi: past, present, and future. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, p. 247-267.
- DARIVA, J.M. 2011. **Fusarioses do maracujazeiro: Etiologia e sintomatologia**. 82f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido). Universidade Estadual de Montes Claros. Janaúba MG, 2011.
- DARRIBA, D., TABOADA, G.L., DOALLO, R., POSADA, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, p. 772.
- DEBUCHY, R., BERTEAUX-LECELLIER, V., SILAR, P. 2010. Mating systems and sexual morphogenesis in ascomycetes, in Borkovich, K., Ebbole, D.J. (Eds.), Cellular and molecular biology of filamentous fungi. **American Society of Microbiology**, p. 501-535.
- DESJARDINS, A. E. ***Fusarium* mycotoxins: Chemistry, genetics and biology**. Saint Paul, Minnesota, The American Phytopathological Society (APS), 2006.
- DHORO, M. **Identification and differentiation of *Fusarium* species using selected molecular methods**. 2010. 101f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Faculty of Science, University of Zimbabwe, Zimbabwe, 2010.
- DINOLFO, M. I., STENGLEIN, S., MORENO, M. V., NICHOLSON, P., JENNINGS, P., SALERNO, G. L. 2010. ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England. **European Journal of Plant Pathology**, v. 127, p. 483-491.
- EDGAR, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 1792-1797.
- ELIOT, T. S. 1971. **Four quartets**. Houghton Mifflin Harcourt.
- FAN, J.H., XIE, Y.P., XUE, J.L., XIONG, Q., JIANG, W.J., ZHANG, Y., REN, Z. 2014. The strain HEB01 of *Fusarium* sp., a new pathogen that infects brown soft scale. **Annals of Microbiology**, v. 64, p. 333-341.
- FRASER, J.A., HEITMAN, J. 2003. Fungal mating type loci. **Current Biology**, v. 13, p. 792-795.

- FREEMAN, S., PROTASOV, A., SHARON, M., MOHOTTI, K.M., ELIYAHU, M., OKON-LEVY, N., MAYMON, M., MENDEL, Z. 2013a. Obligate feed requirement of *Fusarium* sp. nov., an avocado wilting agent, by the ambrosia beetle *Euwallacea* aff. *forficata*. **Symbiosis**, v. 58, p. 245-251.
- FREEMAN, S.; SHARON, M.; MAYMON, M.; MENDEL, Z.; PROTASOV, A.; AOKI T.; ESKALEN, A.; O'DONNELL, K. 2013B. *Fusarium euwallaceae* sp. nov.—a symbiotic fungus of *Euwallacea* sp., an invasive ambrosia beetle in Israel and California. **Mycologia**, v. 105, p. 1595-1606.
- FISHER, N.L., BURGUESS, L.W., TOUSSOUN, T.A., et al. 1982. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. **Phytopathology**, v. 72, p. 151-153.
- GEIB, S.M., SCULLY, E.D., JIMENEZ-GASCO, M.D.M., CARLSON, J.E., TIEN, M., HOOVER, K. 2012. Phylogenetic analysis of *Fusarium solani* associated with the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis*. **Insects**, v. 3, p. 141-160.
- GEISER, D.M., JIMENEZ-GASCO, M.M., KANG, S., MAKALOWSKA, I., VEERARAGHAVAN, N. WARD, T.J., ZHANG, N., KULDAU, G.A. O'DONNELL, K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 473-479.
- GERLACH, W., H. NIRENBERG. 1982. **The genus *Fusarium***— A pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt Für Land- und Forstwirtschaft (Berlin – Dahlem)*, v. 209, p. 1-405.
- GORDON, W.L. 1960. The taxonomy and habitats of *Fusarium* species from tropical and temperate regions. **Canadian Journal of Botany**, v. 38, p. 643-658.
- GORDON, W.L. 1961. Sex and mating types in relation to the production of perithecia by certain species of *Fusarium*. **Proceedings of the Canadian Phytopathological Society**, v. 28, p. 11.
- GRÄFENHAN, T., SCHROERS, H.J., NIRENBERG, H.I., SEIFERT, K.A. 2011. An overview of the taxonomy, phylogeny, and typification of necrotrophic fungi in *Cosmospora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella* and *Volutella*. **Studies in Mycology**, v. 68, p. 79-113.
- GUINDON, S., GASCUEL, O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". **Systematic Biology**, v. 52, p. 696-704.
- HARRINGTON, T.C., MCNEW, D.L. 1998. Partial interfertility among the *Ceratocystis* species on conifers. **Fungal Genetics and Biology**, v. 25, p. 44-53.
- HAWA, M. M., SALLEH, B., LATIFFAH, Z. 2010. Characterization and intraspecific variation of *Fusarium semitectum* (Berkeley and Ravenel) associated with red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton and Rose) in Malaysia. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 3.
- HAWKSWORTH, D.L., LÜCKING, R. 2017. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. **Microbiology spectrum**, v. 5, p. 1–17.
- HORINOUCI, H., MUSLIM, A., SUZUKI, T., HYAKUMACHI, M. 2007. *Fusarium equiseti* GF191 as an effective biocontrol agent against *Fusarium* crown and root rot of tomato in rock wool systems. **Crop Protection**, v. 26, n. 1514-1523.
- HORINOUCI, H., KATSUYAMA, N., TAGUCHI, Y., HYAKUMACHI, M. 2008. Control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in a soil system by combination of a plant growth-

promoting fungus, *Fusarium equiseti*, and biodegradable pots. **Crop Protection**, v. 27, p. 859-864.

HORINOUCI, H., WATANABE, H., TAGUCHI, Y., MUSLIM, A., Hyakumachi, M. 2011. Biological control of *Fusarium* wilt of tomato with *Fusarium equiseti* GF191 in both rock wool and soil systems. **Biocontrol**, v. 56, p. 915-923.

Horn, B.W., Moore, G.G., Carbone, I. 2009a. Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. **Mycologia**, v. 101, p. 423-429.

HORN, B.W., RAMIREZ-PRADO, J.H., CARBONE, I. 2009b. Sexual reproduction and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus parasiticus*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. 169-175.

HORNOK, L., WAALWIJK, C., LESLIE, J.F. 2007. Genetic factors affecting sexual reproduction in toxigenic *Fusarium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 54-58.

HOSSAIN, M. T., MODISE, D. M., RONG, I. H., KARODIA, A. M. 2015. The mycoflora associated with diseased plants and seeds of *Oryza sativa* (rice): exemplifying the importance of effective disease control management. **Asian Journal of Science and Technology**, v. 6, p. 1523-1532.

HSIEH W.H., SMITH S.N., SNYDER W.C. 1977. Mating groups in *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, v. 67, p. 1041-1043.

HUELSENBECK, J.P., RONQUIST, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics**, v. 17, p. 754-755

IDNURM, A., HOOD, M.E., JOHANNESSEN, H., GIRAUD, T. 2015. Contrasted patterns in mating-type chromosomes in fungi: Hotspots versus coldspots of Recombination. **Fungal Biology Reviews**, v. 29, p. 220-229.

INGLE, A.; RAI, M. 2011. Genetic diversity among Indian phytopathogenic isolates of *Fusarium semitectum* Berkeley and Ravenel. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 2, p. 142-148.

IGNJATOV, M., MILOŠEVIĆ, D., NIKOLIĆ, Z., TAMINDŽIĆ, G., GVOZDANOVIĆ-VARGA, J., IVANOVIĆ, Ž., POPOVIĆ, T. 2015. First report of *Fusarium* sp. FIESC 3 on onion seed in Serbia. **Plant Disease**, v. 99, p. 1277.

KASSON, M.T., O'DONNELL, K., ROONEY, A.P., SINK, S., PLOETZ, R.C., PLOETZ, J.N., KONKOL, J.L., CARRILLO, D., FREEMAN, S., MENDEL, Z., SMITH, J.A., BLACK, A.W., HULCR, J., BATEMAN, C., STEFKOVA, K., CAMPBELL, P.R., GEERING, A.D.W., DANN, E.K., ESKALEN, A., MOHOTTI, K., SHORT, D.P.G., AOKI, T., FENSTERMACHER, K.A., DAVIS, D.D., GEISER, D.M. 2013. An inordinate fondness for *Fusarium*: phylogenetic diversity of fusaria cultivated by ambrosia beetles in the genus *Euwallacea* on avocado and other plant hosts. **Fungal Genetics and Biology**, v. 56, p. 147-157.

KERÉNYI, Z., MORETTI, A., WAALWIJK, C., OLÁH, B., HORNOK, L. 2004. Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 4419-4423.

KERÉNYI, Z., ZELLER, K.A., HORNOK, L., LESLIE, J.F. 1999. Standardization of mating type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4071-4076.

- KHOA, L.V., HATAI, K., AOKI, T. 2004. *Fusarium incarnatum* isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius, with black gill disease cultured in Vietnam. **Journal of Fish Diseases**, v. 27, p. 507-515.
- KLITTICH, C.J.R., LESLIE J.F. 1988. Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). **Genetics**, v. 118, p. 417-423.
- KIRK, P.M., CANNON, P.F., MINTER, D.W., STALPERS, J.A. 2008. **Dictionary of the Fungi**, 10th ed. CABI, Wallingford, UK
- KVAS, M., MARASAS, W. F. O., WINGFIELD, B. D., WINGFIELD, M. J. STEENKAMP, E. T. 2009. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. **Fungal Diversity**, v. 34, p. 1-21.
- KURTZMAN, C.P., ROBNETT, C.J. 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5'end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1216-1223.
- LAZO, M.L.S.R. **Caracterização e patogenicidade de fungos entomopatogênicos isolados do percevejo-bronzeado do eucalipto (Hemiptera: Thaumastocoridae)**. 2012. 85f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.
- LAURENCE, M.H., WALSH, J.L., SHUTTLEWORTH, L.A., ROBINSON, D.M., JOHANSEN, R.M., PETROVIC, T., VU, T.H., BURGESS, L.W., SUMMERELL, B.A., LIEW, E.C.Y. 2015. Six novel species of *Fusarium* from natural ecosystems in Australia. **Fungal Diversity**, v. 77, p. 349.
- LAURENCE M.H., SUMMERELL B.A., BURGESS L.W., LIEW E.C.Y. 2014. Genealogical concordance phylogenetic species recognition in the *Fusarium oxysporum* species complex. **Fungal Biology**, v. 118, p. 374-384.
- LESLIE, J., BOWDEN, R. 2008. *Fusarium graminearum*: when species concepts collide. **Cereal Research Communications**, v. 36, p. 609-615.
- LESLIE, J.F., KLEIN, K.K., 1996. Female fertility and mating type effects on effective population size and evolution in filamentous fungi. **Genetics**, v. 144, p. 557-567.
- LESLIE, J.F. SUMMERELL, B.A. 2006. **The Fusarium laboratory manual**. Blackwell Professional, Ames, Iowa.
- LESLIE, J.F., SUMMERELL, B.A. 2011. In search of new *Fusarium* species. **Plant Breeding and Seed Science**, v. 63, p. 94-101.
- LESLIE, J.F., ZELLER, K.A., SUMMERELL, B.A. 2001. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 59, p. 107-117.
- LESLIE, J.F., ZELLER, K.A., LOGRIECO, A., MULE, G., MORETTI, A., RITIENI, A. 2004. Species diversity of and toxin production by *Gibberella fujikuroi* species complex strains isolated from native prairie grasses in Kansas. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2254-2262.
- LIMA, C.S., PFENNING, L.H., COSTA, S.S., ABREU, L.M., LESLIE, J.F. 2012. *Fusarium tuiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. **Mycologia**, v. 104, p. 1408-1419.
- LING, C., LUO, A., GAO, J. 2016. MrBayes 3.2.6 on Tianhe-1A: a high performance and distributed implementation of phylogenetic analysis. IEEE 22nd International Conference on Parallel and Distributed Systems. **IEEE Computer Society**, DOI 10.1109/ICPADS.2016.154.

- LINK, H. F. 1809. Observationes in ordines plantarum naturalis, Dissetatio I. **Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin**, v. 3, p. 3-42.
- LIU, W., XIE Y., DONG, J., XUE J., ZHANG, Y., LU, Y., WU, J. 2014. Pathogenicity of Three Entomopathogenic Fungi to *Matsucoccus matsumurae*. **PLoS ONE**, v. 9, p. 1-9.
- LIU, Y. J., WHELEN, S., HALL, B. D. 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 1799-1808.
- MADBOULY, A. K., IBRAHIM, I. M., SEHAB, A. F., Abdel Wahhab, M.A. 2012. **Food Additives and Contaminants Part B**, v. 5, p. 112-120.
- MALI, A.M., PATIL, V. B., ADE, A. B., CHAVAN, N. S., KAMBLE, S. S. 2015. First Report of *Fusarium* sp. FIESC 17 on *Cucumis trigonus* in India. **Plant Disease**, v. 99, p. 1274-1274.
- MALI, A. M., PATIL, V. B., PISE, N. M., ADE, A. B. 2016. First Report of Leaf Spot Caused by *Fusarium* sp. NFCCI 2882 on *Angiopteris evecta*: A King Fern From Western Ghats, India. **Plant Disease**, v. 100, p. 646-646.
- MANSTRETTA, V., ROSSI, V. 2016. Effects of temperature and moisture on development of *Fusarium graminearum* perithecia in maize stalk residues. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, p. 184-191.
- MARASAS, W. F. O., NELSON, P. E., TOUSSOUN, T. A. 1984. **Toxigenic Fusarium Species: Identity and Mycotoxicology**. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania.
- MATUO, T. 1972. Taxonomic studies of phytopathogenic fungi in Japan. **Review of Plant Protection Research**, v. 5, p. 34-45.
- MATUO, T., SNYDER, W.C. 1973. Use of morphology and mating populations in the identification of special forms in *Fusarium solani*. **Phytopathology**, v. 63, p. 562-565.
- MAYR, E. 1942. **Systematics and the Origin of Species**. Columbia Univ. Press, New York .
- MENDOZA, A.R., SIKORA, R.A. 2009. Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. **Biocontrol**, v. 54, p. 263-272.
- MESSIAEN, C. M. 1959. La systématique du genre *Fusarium* selon Snyder et Hansen. **Revue de pathologie végétale et d'entomologie agricole de France**, v. 38, p. 253-266.
- MIKUNTHAN, G., MANJUNATHA, M. 2006a. *Fusarium semitectum*, a potential mycopathogen against thrips and mites in chilli, *Capsicum annuum*. **Communications in agricultural and applied biological sciences**, v. 71, p. 449-463.
- MIKUNTHAN, G., MANJUNATHA, M. 2006b. Pathogenicity of *Fusarium semitectum* against crop pests and its biosafety to non-target organisms. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, v. 71, p. 465-473.
- MIKUNTHAN, G., MANJUNATHA, M. 2007. Impact of habitat manipulation on mycopathogen, *Fusarium semitectum* to control *Scirtothrips dorsalis* and *Polyphagotarsonemus latus* of chilli. **BioControl**, v. 1, p. 403-12.
- MILLER, M.A., PFEIFFER, W., SCHWARTZ, T. 2012. **The CIPRES science gateway: enabling high-impact science for phylogenetics researchers with limited resources**. In:

Proceedings of the 1st Conference of the Extreme Science and Engineering Discovery Environment: Bridging from the extreme to the campus and beyond, p. 1-8. Association for Computing Machinery, USA.

Mishra, P. K., Tewari, J. P., Clear, R. M., Turkington, T. K. 2006. Genetic diversity and recombination within populations of *Fusarium pseudograminearum* from western Canada. **International Microbiology**, v. 9, 65-68.

MOHANTY, S.S., RAGHAVENDRA, K., RAI, U., DASH, A.P. 2008. Efficacy of female *Culex quinquefasciatus* with entomopathogenic fungus *Fusarium pallidroseum*. **Parasitology Research**, v. 103, n. 1, p. 171-174.

MORETTI, A.N. 2009. Taxonomy of *Fusarium* genus: a continuous fight between lumpers and splitters. **Zbornik Matice srpske za prirodne nauke**, v. 117, p. 7-13.

MOUSSA, T.A.A., AL-ZAHRANI, H.S., KADASA, N.M.S., AHMED, S.A., DE HOOG, G.S., AL-HATMI, A.M.S. 2017. Two new species of the *Fusarium fujikuroi* species complex isolated from the natural environment. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, p. 819-832.

MWANIKI, P.K., ABANG, M.M., WAGARA, I.N., WOLUKAU, J.N., SCHROERS, H.J. 2011. Morphology, pathogenicity and molecular identification of *Fusarium* spp. from wilting eggplants in Tanzania. **African Crop Science Conference Proceedings**, v. 10, p. 217-221.

NELSON, P.E. 1991. History of *Fusarium* systematics. **Phytopathology**, v. 81, p. 1045-1048.

NELSON, P.E., TOUSSOUN, T.A., MARASAS, W.F.O. 1983. ***Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification***. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania.

NI, M., FERETZAKI, M., SUN, S., WANG, X., HEITMAN, J. 2011. Sex in Fungi. **Annual Review of Genetics**, v. 45, p. 405-430.

NIRENBERG, H.I. 1990. Recent advances in the taxonomy of *Fusarium*. **Studies in Mycology**, v. 32, p. 91-101.

NIRENBERG, H.I. 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion Liseola. **Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem**, v. 169, p. 1-117.

O'DONNELL K. 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca* - *Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, v. 92, p. 919-938.

O'DONNELL, K., Cigelnik, E., Nirenberg, H. I. 1998a. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, v. 90, p. 465-493.

O'DONNELL, K., GUEIDAN, C., SINK, S., JOHNSTON, P. R., CROUS, P.W., GLENN, A., et al. 2009a. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. 936-948.

O'DONNELL, K., HUMBER, R.A., GEISER, D.M., KANG, S., PARK, B., ROBERT, V.A.R.G., et al. 2012. Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via FUSARIUM-ID and Fusarium MLST. **Mycologia**, v. 104, p. 427-445.

O'DONNELL, K., KISTLER, H.C., CIGELNIK, E., PLOETZ, R.C. 1998b. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 95, p. 2044-2049.

- O'DONNELL, K., MCCORMICK, S.P., BUSMAN, M., PROCTOR, R.H., WARD, T.J., DOEHRING, G., GEISER, D.M., ALBERTS, J.F., RHEEDER, J.P., 2018. Marasas et al. 1984 "Toxigenic *Fusarium* Species: Identity and Mycotoxicology" revisited. **Mycologia**, v. 110, n. 6, p. 1058-1080.
- O'DONNELL, K., NIRENBERG, H.I., AOKI, T., CIGELNIK, E. 2000. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**, v. 41, p. 61-78.
- O'DONNELL, K., ROONEY, A. P., PROCTOR, R. H., BROWN, D. W., MCCORMICK, S. P., WARD, T. J., et al. 2013. 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.
- O'DONNELL, K., SINK, S., LIBESKIND-HADAS, R., HULCR, J., KASSON, M. T., PLOETZ, R. C., et al. 2014. Discordant phylogenies suggest repeated host shifts in the *Fusarium* – *Euwallacea ambrosia* beetle mutualism. **Fungal Genetics and Biology**, v. 82, p. 277-290.
- O'DONNELL, K., SUTTON, D. A., FOTHERGILL, A., MCCARTHY, D., RINALDI, M. G., BRANDT, M. E., et al. 2008. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 2477-2490.
- O'DONNELL, K., SUTTON, D.A., RINALDI, M.G., GUEIDAN, C., CROUS, P.W., Geiser, D.M. 2009b. Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum*-*F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 3851-3861.
- O'DONNELL, K., SUTTON, D.A., RINALDI, M.G., SARVER, B.A.J., BALAJEE, S.A., et al. 2010. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 3708-3718.
- O'DONNELL, K., SUTTON, D.A., WIEDERHOLD, N., ROBERT, V. A., CROUS, P. W., GEISER, D. M. 2016. Veterinary fusarioses within the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, 54, p. 2813-2819.
- O'DONNELL, K., WARD, T.J., ROBERT, V.A.R.G., CROUS, P.W., GEISER, D.M., KANG, S. 2015. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. **Phytoparasitica**, v. 43, n. 5, p. 583-595.
- O'DONNELL, K., WARD, T.J., GEISER D.M., KISTLER, H.C., AOKI, T. 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 6, p. 600-623.
- O'GORMAN, C., FULLER, M.H.T., DYER, P.S. 2009. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v. 457, p. 471-474.
- PASCOE, I.G. 1990. *Fusarium* morphology I: Identification and characterization of a third conidial type, the mesoconidium. **Mycotaxon**, v. 37, p. 121-160.
- PELIZZA, S.A., STENGLEIN, S.A., CABELLO, M.N., DINOLFO, M.I., LANG, C.E. 2011. First record of *Fusarium verticillioides* as an entomopathogenic fungus of grasshoppers. **Journal of Insect Science**, v. 11, p. 70.

- PRADEEP, K., GUPTA, V.K., MISRA, A.K., MODI, D.R. 2014. Molecular characterization of *Fusarium moniliforme* var. subglutinans isolates. **Journal of Environmental Biology Lucknow**, v. 35, p. 211-216.
- QU, B., LI, H.P., ZHANG, J.B., XU, Y.B., HUANG, T., WU, A.B., LIAO, Y.C. 2008. Geographic distribution and genetic diversity of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* on wheat spikes throughout China. **Plant Pathology**, v. 57, p. 15-24.
- RAMBAUT, A. 2016. **FigTree 1.4.3**. Disponível na internet em <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- RAMDIAL, H., HOSEIN, F., RAMPERSAD, S.N. 2016. First report of *Fusarium incarnatum* associated with fruit disease of bell peppers in Trinidad. **Plant Disease**, v. 100, p. 526-526.
- RAMDIAL, H., LATCHOO, R.K., HOSEIN, F.N., RAMPERSAD, S.N. 2016. Phylogeny and haplotype analysis of fungi within the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex. **Phytopathology**, v. 107, p. 109-120.
- RAILLO, A. 1935. **The diagnostic estimation of morphological and cultural characters of the species of the genus *Fusarium***. Publ. All-Union Acad. Agric. Sciences. Series 2 (Leningrad), v. 7, p. 1-98.
- RAILLO, A. 1950. **Fungi of the genus *Fusarium***. Pub. State Agr. Lit., Moscow, USSR.
- RAYNER, R.W. 1970. **A mycological colour chart**. Kew, Surrey: Common wealth Mycological Institute. 17 p.
- RONQUIST, F., HUELSENBECK, J.P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572-1574.
- ROY, K.W., RATNAYAKE, S. 1997. Frequency of occurrence of *Fusarium pallidoroseum*, effects on seeds and seedlings, and associations with other fungi in soybean seeds and pods. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 19, p. 188-192.
- ROSSMAN, A.Y., SAMUELS, G.J., ROGERSON, C.T., LOWEN, R. 1999. Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes). **Studies in Mycology**, v. 42, p. 1-248.
- SACCARDO, P.A. 1886. Sylloge Hyphomycetum. **Sylloge Fungorum**, v. 4, p. 1-807.
- SANDOVAL-DENIS, M., GUARNACCIA, V., POLIZZI, G., Crous, P.W. 2018. Symptomatic *Citrus* trees reveal a new pathogenic lineage in *Fusarium* and two new *Neocosmospora* species. **Persoonia**, v. 40, p. 1-25.
- SANTOS, A.C.S., OLIVEIRA, R.L.S., COSTA, A.F., TIAGO, P.V., OLIVEIRA, N.T. 2016. Controlling *Dactylopius opuntiae* with *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex and extracts of *Ricinus communis* and *Poincianella pyramidalis*. **Journal of Pest Science**, v. 89, p. 539-547.
- SATOU, M., ICHINOE, M., FUKUMOTO, F., TEZUKA, N., HORIUCHI, S. 2001. *Fusarium* Blight of Kangaroo Paw (*Anigozanthos* spp.) caused by *Fusarium*. **Journal of Phytopathology**, v. 149, p. 203-206.
- SCHEEL, C.M., HURST, S.F., BARREIROS, G., AKITI, T., NUCCI, M., BALAJEE, S.A. 2013. Molecular analyses of *Fusarium* isolates recovered from a cluster of invasive mold infections in a Brazilian hospital. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 49.

- SCHOCH, C.L., SEIFERT, K.A., HUHNDORF, S., ROBERT, V., SPOUGE, J.L., et al. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 109, p. 6241-46.
- SCHROERS, H.J., O'DONNELL, K., LAMPRECHT, S.C., KAMMEYER, P.L., JOHNSON, S., SUTTON, D.A., et al. 2009. Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. **Mycologia**, v. 101, p. 44-70.
- SCHROERS, H.J., SAMUELS, G.J., ZHANG, N., SHORT, D.P., JUBA, J., GEISER, D.M. 2016. Epitypification of *Fusisporium (Fusarium) solani* and its assignment to a common phylogenetic species in the *Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, v. 108, n. 4, 806-819.
- SEIDL V, SEIBEL C, KUBICEK CP, SCHMOLL M. 2009. Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 13909-13914.
- SHARMA, L., MARQUES, G. 2018. *Fusarium*, an Entomopathogen—A Myth or Reality?. **Pathogens**, v. 7, p. 93.
- SHORT, D.P.G., O'DONNELL, K., THRANE, U., NIELSEN, K.F., ZHANG, N., JUBA, J.H., GEISER, D.M. 2013. Phylogenetic relationships among members of the *Fusarium solani* species complex in human infections and the descriptions of *F. keratoplasticum* sp. nov. and *F. petroliphilum* stat. nov. **Fungal Genetics and Biology**, v. 53, p. 59-70.
- SHORT, D.P., O'DONNELL, K., ZHANG, N., JUBA, J.H., GEISER, D.M. 2011. Widespread occurrence of diverse human pathogenic types of the fungus *Fusarium* detected in plumbing drains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 4264-4272.
- SNYDER, W.C., HANSEN, H.N. 1940. The species concept in *Fusarium*. **American Journal of Botany**, v. 27, p. 64-67.
- SNYDER, W.C., HANSEN, H.N. 1941. The species concept in *Fusarium* with reference to section Martiella. **American Journal of Botany**, v. 28, p. 738-742.
- SNYDER, W.C., HANSEN, H.N. 1945. The species concept in *Fusarium* with reference to Discolor and other sections. **American Journal of Botany**, v. 32, p. 657-666.
- SNYDER, W.C., HANSEN, H.N. 1947. Advantages of natural media and environments in the culture of fungi. **Phytopathology**, v. 37, p. 420-421.
- SNYDER, W.C., HANSEN, H.N. 1954. Variation and speciation in the genus *Fusarium*. **Proceedings of the New York Academy of Science**, v. 60, p. 16-23.
- SONG, M., YUN, H. Y., KIM, Y. H. 2014. Antagonistic *Bacillus* species as a biological control of ginseng root rot caused by *Fusarium* cf. *incarnatum*. **Journal of Ginseng Research**, v. 38, p. 136-145.
- STEENKAMP, E.T., WINGFIELD, B.D., COUTINHO, T.A., ZELLER, K.A., WINGFIELD, M.J., MARASAS, W.F., LESLIE, J.F. 2000. PCR-Based Identification of MAT-1 and MAT-2 in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4378-4382.
- SUMMERELL, B.A., LAURENCE, M.H., LIEW, E.C.Y., LESLIE, J.F. 2010. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. **Fungal Diversity**, v. 44, p. 3-13.
- SUMMERELL, B.A.; LESLIE, J.F. 2011. Fifty years of *Fusarium*: how could nine species have ever been enough? **Fungal Diversity**, v. 50, p. 135-144.

- SUMMERELL, B.A., SALLEH, B., LESLIE, J.F. 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant Disease**, v. 87, p. 117-128.
- SUN, S., HEITMAN, J. 2015. From two to one: Unipolar sexual reproduction. **Fungal Biology Reviews**, v. 29, p. 118-125.
- SUNG, G.H., SUNG, J.M., HYWEL-JONES, N.L., SPATAFORA, J.W. 2007. A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, p. 1204-1223.
- TAYLOR, J.W., JACOBSON, D.J., KROKEN, S., KASUGA, T., GEISER, D.M., HIBBETT, D.S., FISHER, C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 31, p. 21-32.
- TEETOR-BARSCH, G.H., ROBERTS, D.W. 1983. Entomogenous *Fusarium* species. **Mycopathologia**, v. 84, p. 3-16.
- TIAGO, P.V., MEDEIROS, L.V., CARNEIRO LEAO, M. P., SANTOS, A.C.S., DA Costa, A.F., Oliveira, N.T. 2016. Polymorphisms in entomopathogenic fusaria based on inter simple sequence repeats. **Biocontrol Science and Technology**, v. 26, n. 10, p. 1401-1410.
- THANGAVELU, R., KUMAR, K.M., DEVI, P.G., MUSTAFFA, M.M. 2012. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense isolates (Foc) of India by inter simple sequence repeats (ISSR) analysis. **Molecular Biotechnology**, v. 51, p. 203-211.
- TOKI, W., KAWAKITA, A., TOGASHI, K. 2016. Presence of weed fungus in a non-social beetle–fungus cultivation mutualism. **Ecological Entomology**, v. 41, n. 3, p. 253-262.
- TOSI, L., BECCARI, G., RONDONI, G., COVARELLI, L., RICCI, C. 2015. Natural occurrence of *Fusarium proliferatum* on chestnut in Italy and its potential entomopathogenicity against the Asian chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus*. **Journal of Pest Science**, v. 88, p. 369-381.
- TURNER, E., JACOBSON, D.J., TAYLOR, J.W. 2010. Reinforced postmating reproductive isolation barriers in *Neurospora*, an Ascomycete microfungus. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 23, p. 1642-1656.
- VAN DIEPENINGEN, A.D., AL-HATMI, A.M., BRANKOVICS, B., DE HOOG, G.S. 2014. Taxonomy and clinical spectra of *Fusarium* species: where do we stand in 2014?. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 1, p. 10-18.
- VAN DIEPENINGEN, A.D., DE HOOG, G.S. 2016. Challenges in *Fusarium*, a Trans-Kingdom Pathogen. **Mycopathologia**, v. 181, p. 161.
- VILLANI, A., MORETTI, A., SAEGER, S., HAN, Z., MAVUNGU, J. D., SOARES, C.M.G., PROCTOR, R.H., VENÂNCIO, A., LIMA, N., STEA, G., PACIOLLA, C., LOGRIECO, A.F., SUSCA, A. 2016. A polyphasic approach for characterization of a collection of cereal isolates of the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex. **International Journal of Food Microbiology**, v. 234, p. 24–35.
- VITALE, S., SANTORI, A., WAJNBERG, E., CASTAGNONE-SERENO, P., LUONGO, L., BELISARIO, A. 2011. Morphological and Molecular Analysis of *Fusarium lateritium*, the Cause of Gray Necrosis of Hazelnut Fruit in Italy. **Phytopathology**, v. 101, p. 679-686.
- WANG, H., XIAO, M., KONG, F., CHEN, S., DOU, H.T., SORRELL, T., XU, Y.C. 2011. Accurate and practical identification of 20 *Fusarium* species by seven-locus sequence analysis

and reverse line blot hybridization, and an in vitro antifungal susceptibility study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 1890-1898.

WALSH, J.L., LAURENCE, M.H., LIEW, E.C.Y., SANGALANG, A.E., BURGESS, L.W., SUMMERELL, B.A., PETROVIC, T. 2010. *Fusarium*: two endophytic novel species from tropical grasses of northern Australia. **Fungal Diversity**, v. 44, p. 149-159.

WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S.B, et al. 1990. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: Innis MA, Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., et al. (eds), PCR protocols: a guide to methods and applications: 315-322. Academic Press, USA.

WOLLENWEBER, H.W., REINKING, O.A. 1935. **Die Fusarien**, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. Berlin, Germany: Verlag Paul Parey.

ZELLER, K.A., SUMMERELL, B.A., BULLOCK, S., LESLIE, J.F. 2003. *Gibberella konza* (*Fusarium konzum*) sp. nov. from prairie grasses, a new species in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, v. 95, p. 943-954.

ZACCARDELLI, M., BALMAS, V., ALTOMARE, C., CORAZZA, L., SCOTTI, C. 2006. Characterization of Italian isolates of *Fusarium semitectum* from alfalfa (*Medicago sativa* L.) by AFLP analysis, morphology, pathogenicity and toxin production. **Journal of Phytopathology**, v. 154, p. 454-460.

ZHANG, N., O'DONNELL, K., SUTTON, D. A., NALIM, F. A., SUMMERBELL, R. C., PADHYE, A. A., GEISER, D. M. 2006. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2186-2190.